



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RENATA DÉBORA PINTO RODRIGUES

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina*
(*Arthrospira*) *platensis* COM LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS

FORTALEZA

2017

RENATA DÉBORA PINTO RODRIGUES

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina*
(*Arthrospira*) *platensis* COM LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

Rodrigues, Renata Débora Pinto.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina (Arthrospira) platensis* COM LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS / Renata Débora Pinto Rodrigues. – 2017.
158 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientação: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar .

1. Ficobiliproteínas. 2. Líquidos iônicos. 3. *Spirulina (Arthrospira) platensis*. 4. Ultrassom. 5. Micro-ondas. I. Título.

CDD 621.3

RENATA DÉBORA PINTO RODRIGUES

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina*
(*Arthrospira*) *platensis* COM LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 08/03/2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Karine Pessoa Bastos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Kirley Marques Canuto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Aos meus amados filhos, Beatriz e Yuri.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo tão grande amor e cuidado.

À FUNCAP pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha pela excelente orientação, pela amizade e por ter contribuído grandemente no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar pela oportunidade de ingressar no doutorado e assim, realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias pelo fornecimento da microalga.

Aos participantes da banca examinadora Profa. Dra. Ana Karine Pessoa Bastos, Prof. Dr. André Casimiro de Macedo, Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana e Dr. Kirley Marques Canuto pelo tempo dispensado, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos alunos de iniciação científica, Felipe Carolino e Priscila Fernandes, pela preciosa e indispensável ajuda na realização das análises.

Aos amigos do laboratório e da vida: Aline Bessa, Filipe Xavier, Francisca Maria Mesquita, Juliana Serpa, Natan Câmara e Regiane Pinheiro pela colaboração e incentivo.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste trabalho.

“A utopia está lá no horizonte. Aproximo-me dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais a alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

RESUMO

Compostos bioativos extraídos de fontes naturais renováveis têm atraído o interesse da indústria e da academia. Cianobactérias possuem uma ampla gama de componentes coloridos que incluem carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas. Ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos acessórios com potencial para utilização em diversas aplicações – corantes em alimentos e cosméticos, marcadores fluorescentes em pesquisas biomédicas, aplicações nutracêuticas e farmacêuticas, dentre outras. Considerações sobre a obtenção de ficobiliproteínas de microalgas devem incluir: a escolha do método de extração mais adequado, o tipo de solvente e a definição dos principais parâmetros de extração. Neste trabalho, o desempenho dos líquidos iônicos acetato de N-metil-2-hidroxiethylamônio (2-HEAA), formiato de N-metil-2-hidroxiethylamônio (2-HEAF), 2-HEAA+2-HEAF (1:1, v/v) e 1-butyl-3-methylimidazolium [Bmim][Cl] como solventes na extração de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis* foi avaliado por três métodos distintos: convencional (aquecimento+agitação), micro-ondas e ultrassom. O desempenho dos líquidos iônicos foi comparado ao do tampão fosfato de sódio que é o solvente tradicionalmente empregado na extração de ficobiliproteínas. A extração foi otimizada através de um delineamento composto central e pela metodologia de superfície de resposta. Os efeitos da temperatura, do pH, da razão solvente:biomassa e da potência foram estudados para determinar as melhores condições de extração. Os resultados mostraram que os líquidos iônicos próticos foram capazes de extrair as ficobiliproteínas da microalga, tendo sido mais eficientes que o tampão e o líquido iônico aprótico [Bmim][Cl]. O efeito do pH foi o mais significativo na extração convencional e com o ultrassom. Na extração por micro-ondas, a potência da irradiação foi a variável mais influente. A aloficocianina foi o pigmento extraído em maior quantidade (13,30 mg.g⁻¹), seguido da ficocianina (10,87 mg.g⁻¹) e ficoeritrina (4,22 mg.g⁻¹). A extração por micro-ondas apresentou vantagens em relação ao tempo de extração, produtividade, pureza e consumo energético frente ao método convencional e à extração assistida por ultrassom. As imagens obtidas por MEV mostraram que as micro-ondas provocaram mais impactos na estrutura celular da microalga em comparação aos outros métodos. Nas condições de operação do estudo, a extração assistida por micro-ondas foi considerada a melhor técnica, utilizando 2-HEAA+2-HEAF como solvente, potência de 62 W, pH 7,0, razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹ e 2 minutos de extração. Uma economia de 99,94% no consumo de energia elétrica foi obtida com o uso do micro-ondas em comparação ao método convencional. O método de extração proposto neste trabalho mostrou-se eficiente para a obtenção de ficobiliproteínas de *S. platensis*. Através da metodologia de purificação aplicada obtiveram-se os seguintes rendimento e pureza para a ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina: 15% e 1,22; 11,33% e 1,03; 11,92% e 0,71, respectivamente. O grau de pureza atingido permite a aplicação destes pigmentos em alimentos e cosméticos. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrou que as ficobiliproteínas têm peso molecular em torno de 20 KDa. Estudos preliminares voltados à recuperação e reutilização do líquido iônico foram conduzidos, comprovando a possibilidade de reaproveitamento destes solventes.

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

ABSTRACT

Bioactive compounds extracted from natural renewable sources have attracted increased interest from both industry and academia. Cyanobacteria possess a broad range of colored components including carotenoids, chlorophyll, and phycobiliproteins. Phycobiliproteins are pigments accessories photosynthetic potential for use in various applications - dyes in food and cosmetics, fluorescent tags in biomedical research, nutraceutical and pharmaceutical applications. Considerations to obtain of microalgae phycobiliproteins may include: choosing the most suitable method of extraction, solvent and extraction of the main setting parameters. While phycobiliproteins extraction classical methods are reproducible and show good yields are generally time consuming and require the use of elevated temperatures and / or large volumes of solvent, which can cause thermal denaturation or chemical transformation of the products of interest. Therefore, the development of new extraction green techniques permitting the transfer of the results obtained in laboratory scale for industrial need for greater biotechnological exploitation of these and other products from microalgae. In this work, the performance of ionic liquids as solvents in phycobiliproteins extraction from *Spirulina (Arthrospira) platensis* was evaluated using three different methods: conventional (heating + agitation), microwave and ultrasound. The extraction was optimized using a central composite design and response surface methodology. The effects of temperature, pH, biomass:solvent ratio and power were studied to determine the best extraction conditions of extraction. The results showed that the protic ionic liquids were capable of extracting phycobiliproteins from microalgae, being more efficient than buffer and aprotic ionic liquid [Bmim][Cl]. The effect of pH was more significant in conventional and ultrasound methods. In microwave-assisted extraction, the irradiation power was the most important variable. The allophycocyanin was extracted in larger quantities (13.30 mg.g^{-1}), followed by phycocyanin (10.87 mg.g^{-1}) and phycoerythrin (4.22 mg.g^{-1}). This method of extraction showed advantages over the extraction time, productivity, purity and energy consumption across the conventional method and ultrasound-assisted extraction. The SEM revealed that the microwave caused more impacts on the cellular structure of the microalgae compared to other methods. In the study of operating conditions, microwave-assisted extraction was considered the best technique, using 2-HEAA + 2-HEAF as solvent at power of 62 W, pH 7.0, biomass:solvent ratio 10 mL.g^{-1} and 2 min of extraction. A savings of 99.94% in electricity consumption was obtained with the use of microwaves compared to conventional method. The extraction method proposed in this work proved to be efficient for obtaining *S. platensis* phycobiliproteins. By the applied purification methodology the following yield and purity were obtained for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin: 15% and 1.22; 11.33% and 1.03; 11.92% and 0.71, respectively. The degree of purity achieved allows the application of these pigments in food and cosmetics. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that the phycobiliproteins have molecular weight around 20 KDa. Preliminary studies on the recovery and reuse of the ionic liquid were conducted, proving the possibility of reuse of these solvents.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagem de <i>Arthrospira</i> típica cultivada em ambiente externo	22
Figura 2 –	Organização estrutural do ficobilissoma	29
Figura 3 –	Fórmulas estruturais dos grupos cromóforos (bilinas) das ficobiliproteínas estudadas	30
Figura 4 –	Fluxograma de purificação das ficobiliproteínas	49
Figura 5 –	Espectro de RMN 1H para o 2-HEAA: a) mistura física dos componentes do 2-HEAA (ácido acético e monoetanolamina) e b) 2-HEAA formado	52
Figura 6 –	Espectro de RMN 1H para o 2-HEAF	53
Figura 7 –	Estruturas químicas dos líquidos iônicos estudados	53
Figura 8 –	Efeito da temperatura na extração de ficocianina e aloficocianina de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> utilizando tampão fosfato de sódio (A e C) e 2-HEAF (B e D), com agitação de 500 rpm. (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◀) 40 °C (▶) 50 °C	56
Figura 9 –	Efeito do pH na extração de ficocianina e aloficocianina de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> utilizando tampão fosfato de sódio (A e C) e 2-HEAF (B e D), na temperatura de 30 °C. (■) 5,0 (●) 5,5 (▲) 6,0 (▼) 6,5 (◀) 7,0 (▶) 8,0	57
Figura 10 –	Influência da temperatura e do solvente na concentração máxima de ficocianina (A) e aloficocianina (B) extraídas de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> . Valores entre parênteses correspondem aos tempos de extração em que foi atingida a concentração máxima de cada ficobiliproteína	58
Figura 11 –	Influência do pH e do solvente na concentração máxima de ficocianina (A) e aloficocianina (B) extraídas de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> . Valores entre parênteses correspondem aos tempos de extração em que foi atingida a concentração máxima de cada ficobiliproteína	59
Figura 12 –	Influência do solvente na concentração máxima de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) extraídas pelo método convencional (35 °C; pH: 6,50; razão solvente:biomassa: 6,59 mL.g ⁻¹). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$)	64
Figura 13 –	Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina pelo método	66

- convencional utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente
- Figura 14 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura, fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa, fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional com 500 rpm de agitação 70
- Figura 15 – Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura, fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g⁻¹(A) e do pH pela razão solvente:biomassa, fixando a temperatura em 35 °C(B), utilizando o 2-HEAA+HEAF como solvente pelo método convencional com 500 rpm de agitação 71
- Figura 16 – Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura, fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g⁻¹(A) e do pH pela razão solvente:biomassa, fixando a temperatura em 35 °C(B), utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional com 500 rpm de agitação 72
- Figura 17 – Influência do tempo na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando o líquido iônico 2-HEAF como solvente (potência: 62 W e razão solvente:biomassa:10 mL.g⁻¹). (■) ficocianina (●) aloficocianina (▲) ficoeritrina 74
- Figura 18 – Influência da potência na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando o líquido iônico 2-HEAF como solvente (tempo: 2 min e razão solvente:biomassa: 10 mL.g⁻¹) 75
- Figura 19 – Influência da razão solvente:biomassa (mL.g⁻¹) na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando o líquido iônico 2-HEAF como solvente (tempo: 2 min e potência: 62 W) 75
- Figura 20 – Variação da temperatura com o tempo de extração utilizando o líquido iônico 2-HEAA+2-HEAF como solvente, na razão s:b 10 mL.g⁻¹ e 62 W de potência 77
- Figura 21 – Influência do solvente nas concentrações máximas de ficocianina (A), 79

aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) empregando micro-ondas nas seguintes condições: 186 W e 10 mL.g⁻¹ para o [Bmim][Cl]; 62 W e 10 mL.g⁻¹ para os demais solventes. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$)

Figura 22 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na extração assistida por micro-ondas de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente 82

Figura 23 – Influência do solvente nas concentrações máximas de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) empregando ultrassom nas seguintes condições: pH 8,0 e razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹ para o tampão; pH 6,5 e razão solvente:biomassa 7,93 mL.g⁻¹ para os LIPs e pH 4,38 e razão solvente:biomassa 15 mL.g⁻¹ para o [Bmim][Cl]. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$) 88

Figura 24 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na extração assistida por ultrassom de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente 91

Figura 25 – Superfície de contorno para a extração assistida por ultrassom de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente 94

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de *Spirulina (Arthrospira) platensis* submetidas à diferentes métodos, nas melhores condições de extração (método convencional – 2-HEAA+2-HEAF, 35 °C, pH 6,50, razão s:b 6,59 mL.g⁻¹, 150 min; micro-ondas – 2-HEAA+2-HEAF, 62 W, pH 7,0, razão s:b 10 mL.g⁻¹, 2 min e ultrassom – 2-HEAA+2-HEAF, pH 6,50, razão s:b 7,93 mL.g⁻¹, 30 min): (A) controle aumentada 1000 x; (A') controle aumentada 2000 x; (B) método convencional aumentada 1000 x; (B') método convencional aumentada 2000 x; (C) micro-ondas aumentada 1000 x; (C') micro-ondas aumentada 2000 x; (D) ultrassom aumentada 1000 x; (D') ultrassom aumentada 2000

Figura 27 –	Comportamento da adsorção das ficobiliproteínas. A) influência da carga de DEAE Sepharose Fast Flow na concentração de ficobiliproteínas. B) quantidade de ficobiliproteínas adsorvida em diferentes cargas de DEAE Sepharose Fast Flow	99
Figura 28 –	Avaliação da dessorção das ficobiliproteínas utilizando 3 mg.mL ⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow, variando a força iônica do tampão de eluição (0 a 50 mM NaCl)	101
Figura 29 –	SDS-PAGE das ficobiliproteínas de <i>Spirulina platensis</i> . Linha 1: marcador de baixo peso molecular (14 – 97 KDa); linha 2: padrão de ficocianina (Sigma Aldrich); linha 3: extrato bruto de ficobiliproteínas; linha 4: amostra de ficobiliproteínas após precipitação com sulfato de amônio; linha 5: amostra de ficobiliproteínas após diálise; linha 6: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 3,33 mg.mL ⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 7: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 10 mg.mL ⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 8: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 33,33 mg.mL ⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 9: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 50 mg.mL ⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 10: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 100 mg.mL ⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow	103
Figura 30 –	Reciclo do 2-HEAA+2-HEAF. Extrações realizadas em micro-ondas (potência de 62 W; 2 min; razão solvente:biomassa 10 mL.g ⁻¹ ; pH 7,00)	104
Figura A.1 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com tampão fosfato de sódio pelo método convencional	124
Figura A.2 –	Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o tampão fosfato como solvente pelo método convencional (500 rpm)	125
Figura A.3 –	Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C	125

	(B), utilizando o tampão fosfato como solvente pelo método convencional (500 rpm)	
Figura A.4 –	Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o tampão fosfato como solvente pelo método convencional (500 rpm)	125
Figura A.5 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo método convencional	127
Figura A.6 –	Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional (500 rpm)	128
Figura A.7 –	Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional (500 rpm)	128
Figura A.8 –	Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional (500 rpm)	129
Figura A.9 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAF pelo método convencional	130
Figura A.10 –	Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional (500 rpm)	131
Figura A.11 –	Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional (500 rpm)	131

Figura A.12 –	Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g ⁻¹ (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em 35 °C (B), utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional (500 rpm)	131
Figura B.1 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com tampão fosfato pelo micro-ondas	133
Figura B.2 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo método convencional	135
Figura B.3 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAF pelo método	137
Figura B.4 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com [Bmim][Cl] pelo micro-ondas	139
Figura C.1 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com tampão fosfato pelo ultrassom	141
Figura C.2 –	Superfícies de contorno para a extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o tampão fosfato como solvente no ultrassom	142
Figura C.3 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo ultrassom	143
Figura C.4 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAF pelo ultrassom	146
Figura C.5 –	Superfícies de contorno para a extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o 2-HEAF como solvente no ultrassom	147
Figura C.6 –	Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com [Bmim][Cl] pelo ultrassom	148
Figura C.7 –	Superfícies de contorno para a extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o [Bmim][Cl] como solvente no ultrassom	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Perfil nutricional da <i>Spirulina platensis</i> em pó	25
Tabela 2 –	Companhias globais que desenvolvem processos e comercializam compostos de alto valor a partir de microalgas	26
Tabela 3 –	Principais espécies de microalgas e alguns métodos de extração e purificação das suas ficobiliproteínas	33
Tabela 4 –	Variáveis e níveis para o DCCR 2 ³ utilizando o método convencional na extração de ficobiliproteínas	44
Tabela 5 –	Variáveis e níveis para o DCCR 2 ² utilizando o micro-ondas na extração de ficobiliproteínas	45
Tabela 6 –	Variáveis e níveis para o DCCR 2 ² utilizando o ultrassom na extração de ficobiliproteínas	45
Tabela 7 –	Caracterização físico-química dos solventes utilizados no trabalho, medições realizadas a 25 °C	54
Tabela 8 –	Valores para a concentração de ficocianina (g.L ⁻¹) obtidos no processo de extração pelo método convencional usando diferentes solventes, após 150 min	61
Tabela 9 –	Valores para a concentração de aloficocianina (g.L ⁻¹) obtidos no processo de extração pelo método convencional usando diferentes solventes, após 150 min	62
Tabela 10 –	Valores para a concentração de ficoeritrina (g.L ⁻¹) obtidos no processo de extração pelo método convencional usando diferentes solventes, após 150 min	63
Tabela 11 –	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional	68
Tabela 12 –	Valores observados de ficocianina (g.L ⁻¹) obtidos no processo de extração assistida por micro-ondas usando diferentes solventes após 2 min de processo	76
Tabela 13 –	Valores observados de aloficocianina (g.L ⁻¹) obtidos no processo de extração assistida por micro-ondas usando diferentes solventes após 2 min de processo	78

Tabela 14 –	Valores observados de ficoeritrina (g.L^{-1}) obtidos no processo de extração assistida por micro-ondas usando diferentes solventes após 2 min de processo	78
Tabela 15 –	ANOVA para o modelo de extração assistida por micro-ondas de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente	84
Tabela 16 –	Valores observados de ficocianina (g.L^{-1}) na extração assistida por ultrassom usando diferentes solventes após 30 min de processo	85
Tabela 17 –	Valores observados de aloficocianina (g.L^{-1}) na extração assistida por ultrassom usando diferentes solventes após 30 min de processo	86
Tabela 18 –	Valores observados de ficoeritrina (g.L^{-1}) na extração assistida por ultrassom usando diferentes solventes após 30 min de processo	87
Tabela 19 –	ANOVA para as concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina obtidas pela extração assistida ultrassom utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente	93
Tabela 20 –	Avaliação e comparação dos métodos de extração através de parâmetros importantes	95
Tabela 21 –	Resumo das vantagens e desvantagens dos métodos alternativos (micro-ondas e ultrassom) em comparação ao método convencional na extração de ficobiliproteínas de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> verificados neste estudo	96
Tabela 22 –	Avaliação das etapas do processo de purificação das ficobiliproteínas de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> obtidas por extração assistida por micro-ondas (2-HEAA+2-HEAF, 62 W, pH 7,0, razão solvente:biomassa 10 mL.g^{-1} , 2 min)	102
Tabela A.1–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o tampão fosfato de sódio como solvente pelo método convencional	123
Tabela A.2–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional	126
Tabela A.3–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional	129

Tabela B.1–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o tampão fosfato como solvente pelo micro-ondas	132
Tabela B.2–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA como solvente pelo micro-ondas	134
Tabela B.3–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAF como solvente pelo micro-ondas	136
Tabela B.4–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o [Bmim][Cl] como solvente pelo micro-ondas	138
Tabela C.1–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o tampão fosfato como solvente pelo ultrassom	140
Tabela C.2–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA como solvente pelo ultrassom	142
Tabela C.3–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAF como solvente pelo ultrassom	144
Tabela C.4–	ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o [Bmim][Cl] como solvente pelo ultrassom	146

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	<i>Spirulina platensis</i>	21
3.1.1	<i>Taxonomia</i>	21
3.1.2	<i>Morfologia</i>	22
3.1.3	<i>Ultraestrutura</i>	23
3.1.3.1	<i>Parede celular</i>	23
3.1.3.2	<i>Inclusões celulares</i>	23
3.1.4	<i>Ecologia e fisiologia</i>	24
3.1.5	<i>Produtos de microalgas</i>	25
3.2	Ficobiliproteínas	28
3.2.1	<i>Estrutura das ficobiliproteínas</i>	28
3.2.2	<i>Potencial biotecnológico das ficobiliproteínas</i>	31
3.2.3	<i>Extração e purificação de ficobiliproteínas</i>	33
3.3	Líquidos iônicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Microalga e condições de cultivo	42
4.2	Síntese e caracterização dos líquidos iônicos	42
4.3	Extração e determinação das ficobiliproteínas	43
4.3.1	<i>Extração pelo método convencional (EMC)</i>	43
4.3.2	<i>Extração assistida por micro-ondas (EAM)</i>	44
4.3.3	<i>Extração assistida por ultrassom (EAU)</i>	45
4.4	Avaliação dos métodos de extração	46
4.4.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	46
4.4.2	<i>Rendimento, produtividade, fator de pureza dos pigmentos e análise do consumo energético</i>	47
4.5	Purificação das ficobiliproteínas	48
4.5.1	<i>Eletroforese (SDS-PAGE)</i>	50

4.6	Recuperação e reuso do líquido iônico	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Caracterização dos líquidos iônicos próticos	52
5.2	Extração de ficobiliproteínas	54
5.2.1	<i>Extração pelo método convencional</i>	54
5.2.2	<i>Extração assistida por micro-ondas</i>	73
5.2.3	<i>Extração assistida por ultrassom</i>	84
5.3	Avaliação dos métodos de extração	94
5.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	94
5.3.2	<i>Rendimento, produtividade, fator de pureza dos pigmentos e análise do consumo energético</i>	96
5.4	Purificação das ficobiliproteínas	98
5.5	Recuperação e reuso do líquido iônico	104
6	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE A – Dados estatísticos dos diferentes solventes na extração convencional	122
	APÊNDICE B – Dados estatísticos dos diferentes solventes na extração assistida por micro-ondas	131
	APÊNDICE C – Dados estatísticos dos diferentes solventes na extração assistida por ultrassom	139

1 INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos capazes de sintetizar e acumular compostos químicos valiosos, tais como, polissacarídeos, ácidos graxos insaturados e uma gama de pigmentos, dentre eles as ficobiliproteínas (Su *et al.*, 2014). Ficobiliproteínas são proteínas que captam a luz e atuam como pigmentos fotossintéticos acessórios em cianobactérias e algas vermelhas. As principais ficobiliproteínas são ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina, cada qual com uma coloração característica, absorvendo a luz numa região específica do espectro (Ramos *et al.*, 2011). Estes pigmentos são comumente utilizados nas indústrias cosmética (Pandey *et al.*, 2013), farmacêutica (Liu *et al.*, 2000; Cherng *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007) e de alimentos (Batista *et al.*, 2006; Jespersen *et al.*, 2005; Mishra *et al.* 2008), apresentam propriedades fisiológicas importantes como atividade antioxidante (Bhat e Madyastha, 2000; Romay *et al.* 1998; Dasgupta *et al.*, 2001; Upasani e Balaraman, 2003; Bermejo *et al.* 2008; Soni *et al.* 2008), anti-inflamatória (Zhu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016) e anticâncer (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). Estes pigmentos também têm sido utilizados como sondas fluorescentes em histoquímica, citometria de fluxo, microscopia e imunoenaios de fluorescência (Sekar e Chandramohan, 2008). Mais recentemente, as ficobiliproteínas têm chamado a atenção pela potencial aplicação no campo da energia, principalmente, na produção de “células solares sensibilizadas por corantes” (DSSCs - *dye sensitized solar cell*). DSSCs são dispositivos que convertem a luz solar em energia elétrica através do efeito fotovoltaico (Martins *et al.*, 2016).

Existem muitos protocolos disponíveis para a extração, quantificação e purificação de ficobiliproteínas diferindo consideravelmente entre si. Alguns autores relatam que a maneira mais eficiente de extrair ficobiliproteínas é repetir ciclos de congelamento/descongelamento em tampão fosfato ou acetato, em água destilada ou nitrogênio líquido (Ranjitha e Kaushik, 2005; Soni *et al.*, 2006). Há trabalhos que utilizam técnicas de rompimento celular para a extração desses pigmentos, como: homogeneizador mecânico de tecidos (Lawrenz *et al.*, 2011); exposição à alta pressão (Patil *et al.*, 2006) e sonicação (Horváth *et al.*, 2013). O tratamento da biomassa microalgácea com lisozima também já foi estudado anteriormente, mas trata-se de um método caro e limitado à escala laboratorial (Boussiba e Richmond, 1979). Contudo,

poucos estudos sobre a otimização dos métodos de extração de ficobiliproteínas (Silveira *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2010).

O método que utiliza aquecimento e agitação 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. Su *et al.* (2014) obtiveram, aproximadamente, 2,0 g.L⁻¹ de ficocianina após 3 horas de extração com tampão fosfato de sódio (pH 7,0) a 50 °C. Silveira *et al.* (2007) após 24 horas de extração a 32,5 °C com tampão fosfato de sódio atingiram a concentração máxima de 4,20 mg.L⁻¹ de ficocianina. Levando-se em conta o consumo de energia e de tempo este método apresenta muito baixa produtividade e elevado custo.

No sentido de maximizar o potencial biotecnológico e comercial das ficobiliproteínas, novos métodos de extração mais eficientes, econômicos e ambientalmente seguros devem ser desenvolvidos.

A extração assistida por micro-ondas (EAM) apresenta como principais vantagens: rapidez – processa-se em minutos ao invés de horas; alta reprodutibilidade; reduzido consumo de solvente, o que simplifica a manipulação e a ampliação de escala; obtenção de um produto final com maior pureza; aquecimento mais eficaz e seletivo; transferência de energia mais rápida; reduzidos gradientes térmicos; equipamentos de tamanho reduzido (Chemat *et al.*, 2006). EAM é um método eficaz para a extração de gorduras e óleos (Chemat *et al.*, 2006; Lucchesi *et al.*, 2007), bem como compostos fenólicos com propriedades antioxidantes (Tsubaki *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2011). Pasquet *et al.* (2011) também empregaram micro-ondas com sucesso para extrair pigmentos (clorofila, fucoxantina e caroteno) a partir de microalgas. Yang e Zhai (2010) compararam a extração de antocianinas por diferentes metodologias e sugeriram que a EAM foi mais eficiente e rápida para extrair tais componentes do milho roxo.

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. Baixos custos operacionais e equipamento de fácil manuseio são as vantagens da tecnologia de ultrassom (Fairbanks, 2001). 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 (Liu *et al.*, 2005). 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. Alguns autores relataram o emprego de ultrassom na extração de ficobiliproteínas de diferentes espécies de microalgas (Abalde *et al.*, 1998; Furuki *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2009).

Solventes diversos têm sido empregados na extração de ficobiliproteínas. Nesse contexto, os líquidos iônicos (LIs) surgem como uma alternativa atraente e inovadora para a extração destas biomoléculas. Levando-se em conta sua ampla versatilidade e capacidade de reaproveitamento (Oliveira *et al.*, 2016).

LIs são sais, compostos somente de íons, com pontos de fusão abaixo de 100 °C, apresentam baixa pressão de vapor, alta capacidade de solvatação e melhor estabilidade química e térmica, quando comparados aos solventes orgânicos. LIs são uma classe de solventes com propriedades físicas ajustáveis (polaridade, hidrofobicidade e viscosidade) pela permuta ou combinação de cátions e ânions. Devido à sua ampla janela de polaridade, são empregados nos mais variados processos: da síntese orgânica (Su e Chen, 2017), extração de metais (Akhtar *et al.*, 2016; Leyma *et al.*, 2016) à biocatálise (Warner *et al.*, 2016; Sheldon, 2016).

Os LIs são classificados em dois grupos: apróticos (LIAs) e próticos (LIPs). Os LIAs são baseados, principalmente, nos cátions imidazólio e piridina o que os torna mais onerosos quando comparados aos LIPs. LIPs são sintetizados pela transferência de prótons de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted (Anouti *et al.*, 2008; Mirjafari *et al.*, 2013). Apesar das várias características interessantes, a maioria dos LIs apresenta como desvantagens alto custo e pouca biodegradabilidade. No entanto, apresentam a vantagem de poderem ser regenerados e reutilizados (Desai *et al.*, 2014).

O maior aproveitamento biotecnológico de ficobiliproteínas passa pelo desenvolvimento de métodos de extração que sejam tanto eficientes quanto seguros ambientalmente. No presente estudo, foi avaliado o efeito da utilização de líquidos iônicos como solventes na extração de ficobiliproteínas da biomassa seca de *Spirulina (Arthrospira) platensis* por três métodos diferentes: extração convencional (aquecimento + agitação), extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom. As condições de extração, tais como: temperatura, razão solvente:biomassa, potência de irradiação e pH foram otimizadas no sentido de maximizar a concentração e

a pureza dos pigmentos. Além disso, o impacto de cada método de extração sobre a célula da microalga foi analisado por microscopia eletrônica de varredura. Estudos voltados à recuperação e reutilização dos líquidos iônicos empregados no processo de extração foram efetuados. Um protocolo para a purificação das ficobiliproteínas foi proposto.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Definir um processo de extração e purificação de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando líquidos iônicos como solventes.

2.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar estrutural e físico-quimicamente os líquidos iônicos próticos;
- Avaliar o desempenho dos líquidos iônicos na extração de ficobiliproteínas pelo método convencional, analisando a influência dos parâmetros: temperatura, pH e razão solvente:biomassa;
- Avaliar o desempenho dos líquidos iônicos na extração de ficobiliproteínas assistida por micro-ondas, analisando a influência dos parâmetros: potência e razão solvente:biomassa;
- Avaliar o desempenho dos líquidos iônicos na extração de ficobiliproteínas assistida por ultrassom, analisando a influência dos parâmetros: pH e razão solvente:biomassa;
- Comparar o impacto dos diferentes métodos de extração sobre a célula da microalga por MEV (microscopia eletrônica de varredura);
- Comparar os métodos e as condições de extração em termos de rendimento, produtividade, fator de pureza e consumo energético;
- Purificar as ficobiliproteínas;
- Recuperar e reutilizar os líquidos iônicos no processo de extração.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Spirulina platensis*

3.1.1 Taxonomia

A correta colocação taxonômica é essencial para a investigação ou aplicação de qualquer organismo. Quando se trata da *Arthrospira* isto tem sido dificultado pelo emprego de diferentes designações por parte dos taxonomistas. Uma correta designação é particularmente importante uma vez que duas espécies de *Arthrospira*, *A. platensis* e *A. maxima*, são amplamente produzidas comercialmente como alimentos, suplementos dietéticos e alimentares (Belay, 2008).

Stizenberger (1852) e Gomont (1892) estabeleceram o gênero *Arthrospira* para distinguir algas verde-azuladas (cianobactérias) com tricomas enrolados regularmente, com septos visíveis (paredes transversais) e septos invisíveis, e incluíram neste grupo o gênero *Spirulina*. No entanto, o tratado de Geitler publicado no início de 1990 (Geitler, 1932) mudou a posição taxonômica destes gêneros sobrepondo o gênero *Spirulina* ao *Arthrospira*, resultando na atual designação *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima* para as duas mais importantes espécies de *A. platensis* e *A. maxima*. A separação destes dois gêneros tem sido afirmada repetidamente com base em características como helicidade e tamanho dos tricomas, estrutura da parede celular e padrão de poros, vesículas de gás, padrão dos tilacoides, fragmentação e motilidade dos tricomas e, mais recentemente, por métodos moleculares. Mostrando claramente que a denominação taxonômica de Geitler não se justifica.

Deve notar-se que "*Spirulina*" é um nome comercial para as duas estirpes importantes de *Arthrospira*, *A. platensis*, e *A. maxima*. É pouco provável que as empresas façam essa correção. Contudo, a corrente designação bacteriológica da *Arthrospira* é reconhecido por taxonomistas, produtores e órgãos reguladores. Neste sistema de classificação, *Arthrospira* pertence ao grupo das cianobactérias, subgrupo 3 (= Oscillatoriales), gênero *Arthrospira* (Boone e Castenholz, 2001).

3.1.2 Morfologia

Arthrospira é uma cianobactéria multicelular, filamentosa (alga verde-azul), composta por células cilíndricas dispostas na forma de tricomas helicoidais não ramificados. As células têm diâmetro de 6 - 12 μm . Os passos da hélice variam de 12 a 72 μm e seu diâmetro varia de 30 a 70 μm (Tomaselli, 1997). As células cilíndricas são mais amplas no comprimento e contêm uma quantidade abundante de vesículas de gás.

Arthrospira tem um ciclo de vida bastante simples. A reprodução acontece pela fragmentação de uma tricoma madura em numerosos segmentos mais curtos, através da destruição sacrificial de múltiplas células especializadas intercaladas chamadas "necridia". Os segmentos curtos que são compostos de algumas células, são em seguida, alongados por divisão binária num único plano perpendicular ao eixo longitudinal do filamento (Tomaselli, 1997). Uma *Arthrospira* típica é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Imagem de *Arthrospira* típica cultivada em ambiente externo



FONTE: RICHMOND e HU (2013).

À luz do microscópio, os tricomas exibem facilmente paredes transversais visíveis. Os tricomas são compostos de paredes de células de quatro camadas envoltas por uma fina bainha mucilaginosa. A helicidade é um traço característico do gênero *Arthrospira*. Em geral, variações morfológicas significativas nas hélices dentro e entre espécies são encontradas. Fatores ambientais como temperatura, luz e estado nutricional afetam a morfologia dos tricomas (Van Eykelenburg, 1980; Belay, 1997).

3.1.3 Ultraestrutura

A estrutura celular da *Arthrospira* é semelhante a de outros organismos procariotos, caracterizada pela ausência de um núcleo morfológicamente delineado ou plastídio, envolvido por uma parede celular gram-negativa exterior.

3.1.3.1 Parede celular

Observações microscópicas eletrônicas de cortes ultrafinos mostraram que a parede celular de *A. platensis* é constituída por quatro camadas longitudinais. Os septos ou paredes transversais, por outro lado, são constituídos de três camadas (Van Eykelenburg, 1980; Tomaselli, 1997). Todas apresentando espessura de 10 - 15 nm e a parede inteira possuindo cerca de 60 nm. Tomaselli (1997) relata a presença de poros juncionais na camada de peptidoglicano próxima às paredes transversais, dispostas sobre várias fileiras hemicirculares. Aparentemente, as condições de crescimento como temperatura e luminosidade parecem não afetar a ultraestrutura da parede celular das microalgas (Van Eykelenburg, 1980).

3.1.3.2 Inclusões celulares

Arthrospira platensis contém várias inclusões celulares que são típicas de outras cianobactérias:

Tilacoides – são inserções mais proeminentes no citoplasma e estão localizados entre o citoplasma periférico e central. Os tilacoides estão associados com os ficobilissomas, desempenhando a função de antenas na coleta de luz.

Grânulos de cianoficina – estes grânulos são estruturas compostas por copolímeros de L-arginina e L-ácido aspártico de elevado peso molecular. O número relativo destes grânulos varia com a concentração do meio, com a idade celular e a temperatura de crescimento (Van Eykelenburg, 1980). Grânulos de cianoficina têm a função de armazenar nitrogênio (Van Eykelenburg, 1980).

Grânulos de poliglucano – compostos por polímeros de glicose de alto peso molecular, semelhantes ao glicogênio ou à amilopectina. Estes grânulos de armazenagem estão localizados no espaço entre os tilacoides. Em temperaturas elevadas, ocorre maior

acúmulo de grânulos de poliglucano, fazendo com que haja um armazenamento maior de carboidratos em relação ao nitrogênio (Van Eykelenburg, 1980).

Corpos cilíndricos – em *A. platensis*, corpos cilíndricos são compostos de membranas duplas e estão localizados na região do nucleoplasma (Tomaselli, 1997). A função destes organismos não é conhecida embora tenha sido sugerido que eles podem ser o sítio de síntese dos ficobilissomas.

Corpos poliédricos (carboxissomas) – estes corpos de inclusão são comumente associados com o material nuclear. Os corpos poliédricos parecem ser o sítio da ribulose 1,5 – bisfosfato carboxilase (Van Eykelenburg, 1980; Cifferi, 1983). São afetados pela luz e pelas condições nutricionais.

Vesículas de gás – aparecem como estruturas ocas com extremidades cônicas empilhadas de forma hexagonal. Vacúolos de gás funcionam como reguladores de flutuabilidade ajudando o organismo a posicionar-se na coluna de água, de acordo com a disponibilidade de nutrientes e luz.

Outras inclusões – uma série de outras inclusões celulares foram observadas em *A. platensis*, incluindo corpos lipídicos, corpos de polifosfato (talvez compostos de poli- β -hidroxi butirato) e mesossomos.

3.1.4 Ecologia e fisiologia

A. platensis ocorre abundantemente em corpos de água tropicais e subtropicais com elevada alcalinidade (Iltis, 1971; Talling *et al*, 1973; Wood e Talling, 1988). Várias observações têm mostrado que a distribuição e abundância da espécie dependem da salinidade da água. Iltis (1975) dividiu os corpos de água em três classes com base na salinidade, devida ao teor de carbonato e bicarbonato, principalmente. Lagos com salinidade $< 2,5 \text{ g.L}^{-1}$ apresentaram uma população de algas muito variada composta por algas verdes, cianobactérias e diatomáceas. Enquanto que aqueles com salinidade de $2,5 - 30 \text{ g.L}^{-1}$ continham uma população predominantemente de cianobactérias. Em lagos com salinidade superior a 30 g.L^{-1} , a população de algas é composta quase exclusivamente de espécies *Arthrospira* como mostrado por um estudo comparativo entre dois lagos, Rombou ($13 - 26 \text{ g.L}^{-1}$) e Bodou ($32 - 65 \text{ g.L}^{-1}$) (Iltis, 1975).

Dentre os principais fatores que afetam o crescimento das microalgas, podemos citar: luminosidade, temperatura, teor de sal e osmorregulação, concentração de oxigênio e a fisiologia dos nutrientes no meio que devem prover concentrações suficientes de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro e elementos traços para o correto desenvolvimento destes organismos (Richmond e Hu, 2013).

3.1.5 Produtos de microalgas

As tendências de mercado e o crescente interesse dos consumidores por produtos naturais e saudáveis têm incentivado pesquisas no setor acadêmico e industrial para o desenvolvimento de novos produtos com ingredientes funcionais. Microalgas têm sido reconhecidas como fonte desses ingredientes com efeitos positivos à saúde. Uma vez que estes microrganismos produzem ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, pigmentos naturais, minerais essenciais, vitaminas, enzimas e peptídeos bioativos (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2014).

Na Tabela 1 é apresentada uma análise típica de *Spirulina* produzida na Earthrise® (USA) em 2011, mostrando os níveis de fitonutrientes essenciais dessa microalga.

Spirulina contém altos níveis de proteína. O perfil de aminoácidos é comparável àquele recomendado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), com exceção dos aminoácidos sulfurados e da lisina. Contém pigmentos benéficos à saúde, como carotenoides, ficobiliproteínas e clorofila, além de ácidos graxos essenciais (AGL), ferro e vitamina B12 (Becker, 1994).

Tabela 1 – Perfil nutricional da *Spirulina platensis* em pó

Composição	por 100 g	Composição	por 100 g
Macronutrientes		Vitaminas	
Calorias	382 cal	A (100% β -caroteno)	360 000 UI
Total de gordura	7,5 g	K	1080 mcg
Gordura saturada	2,71 g	Tiamina HCl (B1)	0,09 mg
Gordura poli-insaturada	2,57 g	Riboflavina (B2)	3,66 mg
Gordura monoinsaturada	0,418 g	Niacina (B3)	16,8 mg
Colesterol	<1 mg	B6	0,839 mg
Carboidratos totais	14,6 g	B12	226 mcg

Fibras	7,72 g	Minerais	
Açúcares	<0,1 g	Cálcio	288 mg
Lactose	<0,1 g	Ferro	53,9 mg
Proteínas	67,5 g	Fósforo	975 mg
Aminoácidos essenciais (mg)		Iodo	549 mcg
Histidina	1010	Magnésio	292 mg
Isoleucina	3490	Zinco	1,4 mg
Leucina	5400	Selênio	21,3 mcg
Lisina	3050	Cobre	0,383 mg
Metionina	1360	Manganês	2,86 mg
Fenilalanina	2770	Cromo	<990 mcg
Treonina	2990	Potássio	1620 mg
Triptofano	920	Sódio	692 mg
Valina	3320	Fitonutrientes	
Aminoácidos não essenciais (mg)		Ficocianina (média)	17,8%
Alanina	4400	Clorofila (média)	1,2%
Arginina	4550	Ácido gama linoléico (AGL)	1,39 g
Ácido aspártico	6120	Carotenoides (média)	509 mg
Cistina	566	B-caroteno (média)	227 mg
Ácido glutâmico	8900	Zeaxantina	116 mg
Glicina	3030		
Prolina	2270		
Serina	2780		
Tirosina	2790		

Fonte: RICHMOND e HU (2013).

Muitas empresas ao redor do mundo produzem e comercializam compostos oriundos de microalgas. A Tabela 2 fornece uma lista de empresas que utilizam microalgas como matéria-prima e suas localizações.

Tabela 2 – Companhias globais que desenvolvem processos e comercializam compostos de alto valor a partir de microalgas

Empresa	Localização	Empresa	Localização
Algae. Tec	Austrália	AlgaFuel, S.A (A4F)	Portugal
Solarvest BioEnergy	Canadá	Necton	Portugal
Canadian Pacific Algae	Canadá	Green Sea Bio Systems s.l.	Espanha
Solarium Biotechnology S.A.	Chile	AlgaEnergy	Espanha

BlueBio	China	Fitoplancton Marino	Espanha
EcoFuel Laboratories	República Checa	Simris	Suécia
Aleor	França	Taiwan Chlorella Manufacturing Company	Taiwan
Fermentalg Roquette	França	Vedan	Taiwan
Alpa Biotech	França	AlgaeLink N.V	Holanda
IBV Biotech IGV GmbH	Alemanha	AlgaeBiotech	Holanda
Subitec	Alemanha	LGem	Holanda
Algomed	Alemanha	Solazyme, Inc.	USA
BlueBioTech	Alemanha	Aurora Algae	USA
Phytolutions	Alemanha	Solix Biosystems	USA
Algae Health	Irlanda	Synthetic Genomics	USA
Seambiotic	Israel	Cellena	USA
Algatechnologies	Israel	Cyanotech	USA
UniVerve Biofuel	Israel	Algaeon	USA
Parry Nutraceuticals	Índia	Alltech Algae	USA
Sunchlorella	Japão	Green Star Products, Inc	USA
Fuji Chemicals	Japão	Bionavitas	USA
DAESANG	Coréia	Heliae	USA
Algaetech International	Malásia	Kuehnle Agro Systems	USA
June Pharmaceutical Tecnología	Malásia	Photon8	USA
Ambiental BIOMEX	México	Ternion BioIndustries	USA
Algae Technology Solutions	México	Algae to Omega Holdings	USA
Aquaflow Binomics Photonz	Nova Zelândia	Sapphire Energy	USA
	Nova Zelândia	Algenol	USA

Fonte: CUELLAR-BERMUDEZ *et al.* (2014).

No Brasil, o interesse pelas microalgas se deu de forma tardia e descentralizada por alguns institutos de pesquisa e universidades, tendo como enfoque principal a alimentação humana e/ou animal. Atualmente, pesquisas sobre a produtividade e a potencialidade da utilização de microalgas para a geração de biocombustíveis de terceira geração vêm sendo desenvolvidas no país, subsidiadas pelo governo e por empresas privadas (Francisco *et al.*, 2015).

3.2 Ficobiliproteínas

Ficobiliproteínas são uma família de macromoléculas acessórias coletoras de luz, organizadas em complexos supramoleculares chamados ficobilissomas. Ficobilissomas funcionam como componentes do aparelho fotossintético em cianobactérias e em algumas algas eucarióticas (Grossman, 1993).

A energia luminosa capturada pelas ficobiliproteínas é transferida para as clorofilas no complexo antena, CP43 e CP47 (contendo clorofila a e carotenoides) e finalmente, para o centro reacional II. Ficobilissomas são compostos de armazenamento de nitrogênio e podem constituir até 60% das proteínas solúveis da célula. Ficobiliproteínas podem sofrer modificações nas proporções de ficocianina e ficoeritrina das hastes para melhorar a captura de luz de acordo com mudanças no *habitat*. Os complexos de ficobiliproteínas são altamente organizados; apresentando conjuntos supramoleculares que transportam bilinas covalentemente ligadas (cromóforos tetrapirrole de cadeia aberta) e polipeptídeos de ligação (MacColl, 1998).

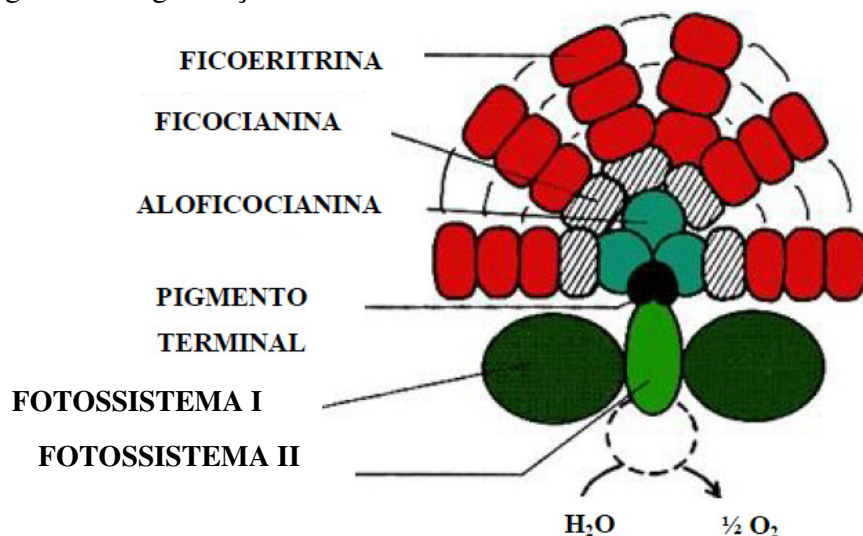
O desenvolvimento da síntese e da função de ficobiliproteínas tem expandido a aplicação desses pigmentos em biotecnologia, diagnósticos, alimentos, cosméticos e medicamentos. Essas biomoléculas são amplamente comercializadas para aplicação de fluorescência em análises clínicas e imunológicas (Richa *et al.*, 2011). De acordo com Chuner Cai *et al.* (2012), o preço de ficobiliproteínas altamente purificadas varia de US\$ 5.000 a 30.000/grama.

3.2.1 Estrutura das ficobiliproteínas

Em geral, a macroestrutura do ficobilissoma consiste de um núcleo (constituído por aloficocianina) rodeado por ficocianina e ficoeritrina (quando presente) organizadas na periferia da estrutura sob a forma de hastes (FIGURA 2). Todas estas proteínas são montadas através de interações específicas com os polipeptídeos ligantes, cujas massas moleculares variam de 7.800 – 100.000 Da. O núcleo está situado na proximidade do fotossistema II, na membrana tilacoide, onde uma clorofila do fotossistema II está localizada (Zolla *et al.*, 2002). As biliproteínas têm seus cromóforos (bilinas) arranjados para produzir uma migração de energia rápida e direcional através dos ficobilissomas e da clorofila a na membrana tilacoide (Glazer, 1989).

Informações sobre a organização supramolecular de ficobilissomas advêm da microscopia eletrônica que mostrou que cianobactérias contêm vários tipos estruturais de ficobilissomas, mas o ficobilissoma hemidiscoidal com um núcleo tricilíndrico e seis hastes é encontrado extensivamente na maior parte delas (Sidler,1997).

Figura 2 – Organização estrutural do ficobilissoma



FONTE: GROSSMAN *et al.* (1993).

Com base na cor e em propriedades espectrais, as ficobiliproteínas são divididas em: 1) ficocianina (FC; $\lambda_{\text{máx}} = 610 - 620 \text{ nm}$), 2) aloficocianina (AF; $\lambda_{\text{máx}} = 650 - 660 \text{ nm}$) e 3) ficoeritrina (FE; $\lambda_{\text{máx}} = 490 - 570 \text{ nm}$) (Sun *et al.*, 2009).

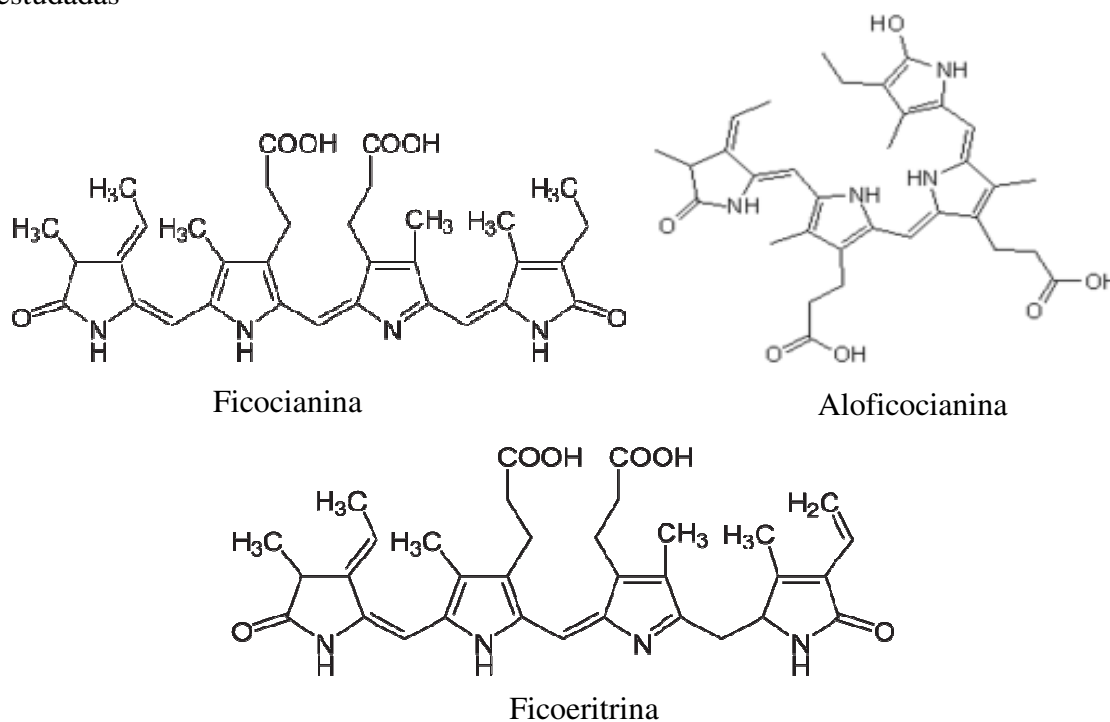
A ficocianina é a maior constituinte dos ficobilissomas, enquanto a aloficocianina detém os pigmentos ponte entre os ficobilissomas e as lamelas fotossintéticas (Glazer, 1988). Ambas ficocianina e aloficocianina são compostas de duas cadeias polipeptídicas, α e β , de cerca de 17.000 e 18.000 Da (MacColl,1998). Os polipetídeos α e β contêm um ou dois cromóforos, respectivamente. Em meio aquoso de baixa força iônica, os ficobilissomas dissociam-se em vários componentes, e biliproteínas individuais, com ou sem ligantes, são obtidas (Westermann, 1993). A relativa estabilidade do complexo biliproteína – ligante varia entre as biliproteínas de diferentes fontes.

Aloficocianina é organizada na forma de trímero, em pH neutro, apresentando três α e três β polipeptídeos; cada um deles com um cromóforo (bilina). Trímeros ($\alpha_3\beta_3$) são conjuntos de três monômeros ($\alpha\beta$) com simetria tripla. Ficocianina é encontrada em solução, como uma mistura complexa de ($\alpha_3\beta_3$) ($\alpha_6\beta_6$), e outros

oligômeros. Os hexâmeros ($\alpha_6\beta_6$) têm forma de disco e são formados pela associação face-a-face de trímeros. As hastes são formadas pela associação desses discos (Zolla *et al.*, 2002).

Ficoeritrinas, especialmente de algas vermelhas, têm outro cromóforo-transportador, o γ . A subunidade γ é considerada um conector de trímeros ($\alpha\beta$)₃ (com cerca de 12 – 30 KDa) na formação de hexâmeros mais estáveis $[(\alpha\beta) - \gamma - (\alpha\beta)]_3$ (240 – 260 KDa). Portanto, usualmente as ficoeritrinas existem na forma de hexâmeros em solução, bem como nos ficobilissomas; contudo, ficocianina e aloficocianina se apresentam na forma de trímeros somente em solução (Sun *et al.*, 2009).

Figura 3 – Fórmulas estruturais dos grupos cromóforos (bilinas) das ficobiliproteínas estudadas



FONTE: GOLDSMITH e MOERNER (2010).

Do ponto de vista fisiológico, a organização das biliproteínas em barras fornece a base estrutural para uma transferência de energia eficiente para responder às variações das condições ambientais e para a adaptação a ambientes extremos. Há tipicamente de dois a seis discos em uma haste, dependendo do organismo e das condições de crescimento. Está bem documentado, por exemplo, que os ficobilissomas de cianobactérias adaptam-se a diferentes níveis de luminosidade através de um processo complexo que envolve alterações na proporção de ficocianina com ficoeritrina

nas hastes a fim de melhorar a coleta de luz (Yu *et al.*, 1981; Wendler *et al.*, 1986). Além disso, a modulação dos níveis de energia nas quatro bilinas quimicamente diferentes por uma série de fatores gera uma colheita de luz e uma migração de energia mais eficiente. É geralmente aceito que os ligantes governam a montagem das biliproteínas nos ficobilissomas e, apesar de serem incolores, em certos casos, eles têm demonstrado melhorar o processo de migração da energia (Tandeau de Marsac e Cohen-Bazire, 1977; Koller *et al.*, 1978). Como alguns ligantes mediam a montagem das biliproteínas, eles produzem modificações nos espectros das biliproteínas e, isto pode melhorar o processo de migração de energia através dos ficobilissomas. Os ligantes são encontrados tanto em ficobilissomas de cianobactérias quanto de algas vermelhas e podem constituir de $10 \pm 15\%$ da sua massa total. Maiores detalhes de como os ligantes executam suas tarefas não são ainda bem conhecidos (Zolla, *et al.*, 2002).

3.2.2 Potencial biotecnológico das ficobiliproteínas

Algumas propriedades espectroscópicas e estruturais das ficobiliproteínas revelam seu grande potencial para uso em ensaios de fluorescência, tais como: i) absorção ampla e forte da luz na região visível do espectro e elevado coeficiente de extinção; ii) alto rendimento quântico de fluorescência em uma ampla faixa de pH; iii) alto desvio de Stokes; iv) muito poucos fenômenos de *quenching* (extinção) entre os múltiplos cromóforos que as ficobiliproteínas carregam; v) muitos grupos funcionais de superfície que são prontamente acoplados pelo uso de reagentes hetero-bifuncionais com uma variedade de pequenos corantes orgânicos ou proteínas (Richa *et al.*, 2011).

Por todas as características apresentadas, as ficobiliproteínas são consideradas marcadores de fluorescência mais adequados do que pequenos marcadores de síntese convencional, com grande potencial para uso prático. Com o desenvolvimento dos produtos comerciais de ficobiliproteínas e os seus conjugados, a utilização dessas proteínas fluorescentes como marcadores já mostra aplicações práticas em vários ramos da Biologia (Richa *et al.*, 2011). Ficobiliproteínas utilizadas como marcadores fluorescentes devem necessariamente apresentar elevado grau de pureza. Elas são 100 vezes mais sensíveis do que os marcadores convencionais. Mesmo em citometria de fluxo e em imunoenaios, a sensibilidade das ficobiliproteínas conjugadas a anticorpos é maior do que a dos correspondentes conjugados orgânicos.

Ficobiliproteínas têm inúmeros sítios para a formação de conjugações estáveis com materiais biológicos e sintéticos. Aloficocianina é a ficobiliproteína mais adequada para a utilização como marcador de fluoerescência (Holmes *et al.*, 2001).

Técnicas de imunoenensaio também se beneficiam das propriedades de ficobiliproteínas. Estas proteínas, hidrofílicas e estáveis, podem se ligar facilmente a anticorpos por ligações cruzadas e, por isso, podem ser usadas como poderosos marcadores em ensaios imunométricos em fase sólida (Hales, 1980). A elevada capacidade de absorção e o pequeno número de ligações não específicas permitem uma simples adaptação de um sistema comercial para a determinação de imunoglobulina humana (IgG) com maior sensibilidade picomolar (Kronick, 1983). Nesta aplicação, fluoróforos de ficobiliproteínas têm certas vantagens espectrais relacionadas com sua fluorescência e seu maior comprimento de onda (Ullman, 1976).

Atualmente, há uma crescente demanda por corantes naturais para uso em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, têxteis e como corantes de impressão. A toxicidade dos corantes sintéticos é a principal motivação para a substituição destes por corantes naturais. O uso industrial da ficocianina é um fato, sendo utilizada em diversos produtos alimentares – gomas de mascar, produtos lácteos, geleias, etc. Apesar da sua baixa estabilidade ao calor e à luz, a ficocianina é considerada mais adaptável do que os sintéticos índigo e gardênia (Lone *et al.*, 2005). Estudos revelaram que a intensidade da coloração azul da ficocianina obtida de *Phorphyridium aeruginosum* não sofre alterações com variações no pH. A cor permaneceu constante sob a luz, mas foi susceptível ao calor, no intervalo de pH de 4 a 5. A cor foi estável a 60 °C durante 40 minutos. Esta propriedade é muito importante para uso em alimentos, uma vez que muitos alimentos apresentam acidez elevada como é o caso de bebidas e alguns produtos de confeitaria (Richa *et al.*, 2011; Jespersen *et al.*, 2005). Em outro estudo, adicionando ficocianina a bebidas sem aplicação de calor, a coloração azul permaneceu estável por pelo menos um mês. A estabilidade deste pigmento é observada também em preparações secas. Dentre os alimentos que apresentam ficobiliproteínas em sua formulação, destacam-se as geleias e os sorvetes (Mishra *et al.*, 2008).

As aplicações terapêuticas sugeridas para ficobiliproteínas e outros componentes de cianobactérias são extremamente diversificadas, abrangendo: inibição da replicação viral (Akao *et al.*, 2009); atividade antitumoral (Duran *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2005), redução da hipercolesterolemia e outras hiperlipidemias

(Mridha *et al.*, 2010; Layam, 2007), efeito antidiabetogênico (Oropeza *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010), efeito anti-hipertensivo (Ravi *et al.*, 2010), modulador do sistema imunológico (Cingi *et al.*, 2008; Gantar *et al.*, 2005) e regulador da resposta alérgica (Tsuchihashi *et al.*, 1987), aumento da absorção intestinal de vitaminas e minerais, aumento dos lactobacilos intestinais (Grinstead *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2003); coadjuvante no tratamento de indivíduos obesos (Habib *et al.*, 2008), anêmicos (Selmi *et al.*, 2011) e redução da nefrotoxicidade por metais pesados e medicamentos (Mohan *et al.*, 2006).

3.2.3 Extração e purificação de ficobiliproteínas

Ficobiliproteínas são pigmentos solúveis em água, extraídos como um complexo pigmento-proteína.

Diferentes técnicas são aplicadas na extração dessas biomoléculas. A Tabela 3 apresenta um resumo das principais espécies de microalgas utilizadas como fontes de ficobiliproteínas, juntamente com o método de extração e purificação empregados.

Tabela 3 – Principais espécies de microalgas e alguns métodos de extração e purificação das suas ficobiliproteínas

Espécie	Produto	Método de extração/purificação	Resultados obtidos	Referência
<i>Spirulina platensis</i>	ficocianina	Aquecimento+agitação em tampão fosfato (10 mM, pH 7,0).	$C_{\text{máx}} = 2,2 \text{ g.L}^{-1}$	Su <i>et al.</i> (2014)
<i>Phormidium sp.</i> A27DM	ficoeritrina	Congelamento/descongelamento (-30 °C e 4 °C) em tampão 1 M Tris-Cl, precipitação em sulfato de amônio com 20% e 70% de saturação e cromatografia de permeação em gel com a matriz de Sephadex G-150.	$A_{565}/A_{280} = 3,9$ $R = 62,6\%$	Parmar <i>et al.</i> (2011)
<i>Spirulina platensis</i>	ficocianina	Aquecimento+agitação (30 °C/150 rpm/4 h) em água destilada, cromatografia troca iônica com a matriz Q-Sepharose fast flow.	$A_{615}/A_{280} = 3,43$ $R = 77,30\%$	Silveira <i>et al.</i> (2007)
<i>Synechocystis Aqualitis</i>	ficocianina	Agitação em água e tampão com 0,01% de azida de sódio, cromatografia leito expandido (Streamline-DEAE), cromatografia de leito fixo (DEAE-Cellulose).	Melhor solvente: tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) Stremaline-DEAE: $A_{615}/A_{280} = 2,61\%$, $R = 91\%$ DEAE cellulose: $A_{615}/A_{280} = >4$, $R = 76\%$	Ramos <i>et al.</i> (2011)
<i>Spirulina platensis</i>	ficocianina aloficocianina	Congelamento/descongelamento em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 5,0), precipitação em sulfato de amônio com 25% e 60%, cromatografia troca	Ficocianina: $A_{618}/A_{280} = 5,59$, $R = 67,04\%$ Aloficocianina: $A_{650}/A_{280} = 5,19$, $R = 80,0\%$	Shi-Gan <i>et al.</i> (2011)

		iônica com a matriz DEAE-Sepharose fast flow.		
<i>Spirulina platensis</i> (CCC540)	ficocianina	Congelamento/descongelamento em tampão acetato (20 mM, pH 5,10) com 0,002 M azida de sódio, precipitação em sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica com a matriz DEAE-Cellulose.	$C_{\text{máx}} = 413 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $A_{620}/A_{280} = 4,58$ $R = 14\%$	Kumar <i>et al.</i> (2014)
<i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	ficocianina aloficocianina ficoeritrina	Congelamento/descongelamento em tampão Tris-HCl (1 M, pH 8,10), precipitação em sulfato de amônio com 20% e 70% de saturação, diálise, cromatografia de exclusão por tamanho (Sephadex G-150), cromatografia de troca iônica (DEAE-Cellulose).	Ficocianina: $R_{\text{máx}} = 18,81 \text{mg.mL}^{-1}$ $A_{620}/A_{280} = 3,31$ Aloficocianina: $R_{\text{máx}} = 1,95 \text{mg.mL}^{-1}$ Ficoeritrina: $R_{\text{máx}} = 0,16 \text{mg.mL}^{-1}$	Soni <i>et al.</i> (2006)
<i>Polysiphonia urceolata</i>	ficoeritrina	Congelamento/descongelamento em tampão fosfato (0,02 M, pH 7,0), precipitação em sulfato de amônio com 25% e 45% de saturação, diálise, cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose fast flow).	$A_{565}/A_{280} = 5,60$ $R = 67,33\%$	Liu L-N. <i>et al.</i> (2005)

<i>Galdieria sulphuraria</i>	ficocianina	Congelamento/descongelamento em tampão fosfato (50 mM, pH 7,20), precipitação em sulfato de amônio (0 – 50% de saturação), sistema aquoso bifásico (PEG 4000 e sulfato de amônio), ultrafiltração, cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose fast flow).	$A_{620}/A_{280} = 4,5$ $R = 40\%$	Sørensen <i>et al.</i> (2013)
<i>Gracilaria crassa</i>	ficocianina aloficocianina ficoeritrina	Repetidos ciclos de centrifugação (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8; água destilada, pH 7,0 e água do mar, pH 8,13), filtração por membrana, precipitação com sulfato de amônio (65% de saturação), diálise, cromatografia de troca iônica (DEAE-Cellulose).	Melhor solvente: água destilada (pH 7,0) Ficocianina = 0,28 mg.g ⁻¹ Aloficocianina = 0,34 mg.g ⁻¹ Ficoeritrina = 0,50 mg.g ⁻¹ $A_{565}/A_{280} = 3,79$	Sudhakar <i>et al.</i> (2015)
<i>Spirulina platensis</i>	ficocianina	Suspensão em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) seguida de centrifugação, precipitação em sulfato de amônio (30% e 50% de saturação), diálise, cromatografia (DEAE-Sepharose).	$A_{620}/A_{280} = 3,84$	Leema <i>et al.</i> (2010)
<i>Calothrix</i> sp.	ficocianina	Agitação+aquecimento (24 h/30 °C) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) contendo	$A_{620}/A_{280} = 3,50$ $R = 80\%$	Santiago-Santos <i>et</i>

		13,6 mM EDTA e 2 mg de lisozima/g biomassa, filtração por membrana (PD 10), cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose 4 fast flow), cromatografia de interação hidrofóbica (metil macro-pep, Biologic LP low-pressure).		<i>al.</i> (2004)
<i>Heterosiphonia japonica</i>	ficoeritrina	Ultrassonicação com tampão fosfato (50mM, pH 7,0, 4 °C) contendo 4 mM NaN ₃ , 2 mM 2-mercaptoetanol e 2 mM EDTA, filtração, precipitação em sulfato de amônio (85% de saturação), filtração em gel (Sepharose CL-4B e Sephadex G-200), cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose fast flow).	$A_{565}/A_{280} = 4,89$	Sun <i>et al.</i> (2009)
<i>Spirulina platensis</i>	ficocianina	Ultrassonicação (20 Hz, 200 W) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,8).	$R = 6\%$ /biomassa seca de <i>Spirulina p.</i>	Furuki <i>et al.</i> (2003)
<i>Spirulina platensis</i>	ficocianina	Alta pressão, sistema aquosos bifásico (PEG 600, 1.500, 4.000, 6.000 e 20.000/fosfato de potássio), cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex).	Melhor sistema: PEG 4.000/fosfato de potássio $C_{m\acute{a}x} = 1,11\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ $A_{620}/A_{280} = 5,10$ $R = 66\%$	Patil <i>et al.</i> (2006)
<i>Nostoc sp.</i>	ficocianina aloficocianina	Ultrassonicação com tampão fosfato (pH 7,0), centrifugação, cromatografia em	$R_{\text{ficobilioproteínas}} = 0,13\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ $A_{620}/A_{280} = 3,55$	Johnson <i>et al.</i> (2014)

	ficoeritrina	camada delgada (Sílica gel 60 F254), cromatografia de troca iônica (DEAE- Sephadex).		
<i>Synechococcus</i> sp. IO9201	ficocianina	- Sonicação (4 °C); - Ciclos de congelamento/descongelamento em N ₂ a 4 °C; - Ciclos de congelamento/descongelamento a 4 °C em diferentes solventes. Cromatografia de interação hidrofóbica (diferentes matrizes), cromatografia de troca iônica (Q- Sephrose fast flow).	Melhor método: congelamento/descongelamento a 4 °C Melhor solvente: fase alcalina (contendo carbonato de sódio e potássio, pH 10,50) Melhor resina: butil-sepharose A ₆₂₀ /A ₂₈₀ = 4,85	Abalde <i>et al.</i> (1998)
<i>Synechococcus</i> sp.	ficocianina aloficocianina ficoeritrina	8 métodos físicos e 8 métodos químicos. Micro-ondas, ultrassom, congelamento/ descongelamento em diferentes tampões 1 M (acetato, pH 5,0; fosfato de sódio, pH 6,0 e 7,0 e Tris-Cl, pH 8,0).	Melhor método: cavitação com N ₂ Melhor solvente: ácido propanosulfônico+asolecitina Melhor método: micro-ondas Melhor solvente: tampão fosfato, pH 7,0 C _{máx} = 4, 54 mg.L ⁻¹ A ₆₁₅ /A ₂₈₀ = 1,27	Viskari <i>et al.</i> (2003)
<i>Spirulina</i> <i>platensis</i>	ficocianina			Aftari <i>et al.</i> (2015)
<i>Spirulina</i>	ficocianina	Sistema aquoso bifásico	A ₆₂₀ /A ₂₈₀ = 4,32	Chetana <i>et</i>

<i>platensis</i>	(PEG/fosfato de sódio, 25 °C, pH 7,0).	R = 80%	<i>al.</i> (2015)
------------------	---	---------	-------------------

Fonte: A autora (2016).

Analisando a Tabela 3, percebeu-se que a ficocianina obtida de *Spirulina (Arthrospira) platensis* é o pigmento mais estudado entre as ficobiliproteínas. Além disso, não há uma metodologia definida para extrair e purificar ficobiliproteínas, a maioria das técnicas é limitada à escala laboratorial por exigirem altos investimentos de tempo e de recursos financeiros, o que as torna inviáveis do ponto de vista industrial.

O grau de pureza obtido com a purificação é quem determina a aplicação das ficobiliproteínas. Neste ponto, ficobiliproteínas com $A_{\text{máx}}/A_{280} \leq 1,0$ são consideradas de baixa pureza e podem ser usadas em cosméticos e alimentos. Por outro lado, quando $A_{\text{máx}}/A_{280} \geq 4,0$ são consideradas de alta pureza e podem ser empregadas em aplicações mais nobres, como na indústria farmacêutica (Santiago-Santos *et al.* 2004).

Dentre os fatores que afetam os métodos de extração de maneira geral, destacam-se: método de rompimento celular, razão solvente:biomassa, pH, temperatura, tempo de extração e tipo de solvente (Abalde *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2007; Sudhkar *et al.*, 2015).

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 (Araujo *et al.*, 2013).

O método convencional alia aquecimento mais agitação mecânica e proporciona um maior controle das condições de extração. 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 (EAU) tem sido usada com sucesso na extração de diversos compostos e é facilmente implementada para aplicação industrial em larga escala (Hadiyanto e Sutrisnorhadi, 2016). Alguns autores relataram o emprego de ultrassom na extração de ficobiliproteínas de diferentes espécies de microalgas (Abalde *et al.*, 1998; Furuki *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2009). 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 (Greenly e Tester, 2015). A

frequência de operação, o pH e a razão solvente:biomassa são variáveis importantes nesse tipo de extração.

Os principais processos que ocorrem durante a exposição às micro-ondas são o aquecimento dos materiais, com base em suas constantes dielétricas, seguido por condução iônica e rotação das moléculas dipolo. Condução iônica é a migração eletroforética de íons na presença de um campo eletromagnético. O atrito produzido como resultado da resistência da solução para esta migração de íons gera o aquecimento da mesma. O alinhamento e realinhamento dos dipolos, com um campo aplicado, é denominado rotação dipolo. O calor é produzido como um resultado desta randomização molecular forçada dos dipolos a uma taxa de $4,9 \times 10^9$ tempos por segundo (Khrishnan *et al.*, 2016). Potência do equipamento, pH e razão solvente:biomassa são parâmetros importantes a serem avaliados na extração assistida por micro-ondas (EAM).

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 no 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).

3.3 Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) satisfazem grande parte dos requisitos indispensáveis a um bom solvente. LIs são sais fundidos a baixas temperaturas que apresentam propriedades ajustáveis para aplicações específicas pela adequada combinação de cátions/ânions/cadeia alquila. Por causa de suas propriedades únicas, incluindo não volatilidade, não inflamabilidade, solubilidade variável, elevada estabilidade química e térmica, alta condutividade e amplo potencial eletroquímico, os LIs têm sido amplamente estudados e reconhecidos como alternativas promissoras para várias aplicações, algumas delas com elevado potencial industrial (Oliveira *et al.*, 2016).

Neste cenário, LIs têm sido usados como alternativas promissoras em 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) e em 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).

Os LIs são classificados em dois grupos, de acordo com o comportamento químico: apróticos (LIAs) e próticos (LIPs). Os LIAs são baseados, principalmente, nos cátions imidazólio ou piridina com substituintes de cadeia alquila comprida e grande variedade de ânions (Cl^- , Br^- , BF_4^- , etc.) (Peric *et al.*, 2013).

Os LIPs têm sido foco de diversas pesquisas recentes (Chen *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Kusano *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016; Peric *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014). Eles são sintetizados pela transferência de prótons de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted (Anouti *et al.*, 2008; Mirjafari *et al.*, 2013). A propriedade principal dos LIPs é a sua capacidade em promover ligações de hidrogênio, nas quais a aceitação e a doação de prótons estão envolvidas. O interesse nesta classe de LIs decorre da sua síntese simplificada, do baixo custo de preparação e purificação, além da maior biodegradabilidade em comparação aos LIAs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microalga e condições de cultivo

A cianofíceia *Spirulina (Arthrospira) platensis* foi obtida a partir de um monocultivo realizado em ambiente externo no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, utilizando um sistema de recirculação em reatores de polietileno com volume de 500 L. A alcalinidade do meio seletivo foi garantida com a inclusão de 10 g.L^{-1} de bicarbonato de sódio, sendo a cultura enriquecida com ureia ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) e superfosfato triplo [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$) (SYNTH) a cada 20 dias e, diariamente, com efluentes de aquicultura para repor as perdas por evaporação. A densidade ótica do meio de cultivo foi monitorada com o auxílio de um espectrofotômetro (HACH, DR2700, PORTUGAL) a 680 nm (DO 680 nm) e a biomassa de *S. platensis* foi filtrada diariamente, por aproximadamente duas horas, em uma manta sintética de fibra de vidro com $60 \mu\text{m}$. Em seguida, a biomassa úmida foi seca em estufa com recirculação de ar a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e triturada até a obtenção de um pó fino. A biomassa em pó foi armazenada em frascos com tampa à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) até a realização dos estudos. As partículas de microalga utilizadas nos estudos variaram de 0,25 a 0,84 mm.

4.2 Síntese e caracterização dos líquidos iônicos

Os líquidos iônicos próticos acetato (2-HEAA) e formiato (2-HEAF) de N-metil-2-hidroxietilamônio foram sintetizados através de uma reação de neutralização ácido-base (ÁLVAREZ, 2010). Para preparar 1 L de 2-HEAA foram utilizados 496 mL de ácido acético e 505 mL de monoetanolamina, e para produzir a mesma quantidade de 2-HEAF, 470 mL de ácido fórmico e 530 mL de monoetanolamina. Os ácidos acético ($\geq 99,85\%$) e fórmico (88–91%) e a monoetanolamina (99%) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich e não foram submetidos a processos de purificação adicional. A monoetanolamina foi adicionada em um balão de três bocas equipado com um condensador de refluxo, um funil contendo o ácido (acético ou fórmico) e um termômetro. O ácido foi adicionado gota a gota à amina e o sistema foi mantido sob

agitação a 35 °C por 24 h. Após a síntese, os líquidos iônicos foram armazenados em temperatura ambiente (25 °C), em frascos escuros a fim de evitar a degradação pela luz.

Para a caracterização físico-química dos líquidos iônicos práticos foram determinados: pH, densidade e viscosidade. O pH foi medido em pHmetro digital (HANNA, HI 2223, EUA). A densidade e a viscosidade foram determinadas na temperatura de 25 °C através de densímetro digital (ANTON PAAR, DSA 5000, ÁUSTRIA) e viscodensímetro digital de oscilação em tubo U (ANTON PAAR, SVM 3000, ÁUSTRIA), respectivamente. O líquido iônico comercial cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [Bmim][Cl] ($\geq 98\%$) foi adquirido pela Sigma-Aldrich e não passou por nenhum processo de purificação adicional. O líquido iônico comercial é sólido à temperatura ambiente (25 °C), logo, necessitou ser fundido (80 °C) e diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,00) (1:1) para ser utilizado no processo de extração.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (EUA) equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. Os espectros unidimensionais de ^1H foram adquiridos com um tempo de espera entre cada aquisição de 1 s, ganho de 26, aquisição de 16 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32 k de número de pontos. Os dados foram processados utilizando o programa TopSpin 3.0™.

4.3 Extração e determinação das ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* foi avaliada por três métodos distintos com a tradicional extração por solvente: (1) método convencional (aquecimento + agitação), (2) ultrassom e (3) micro-ondas, utilizando cinco solventes em cada um deles, a saber: os líquidos iônicos práticos acetato de N-metil-2-hidroxietilamônio (2-HEAA); formiato de N-metil-2-hidroxietilamônio (2-HEAF); a mistura deles (2-HEAA+2-HEAF) (1:1,v/v); o líquido iônico comercial cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [Bmim][Cl] e o tampão fosfato de sódio (0,1 M, em diferentes valores de pH), como controle.

4.3.1 Extração pelo método convencional (EMC)

Testes preliminares foram realizados para averiguar a viabilidade ou não do emprego destes solventes na extração dos pigmentos. No primeiro teste, a obtenção de ficocianina e aloficocianina de *S. platensis* com o LI 2-HEAF foi avaliada e comparada com o solvente controle (tampão fosfato de sódio, 0,1 M, pH 7,0), a influência da temperatura e do pH também foi investigada. A extração foi realizada misturando-se 2 g da microalga com 30 mL dos solventes (tampão ou 2-HEAF) em reator encamisado de 100 mL acoplado a um banho termostático (TECNAL, TE- 2005, BRASIL), sob agitação mecânica constante de 500 rpm. A temperatura de extração variou de 20 °C a 50 °C; pH de 5,0 a 8,0 e o tempo total de extração foi de 240 min.

Com base nos resultados dos ensaios preliminares, um planejamento fatorial do tipo composto central rotacional (DCCR) 2^3 foi executado tendo como variáveis de entrada: pH, razão solvente:biomassa e temperatura; apresentando como respostas as concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. A razão de solvente em relação à biomassa, que foi fixada em 2 g, variou de 6,59 a 23,41 mL.g⁻¹. O tempo de extração foi fixado em 150 minutos. Neste planejamento foram utilizados 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios para cada solvente. Os níveis e as faixas das variáveis utilizados no planejamento são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Variáveis e níveis para o DCCR 2^3 utilizando o método convencional na extração de ficobiliproteínas

Variáveis	Unidade	Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
pH	-	3,98	5,00	6,50	8,00	9,02
Razão solvente:biomassa	(mL.g ⁻¹)	6,59	10,00	15,00	20,00	23,41
Temperatura	°C	9,77	20,00	35,00	50,00	60,23

4.3.2 Extração assistida por micro-ondas (EAM)

Ensaio prévios no forno micro-ondas (CONSUL, CM020BFBNA, BRASIL, 20 L, P_{máx} = 620W) também foram executados para avaliar a efetividade do LI e a interferência de variáveis importantes, como: tempo de extração, potência do equipamento e razão solvente:biomassa. Os testes utilizaram o 2-HEAF (pH 7,0) como

solvente. A potência do equipamento variou de 62 W a 186 W, a razão solvente:biomassa de 7,93 – 22,07 mL.g⁻¹ e o tempo de 0 a 15 minutos.

A partir desses ensaios, as condições de extração foram definidas e o planejamento experimental pôde ser executado (Tabela 5). O delineamento composto central rotacional apresentou 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, resultando em 11 ensaios por solvente.

Tabela 5 – Variáveis e níveis para o DCCR 2² utilizando o micro-ondas na extração de ficobiliproteínas

Variáveis	Unidade	Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
Potência	W	0	62	124	186	248
Razão solvente:biomassa	(mL.g ⁻¹)	8	10	15	20	22

A variação da temperatura com o tempo foi determinada para a melhor condição de extração (Figura 20).

4.3.3 Extração assistida por ultrassom (EAU)

A sonicação foi conduzida em banho ultrassônico (UNIQUE, USC-1450, 25 KHz, sem aquecimento, BRASIL) em temperatura ambiente (25 °C), com um tempo total de reação de 30 minutos. Um planejamento experimental do tipo DCCR 2² foi empregado. As variáveis dependentes foram: pH e razão solvente:biomassa, obtendo como respostas as concentrações de ficobiliproteínas. Os níveis e faixas adotados no planejamento estão resumidos na Tabela 6. O delineamento utilizou 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, resultando em 11 ensaios por solvente.

Tabela 6 – Variáveis e níveis para o DCCR 2² utilizando o ultrassom na extração de ficobiliproteínas

Variáveis	Unidade	Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
pH	-	4,38	5,00	6,50	8,00	8,62
Razão solvente:biomassa	(mL.g ⁻¹)	7,93	10,00	15,00	20,00	22,07

Após a extração, independentemente do método utilizado, alíquotas de 0,5

mL foram retiradas do meio reacional, em intervalos de tempo definidos, e centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos (GMCLAB GILSON, CAPSULEFUGE PMC-880, JAPÃO). A densidade ótica dos sobrenadantes foi determinada por espectrofotometria (BIOCHROM, LIBRA S11, REINO UNIDO) nos comprimentos de onda 562 nm, 615 nm, 652 nm. As concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram estimadas através das Equações 1, 2 e 3, respectivamente (Bennett e Bogorad, 1973).

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

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

$$CFE = \frac{DO_{562} - 2,41 \times CF - 0,849 \times CAF}{9,62} \quad (3)$$

Sendo CF a concentração de ficocianina; CAF a concentração de aloficocianina e CFE a concentração de ficoeritrina (g.L^{-1}); DO_{562} , DO_{615} e DO_{652} as densidades óticas das amostras a 562, 615, 652 nm, respectivamente.

A análise dos dados, obtidos no planejamento experimental, foi realizada pela aplicação da ANOVA e o teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica® 10.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 95% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

4.4 Avaliação dos métodos de extração

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As mudanças ocorridas na estrutura celular da microalga, após a extração dos pigmentos pelos diferentes métodos foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV – HITACHI TM 3000 TABLETOP MICROSCOPE), nas melhores condições de extração. Um controle (biomassa íntegra) foi utilizado para efeito de

comparação. Para preparação das amostras, foi realizada a dispersão das mesmas em água destilada, seguida de pipetagem em lâminas de vidro e secagem à temperatura ambiente (25 °C/24 h).

4.4.2 Rendimento, produtividade, fator de pureza dos pigmentos e análise do consumo energético

O rendimento em ficobiliproteínas para cada um dos métodos de extração avaliados foi calculado conforme a Equação 4.

$$R = \frac{C_{\text{pigmento}} \times V_{\text{solvente}}}{m_{\text{microalga}}} \quad (4)$$

Sendo: R o rendimento (mg.g⁻¹); C a concentração do pigmento extraído (g.L⁻¹); V o volume do solvente (L) e m é a massa em gramas de microalga.

A produtividade é a relação da concentração por unidade de tempo e foi calculada como na Equação 5:

$$P = \frac{C_{\text{pigmento}}}{t} \quad (5)$$

Sendo: P a produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹); C a concentração do pigmento extraído (g.L⁻¹) e t o tempo em horas.

A pureza de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foi monitorada espectrofotometricamente conforme as Equações 6, 7 e 8, respectivamente (Abalde *et al.*, 2008).

$$F = \frac{A_{615}}{A_{280}} \quad (6)$$

$$AF = \frac{A_{652}}{A_{280}} \quad (7)$$

$$FE = \frac{A_{562}}{A_{280}} \quad (8)$$

Sendo: F o fator de pureza da ficocianina; A₆₁₅ a densidade ótica da amostra determinada à 615 nm; A₂₈₀ a densidade ótica da amostra medida em 280 nm; AF o fator de pureza da aloficocianina; A₆₅₂ a densidade ótica da amostra medida em 652 nm, FE o fator de pureza da ficoeritrina, A₅₆₂ a densidade ótica da amostra medida em 562 nm.

Uma análise simplista do consumo de energia foi realizada, levando-se em conta apenas o tempo de extração e a potência dos equipamentos utilizados, a fim de comparar os diferentes métodos empregados. O cálculo do consumo foi efetuado através da Equação 9, onde P é a potência do dispositivo utilizado, em Watts, e t , o tempo de utilização, em horas, determinando um resultado em W.h. Para simplificar os cálculos, não foi levada em consideração a proporcionalidade entre a potência dos aparelhos e a temperatura ou velocidade utilizadas.

$$CE = P \times t \quad (9)$$

A análise do consumo de energia dos equipamentos foi realizada comparando-se o método de extração convencional, no qual foram empregados banho termostático ($P = 1800$ W e $t = 2,50$ h) e agitador mecânico ($P = 130$ W e $t = 2,50$ h), com a extração por micro-ondas ($P = 62$ W e $t = 0,03$ h) e com a extração assistida por ultrassom ($P = 135$ W e $t = 0,50$ h).

4.5 Purificação das ficobiliproteínas

Após a extração dos pigmentos no micro-ondas, a amostra foi filtrada e o sobrenadante submetido a duas precipitações com sulfato de amônio (25% e 45% m/v de saturação) (SYNTH). O sulfato de amônio sólido foi adicionado para obter 25% de saturação, permanecendo a 4 °C por 4 h sendo então, centrifugado a 6.500 rpm por 15 min a 4 °C (EXCELSA 280 R, BRASIL). O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante, subsequentemente, adicionado de sulfato de amônio até atingir 45% de saturação. A amostra permaneceu sob refrigeração (4 °C) *overnight*, quando foi novamente centrifugada, conforme descrito anteriormente.

Aproximadamente 3 mL do precipitado azul obtido da precipitação com sulfato de amônio foi ressuspensão em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,00) e dialisado na coluna PD-10 Sephadex G – 25 M (8 x 1,6 x 5 cm) (GE HEALTHCARE).

A seguir, o eluato oriundo da diálise foi purificado por cromatografia de troca iônica, em batelada, utilizando a resina DEAE Sepharose Fast Flow (GE HEALTHCARE).

A influência da carga de resina no processo de purificação foi avaliada, tendo sido utilizadas as seguintes concentrações de DEAE Sepharose Fast Flow: 3,33; 10; 33,33;

50 e 100 mg.mL⁻¹. A eluição das amostras foi realizada com soluções de NaCl (0 a 50 mM).

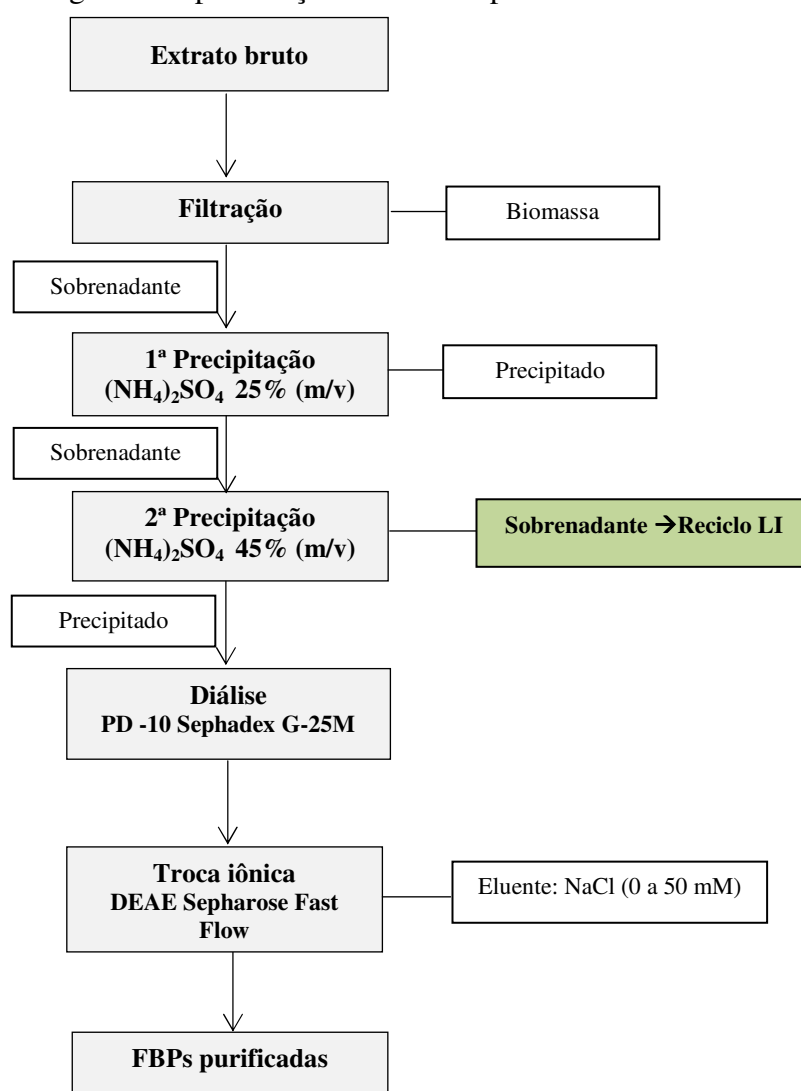
A quantidade de ficobiliproteínas adsorvida na resina foi calculada pela Equação 10.

$$q = \frac{(C_f - C_i) \times V}{m} \quad (10)$$

Onde: q é a quantidade de pigmento adsorvida na resina (g de pigmento.g⁻¹ de resina); C_f é a concentração final de pigmento (g.L⁻¹); C_i é a concentração inicial de pigmento (g.L⁻¹); V o volume de amostra (L) e m é a massa de resina utilizada (g).

O protocolo de purificação das ficobiliproteínas é apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma de purificação das ficobiliproteínas



Fonte: A autora (2017).

4.5.1 Eletroforese (SDS-PAGE)

Os extratos proteicos contendo as ficobiliproteínas purificadas foram caracterizados em termos da massa molecular e homogeneidade de suas subunidades por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), seguindo a metodologia adaptada de Laemmli (1970), usando 5% e 15% (v/v) de poliacrilamida nos géis de empilhamento e separação, respectivamente (MINI PROTEAN III, BIORAD, USA). As diferentes amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min e alíquotas de 20 µL de cada uma delas foram aplicadas aos géis. As corridas foram realizadas sob as seguintes condições: 150 V, 2 horas, 25 °C, utilizando como tampão de corrida Tris 0,025 M (pH 8,7) contendo glicina 0,192 M e 1% de SDS. As bandas proteicas foram visualizadas após coloração dos géis com uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) contendo o corante *Coomassie Brilliant Blue R-2500*, 25 % (PhastGel Blue R) e revelação com uma solução contendo os mesmos componentes, porém, sem o corante. Um marcador padrão de baixo peso molecular variando de 14 a 97 KDa foi utilizado (fosforilase – 97 KDa, albumina – 66 KDa, ovalbumina – 45 KDa, anidrase carbônica –30 KDa, inibidor de tripsina – 20 KDa e lactalbumina – 14 KDa) para determinação da massa molecular. Além disso, foi empregada solução contendo ficocianina comercial purificada para análise de comparação (SIGMA ALDRICH). Ao término da descoloração, os géis obtidos foram escaneados e comparados aos padrões.

4.6 Recuperação e reuso do líquido iônico

Ao término do processo de extração no micro-ondas (62 W, 10 mL.g⁻¹, 2 min) utilizando o 2-HEAA+2-HEAF (pH 7,00), a amostra foi filtrada para a separação da biomassa e o sobrenadante submetido a precipitações consecutivas com sulfato de amônio (25% e 45% m/v de saturação) e centrifugado (6.500 rpm/ 4 °C/ 15 min). O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,00) e expedido para as demais etapas de purificação e, o sobrenadante, contendo LI com proteínas remanescentes, foi reutilizado no processo de extração (conforme descrito no item 4.3.2) e ressubmetido a novas precipitações com sulfato de amônio. A estabilidade

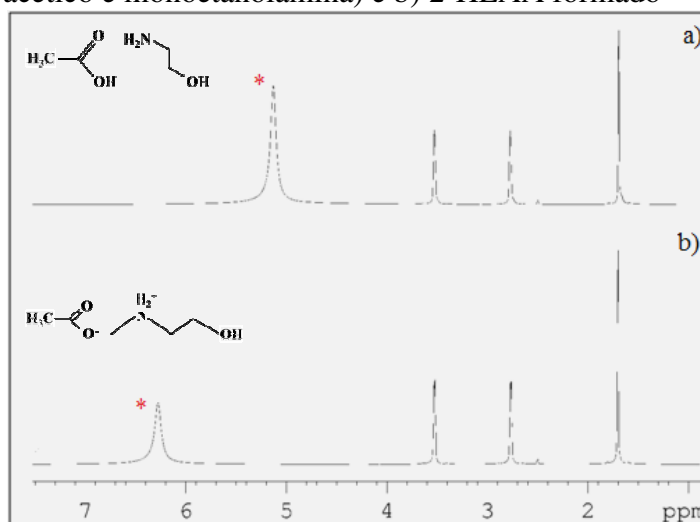
operacional do LI foi avaliada em 3 diferentes ciclos, consoante o protocolo descrito acima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos líquidos iônicos próticos

As Figuras 5 e 6 referem-se aos resultados das análises de RMN para os líquidos iônicos próticos, sintetizados no laboratório.

Figura 5 – Espectro de RMN 1H para o 2-HEAA: a) mistura física dos componentes do 2-HEAA (ácido acético e monoetanolamina) e b) 2-HEAA formado



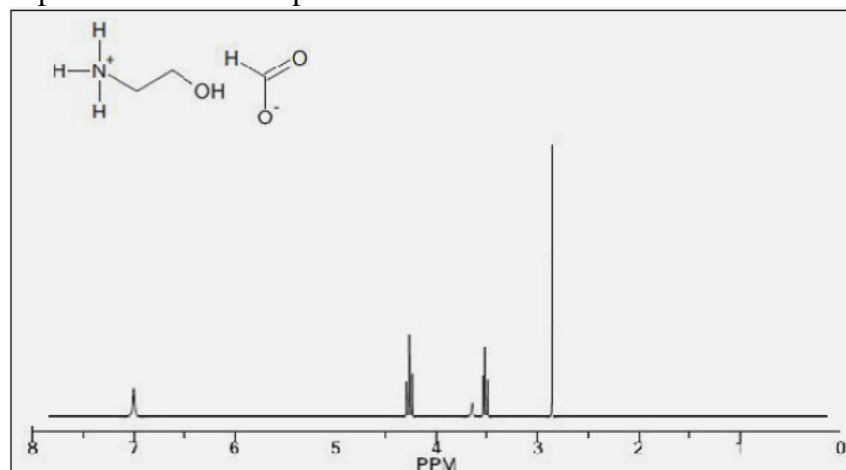
Fonte: Reis *et al.* (2017).

Na Figura 5 é apresentado o espectro de RMN 1H para o 2-HEAA. Comparando as misturas físicas com o líquido iônico verificou-se que ocorreu uma modificação considerável do deslocamento químico do hidrogênio oriundo do grupo amina da monoetanolamina (de 5,12 ppm para 6,28 ppm) e uma pequena variação do carbono carboxílico do ácido. Isto indica que a formação do líquido iônico ocorre através de interações intermoleculares não covalentes do grupo amina da monoetanolamina com o oxigênio carboxílico do ácido. Os deslocamentos químicos dos demais hidrogênios não variaram, pois, a natureza da interação intermolecular não é forte o suficiente para causar grandes variações (Pentillã *et al.*, 2014).

A análise de RMN confirmou a estrutura do líquido iônico 2-HEAF (FIGURA 6). O espectro obtido foi comparado com o reportado por Vega *et al.* (2015), tendo apresentado concordância com este. Na Figura 6 os picos mais largos referem-se, ao próton móvel da estrutura, correspondente à função NH_3^+ (7ppm) e ao pico da hidroxila pertencente ao cátion (3,65 ppm). O pico localizado em 4,27 ppm no espectro

refere-se ao grupamento etila (CH_2) ligado ao grupo carboxílico do ânion. Os picos em 3,52 ppm e 2,86 ppm correspondem, respectivamente, aos grupamentos etila e metila (CH_3) ligados ao cátion.

Figura 6 – Espectro de RMN ^1H para o 2-HEAF



Fonte: Mesquita *et al.* (2015).

As estruturas dos líquidos iônicos estudados estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7 – Estruturas químicas dos líquidos iônicos estudados

2-HEAA	
2-HEAF	
[Bmim][Cl]	

Fonte: A autora (2016).

Na Tabela 7 estão listadas algumas propriedades dos solventes utilizados neste trabalho. O 2-HEAA apresentou maior viscosidade e pH e menor densidade, dentre os LIPs. A densidade mais elevada foi verificada para o 2-HEAF e os menores pH e viscosidade. O 2-HEAA+2-HEAF apresentou valores intermediários para todos os parâmetros avaliados. A mistura de LIs com outros LIs objetiva melhorar suas propriedades alvo enquanto mantém características favoráveis. Alguns estudos mostram

que as propriedades dessas misturas podem ser descritas pelo comportamento de misturas simples entre dois LIs puros. Annat *et al.* (2012) ao misturarem [P6,6,6,14][NTf2] e [C3mpyr][NTf2] observaram que as propriedades físicas desse sistema desviaram significativamente do comportamento dos LIs individuais, comprovando que a mistura de LIs origina um novo LI.

Os valores de densidade e viscosidade para o 2-HEAF encontrados neste trabalho estão condizentes com os apresentados por Mesquita *et al.* (2015), Vega *et al.* (2015) e Iglesias *et al.* (2008). A densidade do 2-HEAA foi confirmada por Pentilä *et al.* (2014), Alvarez *et al.* (2011) e Kurnia *et al.* (2009), que obtiveram valores próximos de $1,15 \text{ g.cm}^{-3}$. Dados relacionados à mistura destes LIPs (2-HEAA+2-HEAF) não foram encontrados na literatura. O tampão fosfato de sódio a pH 7,0 apresentou a menor densidade dentre os solventes utilizados ($1,02 \text{ g.cm}^{-3}$). Por ser altamente viscoso, as propriedades físico-químicas do [Bmim][Cl] não foram determinadas devido à limitação do aparato utilizado. Entretanto, Huddleston *et al.* (2001) e Saba *et al.* (2015) relataram densidade em torno de $1,08 \text{ g.cm}^{-3}$, à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para este líquido iônico.

Tabela 7 – Caracterização físico-química dos solventes utilizados no trabalho, medições realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Solvente	Densidade (g.cm^{-3})	Viscosidade (mPa.s)	pH
2-HEAF	1,1936	81,8	7,73
2-HEAA	1,1510	2.696,9	9,71
2-HEAF + 2-HEAA (1:1)	1,1694	229,9	8,84
Tampão fosfato de sódio 0,1M	1,0202	0,89	7,00

Fonte: A autora (2016).

5.2 Extração de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina platensis*

5.2.1 Extração pelo método convencional

Nesta etapa do estudo, dois solventes distintos, tampão fosfato de sódio 0,1 M e o líquido iônico 2-HEAF, foram utilizados para observação do seu efeito na extração de ficocianina e aloficocianina da *S. platensis* pelo método convencional. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 8 e 9. Por se tratar de um teste preliminar, a concentração de ficoeritrina não foi avaliada nesta fase do trabalho.

Na Figura 8 é apresentada a evolução da extração dos pigmentos com o aumento da temperatura de 20 a 50 °C para os dois solventes, tampão fosfato (pH 7,0) e 2-HEAF (pH 7,79). Ambos os solventes foram capazes de extrair os pigmentos da microalga. Na extração de ficocianina, o tampão foi mais eficiente do que o líquido iônico em todas as temperaturas avaliadas. As concentrações máximas de ficocianina foram obtidas a 30 °C; 1,20 g.L⁻¹ para o tampão e 0,80 g.L⁻¹ para o 2-HEAF. Na extração de aloficocianina, a máxima concentração observada tanto para o tampão quanto para o líquido iônico foi de aproximadamente 0,70 g.L⁻¹. Em relação à obtenção de aloficocianina, os dois solventes apresentaram comportamento similar na faixa de temperatura estudada. O melhor desempenho do tampão frente ao 2-HEAF, na extração de ficocianina, pode estar associado à sua menor viscosidade. Além disso, o aumento de temperatura pode ter promovido mudanças nas propriedades coligativas do líquido iônico de modo a reduzir a interação deste solvente com o produto de interesse.

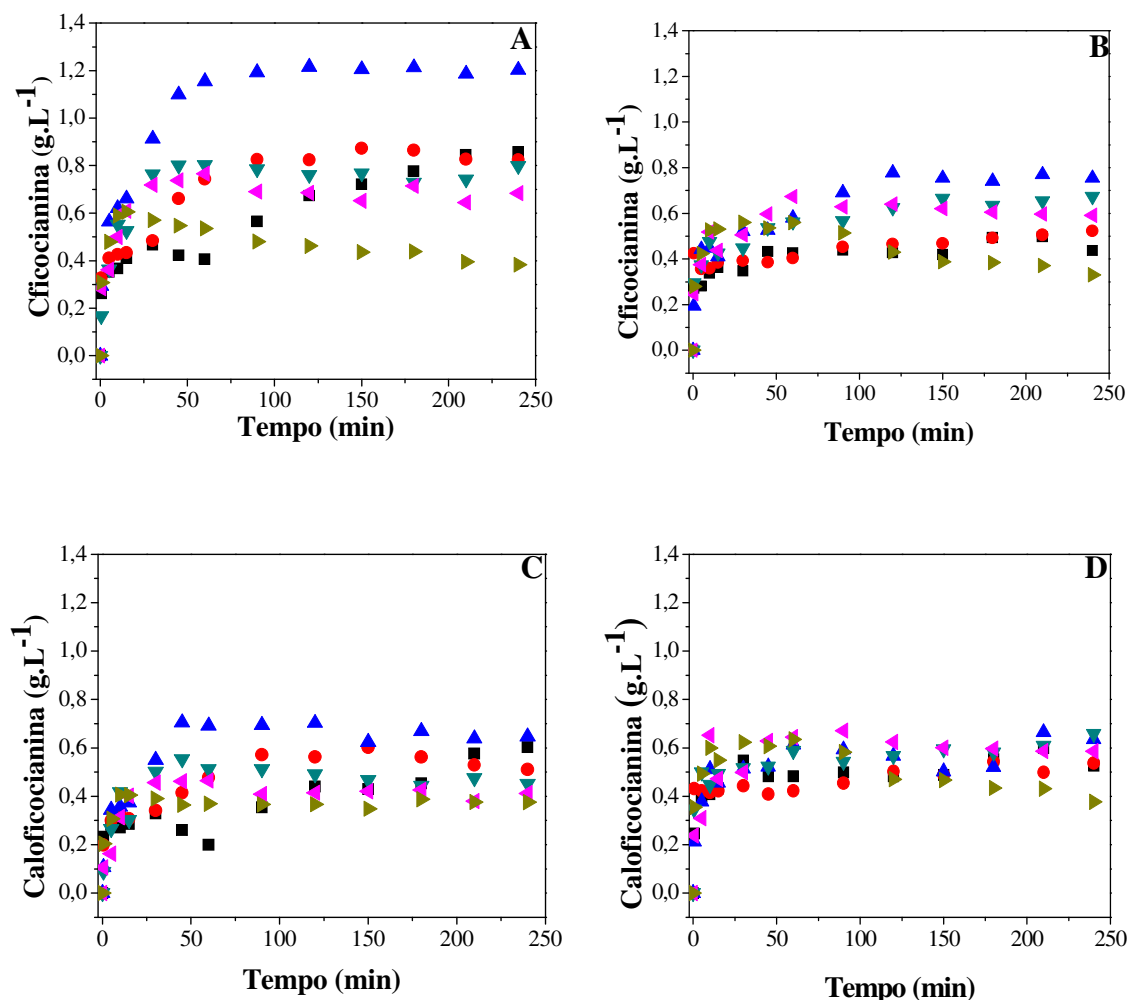
Considerando a obtenção de ficocianina com o tampão, observou-se que um rápido aumento na taxa de extração foi verificado com o aumento da temperatura até 30 °C; porém, com o posterior aumento até 50 °C, a extração dos pigmentos foi negativamente afetada.

A ficocianina (Figura 2) está situada na periferia da estrutura que encerra as ficobiliproteínas, o ficobilissoma. A aloficocianina, por sua vez, situa-se no núcleo sendo necessários maior força iônica ou maior poder difusional do solvente para extraí-la.

Em temperaturas mais elevadas, acima de 50 °C, há redução na viscosidade e aumento na difusividade dos solventes, o que deveria incrementar a extração de ficobiliproteínas com o 2-HEAF. Contudo, tais biomoléculas são de natureza protéica e podem desnaturar quando submetidas a temperaturas elevadas. Um efeito compensa o outro e assim, nenhum acréscimo na extração das ficobiliproteínas é observado com o aumento da temperatura para este solvente.

A maioria das proteínas pode ser desnaturada pelo calor, que age de maneira complexa sobre suas ligações fracas (principalmente ligações de hidrogênio). Se a temperatura é aumentada lentamente, a conformação da proteína em geral é mantida intacta até que, em uma estreita faixa de temperatura, ocorre uma perda abrupta da estrutura (e da função). Os efeitos do aquecimento sobre as proteínas não são facilmente preditos (Nelson e Cox, 2014).

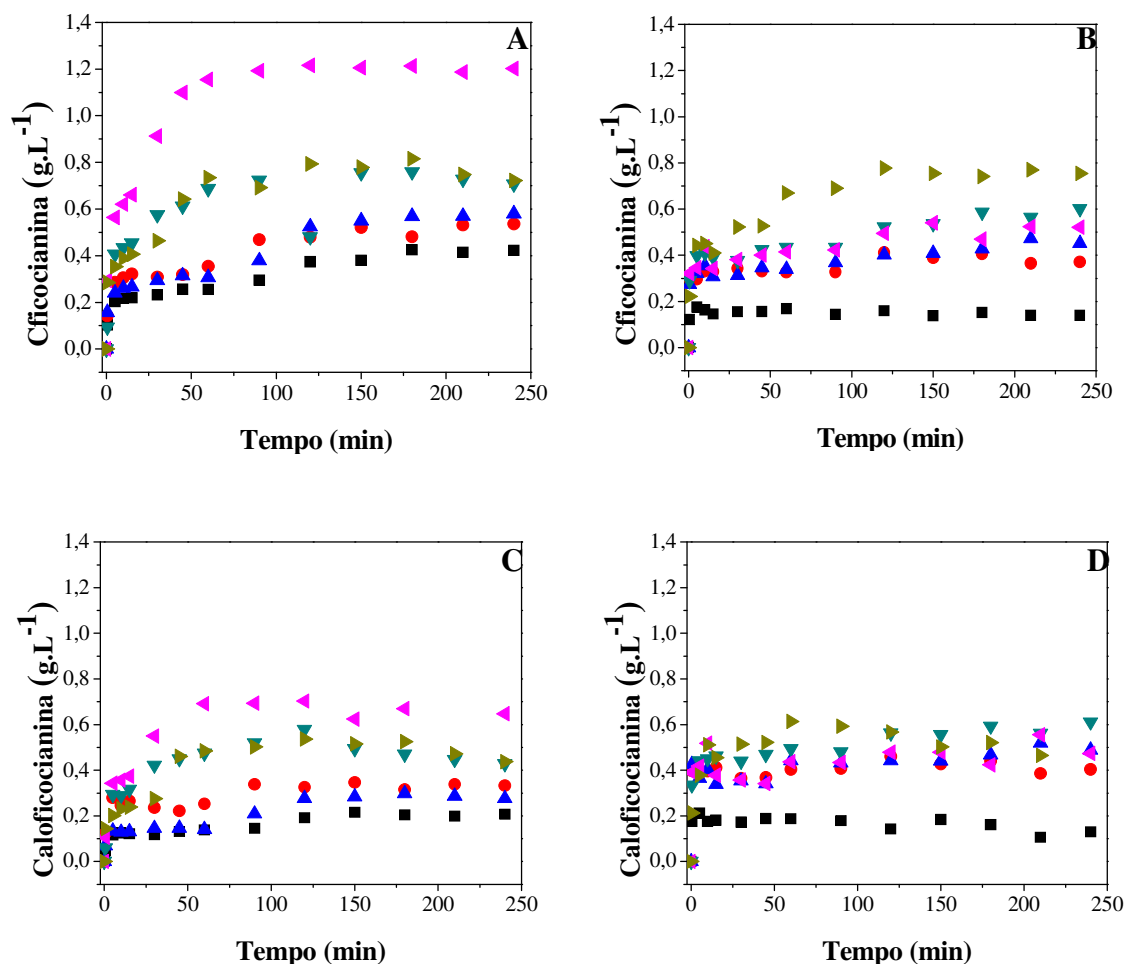
Figura 8 – Efeito da temperatura na extração de ficocianina e aloficocianina de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando tampão fosfato de sódio (A e C) e 2-HEAF (B e D), respectivamente, com agitação de 500 rpm. (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◀) 40 °C (▶) 50 °C



Fonte: A autora (2016).

O pH é um fator crítico nos processos de extração porque ele afeta diretamente a solubilidade das biomoléculas (Su *et al.*, 2014). A extração de ficocianina e aloficocianina, com tampão fosfato e 2-HEAF, foi realizada variando o pH de 5,0 a 8,0, mantendo a temperatura em 30 °C, uma vez que acima desse valor não houve variação significativa na concentração dos pigmentos (FIGURA 9). Este intervalo foi selecionado porque a ficocianina é instável em valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 8,0 (Patil e Raghavarao, 2007).

Figura 9 – Efeito do pH na extração de ficocianina e aloficocianina de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando tampão fosfato de sódio (A e C) e 2-HEAF (B e D), respectivamente, na temperatura de 30 °C. (■)5,0 (●)5,5 (▲)6,0 (▼)6,5 (◆)7,0 (►)8,0



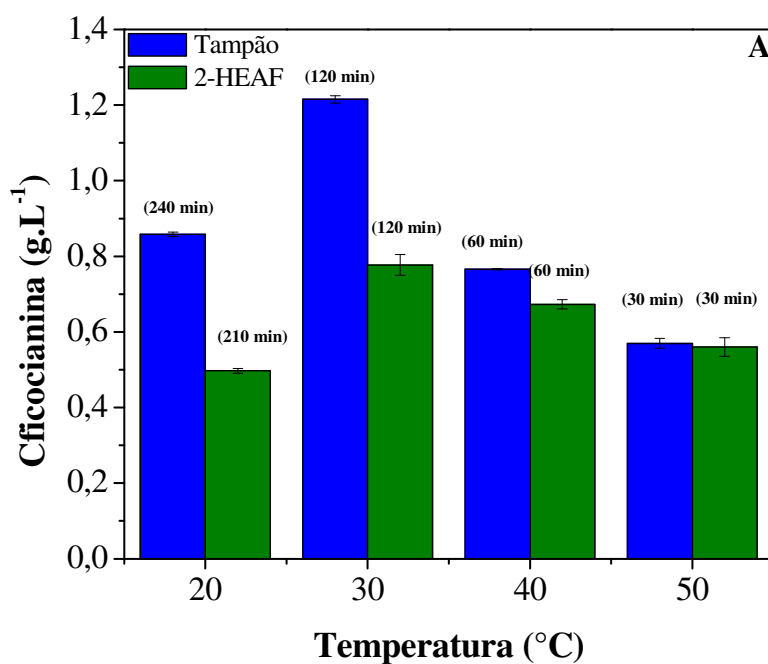
Fonte: A autora (2016).

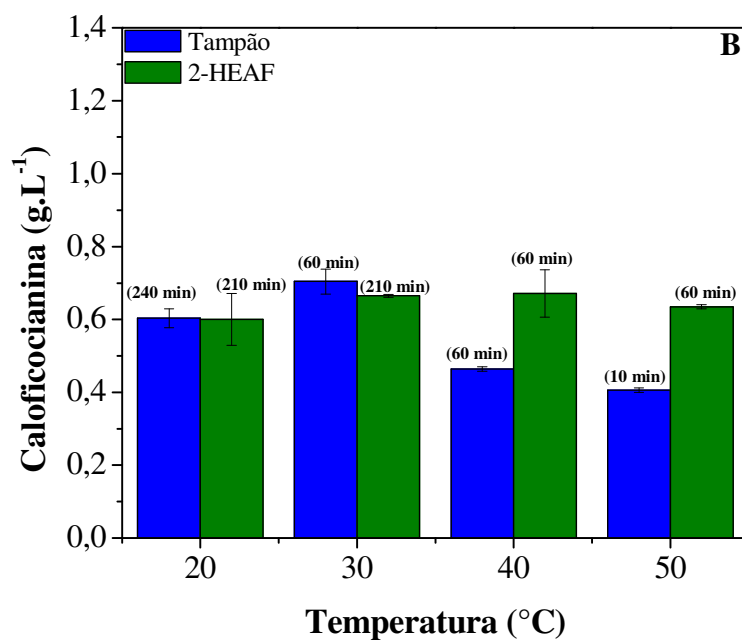
O incremento no pH aumentou a extração dos pigmentos. Entretanto, para o tampão, um ligeiro decréscimo nas concentrações de ficocianina e aloficocianina ocorreu no pH 8,0. O tampão foi mais eficiente em pH 7,0 e o 2-HEAF, em pH 8,0. As máximas concentrações de ficocianina observadas foram 1,20 g.L⁻¹ para o tampão e 0,80 g.L⁻¹ para o líquido iônico. Em relação à aloficocianina, a máxima concentração obtida com o tampão foi de 0,70 g.L⁻¹ e com o 2-HEAF, 0,60 g.L⁻¹.

Além de interferir na solubilidade, o pH afeta as constantes cinéticas das proteínas. Valores elevados de pH alteram a carga líquida das proteínas, causando repulsão eletrostática e o rompimento de algumas ligações de hidrogênio, desestabilizando-as (Nelson e Cox, 2014).

As Figuras 10 e 11 apresentam a influência da temperatura e do pH, respectivamente, na máxima concentração de ficocianina e aloficocianina para os dois solventes estudados, bem como o tempo necessário para atingi-la e ilustram melhor os resultados apresentados anteriormente (nas Figuras 8 e 9).

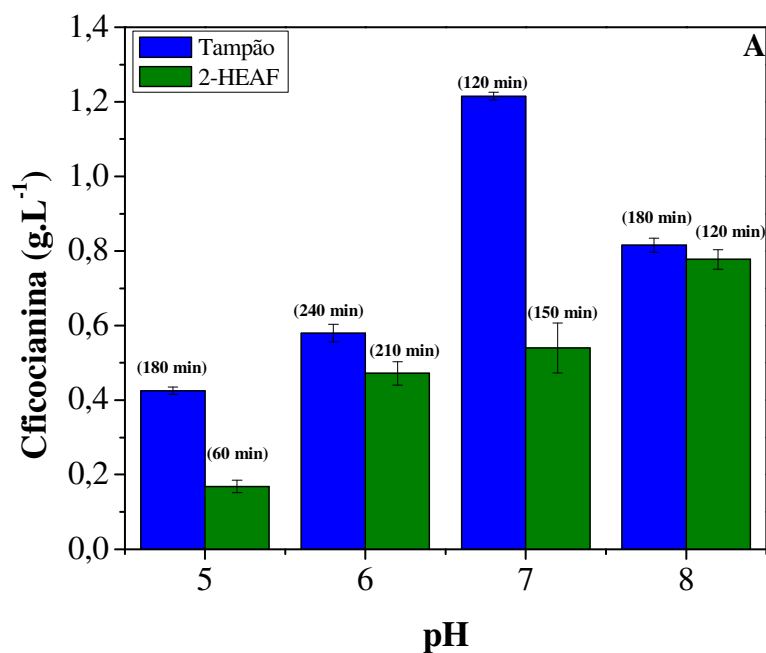
Figura 10 – Influência da temperatura e do solvente na concentração máxima de ficocianina (A) e aloficocianina (B) extraídas de *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Valores entre parênteses correspondem aos tempos de extração em que foi atingida a concentração máxima de cada ficobiliproteína

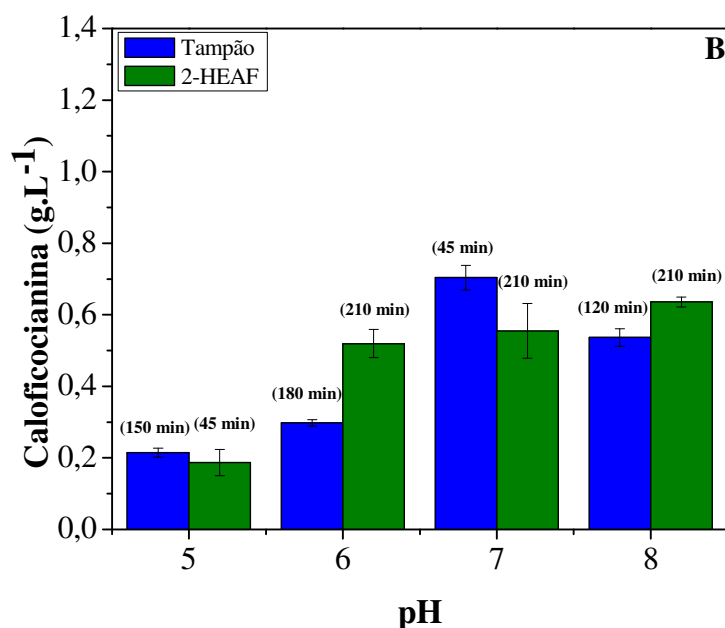




Fonte: A autora (2016).

Figura 11 – Influência do pH e do solvente na concentração máxima de ficocianina (A) e aloficocianina (B) extraídas de *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Valores entre parênteses correspondem aos tempos de extração em que foi atingida a concentração máxima de cada ficobiliproteína





Fonte: A autora (2016).

Nas Figuras 10 e 11 observa-se com maior nitidez que o tampão foi mais eficiente na extração de ficocianina e que o 2-HEAF extraiu mais aloficocianina que o tampão em algumas temperaturas e pH testados. Meios alcalinos favorecem a extração de aloficocianina (Su *et al.*, 2014).

A utilização do líquido iônico na extração de ficocianina e aloficocianina mostrou-se satisfatória, por dois motivos principais: (1) a possibilidade de reciclo e reutilização do solvente no processo de extração e, (2) a maior estabilidade que este solvente apresenta frente ao tampão. Variações de temperatura e pH não produziram grandes alterações no comportamento das curvas de cinética de extração (Figuras 8 e 9). Esse efeito é bastante desejável para algumas aplicações, tais como as que envolvem a síntese de medicamentos e outros produtos farmacêuticos.

Os resultados supracitados mostraram que o 2-HEAF foi capaz de extrair as ficobiliproteínas em condições moderadas de temperatura e pH mais básicos. Partindo desse princípio, estudos mais aprofundados foram realizados e o desempenho de novos líquidos iônicos foi avaliado no processo de extração. Para tal, um planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional), conforme apresentado no item 4.3.1, foi executado para comparar o desempenho dos líquidos iônicos próticos com o do tampão fosfato, e avaliar outras variáveis importantes no processo de extração de ficobiliproteínas da *S. platensis*, os resultados são mostrados a seguir.

A Tabela 8 apresenta os valores de concentração de ficocianina (g.L^{-1}) obtidos para cada solvente estudado.

Tabela 8 – Valores para a concentração de ficocianina (g.L^{-1}) obtidos no processo de extração pelo método convencional usando diferentes solventes, após 150 min

Ensaio	T(°C)	pH	Razão		2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF
			s:b (mL.g^{-1})	Tampão			
1	20	5	10	0,26	0,74	0,27	0,82
2	20	5	20	0,10	0,73	0,11	0,50
3	20	8	10	0,40	1,22	0,40	1,26
4	20	8	20	0,37	1,17	0,37	0,82
5	50	5	10	0,03	0,14	0,03	0,17
6	50	5	20	0,01	0,09	0,01	0,14
7	50	8	10	0,36	0,88	0,36	1,17
8	50	8	20	0,29	0,68	0,28	0,97
9	9,77	6,5	15	0,45	0,91	0,32	0,91
10	60,23	6,5	15	0,06	0,15	0,10	0,37
11	35	3,98	15	0,02	0,04	0,03	0,06
12	35	9,02	15	0,35	0,61	0,34	0,79
13	35	6,5	6,59	1,15	1,56	1,32	1,65
14	35	6,5	23,41	0,24	0,98	0,26	1,15
15	35	6,5	15	0,96	1,38	1,28	1,37
16	35	6,5	15	1,00	1,36	1,27	1,43
17	35	6,5	15	0,99	1,36	1,24	1,37

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

De maneira geral, todos os solventes estudados foram capazes de extrair a ficocianina da microalga. Os LIPs e o tampão extraíram mais ficocianina nas condições do ensaio 13 com valores moderados de temperatura e pH e em baixa concentração de solvente em relação à biomassa (35 °C; 6,59 mL.g^{-1} e pH 6,50).

Na Tabela 9 são apresentados os valores de concentração de aloficocianina observados empregando os diferentes solventes pelo método convencional.

Tabela 9 – Valores para a concentração de aloficocianina (g.L^{-1}) obtidos no processo de extração pelo método convencional usando diferentes solventes, após 150 min

Ensaio	T(°C)	pH	Razão s:b (mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF
1	20	5	10	0,23	1,06	0,23	0,92
2	20	5	20	0,04	0,95	0,03	0,54
3	20	8	10	0,44	1,25	0,44	1,72
4	20	8	20	0,36	1,13	0,37	1,00
5	50	5	10	0,02	0,18	0,02	0,09
6	50	5	20	0,01	0,09	0,01	0,11
7	50	8	10	0,38	1,09	0,37	1,18
8	50	8	20	0,26	0,86	0,26	0,99
9	9,77	6,5	15	0,28	0,83	0,29	1,25
10	60,23	6,5	15	0,08	0,15	0,11	0,47
11	35	3,98	15	0,04	0,02	0,04	0,11
12	35	9,02	15	0,41	0,81	0,41	1,15
13	35	6,5	6,59	0,86	1,47	1,13	1,70
14	35	6,5	23,41	0,26	0,81	0,20	1,08
15	35	6,5	15	0,59	1,24	1,14	1,42
16	35	6,5	15	0,64	1,19	1,10	1,42
17	35	6,5	15	0,60	1,24	1,12	1,39

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Todos os solventes conseguiram extrair a aloficocianina. Assim como na extração de ficocianina, as máximas concentrações deste pigmento foram obtidas nas condições do ensaio 13 (35 °C, pH 6,50, razão s:b 6,59 mL.g^{-1}).

Os valores obtidos experimentalmente para a extração de ficoeritrina são dispostos na Tabela 10. A ficoeritrina foi extraída em menores quantidades em relação à ficocianina e à aloficocianina, independentemente do solvente utilizado, o que já era esperado uma vez que este pigmento é menos abundante em microalgas deste gênero, sendo mais encontrado em algas vermelhas (Zolla *et al.*, 2002). Ficocianina e aloficocianina são as ficobiliproteínas mais consideráveis em cianobactérias e constituem, aproximadamente, 20% do total de proteínas (Johnson *et al.*, 2014). As condições do ensaio 13 (35 °C, pH 6,50, razão s:b 6,59 mL.g⁻¹) foram as mais propícias para a obtenção de ficoeritrina.

Tabela 10 – Valores para a concentração de ficoeritrina (g.L⁻¹) obtidos no processo de extração pelo método convencional usando diferentes solventes, após 150 min

Ensaio	T(°C)	pH	Razão		2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF
			s:b (mL.g ⁻¹)	Tampão			
1	20	5	10	0,09	0,41	0,10	0,48
2	20	5	20	0,02	0,25	0,02	0,41
3	20	8	10	0,19	0,58	0,19	0,78
4	20	8	20	0,16	0,09	0,16	0,26
5	50	5	10	0,01	0,04	0,01	0,08
6	50	5	20	0,01	0,04	0,01	0,06
7	50	8	10	0,15	0,38	0,16	0,40
8	50	8	20	0,13	0,31	0,11	0,33
9	9,77	6,5	15	0,08	0,34	0,11	0,39
10	60,23	6,5	15	0,03	0,07	0,05	0,20
11	35	3,98	15	0,03	0,06	0,03	0,06
12	35	9,02	15	0,21	0,33	0,21	0,53
13	35	6,5	6,59	0,21	0,62	0,34	0,64
14	35	6,5	23,41	0,10	0,30	0,08	0,40
15	35	6,5	15	0,15	0,53	0,40	0,59
16	35	6,5	15	0,16	0,53	0,40	0,63

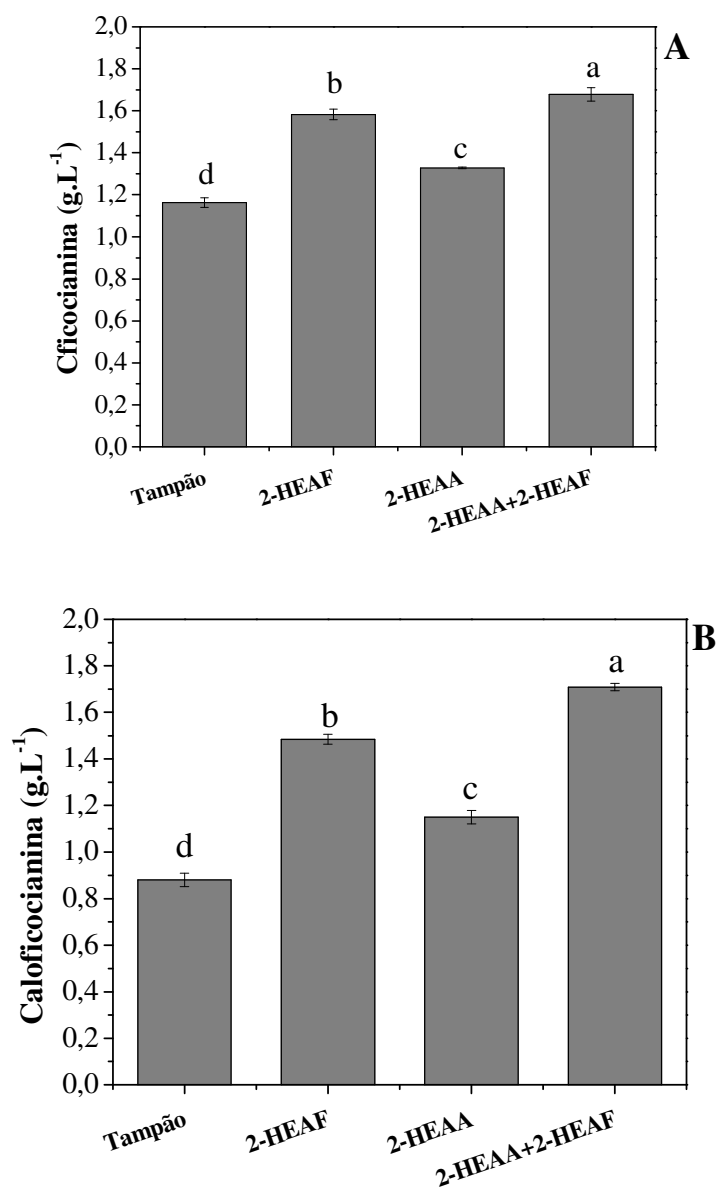
17	35	6,5	15	0,16	0,50	0,40	0,58
----	----	-----	----	------	------	------	------

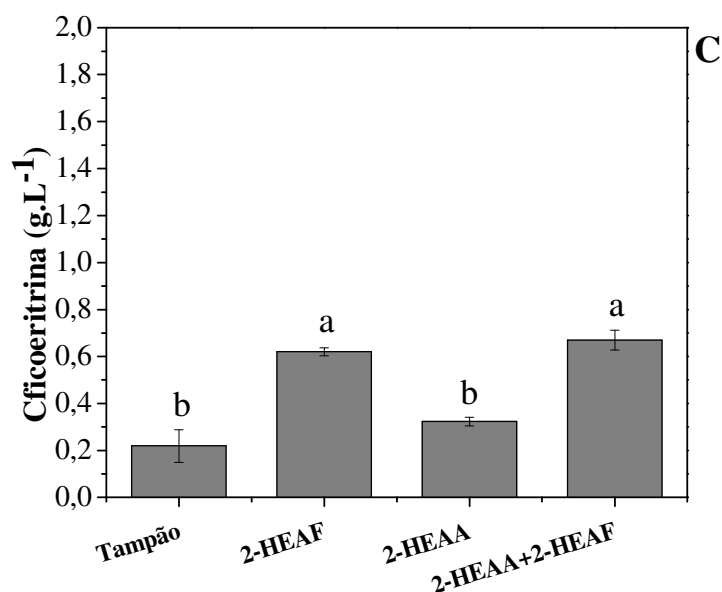
(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Na Figura 12 é possível comparar o desempenho dos solventes na extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina nas condições do ensaio 13.

Figura 12 – Influência do solvente na concentração máxima de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) extraídas pelo método convencional (35 °C; pH: 6,50; razão solvente:biomassa: 6,59 mL.g⁻¹). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$)





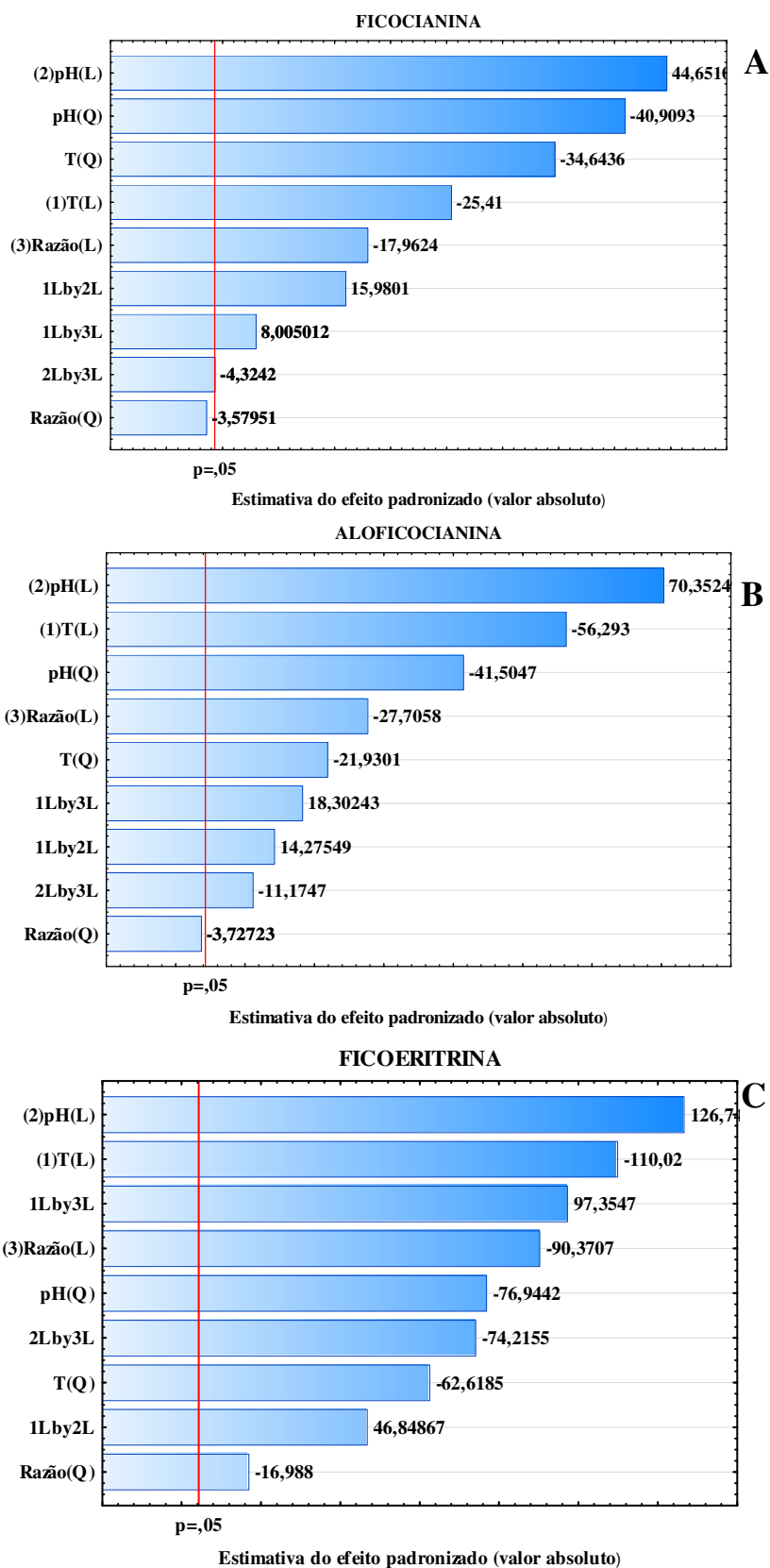
Fonte: A autora (2016).

Na Figura 12 observa-se que os líquidos iônicos próticos foram mais eficientes que o tampão na extração dos pigmentos com destaque para o 2-HEAA+HEAF que extraiu $1,65 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de ficocianina e $1,70 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de aloficocianina.

Na extração de ficoeritrina, a mistura 2-HEAA+2-HEAF apresentou desempenho ligeiramente superior ao do 2-HEAF, porém não houve diferença estatística entre estes solventes ao nível de significância de 95%. O 2-HEAA extraiu $0,34 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de ficoeritrina e o tampão $0,21 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$, esses valores também não diferiram ao nível de 95%. Su *et al.* (2014) ao investigarem a influência do pH e da temperatura sobre a extração de ficocianina de *S. platensis* com tampão fosfato relataram valores de concentração próximos aos deste trabalho ($2,00 \text{ g.L}^{-1}$ de ficocianina, em pH 7,00 e temperatura de 30 °C).

Na Figura 13 é apresentado o diagrama de Pareto para a extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente (melhores resultados). Os Gráficos de Pareto para os demais solventes estão apresentados no Apêndice A.

Figura 13 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina pelo método convencional utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente



Fonte: A autora (2016).

O efeito linear do pH (L) foi o mais significativo na extração de ficocianina (44,65), seguido do seu efeito quadrático e negativo pH (Q) (-40,90), dos efeitos quadrático T (Q) (-34,64) e linear da temperatura T (L) (-25,41) e do efeito linear da razão solvente:biomassa (L) (-17,96), ao nível de confiança de 95%.

A variável que apresentou maior efeito na extração de aloficocianina foi o efeito linear do pH (L) (70,35), seguido do efeito linear da temperatura T (L) (-56,29).

Na extração de ficoeritrina os efeitos de todas as variáveis e as interações entre elas foram significativas sendo o efeito linear do pH o maior (126,74), seguido do efeito linear e negativo da temperatura (-110,02).

O pH e a temperatura foram as variáveis mais relevantes no processo de extração da ficobiliproteínas. O efeito positivo e linear do pH indica que a extração é crescente com o aumento dessa variável. O efeito quadrático do pH e da temperatura, por sua vez, sinalizam que o aumento destas variáveis promoverão acréscimo na extração do pigmento até determinado ponto, a partir do qual, mesmo aumentando estas variáveis, a extração decrescerá. Como já foi mencionado anteriormente, o efeito do pH é crucial nos processos de extração porque a solubilidade e as constantes cinéticas aparentes dos biocompostos são diretamente dependentes de suas variações. Valores extremos de pH alteram a carga líquida das proteínas, causando repulsão eletrostática e o rompimento de algumas ligações de hidrogênio, desestabilizando-as (Nelson e Cox, 2014).

A temperatura mais elevada de extração pode aumentar a interação solvente-matriz fazendo com que o coeficiente de difusão e a solubilidade do soluto em solventes aquosos aumentem (Filly *et al.*, 2016). Entretanto, acima do pH e temperatura ótimos a concentração dos pigmentos tende a diminuir devido à degradação térmica e à desnaturação proteica (Chaiklahan *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014).

O efeito linear e negativo da razão solvente:biomassa, sugere que à medida que a quantidade de solvente aumenta, a extração diminui. Silveira e colaboradores (2007) otimizando o processo de extração da ficocianina de *S. platensis* pelo método convencional com diferentes solventes, mostraram que a razão solvente:biomassa influenciou fortemente no processo de extração do pigmento e que o valor máximo foi obtido usando a menor razão solvente:biomassa. Tal observação é importante por possibilitar o uso de menores volumes de solvente na extração. Entretanto, os autores também relataram que a utilização de uma razão solvente:biomassa muito baixa torna a

suspensão muito concentrada, impedindo que o solvente interaja com o soluto de maneira apropriada, tornando a extração ineficiente.

Conforme observado neste trabalho, o tipo e a concentração do solvente, o pH e a temperatura são fatores muito influentes nos processos de extração sólido-líquido (Patil e Raghavarao, 2007).

A Tabela 11 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o líquido iônico prótico 2-HEAA+2-HEAF como solvente. As Tabelas de ANOVA para os demais solventes empregados estão apresentadas no Apêndice A.

Tabela 11 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	3,2087	9	0,3565	28,82
Resíduo	0,0866	7	0,0124	
Falta de ajuste	3,2952	16	0,2060	
Erro puro	0,0855	5	0,0171	
Total	3,2952	16	0,2060	
R^2	0,97			
F_{tab}				F(9,7) = 3,68
Aloficocianina				
Regressão	3,5483	9	0,3943	12,90
Resíduo	0,2139	7	0,0306	
Falta de ajuste	3,7622	16	0,2351	
Erro puro	0,2132	5	0,0426	
Total	3,7622	16	0,2351	
R^2	0,94			
F_{tab}				F(9,7) = 3,68
Ficoeritrina				
Regressão	0,5120	9	0,0569	5,36
Resíduo	0,0743	7	0,0106	
Falta de ajuste (FA)	0,5863	16	0,0366	
Erro puro (EP)	0,0743	5	0,0149	
Total	0,5863	16	0,0366	
R^2	0,87			

F_{tab}
95% de confiança

F(9,7) = 3,68

(a) $F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$
Fonte: A autora (2016).

Através da ANOVA pode-se determinar a qualidade do ajuste do modelo. Em termos práticos, um bom modelo necessita ter uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa, com valores de F_{calc} maiores que os valores de F_{tab} . Outro parâmetro utilizado para avaliar o modelo é o valor de R^2 . Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente de variação estiver, melhor estará o ajuste do modelo às respostas observadas (Teófilo e Ferreira, 2006).

Para processos biológicos admite-se que valores de R^2 acima de 0,80 em um intervalo de confiança de 95%, são considerados bons (Bastos, 2013). De modo que os modelos para a extração das três ficobiliproteínas pelo método convencional foram significativos para todos os solventes analisados (APÊNDICE A, TABELA 11).

Os modelos de extração da ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina com o 2-HEAA+2-HEAF obedecem as Equações 11, 12 e 13:

$$C_{ficocianina} = -0,58pH^2 - 0,49T^2 + 0,27pHxT + 0,13pHxRazão\ s:b - 0,07TxRazão\ s:b + 0,57pH - 0,32T - 0,23Razão\ s:b + 1,26 \quad (11)$$

$$C_{aloficocianina} = -0,43pH^2 - 0,23T^2 + 0,18pHxT + 0,23pHxRazão\ s:b - 0,14TxRazão\ s:b + 0,67pH - 0,53T - 0,26Razão\ s:b + 1,11 \quad (12)$$

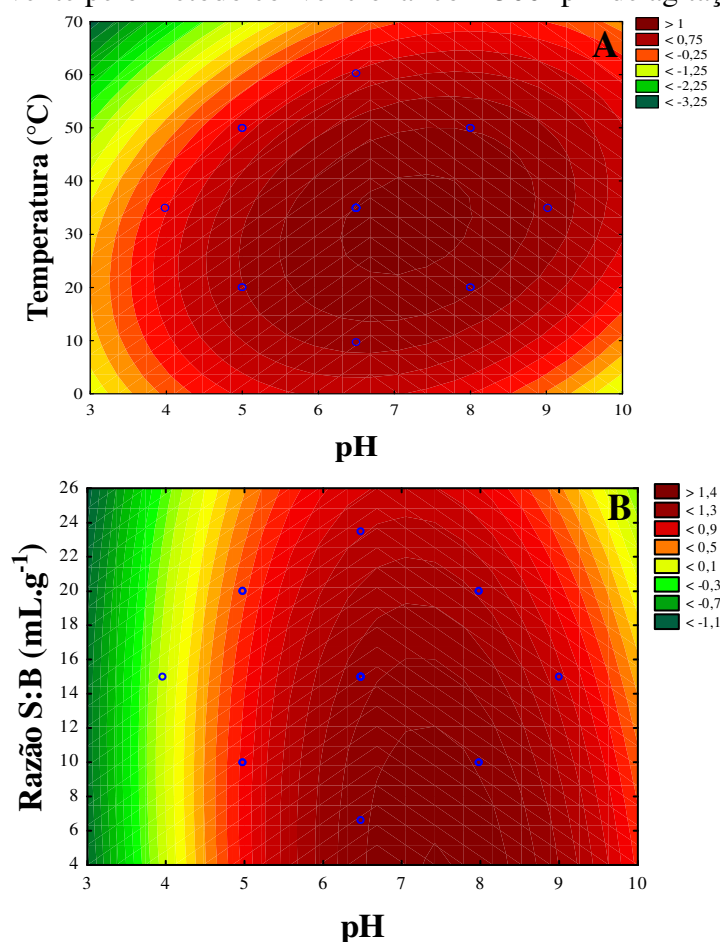
$$C_{ficoeritrina} = -0,13pH^2 - 0,11T^2 - 0,03Razão\ s:b^2 + 0,09pHxT + 0,20pHxRazão\ s:b - 0,15TxRazão\ s:b + 0,20pH - 0,17T - 0,14Razão\ s:b + 0,40 \quad (13)$$

Sendo: T a temperatura (°C) e razão s:b a razão de solvente (mL) em relação à biomassa (g).

A Figura 14 apresenta as superfícies de contorno obtidas do modelo para a concentração de ficocianina utilizando o solvente 2-HEAA+2-HEAF, a região ótima está compreendida no intervalo de pH de 6,50 a 8,00; de 25 °C a 40 °C e valores de razão solvente:biomassa abaixo de 10,00 mL.g⁻¹. A partir do conhecimento do ponto isoelétrico (pI) de dada proteína é possível determinar em que valores de pH ela estará carregada positivamente ou negativamente. Sabe-se que a solubilidade das proteínas é

reduzida em valores de pH próximos ao seu ponto isoelétrico (pI) e que acima do pI as proteínas assumem cargas negativas que “atraem” os solventes aquosos, aumentando sua extração (Su *et al.*, 2014). Segundo Liu e Pawliszyn (2005), o pI da ficocianina é 4,65, confirmando que a faixa de pH ótima para a extração deste pigmento deve estar situada entre 6,00 e 7,50.

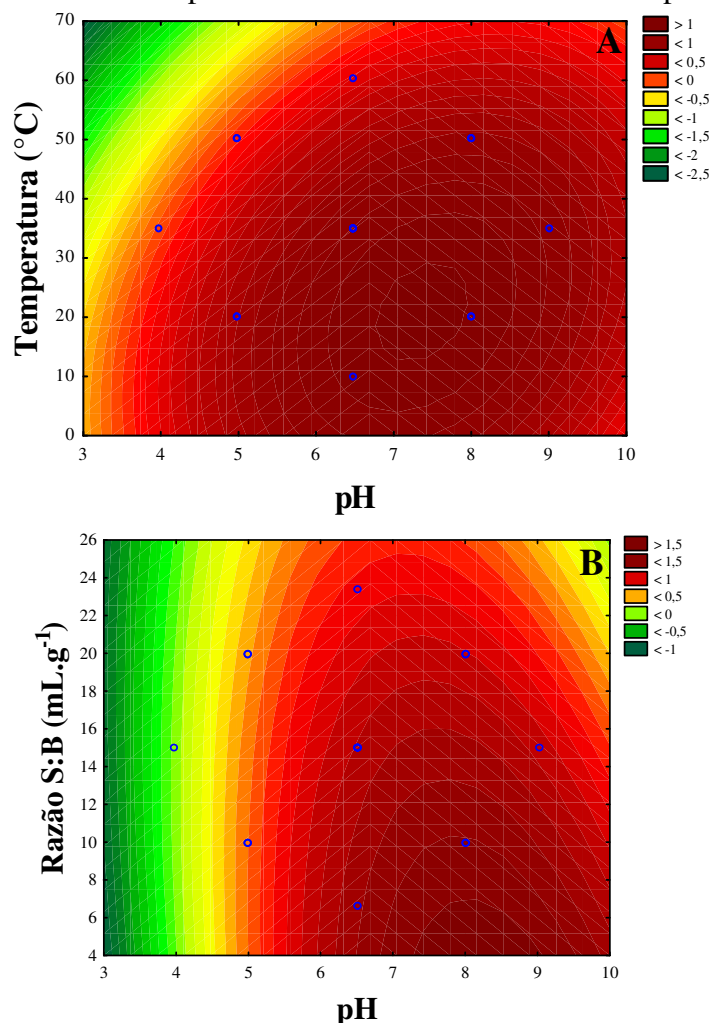
Figura 14 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura, fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa, fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional com 500 rpm de agitação



Fonte: A autora (2016).

As superfícies de contorno revelaram que a região ótima de extração de aloficocianina está compreendida na faixa de pH de 7,00 a 8,00; $15 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e em valores de razão solvente:biomassa abaixo de $6,00 \text{ mL.g}^{-1}$ (FIGURA 15).

Figura 15 - Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura, fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa, fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAA+HEAF como solvente pelo método convencional com 500 rpm de agitação

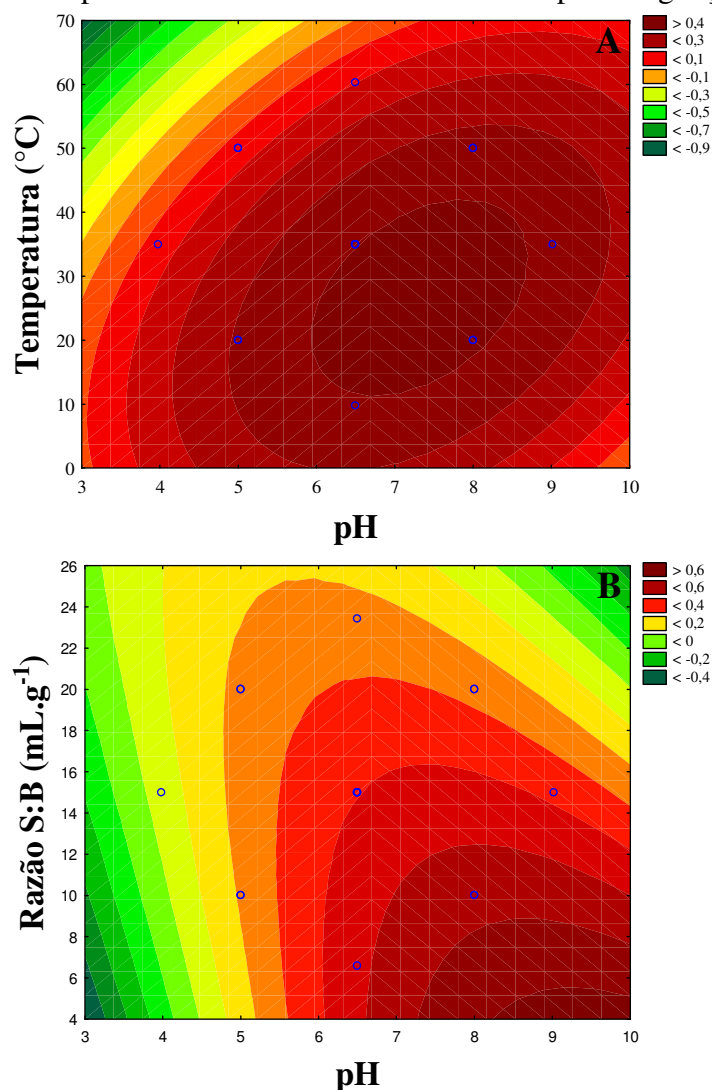


Fonte: A autora (2016).

As superfícies de contorno apontaram que a região ótima de extração da ficoeritrina está situada em valores de pH entre 6,00 e 8,50; temperaturas entre $15 \text{ }^\circ\text{C}$ e $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e razão solvente:biomassa abaixo de 6 mL.g^{-1} (FIGURA 16). De um modo geral, as condições ótimas observadas no estudo estavam condizentes com as obtidas nas superfícies de contorno.

As superfícies de contorno para os demais solventes utilizados na extração convencional estão apresentadas no Apêndice A.

Figura 16 – Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura, fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa, fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente pelo método convencional com 500 rpm de agitação



Fonte: A autora (2016).

Em suma, na extração pelo método convencional, os líquidos iônicos próticos foram mais eficientes que o tampão fosfato na extração da ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. O baixo desempenho do tampão era previsível uma vez que ele apresenta menor força iônica dentre os solventes testados.

A eficiência da extração com LIs, geralmente, é ampliada com o decréscimo da hidrofobicidade dos cátions e com o crescimento da força das ligações de hidrogênio do ânion (Ge *et al.*, 2010). O mecanismo pelo qual os LIs extraem proteínas não está bem esclarecido. Entretanto, alguns estudos indicam que a combinação dos efeitos de interações hidrofóbicas, *salting out* e interações eletrostáticas entre a carga positiva do

cátion do LI com a carga negativa dos resíduos de aminoácido na superfície da proteína podem estar envolvidas neste processo (Desai *et al.*, 2014).

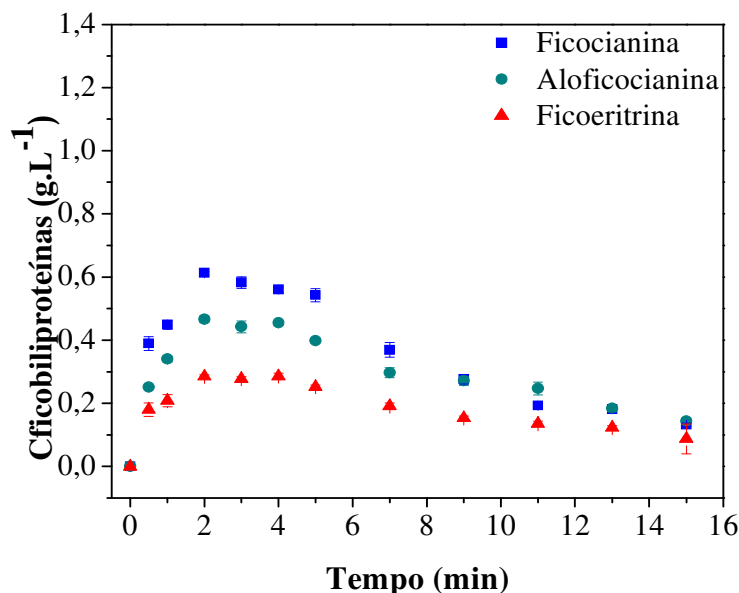
Com base no exposto, as condições mais adequadas para a extração de ficobiliproteínas pelo método convencional foram: temperatura de 35 °C; pH: 6,50 e razão solvente:biomassa: 6,59 mL.g⁻¹, utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente, após 150 minutos de extração. As concentrações máximas de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram: 1,65 ± 0,03 g.L⁻¹; 1,70 ± 0,01 g.L⁻¹; 0,64 ± 0,04 g.L⁻¹, respectivamente.

5.2.2 Extração assistida por micro-ondas

Na extração assistida por micro-ondas, foram realizados testes iniciais utilizando o 2-HEAF em pH 7,0 para verificar a eficiência deste solvente, além da influência do tempo, da potência do equipamento e da razão solvente:biomassa sobre a extração das ficobiliproteínas da *S. platensis*. Inicialmente, o tempo de extração variou de 0 a 15 minutos, a potência do equipamento de 62 a 186 W e a razão solvente:biomassa de 10 a 20 mL.g⁻¹. Os resultados são expostos nas Figuras 17, 18 e 19.

Neste processo, a ficocianina foi extraída em maior quantidade, seguida da aloficocianina e ficoeritrina. A extração assistida por micro-ondas foi rápida, as maiores concentrações de ficobiliproteínas foram atingidas após 2 minutos de reação. Durante a exposição às micro-ondas ocorre intenso aquecimento dos materiais, fazendo com que a extração dos pigmentos se processe mais rapidamente. A partir deste ponto, com o aumento do tempo houve redução na extração dos pigmentos. As máximas concentrações obtidas foram 0,65 g.L⁻¹ de ficocianina; 0,45 g.L⁻¹ de aloficocianina e 0,25 g.L⁻¹ de ficoeritrina (FIGURA 17).

Figura 17 – Influência do tempo na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando o líquido iônico 2-HEAF como solvente (potência: 62 W e razão solvente:biomassa:10 mL.g⁻¹). (■) ficocianina (●) aloficocianina (▲) ficoeritrina



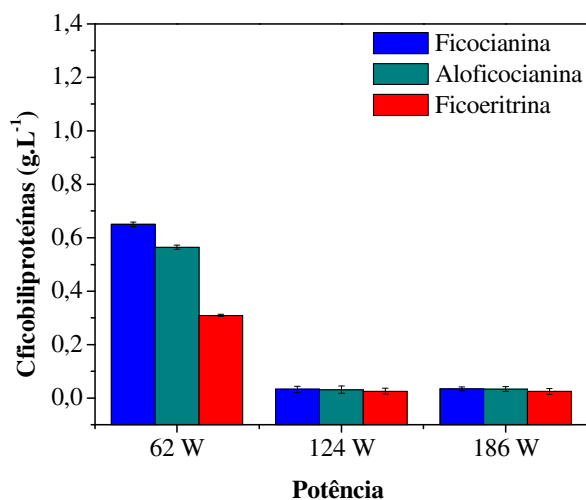
Fonte: A autora (2016).

Com base na cinética apresentada na Figura 17, o tempo de extração foi fixado em 2 min e o efeito da potência ou irradiação sobre a extração de ficobiliproteínas também foi investigado.

O aumento da potência afetou negativamente o processo de extração. Os maiores valores de concentração foram observados em 62 W. Nessa potência, mais ficocianina foi extraída em relação aos demais pigmentos. Nas potências 124 W e 186 W praticamente não houve diferenciação nas quantidades de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina obtidas (FIGURA 18).

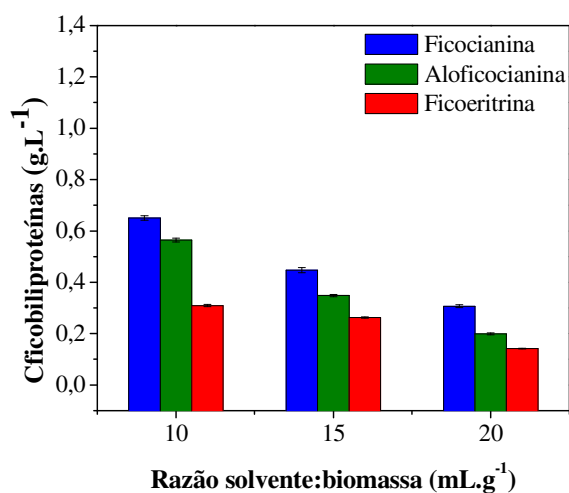
Posteriormente, foram fixados o tempo e a potência para verificar o quanto o percentual de solvente em relação à biomassa afeta o processo de extração. De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, quanto menor a razão solvente:biomassa, melhor a extração de ficobiliproteínas.

Figura 18 – Influência da potência na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando o líquido iônico 2-HEAF como solvente (tempo: 2 min e razão solvente:biomassa: 10 mL.g⁻¹)



Fonte: A autora (2016).

Figura 19 – Influência da razão solvente:biomassa (mL.g⁻¹) na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando o líquido iônico 2-HEAF como solvente (tempo: 2 min e potência: 62 W)



Fonte: A autora (2016).

De posse dos resultados acima, um DCCR 2² foi executado variando-se a potência e a razão solvente:biomassa (mL.g⁻¹) para cada solvente do estudo.

Na Tabela 12 são apresentados os valores de concentração observados experimentalmente para a extração da ficocianina.

Tabela 12 – Valores observados de ficocianina (g.L^{-1}) obtidos no processo de extração assistida por micro-ondas usando diferentes solventes após 2 min de processo

Ensaio	P (W)	Razão s:b (mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF	[Bmim][Cl]
1	62	10	0,37	0,44	0,29	0,84	0,29
2	62	20	0,26	0,33	0,28	0,66	0,19
3	186	10	0,04	0,03	0,11	0,03	0,36
4	186	20	0,02	0,02	0,03	0,02	0,16
5	0	15	0,30	0,39	0,23	0,73	0,17
6	248	15	0,03	0,01	0,01	0,01	0,34
7	124	8	0,05	0,03	0,02	0,06	0,24
8	124	22	0,06	0,14	0,08	0,46	0,16
9	124	15	0,05	0,07	0,03	0,29	0,24
10	124	15	0,05	0,07	0,03	0,26	0,19
11	124	15	0,05	0,06	0,03	0,28	0,18

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

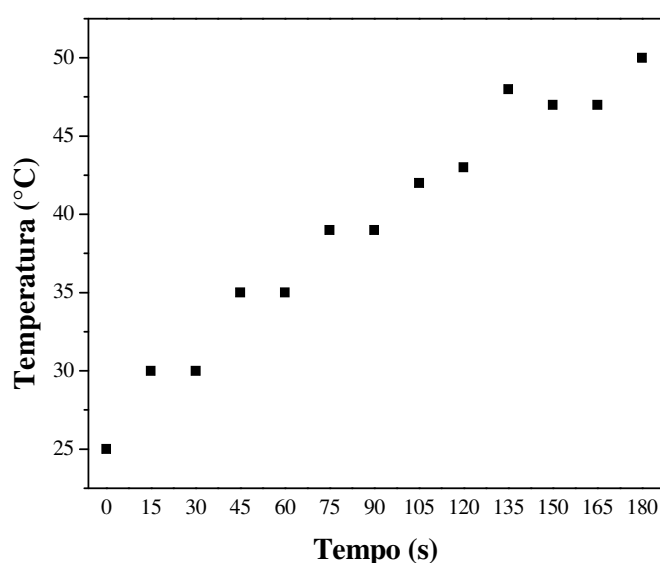
Fonte: A autora (2016).

De acordo com a Tabela 12, a extração foi negativamente afetada pelo aumento da potência e da razão solvente:biomassa e todos os solventes foram capazes de extrair o pigmento. Os líquidos iônicos próticos e o tampão apresentaram melhor desempenho nas condições do ensaio 1, 62 W e 10 mL.g^{-1} de solvente em relação à biomassa. Por sua vez, o LI comercial foi mais eficiente nas condições do ensaio 3, no qual maior potência foi empregada (186 W), mantendo-se a razão solvente:biomassa em 10 mL.g^{-1} . Uma irradiação mais forte pode ter auxiliado na difusão do [Bmim][Cl] no soluto, pela redução da sua viscosidade. As condições do ensaio 6 (248 W e 15 mL.g^{-1}) foram as mais drásticas para a extração deste pigmento para todos os solventes, exceto para o [Bmim][Cl]. Para um dado valor de potência, quanto menor a razão solvente:biomassa, menor a concentração do pigmento. Medindo-se a temperatura ao final do processo de extração, verificou-se que mantendo a potência em 124 W, a massa de microalga em 2 g e variando-se o volume do solvente em 16 mL, 30 mL e 44 mL as temperaturas atingidas foram $75 \text{ }^\circ\text{C}$, $68 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Quanto menor a

razão solvente:biomassa, maior o aquecimento provocado pelas micro-ondas, e, portanto, maior a desnaturação térmica.

Analisando a Figura 20, verifica-se que a temperatura aumentou com o tempo de extração. Tal acréscimo na temperatura apesar de proporcionar maior interação soluto – solvente, aumentando a difusão e a solubilidade pode promover a desnaturação dos mesmos.

Figura 20 – Variação da temperatura com o tempo de extração utilizando o líquido iônico 2-HEAA+2-HEAF como solvente, na razão s:b 10 mL.g⁻¹ e 62 W de potência



Fonte: A autora (2016).

As concentrações de aloficocianina obtidas estão expostas na Tabela 13. Fixando a potência em 62 W, à medida que a razão solvente:biomassa aumenta, a concentração diminui porque uma menor interação entre o soluto e o solvente é observada. Na potência de 124 W e 186 W, quanto maior a razão, maior a concentração. Fixando-se a razão e aumentando a potência, a taxa de extração declina. Os LIPs e o tampão, apresentaram melhor desempenho nas condições moderadas do ensaio 1, e o LI comercial nas do ensaio 3. Como mencionado anteriormente, o aumento da potência da irradiação melhorou a extração com o [Bmim][Cl] provavelmente por ter reduzido sua viscosidade, aumentando a interação da microalga com o solvente.

Tabela 13 – Valores observados de aloficocianina (g.L^{-1}) obtidos no processo de extração assistida por micro-ondas usando diferentes solventes após 2 min de processo

Ensaio	P (W)	Razão s:b (mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF	[Bmim][Cl]
1	62	10	0,25	0,71	0,29	1,33	0,03
2	62	20	0,19	0,35	0,21	0,82	0,02
3	186	10	0,03	0,02	0,02	0,05	0,13
4	186	20	0,02	0,01	0,01	0,02	0,05
5	0	15	0,20	0,41	0,25	0,82	0,03
6	248	15	0,02	0,01	0,01	0,02	0,13
7	124	8	0,04	0,05	0,02	0,06	0,10
8	124	22	0,04	0,19	0,10	0,61	0,08
9	124	15	0,04	0,11	0,02	0,30	0,11
10	124	15	0,04	0,09	0,02	0,28	0,10
11	124	15	0,04	0,10	0,03	0,29	0,08

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Na extração de ficoeritrina, foi observada uma tendência muito similar à da aloficocianina. Novamente, as condições do ensaio 1 (62 W e 10 mL.g^{-1}) foram as mais favoráveis para a extração do pigmento. Em contrapartida, as condições do ensaio 6 (248 W e 15 mL.g^{-1}) foram as mais prejudiciais. Sinalizando a importância da potência no processo de extração.

Tabela 14 – Valores observados de ficoeritrina (g.L^{-1}) obtidos no processo de extração assistida por micro-ondas usando diferentes solventes após 2 min de processo

Ensaio	P (W)	Razão s:b(mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF	[Bmim][Cl]
1	62	10	0,10	0,12	0,12	0,41	0,06
2	62	20	0,08	0,08	0,08	0,28	0,04
3	186	10	0,01	0,01	0,01	0,02	0,09
4	186	20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04

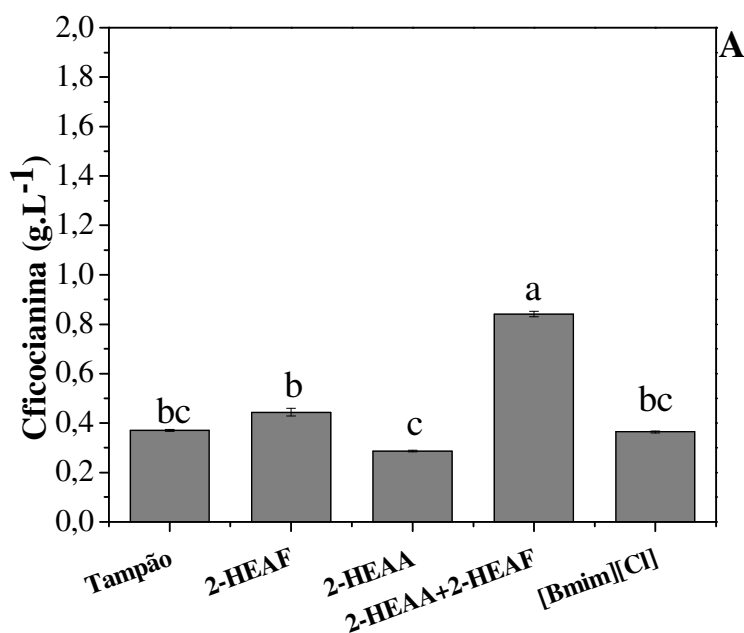
5	0	15	0,08	0,09	0,09	0,31	0,04
6	248	15	0,01	0,00	0,00	0,01	0,09
7	124	8	0,02	0,01	0,01	0,02	0,07
8	124	22	0,01	0,04	0,04	0,13	0,05
9	124	15	0,02	0,02	0,01	0,08	0,07
10	124	15	0,02	0,01	0,01	0,08	0,05
11	124	15	0,02	0,01	0,01	0,09	0,05

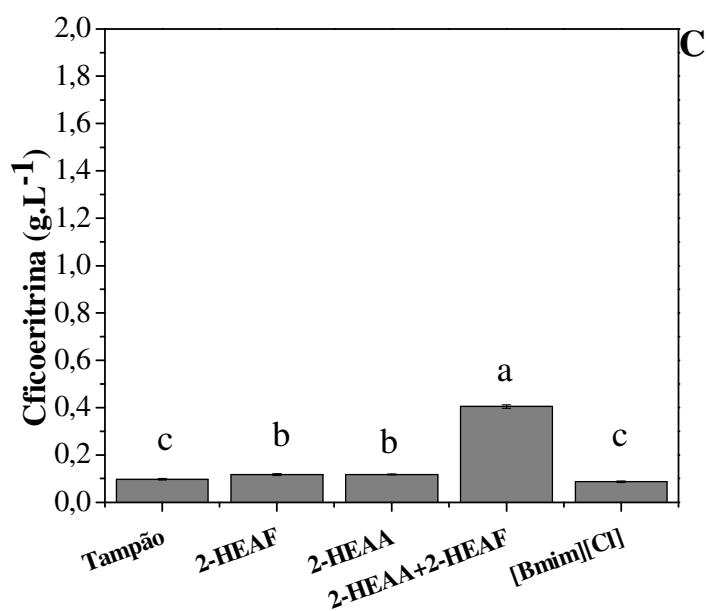
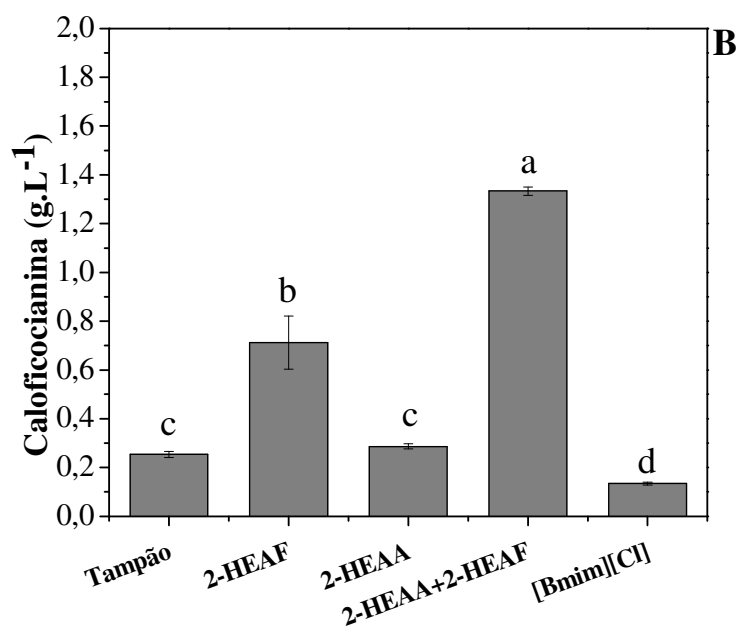
(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Na Figura 21 é apresentada a influência do solvente nas concentrações máximas de ficobiliproteínas obtidas pela extração assistida por micro-ondas.

Figura 21 – Influência do solvente nas concentrações máximas de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) empregando micro-ondas nas seguintes condições: 186 W e 10 mL.g⁻¹ para o [Bmim][Cl]; 62 W e 10 mL.g⁻¹ para os demais solventes. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$)





Fonte: A autora (2016).

Dentre os LIPs, o mais eficiente na extração de ficocianina foi o 2-HEAA+2-HEAF ($0,84 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$) e o menos eficiente, o 2-HEAA ($0,29 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$). O desempenho do LI aprótico (comercial) foi semelhante ao do tampão ($0,36 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,37 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) não havendo diferença nos valores de concentração obtidos por eles ao nível de 95%. Para a extração de ficocianina os solventes extratores podem ser ordenados, de acordo com sua eficiência, da seguinte forma: 2-HEAA+2-HEAF > 2-HEAF > tampão > [Bmim][Cl] > 2-HEAA.

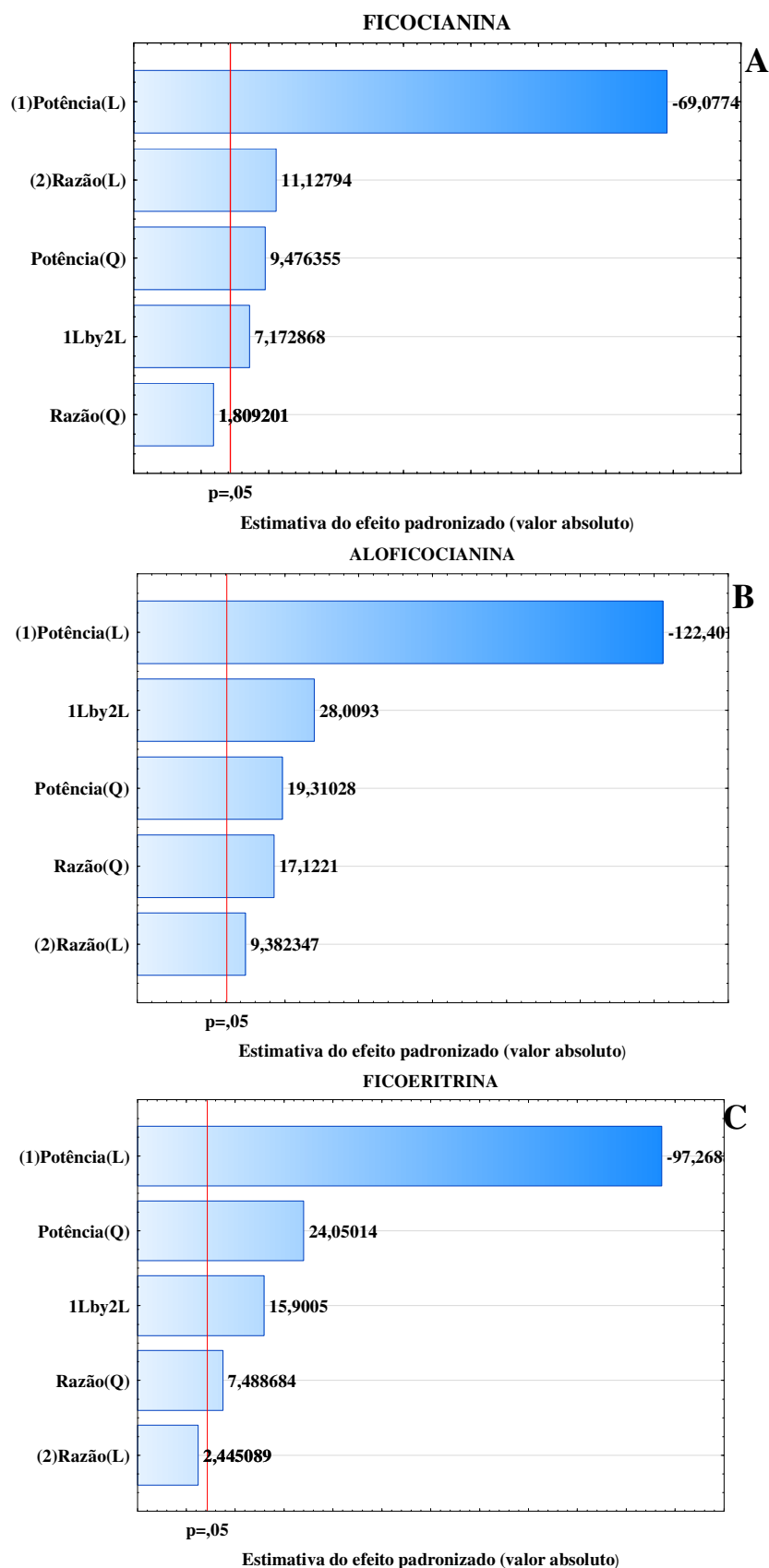
Os solventes mais eficientes na extração de aloficocianina foram os LIPs (2-HEAA+2-HEAF>2-HEAF>2-HEAA), seguidos do tampão e do [Bmim][Cl], nessa ordem. Não houve diferença significativa nas concentrações de aloficocianina obtidas com o tampão e com o 2-HEAA ($p<0,05$). O menor rendimento do 2-HEAA pode estar associado à sua maior viscosidade em relação aos demais LIPs, o que dificulta a transferência de massa entre o soluto e o solvente, reduzindo a liberação dos pigmentos neste solvente (Mustafa e Turner, 2011). Além disso, o aumento de temperatura, provocado pelo aumento da irradiação, pode ter alterado as propriedades coligativas desse LIP, contribuindo para o seu baixo desempenho.

Os LIPs foram os mais eficientes na extração de ficoeritrina, dentre eles o que mais se destacou foi o 2-HEAA+2-HEAF ($0,41 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$), 2-HEAF e 2-HEAA extraíram as mesmas quantidades de ficoeritrina ($0,12 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$). Também não houve diferença estatística na extração com o tampão e com o líquido iônico aprótico ($0,10 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,09 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente). Os LIPs apresentam um próton ionizável o que facilita muito sua interação com as ficobiliproteínas e com a parede celular da microalga, por isso apresentam desempenho superior ao tampão e ao [Bmim][Cl]. Ademais, o custo médio de produção de 1 L de 2-HEAF, levando-se em conta apenas o valor dos reagentes empregados, é de, aproximadamente, R\$ 30,00. Em contrapartida, 250 g de [Bmim][Cl] custam R\$ 2.638,00 (SIGMA ALDRICH). O que comprova a superioridade dos LIPs em relação aos demais solventes utilizados no estudo.

No corpo do texto só serão apresentados os dados estatísticos referentes ao 2-HEAA+2-HEAF, que foi o solvente mais eficiente. Os resultados para os demais solventes empregados na extração assistida por micro-ondas podem ser encontrados no Apêndice B.

Analisando o diagrama de Pareto mostrado na Figura 22.A, confirmou-se que a potência foi a variável mais influente no processo de extração da ficocianina, e que seu efeito linear e negativo pH (L) (-69,08) sinaliza que a concentração será maior quanto menor o valor da potência. O efeito linear e positivo da razão solvente:biomassa (11,13) indica que a taxa de extração é crescente com o aumento dessa variável, o que está diretamente relacionado com o efeito do aquecimento mencionado anteriormente.

Figura 22 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na extração assistida por micro-ondas de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente



Fonte: A autora (2016).

Na extração de alofococianina, o efeito linear e negativo da potência novamente foi o mais significativo (-122,40), acompanhado da interação entre potência e razão solvente:biomassa (28,01). Indicando que a concentração de alofococianina é tanto maior quanto menor a potência utilizada (FIGURA 22.B). Pasquet *et al.* (2011), comparando diferentes métodos para obter pigmentos de duas microalgas marinhas (*Dunaliella tertiolecta* e *Cylindrotheca closterium*), observaram que o método assistido por micro-ondas foi o mais rápido e eficiente, em períodos de tempo curtos (≤ 5 min) sob irradiação fraca (≤ 50 W). Tais resultados corroboram com os obtidos neste trabalho. As maiores concentrações de ficobiliproteínas foram observadas na potência de 62 W (potência mínima do equipamento), sugerindo que se a potência pudesse ser diminuída ainda mais, provavelmente, maiores rendimentos seriam alcançados.

Potência foi a variável que mais influenciou no processo de extração da ficoeritrina (FIGURA 22.C). O efeito linear e negativo da potência foi o mais significativo (-97,27), indicando que à medida que a potência cresce, a concentração diminui.

A análise de variância é apresentada na Tabela 15. Os modelos para a extração de ficocianina, alofococianina e ficoeritrina com o 2-HEAA+2-HEAF não apresentaram bom ajuste nas faixas empregadas para as variáveis do estudo, o que pode ser verificado pelos baixos valores de R^2 e F_{calc} . Dessa maneira, não é possível descrever equações para os modelos tampouco obter suas superfícies de contorno.

Tabela 15 – ANOVA para o modelo de extração assistida por micro-ondas de ficocianina, alofococianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,7345	5	0,1469	4,01
Resíduo	0,1831	5	0,0366	
Falta de ajuste	0,9175	10	0,0918	
Erro puro	0,1828	3	0,0609	
Total	0,9175	10	0,0918	
R^2	0,61			
F_{tab}				F(5,5) =5,05
Alofococianina				
Regressão	1,2390	5	0,2478	2,09
Resíduo	0,5926	5	0,1185	

Falta de ajuste	1,8315	10	0,1832	
Erro puro	0,5924	3	0,1975	
Total	1,8315	10	0,1832	
R ²	0,68			
F_{tab}				F(5,5) =5,05
<hr/>				
Ficoeritrina				
Regressão	0,1461	5	0,0292	3,10
Resíduo	0,0471	5	0,0094	
Falta de ajuste (FA)	0,1932	10	0,0193	
Erro puro (EP)	0,0471	3	0,0157	
Total	0,1932	10	0,0193	
R ²	0,76			
F_{tab}				F(5,5) =5,05
<hr/>				
95% de confiança				

(a) $F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$
 Fonte: A autora (2016).

Então, na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas, o solvente que apresentou melhor desempenho foi a mistura 2-HEAA+2-HEAF em pH 7,0, na potência de 62 W e razão solvente:biomassa: 10 mL.g⁻¹. A extração por este método é muito rápida, após 2 minutos a concentração máxima é atingida. Das variáveis estudadas, a potência teve o efeito mais significativo. A aloficocianina foi o pigmento mais extraído ($1,33 \pm 0,02$ g.L⁻¹), seguido da ficocianina ($0,84 \pm 0,01$ g.L⁻¹) e da ficoeritrina ($0,41 \pm 0,00$ g.L⁻¹).

5.2.3 Extração assistida por ultrassom

Na extração assistida por ultrassom, os valores de concentração de ficocianina obtidos experimentalmente são apresentados na Tabela 16. Todos os LIPs extraíram mais ficocianina nas condições do ensaio 7 (pH 6,5 e razão solvente:biomassa 7,93 mL.g⁻¹). O tampão foi mais efetivo em pH 8,0 e razão 10 mL.g⁻¹ e o LI comercial conseguiu extrair melhor em pH ácido (4,38) e razão solvente:biomassa intermediária (15 mL.g⁻¹).

Tabela 16 – Valores observados de ficocianina (g.L^{-1}) na extração assistida por ultrassom usando diferentes solventes após 30 min de processo

Ensaio	pH	Razão s:b (mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF	[Bmim][Cl]
1	5	10	0,37	0,30	0,20	0,30	0,27
2	5	20	0,17	0,16	0,12	0,12	0,25
3	8	10	0,70	0,67	0,30	0,69	0,16
4	8	20	0,43	0,25	0,24	0,31	0,15
5	4,38	15	0,24	0,06	0,03	0,03	0,36
6	8,62	15	0,43	0,31	0,47	0,57	0,09
7	6,5	7,93	0,60	0,73	0,68	0,75	0,23
8	6,5	22,07	0,27	0,27	0,28	0,36	0,16
9	6,5	15	0,41	0,38	0,33	0,53	0,26
10	6,5	15	0,47	0,37	0,32	0,52	0,22
11	6,5	15	0,50	0,34	0,35	0,51	0,29

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Analisando os valores obtidos para extração de aloficocianina, percebeu-se que os LIPs foram mais eficientes em relação ao tampão e ao [Bmim][Cl]. A extração de aloficocianina foi mais efetiva para os LIPs nas condições do ensaio 7 (pH 6,5 e razão solvente:biomassa $7,93 \text{ mL.g}^{-1}$), para o tampão a melhor condição foi pH 8,0 e razão 10 mL.g^{-1} e para o LI comercial em pH 4,38 e razão solvente:biomassa 15 mL.g^{-1} . Pouca variação foi verificada no desempenho dos LIPs na extração de aloficocianina em comparação à ficocianina, ou seja, estes solventes foram capazes de extrair praticamente as mesmas quantidades de aloficocianina e ficocianina. Por sua vez, o tampão e o [Bmim][Cl] extraíram muito menos aloficocianina do que ficocianina. Esse resultado demonstra o maior poder difusional e a maior interação dos LIPs com os pigmentos.

Tabela 17 – Valores observados de aloficocianina (g.L^{-1}) na extração assistida por ultrassom usando diferentes solventes após 30 min de processo

Ensaio	pH	Razão s:b (mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF	[Bmim][Cl]
1	5	10	0,21	0,41	0,10	0,35	0,17
2	5	20	0,07	0,19	0,04	0,06	0,11
3	8	10	0,54	0,64	0,42	0,82	0,08
4	8	20	0,20	0,19	0,15	0,32	0,03
5	4,38	15	0,10	0,07	0,02	0,02	0,18
6	8,62	15	0,24	0,25	0,74	0,67	0,07
7	6,5	7,93	0,27	0,77	0,74	0,80	0,05
8	6,5	22,07	0,07	0,21	0,31	0,31	0,05
9	6,5	15	0,18	0,36	0,42	0,54	0,10
10	6,5	15	0,22	0,36	0,44	0,54	0,10
11	6,5	15	0,27	0,30	0,44	0,59	0,11

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Pela Tabela 18, na qual são expostos os valores observados para a extração de ficoeritrina, notou-se que este pigmento foi extraído em quantidades inferiores em relação à ficocianina e à aloficocianina para todos os solventes utilizados. O que já era esperado, uma vez que em microalgas verde-azuladas, como a *S. platensis*, este pigmento está naturalmente presente em menores quantidades, sendo mais abundante em algas vermelhas (Johnson *et al.*, 2014).

As condições ótimas de extração para o tampão, LIPs e [Bmim][Cl] foram: pH 8,0 e razão solvente:biomassa 10 mL.g^{-1} ; pH 6,5 e razão solvente:biomassa $7,93 \text{ mL.g}^{-1}$ e pH 4,38 e razão solvente:biomassa 15 mL.g^{-1} , respectivamente.

Tabela 18 – Valores observados de ficoeritrina (g.L^{-1}) na extração assistida por ultrassom usando diferentes solventes após 30 min de processo

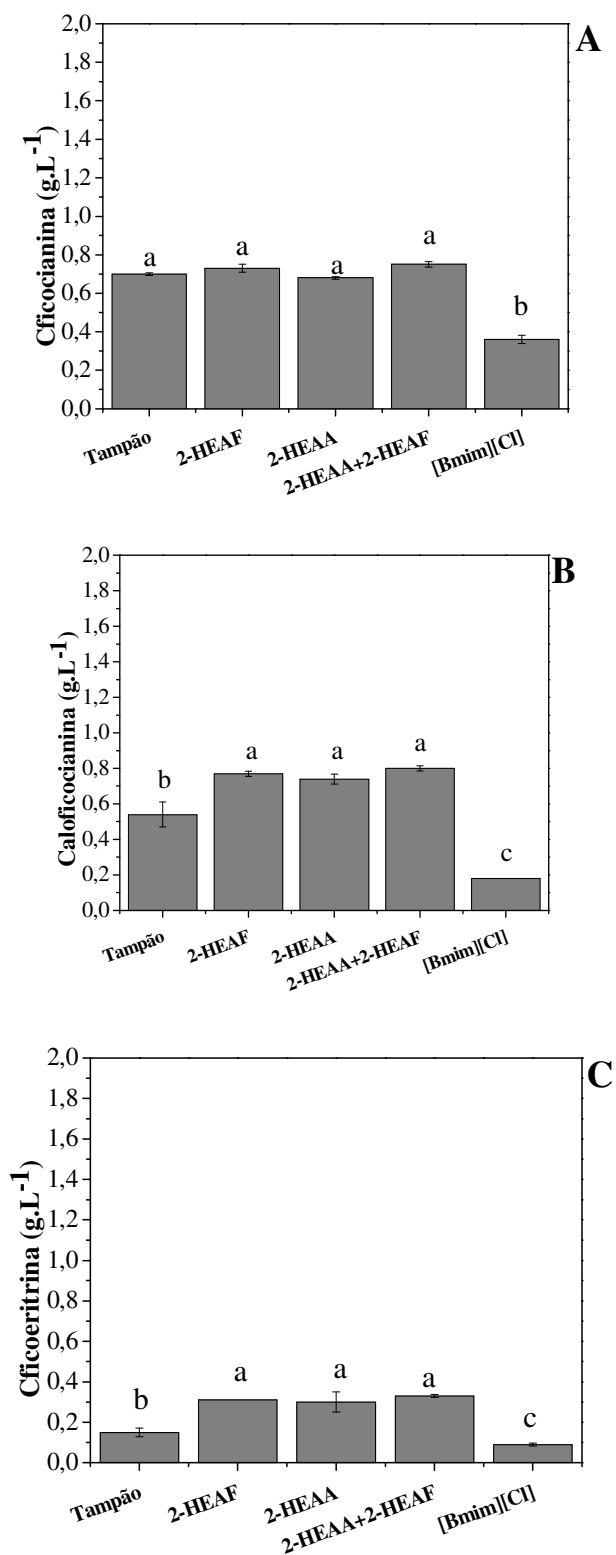
Ensaio	pH	Razão s:b (mL.g^{-1})	Tampão	2-HEAF	2-HEAA	2-HEAA+ 2-HEAF	[Bmim][Cl]
1	5	10	0,06	0,17	0,05	0,12	0,05
2	5	20	0,02	0,09	0,03	0,03	0,04
3	8	10	0,15	0,27	0,19	0,34	0,03
4	8	20	0,04	0,08	0,07	0,10	0,02
5	4,38	15	0,03	0,03	0,01	0,01	0,09
6	8,62	15	0,06	0,10	0,26	0,30	0,05
7	6,5	7,93	0,06	0,31	0,30	0,33	0,04
8	6,5	22,07	0,01	0,07	0,13	0,13	0,03
9	6,5	15	0,04	0,12	0,20	0,21	0,06
10	6,5	15	0,04	0,11	0,22	0,23	0,06
11	6,5	15	0,05	0,12	0,21	0,26	0,06

(*) Em negrito, os maiores valores de concentração observados.

Fonte: A autora (2016).

Pela Figura 23.A percebe-se que estatisticamente não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os desempenhos dos líquidos iônicos próticos e do tampão na obtenção de ficocianina, embora a maior concentração tenha sido obtida com a mistura 2-HEAA+2-HEAF ($0,75 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$). O [Bmim][Cl] foi o solvente menos eficiente, tendo extraído $0,36 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de ficocianina. A macroestrutura das ficobilissomas, estrutura que encerra as ficobiliproteínas, consiste de um núcleo (constituído de aloficocianina) cercado de ficocianina e ficoeritrina organizadas na periferia da estrutura na forma de hastes (Zolla *et al.*, 2002). Isso explica o porquê do tampão ter conseguido extrair praticamente as mesmas quantidades de ficocianina que os LIPs. A ficocianina está mais disponível e, portanto, é mais fácil extraí-la do que a aloficocianina que está localizada no interior da estrutura. Ademais, como será apresentado posteriormente (MEV), o ultrassom interferiu muito pouco na estrutura da célula microalgácea, o que pode ter dificultado a liberação da aloficocianina nos solventes.

Figura 23 – Influência do solvente nas concentrações máximas de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) empregando ultrassom nas seguintes condições: pH 8,0 e razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹ para o tampão; pH 6,5 e razão solvente:biomassa 7,93 mL.g⁻¹ para os LIPs e pH 4,38 e razão solvente:biomassa 15 mL.g⁻¹ para o [Bmim][Cl]. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$)



Fonte: A autora (2016).

Na Figura 23.B é possível comparar melhor o desempenho de cada solvente na obtenção de aloficocianina. Novamente, o 2-HEAA+2-HEAF foi superior ($0,80 \text{ g.L}^{-1}$), embora não tenha havido diferença significativa, ao nível de 95%, em relação aos demais LIPs. O tampão conseguiu extrair $0,54 \text{ g.L}^{-1}$ e o [Bmim][Cl], apenas $0,18 \text{ g.L}^{-1}$ de aloficocianina.

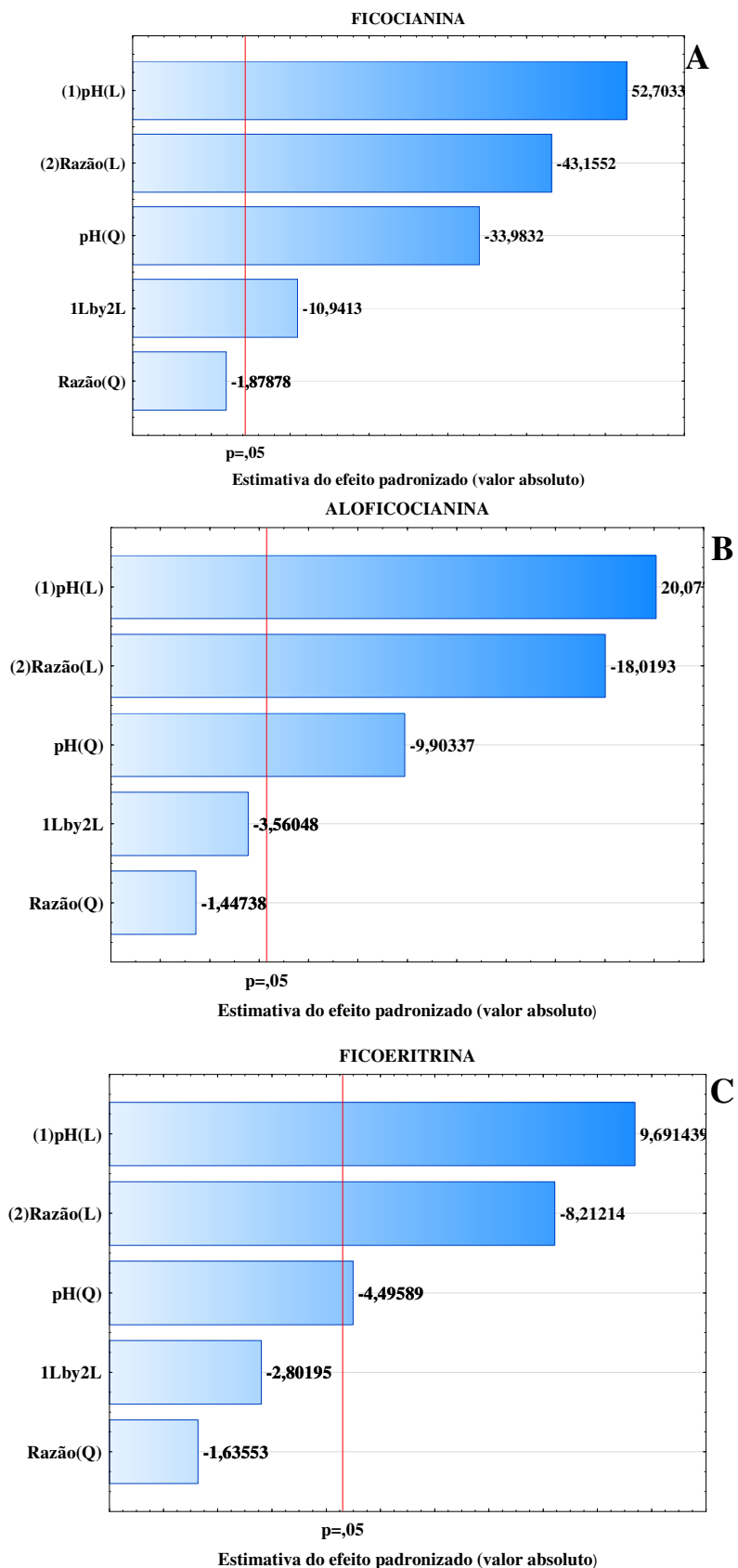
Observando o desempenho dos solventes na extração de ficoeritrina, não houve diferença considerável, ao nível de 95%, entre os 3 líquidos iônicos próticos. Os solventes podem ser ordenados da maior para a menor concentração de ficoeritrina extraída da seguinte forma: 2-HEAA+2-HEAF ($0,33 \text{ g.L}^{-1}$) \geq 2-HEAF ($0,31 \text{ g.L}^{-1}$) \geq 2-HEAA ($0,30 \text{ g.L}^{-1}$) $>$ Tampão ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) $>$ [Bmim][Cl] ($0,09 \text{ g.L}^{-1}$) (FIGURA 23.C).

Para Elgharbawya *et al.* (2016), cátion e ânion são igualmente importantes para o desempenho dos líquidos iônicos. A basicidade do ânion tem correlação com sua capacidade em formar ligações de hidrogênio. Quanto maior a cadeia do ânion, menor sua habilidade em formar pontes de H^+ e menor a solubilidade da molécula alvo no LI. Já a estrutura e tamanho do cátion determinam o ponto de fusão e a polarizabilidade dos LIs, influenciando diretamente na solubilização das proteínas. Araki *et al.* (2015) observaram que a inserção de grupamentos hidroxila, éter ou amida aos LIs aumentam sua afinidade por proteínas. Isto ajuda a explicar o porquê do melhor desempenho do 2-HEAA+2-HEAF frente ao 2-HEAA e 2-HEAF.

A baixa eficiência do [Bmim][Cl] deve estar ligada à sua elevada viscosidade e à hidrofobicidade associada à planaridade do anel do cátion imidazólio (que promove um menor efeito estérico) que parecem ser importantes para o aumento da toxicidade dos líquidos iônicos. Estes parâmetros favorecem as interações dos líquidos iônicos com as proteínas, provocando sua desnaturação (Hernández-Fernández *et al.*, 2015).

O diagrama de Pareto para a extração das ficobiliproteínas usando o 2-HEAA+2-HEAF é apresentado na Figura 24.

Figura 24 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na extração assistida por ultrassom de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente



Fonte: A autora (2016).

O pH foi a variável mais relevante na extração assistida por ultrassom de ficocianina, utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente; seu efeito linear e positivo (52,70) sinaliza que a extração será crescente com o aumento do pH do meio. A razão solvente:biomassa apresentou efeito linear e negativo (-43,15), isto é, quanto maior a razão solvente:biomassa, menor a extração de ficocianina (FIGURA 24.A). Ademais, a ficocianina é instável em pH acima de 9,0 (Su *et al.*, 2014).

Assim como na extração de ficocianina, o pH foi a variável mais significativa para o processo de extração da aloficocianina (20,07), utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente, seguido do efeito linear e negativo da razão solvente:biomassa (-18,02) e do efeito quadrático e negativo do pH (-9,90). A interação entre pH e razão solvente:biomassa e o efeito quadrático da razão solvente:biomassa não foram significativos para a extração, no intervalo de confiança avaliado (FIGURA 24.B). Aumentando o pH do meio, as ficobiliproteínas permanecem carregadas negativamente o que favorece a interação com o solvente, facilitando o processo de extração (Sun *et al.*, 2009).

Assim como para os pigmentos mencionados anteriormente, o efeito positivo e linear do pH (L) foi a variável mais significativa na extração de ficoeritrina (9,69), seguido da razão solvente:biomassa linear (L) (-8,21) e do efeito quadrático e negativo do pH (Q) (-4,50) (FIGURA 24.C).

Os modelos de extração das ficobiliproteínas ajustaram-se muito bem às respostas, o que pode ser observado pelos elevados valores do coeficiente de determinação (R^2) e do F_{calc} em relação ao F_{tab} (TABELA 19).

Tabela 19 – ANOVA para as concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina obtidas pela extração assistida ultrassom utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,4757	5	0,0951	32,40
Resíduo	0,0147	5	0,0029	
Falta de ajuste	0,4904	10	0,0490	
Erro puro	0,0145	3	0,0048	
Total	0,4904	10	0,0490	
R^2	0,97			
F_{tab}				$^a F(5,5) = 5,05$

Aloficocianina				
Regressão	0,7115	5	0,1423	46,70
Resíduo	0,01524	5	0,0030	
Falta de ajuste	0,7267	10	0,0727	
Erro puro	0,0135	3	0,0045	
Total	0,7267	10	0,0727	
R ²	0,98			
F _{tab}				^a F(5,5) = 5,05
Ficoeritrina				
Regressão	0,1249	5	0,0250	19,71
Resíduo	0,0063	5	0,0013	
Falta de ajuste	0,1313	10	0,0131	
Erro puro (EP)	0,0050	3	0,0017	
Total	0,1313	10	0,0131	
R ²	0,95			
F _{tab}				^a F(5,5) = 5,05
95% de confiança				

(a) $F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$

Fonte: A autora (2016).

Os modelos para as concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina obtidas pela extração assistida por ultrassom, com o 2-HEAA+2-HEAF, seguem as Equações 14, 15 e 16, respectivamente.

$$C_{ficocianina}(g.L^{-1}) = -0,26pH^2 - 0,10pH \times \text{Razão } s:b + 0,33pH - 0,27 \text{Razão } s:b + 0,52 \quad (14)$$

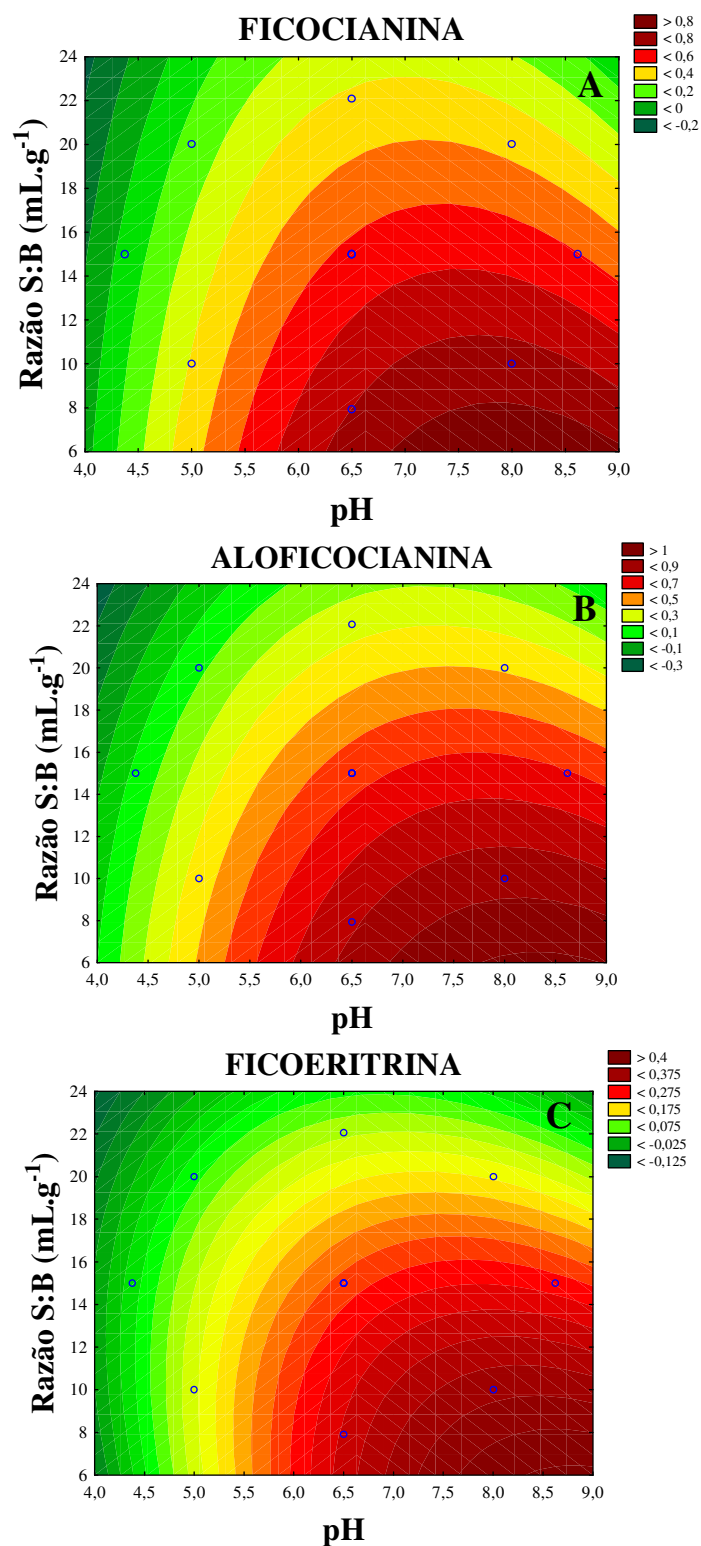
$$C_{aloficocianina}(g.L^{-1}) = -0,24pH^2 + 0,41 \times pH - 0,37 \times \text{Razão } s:b + 0,56 \quad (15)$$

$$C_{ficoeritrina}(g.L^{-1}) = -0,10pH^2 + 0,17pH - 0,15 \text{Razão } s:b + 0,23 \quad (16)$$

Sendo: razão s:b a quantidade de solvente (mL) em relação à biomassa (g).

Analisando a superfície de contorno para a extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina (FIGURA 25), observou-se que a região ótima seria atingida diminuindo ainda mais a razão solvente:biomassa e aumentando o pH do solvente. O que não é viável do ponto de vista bioquímico, uma vez que, como explicado anteriormente, as ficobiliproteínas são instáveis em pH elevados. Além disso, em baixos volumes de solvente não há a correta interação entre o soluto e o solvente.

Figura 25 – Superfície de contorno para a extração assistida por ultrassom de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente



Fonte: A autora (2016).

Na extração assistida por ultrassom os solventes mais eficientes foram os líquidos iônicos próticos, com destaque para o 2-HEAA+2-HEAF, em pH 6,5 e razão

solvente:biomassa $7,93 \text{ mL.g}^{-1}$, na frequência de 25 KHz, após 30 minutos de reação. O pH foi mais impactante na extração por ultrassom do que a razão solvente:biomassa para os três pigmentos avaliados. As máximas concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina obtidas por este método foram: 0,75; 0,80 e $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

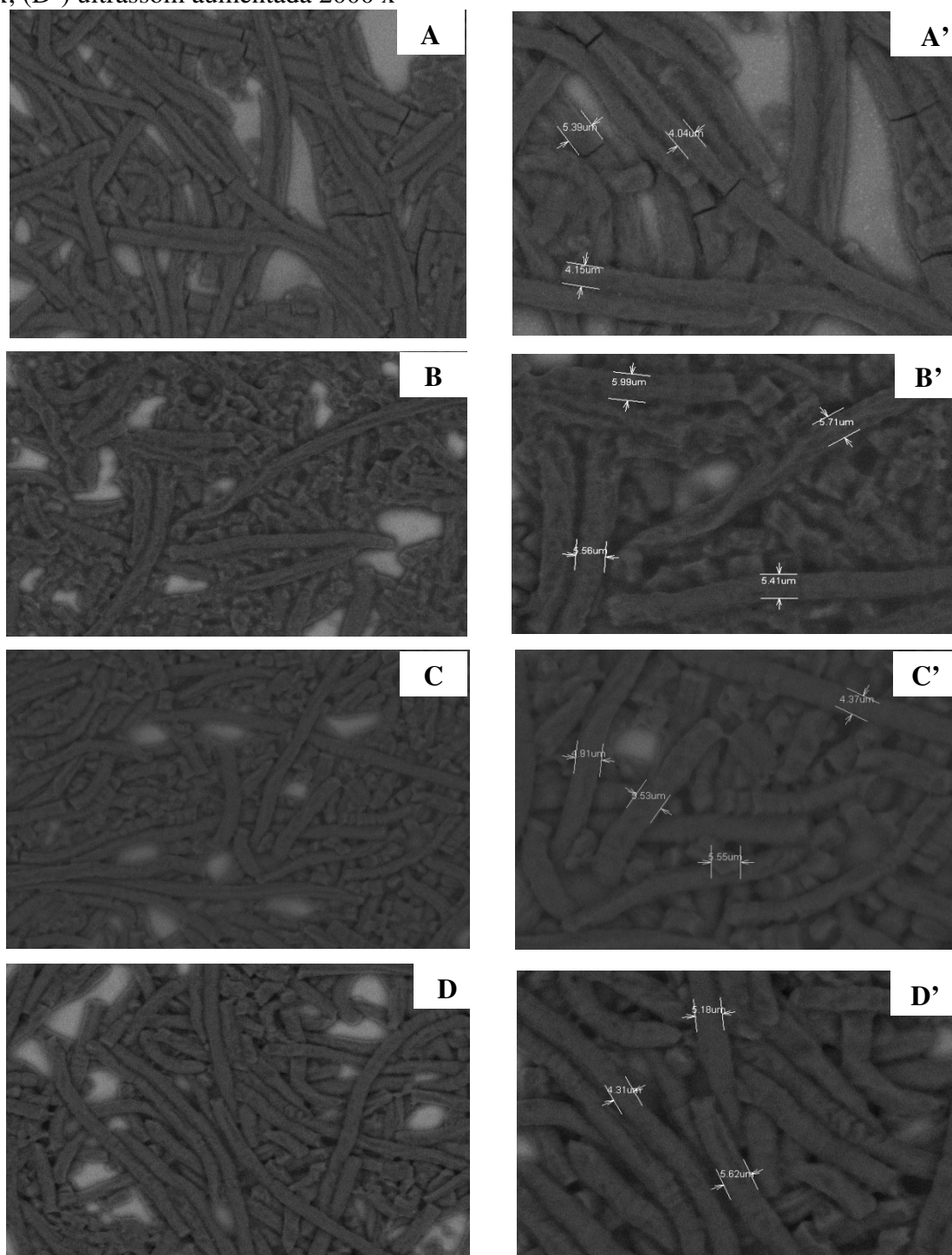
Abalde *et al.* (1998), obtiveram resultados inferiores aos encontrados neste trabalho na extração de ficocianina por ultrassom da *Synechococcus* sp. 109201 ($0,007 \text{ g.L}^{-1}$). Por outro lado, Aftari *et al.* (2015), empregando ultrassom associado ao congelamento/descongelamento da biomassa de *S. platensis*, alcançaram concentração máxima de $2,84 \text{ g.L}^{-1}$ de ficocianina. Hadiyanto e Sutrisnorhadi (2016), otimizando a extração de ficocianina de *S. platensis* por superfície de resposta, obtiveram concentração máxima de $1,05 \text{ g.L}^{-1}$, em 42 minutos de extração, $52,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e frequência ultrassônica de 200 W. Estes autores relataram concentração de ficocianina ligeiramente superior à deste trabalho, com maior gasto energético pelo uso de temperatura elevada e maior potência ultrassônica num intervalo de tempo superior.

5.3 Avaliação dos métodos de extração

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

À luz do microscópio eletrônico de varredura, foi possível identificar as espiras e os septos típicos de uma célula de *Spirulina (Arthrospira) platensis*. A amostra controle mostrou-se mais íntegra, como era esperado, com alguns fragmentos de células oriundos das operações de trituração e secagem pelas quais a biomassa passa para a obtenção do pó. A amostra rompida pelo método convencional tem um aspecto diferenciado, com maior rugosidade que deve ser ocasionado pela exposição a altas temperaturas por maior período de tempo. Aquela submetida às micro-ondas apresentou maior número de partículas ou fragmentos em comparação às demais, sinalizando que este método afetou mais intensamente a estrutura celular. Dentre os métodos avaliados, o ultrassom pareceu interferir muito pouco na morfologia da microalga (FIGURA 26).

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de *Spirulina (Arthrospira) platensis* submetidas à diferentes métodos, nas melhores condições de extração (método convencional – 2-HEAA+2-HEAF, 35 °C, pH 6,50, razão s:b 6,59 mL.g⁻¹, 150 min; micro-ondas – 2-HEAA+2-HEAF, 62 W, pH 7,0, razão s:b 10 mL.g⁻¹, 2 min e ultrassom – 2-HEAA+2-HEAF, pH 6,50, razão s:b 7,93 mL.g⁻¹, 30 min): (A) controle aumentada 1000 x; (A') controle aumentada 2000 x; (B) método convencional aumentada 1000 x; (B') método convencional aumentada 2000 x; (C) micro-ondas aumentada 1000 x; (C') micro-ondas aumentada 2000 x; (D) ultrassom aumentada 1000 x; (D') ultrassom aumentada 2000 x



Fonte: A autora (2017).

5.3.2 Rendimento, produtividade, fator de pureza dos pigmentos e análise do consumo energético

As Tabelas 20 e 21 apresentam um resumo dos resultados mais relevantes para cada método de extração empregado. Nelas é possível compará-los com base em parâmetros importantes, como: rendimento, produtividade, pureza e consumo energético.

De acordo com a Tabela 20, os líquidos iônicos próticos foram os solventes mais eficientes em todos os métodos de extração frente ao tampão e ao líquido iônico comercial, requerendo condições de extração moderadas, isto é, baixas temperaturas, potência e frequência dos equipamentos; menor volume de solvente e valores de pH próximos à neutralidade. Os líquidos iônicos (próticos e apróticos) possuem maior força iônica que o tampão. Apesar disso, o líquido iônico aprótico apresentou desempenho inferior ao do tampão fosfato em praticamente todas as condições de operação. O baixo rendimento do [Bmim][Cl] na extração das ficobiliproteínas está associado, principalmente, à sua elevada viscosidade como descrito com mais detalhes anteriormente. A propriedade principal dos líquidos iônicos próticos é a sua capacidade em promover ligações de hidrogênio, nas quais aceitação e doação de prótons estão envolvidas. O interesse nesta classe de LIs decorre da sua síntese simplificada, do baixo custo de preparação e purificação, além da maior biodegradabilidade em comparação aos LIAs. LIPs apresentam bom desempenho como solventes nos mais variados processos (Oliveira *et al.*, 2016).

Com o método convencional foram atingidas as maiores concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. Entretanto, em termos de rendimento, praticamente não houve diferença entre este método e aquele que empregou micro-ondas. O ultrassom apresentou os menores rendimentos para os três pigmentos dentre os métodos analisados. Nesse ponto é importante ressaltar que a cavitação é caracterizada pelo colapso violento de bolhas em um campo de pressão alternado. As bolhas de cavitação na suspensão aquosa de algas produzem graves e localizados aumentos de temperatura e pressão de curta duração, bem como efeitos *microstreaming* (movimento de líquido em torno das bolhas de gás formadas pela cavitação) e ondas de choque que promovem a ruptura das células de algas (Greenly e Tester, 2015).

Tabela 20 – Avaliação e comparação dos métodos de extração através de parâmetros importantes

Método	Solvente	Condição ótima	Pigmento	C (g.L ⁻¹)	R (mg.g ⁻¹)	P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Pureza (A _{máx} /A ₂₈₀)	Consumo energético (W.h)
MC	2-HEAA+ 2-HEAF	35 °C pH 6,5 6,59 mL.g ⁻¹ 150 min	F	1,65	10,87	0,66	0,53	4.825
			AF	1,70	11,20	0,68	0,41	
			FE	0,64	4,22	0,26	0,41	
EAM	2-HEAA+ 2-HEAF	62 W pH 7,0 10 mL.g ⁻¹ 2min	F	0,84	8,40	25,45	0,50	2,07
			AF	1,33	13,30	40,30	0,60	
			FE	0,41	4,10	12,42	0,46	
EAU	2-HEAA+ 2-HEAF	25 Hz pH 6,5 7,93 mL.g ⁻¹ 30min	F	0,75	5,95	1,50	0,23	67,50
			AF	0,80	6,34	1,60	0,19	
			FE	0,33	2,62	0,66	0,19	

MC = método convencional, EAM = extração assistida por micro-ondas, EAU = extração assistida por ultrassom, F = ficocianina; AF = aloficocianina, FE = ficoeritrina, C = concentração (g.L⁻¹); R = rendimento (mg.g⁻¹), Pureza = (A_{máx}/A₂₈₀) e P = produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹).

Fonte: A autora (2016).

Quando o fator tempo é considerado no processo, a extração com micro-ondas apresenta produtividade 38 vezes maior do que a convencional na obtenção de ficocianina, 59 vezes maior na de aloficocianina e 47 vezes maior na extração de ficoeritrina. A produtividade com ultrassom também foi maior do que aquela obtida pelo método convencional.

O método de extração ideal deve levar em consideração não apenas o rendimento, mas também a pureza da molécula alvo. A separação de ficobiliproteínas envolve uma série de processos, tais como, precipitação, diálise, cromatografia, etc. Os processos *downstream* representam de 50-90% do custo total (Patil *et al.*, 2006).

A economia energética, conseguida com os métodos de extração alternativos, é bastante relevante considerando os princípios da Química Verde, que defendem a busca pela eficiência energética, onde a utilização de energia pelos processos químicos deve ser minimizada, priorizando aqueles conduzidos à temperatura e pressão ambientes (Tsukui e Rezende, 2014).

Tabela 21 – Resumo das vantagens e desvantagens dos métodos alternativos (micro-ondas e ultrassom) em comparação ao método convencional na extração de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* verificados neste estudo

Método	Rendimento	Tempo de extração	Produtividade	Pureza	Consumo energético
MC	Referência	Referência	Referência	Referência	Referência
EAM	=	-	+	+	-
EAU	-	-	+	-	-

Fonte: A autora (2016).

Efeito negativo

Referência

Efeito positivo

Sinal +: corresponde a um valor maior que o valor referência

Sinal -: corresponde a um valor menor que o valor referência

Cor vermelha: descreve efeito negativo

Cor verde: descreve efeito positivo

Krishnan *et al.* (2016) compararam a extração de flavonoides de *Terminalia chebula* pelo método convencional com a extração assistida por micro-ondas. Segundo os autores, as micro-ondas possuem a capacidade de desbloquear as espécies de soluto favorecendo o contato com o solvente, permitindo bons rendimentos de extração com

um menor volume de solvente. A avaliação de parâmetros termodinâmicos permitiu concluir que a extração assistida por micro-ondas é um processo endotérmico, irreversível, viável e espontâneo. O estudo da energia de ativação indicou que a extração é governada pela difusão, e que a redução da energia de ativação para a difusão durante a irradiação por micro-ondas é atribuída à formação de poros e fissuras. O coeficiente de difusão efetivo, o coeficiente de transferência de massa e o coeficiente da temperatura de extração foram maiores na EAM em comparação com a extração convencional. Além disso, o potencial antioxidante (DPPH) dos flavonoides pelos dois métodos foi compatível e os dados de CG-MS mostraram que as micro-ondas não modificaram a composição química dos extratos aquosos de *T. chebula*.

Pasquet *et al.* (2011) ao extraírem pigmentos de duas microalgas marinhas, concluíram que a EAM oferece a vantagem da termorregulação homogênea do meio; como não há transferência de calor, as células aquecidas são obrigadas a permanecer no centro do frasco e não há formação de pontos quentes como na EAU. Os autores afirmaram ainda que a irradiação por micro-ondas não provoca o rompimento da parede celular da microalga como observado no ultrassom. Logo, a EAM pode ser considerada um processo “limpo” que induz a permeabilização da parede celular sem destruí-la, permitindo que a molécula alvo seja extraída com maior grau de pureza. Apesar dos elevados rendimentos de extração atingidos pelos autores com o ultrassom, a repetibilidade através desse método foi insuficiente para defini-lo como um relevante e reprodutível processo de extração de pigmentos. Dessa forma, a pureza é um parâmetro extremamente relevante na escolha do método de extração. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os métodos de extração podem ser dispostos em ordem decrescente de pureza da seguinte forma: micro-ondas > método convencional > ultrassom (TABELA 20).

Aftari *et al.* (2015) compararam a extração de ficocianina de *Spirulina platensis* por ultrassom e micro-ondas, empregando diferentes tampões e ciclos de congelamento-descongelamento. Os resultados mostraram que maior concentração (4,54 mg.mL⁻¹) e pureza (1,27) foram obtidas com o micro-ondas em relação ao ultrassom (2,84 mg.mL⁻¹ e 0,65, respectivamente). Calculando-se o rendimento, foram obtidos 0,36 mg.g⁻¹ com o micro-ondas e 0,23 mg.g⁻¹ para o ultrassom, valores inferiores aos obtidos neste trabalho, o que pode ser explicado pela maior potência de irradiação empregada pelos autores.

A eficiência de um processo de extração é definida pela sua seletividade, rapidez, rendimento, reprodutibilidade e proteção das moléculas extraídas contra a transformação química. A EAM apresenta como principal vantagem a rápida e eficiente extração de pigmentos sem a necessidade de aplicação de altas pressões para a obtenção de rendimentos importantes. Assim, a extração assistida por micro-ondas aparece como um processo inovador e relevante para extrair pigmentos em escala laboratorial. Ademais, o desenvolvimento de micro-ondas em unidades piloto e de reatores micro-ondas industriais permitem considerar o uso deste método em escala industrial, superando os limites das técnicas tradicionais em termos de qualidade ou lucratividade dos extratos.

Um efetivo método para extrair ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis* aliando micro-ondas e líquidos iônicos próticos foi desenvolvido com sucesso neste trabalho.

5.4 Purificação das ficobiliproteínas

Após a definição do melhor método de extração (micro-ondas – 2-HEAA+2-HEAF, 62 W, pH 7,0, razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹, 2min de extração), a purificação das ficobiliproteínas foi estudada.

O processo de purificação das ficobiliproteínas foi dividido em 4 etapas: preparação do extrato bruto; precipitação com sulfato de amônio; diálise e cromatografia de troca iônica.

A precipitação com sulfato de amônio fracionada em 2 etapas promove o *salting out* de proteínas indesejadas ao passo que concentra as proteínas de interesse (Román *et al.*, 2002). O sulfato de amônio foi escolhido como agente precipitante porque mantém a integridade das proteínas, precipita prontamente as ficobiliproteínas, ajuda a reduzir a quantidade de amostra a ser manipulada e é altamente solúvel em baixas temperaturas (Soni *et al.*, 2006). No primeiro passo da precipitação, utilizou-se 25% (m/v) de saturação com o objetivo de precipitar outras proteínas. No segundo passo, 45% (m/v) de sulfato de amônio foram adicionados ao extrato a fim de precipitar as ficobiliproteínas. Após a centrifugação, um precipitado azul brilhante foi obtido.

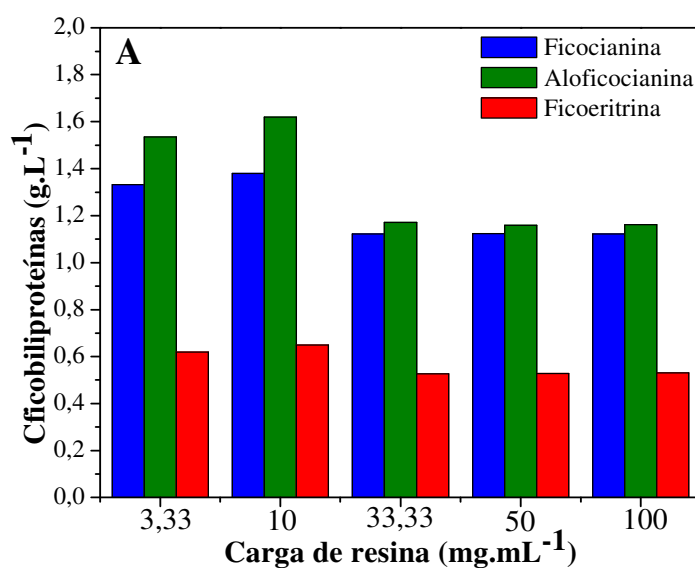
A diálise foi executada com o intuito de remover o sulfato de amônio presente no extrato e para concentrar a amostra. O uso de colunas de dessalinização

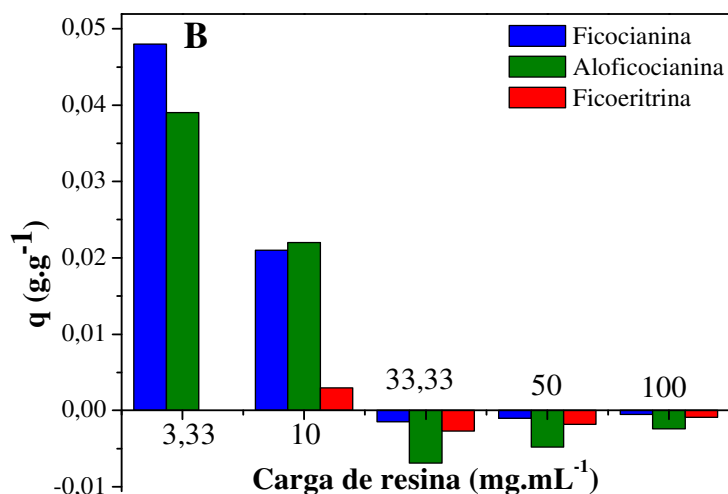
apresenta como principal vantagem a economia de tempo. O processo tradicional, com membranas, leva aproximadamente 24 h para ser concluído. Enquanto que na coluna, a diálise é processada em alguns minutos.

Cromatografia de troca iônica é uma das técnicas mais difundidas na separação de proteínas. O método se baseia na adsorção reversível das moléculas carregadas do soluto para imobilizar os grupos trocadores de carga da resina ou trocador (Roe, 2006).

A cromatografia de troca iônica foi realizada em batelada com um trocador aniônico fraco – DEAE Sepharose Fast Flow, que tem sido amplamente utilizado na purificação de ficobiliproteínas (Yan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). O comportamento da adsorção dos pigmentos em diferentes concentrações de DEAE Sepharose Fast Flow (3,33; 10; 33,33; 50 e 100 mg.mL⁻¹) é apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Comportamento da adsorção das ficobiliproteínas. A) influência da carga de DEAE Sepharose Fast Flow na concentração de ficobiliproteínas. B) quantidade de ficobiliproteínas adsorvida em diferentes cargas de DEAE Sepharose Fast Flow



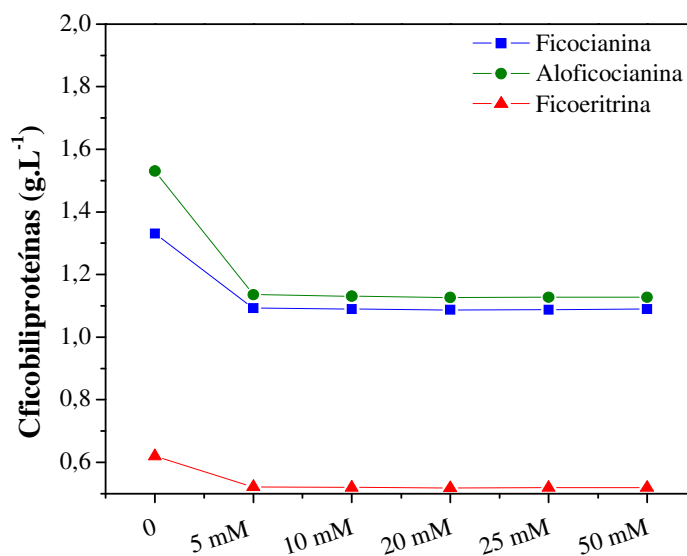


Fonte: A autora (2017).

Na Figura 27 observa-se que quando a carga de resina é aumentada, em um dado volume, o excesso de sólidos no meio dificulta a transferência de massa, compromete o processo difusional e, por conseguinte, a troca de íons entre as ficobiliproteínas e a resina. Levando-se em conta apenas a concentração de ficobiliproteínas, os melhores resultados foram alcançados com 10 mg.mL⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow e a aloficocianina foi o pigmento adsorvido em maior quantidade, seguido da ficocianina e ficoeritrina (Figura 27.A). Entretanto, quando de fato calcula-se a quantidade de ficobiliproteínas adsorvida nas diferentes concentrações de DEAE Sepharose Fast Flow (Equação 10) os melhores resultados foram atingidos com 3 mg.mL⁻¹ de resina. A ficocianina passa a ser o pigmento adsorvido em maior quantidade, seguido da aloficocianina. A ficoeritrina não foi adsorvida nessa condição.

Após verificar as melhores condições de adsorção, a dessorção dos pigmentos foi avaliada variando-se a força iônica do tampão de eluição (0 – 50 mM NaCl), conforme Figura 28.

Figura 28 – Avaliação da dessorção das ficobiliproteínas utilizando 3 mg.mL^{-1} de DEAE Sepharose Fast Flow, variando a força iônica do tampão de eluição (0 a 50 mM NaCl)



Fonte: A autora (2017).

Analisando a Figura 28 observa-se que a solução com menor força iônica (água destilada) foi suficiente para arrastar as ficobiliproteínas, demonstrando que os pigmentos estavam fracamente ligados à resina.

A Tabela 22 apresenta o resumo do protocolo de purificação das ficobiliproteínas em termos de concentração, pureza e rendimento para cada etapa.

A concentração de ficobiliproteínas aumentou com o avanço da purificação. Após a troca iônica, foram obtidas $1,33 \text{ g.L}^{-1}$ de ficocianina, $1,53 \text{ g.L}^{-1}$ de aloficocianina e $0,62 \text{ g.L}^{-1}$ de ficoeritrina. Em contrapartida, o rendimento diminuiu após cada etapa. Ao final, conseguiu-se um rendimento em ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina de 15,29%, 11,33% e 11,92%, respectivamente.

As razões de pureza 0,55; 0,60 e 0,46 no extrato bruto foram melhoradas para 1,22; 1,03 e 0,71 para a ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina, respectivamente.

Tabela 22 – Avaliação das etapas do processo de purificação das ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* obtidas por extração assistida por micro-ondas (2-HEAA+2-HEAF, 62 W, pH 7,0, razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹, 2 min)

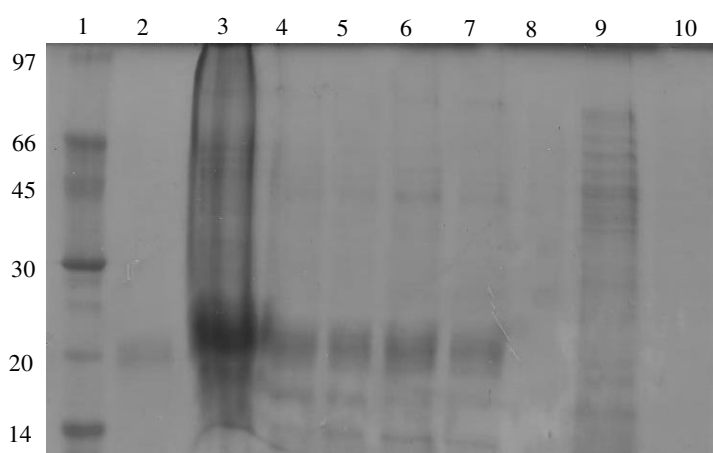
Etapa	Volume (mL)	Pigmento	C (g.L ⁻¹)	Pureza (A _{máx} /A ₂₈₀)	Rendimento (%)
Extrato bruto	30	FC	0,87	0,55	100
		AFC	1,35	0,60	
		FE	0,52	0,46	
Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	19	FC	1,07	0,75	78
		AFC	1,36	0,65	63,80
		FE	0,60	0,55	73,08
Diálise	10	FC	1,17	0,81	45
		AFC	1,40	0,67	34,56
		FE	0,62	0,56	39,74
DEAE Sepharose Fast Flow	3	FC	1,33	1,22	15,29
		AFC	1,53	1,03	11,33
		FE	0,62	0,71	11,92

F: ficocianina; AF: aloficocianina; FE: ficoeritrina
 Fonte: A autora (2017).

Apesar do aumento no grau de pureza, estes valores estão bem abaixo dos reportados por Kumar *et al.* (2014) que utilizaram um protocolo de purificação da ficocianina semelhante ao deste trabalho, com modificações no processo de diálise, realizado em membranas, e na cromatografia de troca iônica (DEAE – Cellulose, SRL). Os valores de concentração, pureza e rendimento obtidos por estes autores foram 0,413 g.L⁻¹; 4,58 e 14%, respectivamente. Assim, novos estudos devem ser efetuados com o intuito de maximizar a pureza e os rendimentos em ficobiliproteínas.

A pureza das ficobiliproteínas após cada etapa de purificação também foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS PAGE (Figura 29). A imagem está prejudicada pela falta de um aparato experimental que permita uma melhor revelação do gel obtido. A linha 20 KDa corresponde ao padrão de ficocianina purificada.

Figura 29 – SDS-PAGE das ficobiliproteínas de *Spirulina platensis*. Linha 1: marcador de baixo peso molecular (14 – 97 KDa); linha 2: padrão de ficocianina (Sigma Aldrich); linha 3: extrato bruto de ficobiliproteínas; linha 4: amostra de ficobiliproteínas após precipitação com sulfato de amônio; linha 5: amostra de ficobiliproteínas após diálise; linha 6: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 3,33 mg.mL⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 7: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 10 mg.mL⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 8: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 33,33 mg.mL⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 9: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 50 mg.mL⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow; linha 10: amostra de ficobiliproteínas após cromatografia de troca iônica utilizando 100 mg.mL⁻¹ de DEAE Sepharose Fast Flow



Fonte: A autora (2017).

Nas linhas 3 a 5 foram observadas 3 bandas intensas de pesos moleculares variando entre 14 e 20 KDa, sendo a de 20 KDa correspondente à ficocianina por comparação com o padrão comercial da linha 2. Sonani *et al.* (2014) relataram pesos moleculares, para as subunidades α e β , próximos de 17,5 e 19 KDa para a ficocianina; 15,5 e 17 KDa para a aloficocianina e 19 e 21,5 KDa para a ficoeritrina, respectivamente.

O extrato bruto (linha 3) é manchado e apresenta várias bandas de proteínas que não são observadas com o progresso da purificação (linhas 4 a 7). A eletroforese confirmou que elevadas cargas de resina não adsorvem as ficobiliproteínas, uma vez que as bandas características destes pigmentos não foram visualizadas nestas condições (linhas 8 a 10). De maneira geral, as amostras apresentaram-se mais homogêneas, com as bandas referentes às ficobiliproteínas mais nítidas, com o avanço da purificação.

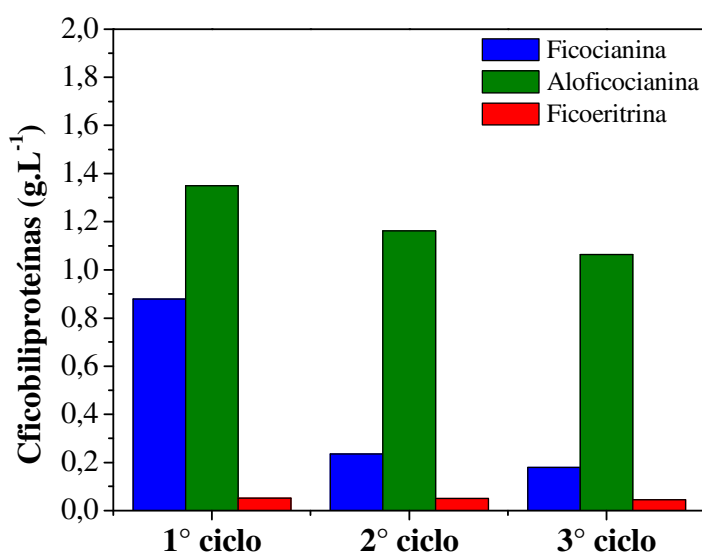
5.5 Recuperação e reuso do LI

Uma das principais vantagens na utilização dos líquidos iônicos é a possibilidade de recuperá-los e reutilizá-los ao final dos processos. Neste trabalho, um estudo preliminar de recuperação e reuso desses solventes foi proposto.

Após a extração assistida por micro-ondas (condições otimizadas: 62 W, pH 7,0, razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹, 2 min), o 2-HEAA+2-HEAF, que continha as ficobiliproteínas extraídas, foi submetido a precipitações com sulfato de amônio, para remoção destas biomoléculas, a fim de ser utilizado em novos ciclos de extração.

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos da estabilidade operacional do líquido iônico em consecutivos processos de extração. Analisando a Figura 30 percebeu-se que a ficocianina parece ter sido mais afetada no processo, isso porque o sulfato de amônio ainda presente no LI favoreceu a precipitação deste pigmento, fazendo com que sua concentração fosse menor a cada ciclo. A concentração de aloficocianina diminuiu de 1,35 g.L⁻¹ (1º ciclo) para 1,06 g.L⁻¹ (3º ciclo) e a de ficoeritrina manteve-se praticamente inalterada. Diante desses resultados, o mesmo líquido iônico pode ser reaproveitado em 3 ciclos de extração, obtendo bons rendimentos de ficobiliproteínas.

Figura 30 – Reciclo do 2-HEAA+2-HEAF. Extrações realizadas em micro-ondas (potência de 62 W; 2 min; razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹; pH 7,00)



Fonte: A autora (2017).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho uma metodologia alternativa para a extração de ficobiliproteínas foi proposta e otimizada. Os líquidos iônicos próticos, sintetizados no laboratório, provaram ser mais eficientes que o tampão fosfato de sódio e o líquido iônico comercial e aprótico [Bmim][Cl] na extração dos pigmentos. Ficocianina e ficoeritrina foram extraídas com sucesso pelos solventes estudados através dos diferentes métodos, sendo a aloficocianina o pigmento extraído em maior quantidade pelos líquidos iônicos, demonstrando o maior poder difusional desses solventes, uma vez que este pigmento se localiza no núcleo das ficobilissomas (estruturas que encerram as ficobiliproteínas).

As condições operacionais foram otimizadas em termos de temperatura, pH, potência do equipamento e razão solvente:biomassa para cada um dos métodos avaliados (convencional, micro-ondas e ultrassom).

Nas condições de operação do estudo, a extração assistida por micro-ondas foi considerada a melhor técnica, utilizando o 2-HEAA+2-HEAF como solvente, potência de 62 W, pH 7,0, razão solvente:biomassa 10 mL.g⁻¹, após 2 minutos de extração.

As ficobiliproteínas foram purificadas através de um protocolo que combinou precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia de troca iônica. Contudo, essa metodologia não se mostrou tão eficiente tendo em vista os rendimentos e o grau de pureza apresentados. Considerando o grau de pureza atingido, as ficobiliproteínas obtidas no trabalho podem ser aplicadas em alimentos e cosméticos.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Sci.**, v. 136, p. 109-20, 1998.
- AFTARI, R. V.; REZAEI, K.; MORTAZAVI, A.; BANDANI, A. R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycocyanin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound assisted extraction methods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 3080-3091, 2015.
- AKAO, Y.; EBIHARA, T.; MASUDA, H.; SAEKI, Y.; AKAZAWA, T.; HAZEKI, K.; HAZEKI, O.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice. **Canc Sci.**, v. 100, p. 1494-1501, 2009.
- AKHATAR, A.; KAZI, G. T.; AFRIDI, H. I.; MUSHARRAF, S. G.; TALPUR, F. N.; KHAN, N.; BILAL, M.; KHAN, M. Vortex-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction for assessment of chromium species in artificial saliva extract of different chewing tobacco products. **Environ Sci Pollut Res.**, DOI: 10.1007/s11356-016-7700-3, 2016.
- ÁLVAREZ, V. H. A. **Termodinâmica e aplicações de líquidos iônicos**. 2010. 382 f. Tese de Doutorado. (Doutorado em Engenharia Química) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- ÁLVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. **J. Chem. Thermodyn.**, v. 43, p. 997-1010, 2011.
- ANNAT, G.; FORSYTH, M.; MACFARLANE, D. R. Ionic liquid mixtures – variations in physical properties and their origins in molecular structure. **J. Phys. Chem. B.**, v. 116, p. 8251-8258, 2012.
- ANOUTI, M., CAILLON-CARAVANIER, M., LE FLOCH, C., LEMORDANT, D. Alkylammonium-based protic ionic liquids part i: preparation and physicochemical characterization. **J. Phys. Chem. B.**, v. 112, p. 9406-9411, 2008.
- ARAKI, S.; WAKABAYASHI, R.; MONIRUZZAMAN, M.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Ionic liquid-mediated transcutaneous protein delivery with solid-in-oilnanodispersions. **Med Chem Comm**, v. 6, p. 2124-2128, 2015.

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.

ARAÚJO, K. G. L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, C. P. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v. 23, p. 6-9, 2003.

BASTOS, A. K. P. **Estudo da seletividade de lipases para a obtenção de ésteres de ácidos graxos.** 2013. 115 f. Tese de Doutorado. (Doutorado em Processos Químicos e Bioquímicos) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BATISTA, A. P.; RAYMMUNDO, A.; SOUSA, I.; EMPIS, J. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. **Food Hydrocoll.**, v. 20, p. 44-52, 2006.

BECKER, E.W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology.** Cambridge University Press, Cambridge, UK., 293 p., 1994.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – the Earthrise Farms experience. In: ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology** (ed. A. Vonshak), pp. 131-158. Taylor & Francis, London,UK, 1997.

BELAY, A. ***Spirulina* (*Arthrospira*): production and quality control.** In: ***Spirulina in Human Nutrition and Health*** (eds M.E. Gershwin & A. Belay), p. 1-26. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.

BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alg. **J. Cell Biol.**, v. 58, p. 419-435, 1973.

BERMEJO, P.; PINERO, E.; VILLAR, Á. M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chem.**, v. 110, p. 436-445, 2008.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycocyanin: a Potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 275, p. 20-25, 2000.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (eds) **The Archea and the deeply branching and phototrophic bacteria.** **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., v. 1, Springer Verlag, New York, 2001.

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. E. Characterization of a specific phycocyanin-hydrolysing protease purified from *Spirulina platensis*. **Arch. Microbiol.**, v.120, p. 155-159, 1979.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochem.**, v. 47, p. 659-664, 2012.

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.

CHEN, L.; MULLEN, G. E.; LE ROCH, M.; CASSITY, C. G.; GOUAULT, N.; FADAMIRO, H. Y.; BARLETTA, R. E.; O'BRIEN, R. A.; SYKORA, R. E.; STENSON, A. C.; WEST, K. N.; HORNE, H. E.; HENDRICH, J. M.; XIANG, K. R.; DAVIS, J. H. On the formation of a protic ionic liquid in nature. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 53, p. 11762-11765, 2014.

CHERNG, S. C.; CHENG, S. N.; TARN, A.; CHOU, T. C. Anti-inflammatory activity of C-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Life Sci.**, v. 81, p. 1431-1435, 2007.

CHETHANA, S.; NAYAK, C. N.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. **J Food Sci Technol.**, v. 52, p.2415-2421, 2015.

CHUNER C.; CHUNXIA L.; SHUXIAN W.; QING W.; ZIYE G.; PEIMIN H. Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. **Natural Science**, v. 4, p. 536-543, 2012.

CIFFERI, O. *Spirulina*, the edible organism. **Microbiol. Rev.**, v. 47, 551 p., 1983.

CINGI, C.; CONK-DALAY, M.; CAKLI, H.; BAL, C. The effects of *Spirulina* on allergic rhinitis. **Eur Arch Otorhinolaryngol.**, v. 265, p. 1219-1223, 2008.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; AGUILAR-HERNANDEZ, I.; CARDENAS-CHAVEZ, D. L.; ORNELAS-SOTO, N.; ROMERO-OGAWA, M. A.; PARRA-SALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 190-209, 2014.

DASGUPTA, T.; BANERJEE, S.; YADAV, P. K.; RAO, A. R. Chemomodulation of carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. **Mol. Cell Biochem.**, v.226, p. 27-38, 2001.

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.

DURAN, P. V. T.; CARBAJAL, M. C. P.; MASCHER, D.; GONZALEZ, J. Z.; ZAGOYA, J. C. D.; OROPEZA, M. A. J. Protective effects of *Arthrospira maxima* on fatty acid composition in fatty liver. **Arch Med Res.**, v. 37, p. 479 -483, 2006.

ELGHARBAWYA, A. A.; ALAMA, M. Z.; MONIRUZZAMANB, M.; GOTOC, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass Biochemical. **Engineering Journal**, v. 109, p. 252-267, 2016.

FAIRBANKS, H. V. Drying powdered coal with the aid of ultrasound. **Powder Technol.** 40, 257-264, 2001.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HÉRNANDEZ-JUARÉZ, J.; PEDRAZZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **J. Func. Food**, v. 2, p. 375-392, 2014.

FILLY, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; LOUIS, E.; FERNANDEZ, X.; CHEMAT, F. Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. **C. R. Chimie**, v. 19, p. 707-717, 2016.

FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; MARONEZE, M. M.; ZEKPA, L. Q. JACOB-LOPES, E. Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas. **Ciência Rural**, v. 45, 2015.

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.

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

GANTAR, M.; PAO, T. K.; WATER, J. V.; GERSHWIN, M. E. Effects of a *Spirulina* based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. **J Med Food.**, v. 8, p. 27-30, 2005.

GE, L.; WANG, X. T.; TAN, S. N.; TSAI, H. H.; YONG, J. W. H.; HUA, L. A novel method of protein extraction from yeast using ionic liquid solution. **Talanta**, v. 81, p. 1861-1864, 2010.

GEITLER, L. In: **Cyanophyceae**. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz, v. 14 (ed. R. Kolkwitz) Akademischer Verlag, Leipzig, Germany, 1932.

GLAZER, A. Minireview: directional energy transfer in phycobilisomes. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 1-4, 1989.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins. **Methods Enzymol.**, v. 167, p. 291-303, 1988.

GOLDSMITH, R. H.; MOERNER, W. E. Watching conformational- and photodynamics of single fluorescent proteins in solution. **Nature chemistry**, v. 2, 2010.

GOMONT, M. Monographie des Oscillariees. Annales Science de Naturelle. Serie 7, **Botanique**, v. 16, p. 246-264, 1892.

GREENLY, J. M.; TESTER, J. F. Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 276-279, 2015.

GRINSTEAD, G. S.; TOKACH, M. D.; DRITZ, S. S.; GOODBAND, R. D.; NELSSON, J. L. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. **Animal Feed Sci Techn.**, v. 83, p. 237-47, 2000.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 725-749, 1993.

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food humans and feeds for domestic animals and fish. **Food and agriculture Organization of the United Nations**, v. 1034, p.1-33, 2008.

HADIYANTO, H.; SUTTRISNORHADI. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. **Emirates Journal of Food and Agriculture (Emir.J. Food Agric)**, v. 28, p. 227-234, 2016.

HALES, C. N.; WOODHEAD, J. S. Labeled antibodies and their use in immunoradiometric assay. **Methods Enzymol.**, v. 70, p.334-355, 1980.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; BAYO, PÉREZ DE LOS RÍOS, J. A.; VICENTE, M. A.; BERNAL, F. J.; QUESADA-MEDINA, J. Discovering less toxic ionic liquids by using the *Microtox* toxicity test. **(Eco)toxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 1629-1633, 2015.

HOLMES, K. L.; LANTZ, L. M. Protein labeling with fluorescent probes. **Meth Cell Biol**, v. 63, p. 185-204, 2001.

HORVÁTH, H.; KOVÁCS, A. W.; RIDDICK, C.; PRÉSING, M. Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. **Eur. J. Phycol.**, v. 48, p. 278-286, 2013.

HUANG, K.; ZHANG, X. M.; XU, Y.; WU, Y. T.; HU, X. B.; XU, Y. Protic ionic liquids for the selective absorption of H₂S from CO₂: thermodynamic analysis. **AIChE J.**, v. 60, p. 4232-4240, 2014.

HUDDLESTON, J.G.; VISSER, A. E.; REICHERT, W. M.; WILLAUER, H. D.; BROKER, G. A.; ROGERS, R. D. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. **Green Chem.**, v. 3, p. 156-164, 2001.

IGLESIAS, M.; TORRES, A.; GONZALEZ-OLMOS, R.; SALVATIERRA, D. Effect of temperature on mixing thermodynamics of a new ionic liquid: {2-Hydroxy ethylammoniumformate (2-HEAF) + short hydroxylic solvents}. **J. Chem. Thermodyn.**, v. 40, p. 119-133, 2008.

ILTIS, A. Note sur *Oscillatoria* (sous-genre *Spirulina*) *platensis* (Nordst) Bourrelly (Cyanophyta) au Tchad. Cah. O.R.S.T.O.M. ser. **Hydrobiology**, v. 5, p. 53-72, 1971.

ILTIS, A. Phytoplankton des eaux natronees du Kanem (Tchad). X. Conclusions. Cah. O.R.S.T.O.M. ser. **Hydrobiology**, v. 9, p. 13-17, 1975.

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

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.

JOHNSON, E. M.; KUMAR, K.; DAS, D. Physicochemical parameteres optimization, and purification of phycoliproteins from the isolated Nostoc sp. **BioresourceTechnol.**, v. 166, p. 541-547, 2014.

KOLLER, K. P.; WEHRMEYER, W.; MORSCHEL, E. Biliprotein assembly in its disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. On the molecular composition of energy-transferring complexes (tripartite units) forming the periphery of the phycobilisomes. **Eur. J. Biochem.**, v. 91, p. 57-63, 1978.

KRISHNAN, Y.; CHANDRAN, M. N.; VADIVEL, V.; RAJAN, K. S. Insights on the influence of microwave irradiation on the extraction of flavonoids from *Terminalia chebular*, **Separation and Purification Technology**, v. 170, p. 224-233, 2016.

KRONICK, M. N.; GROSSMAN, P. D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. **Clin Chem**, v. 29, p. 1582-1586, 1983.

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

KUMAR, S. K. V.; SWAPNA, I.; REDDY, P. V. B.; MURTHY, C. R. K.; ROY, K. R.; GUPTA, D.; SENTHILKUMARAN, B.; REDDANNA, P. Co-administration of C-phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. **J. Neurol. Sci.**, v. 252, p. 67-75, 2007.

KURNIA, K. A.; WILFRED, C. D.; MURUGESAN, T. Thermophysical properties of hydroxyl ammonium ionic liquids. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 41, p. 517-521, 2009.

KUSANO, T.; FUJII, K.; HASHIMOTO, K.; SHIBAYAMA, M. Water-in-ionic liquid microemulsion formation in solvent mixture of aprotic and protic imidazolium-based ionic liquids. **Langmuir**, v. 30, p. 11890-11896, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAWRENZ, E.; FEDEWA, E.J.; RICHARDSON, T. L. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. **J Appl Phycol.**, v. 23, p. 865-871, 2011.

LAYAM, A.; REDDY, C. L. K. Antidiabetic property of *Spirulina*. **Diabet Croat.**, v. 35, p. 29-33, 2007.

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

LEYMA, R.; JIRSA, F.; KANDIOLLER, W. KRACHLER, R.; KEPPLER, B. K. Novel thiosalicylate-based ionic liquids for heavy metal extractions. *Journal of Harzards Materials*, v. 314, p. 164-171, 2016.

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.

LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia k562 cells. **J Appl Phycol.**, v. 12, p. 125-130, 2000.

LIU, Z.; PAWLISZYN, J. Applications of capillary isoelectric focusing with liquid-core waveguide laser-induced fluorescence whole-column imaging detection. **Analytical Biochemistry**, n. 1, v. 336, p. 94-101, 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.

LONE, J.; LENE, D. S.; KARSTEN, O. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **Eur Food Res Technol**, v. 220, p. 261-266, 2005.

LU, J.; REN, D. F.; XUE, Y. L.; SAWANO, Y.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. **J Agric Food Chem.**, v. 58, p. 1166-1171, 2010.

LUCCHESI, M. E.; SMADJA, J.; BRADSHAW, S.; LOUW, W.; CHEMAT, F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum L.*: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. **J. Food Eng.**, v. 79, p. 1079-1086, 2007.

MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. **J. Struct.Biol.**, v. 124, p. 311-334, 1998.

MARTINS, M.; VIEIRA, F. A.; CORREIA, I.; FERREIRA, R. S.; ABREU, H.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M. Recovery of phycobiliproteins from the red macroalga *Gracilaria sp.* using ionic liquid aqueous solutions. **Green Chemistry**, v. 18, p. 4287-4296, 2016.

MESQUITA, F. M. R.; PINHEIRO, R. S.; SANTIAGO-AGUIAR, R.; SANT'ANA, H. B. de. Measurement of phase equilibria data for the extraction of toluene from alkane using

different solvents. **Fluid Phase Equilib.**, v. 404, p. 49-54, 2015.

MICHEL, T.; DESTANDAU, E.; ELFAKIR, C. Analytical Methods Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. **Food Chem.**, v. 126, p. 1380-1386, 2011.

MIRJAFARI, A.; PHAM, L. M.; MCCABE, J. N.; MOBARREZ, N.; SALTER, E. A.; WIERZBICKI, A.; WEST, K. N.; SYKORA, R. E.; DAVIS JR. Building a bridge between aprotic and protic ionic liquids. **RSC Adv.**, v. 3, p. 337-340, 2013.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Effects of preservatives for food grade CPC from *Spirulina platensis*. **Process Biochem.**, v. 43, p. 339-345, 2008.

MOHAN, I. K.; KHAN, M.; SHOBHA, J. C.; NAIDU, M. U. R.; PRAYAG, A.; KUPPUSAMY, P.; KUTALA, V. K. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by *Spirulina* in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 58, p. 802-808, 2006.

MORAES, C. C.; DE MEDEIROS B.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. **J. Food Biochem.**, v. 34, p. 133-148, 2010.

MRIDHA, M. O. F.; JAHAN, M. A. A.; AKHTAR, N.; MUNSHIB, N. B. L.; NESSAC, Z. Study on hypoglycaemic effect of *Spirulina platensis* on long-evans rats. **J Sci Ind Res.**, v. 45, p. 16-168, 2010.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p. 8-18, 2011.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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, M. V. S.; VIDAL, B. T.; MELO, C. M.; MIRANDA, R. C. M.; SOARES, C. M. F.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M.; MATTEDI, S.; LIMA, A. S. (Eco)toxicity and biodegradability of protic ionic liquids. **Chemosphere**, v. 147, p. 460-466, 2016.

OROPEZA, J. M. A.; MASCHER, D.; DURAN, P. V. T.; FARIAS, J. M.; CARBAJAL, M. C. P. Effects of dietary Spirulina on vascular reactivity. **J Med Food.**, v.12, p. 15-20, 2009.

PANDEY, V. D.; PANDEY, A.; SHARMA, V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 2, p. 89-97, 2013.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; KAUSHAL, A.; MADAMWAR, D. Characterization of an intact phycoerythrin and its cleaved 14 kDa functional subunit from marine cyanobacterium *Phormidium* sp. A27DM. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1793-1799, 2011.

PASQUET, V.; CHÉROUVRIER, JR.; FARHAT, F.; THIÉRY, V.; PIOT, JM.; BÉRARD, JB.; KAAS, R.; SERIVE, B.; PATRICEC, T.; CADORET, JP.; PICOT, L. Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 59-67, 2011.

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

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. **Biochem. Eng. J.**, v. 34, p. 156-164, 2007.

PENTTILÄ, A.; PETRI, UK.; SALMINEN, J. S.; VILLE A. A comprehensive thermodynamic study of heat stable acetic acid salt of monoethanolamine. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v.22, p. 313-324, 2014.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTÍ, E.; CRUANAS, R.; GARAU, M. A. A comparative study of the terrestrial ecotoxicity of selected protic and aprotic ionic liquids. **Chemosphere**, v. 108, p. 418-425, 2014.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTÍ, E.; CRUANAS, R.; GARAU, M. A.; ARNING, J.; BOTTIN-WEBER, U.; STOLTE, S. (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. **J. Hazard. Mater**, v. 261, p. 99-105, 2013.

RAMOS, A., ACIÉN, F. G., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M., GONZÁLEZ, C. V., BERMEJO, R. Development of a process for large-scale purification of C-phycoyanin from *Synechocystis aquaticus* using expanded bed adsorption chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 879, p. 511-519, 2011.

RANJITHA, K.; KAUSHIK, B. D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 64, p. 372-375, 2005.

RAVI, M.; DE, S. L.; AZHARUDDIN, S.; PAUL, S. F. D. The beneficial effects of *Spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. **Nutr and Diet Suppl.**, v. 2, p. 73-83, 2010.

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. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 694-701, 2017.

RICHA, R. R. P.; KUMARI, S.; SINGH, K. L.; KANNAUJIYA, V. K.; SINGH, G.; KESHERI, M.; SINHA, R. P. Biotechnological potential of mycosporine-like amino acids and phycobiliproteins of cyanobacterial origin. **Biotechnol Bioinf Bioeng**, v. 1, p. 159-171, 2011.

RICHA, V. K.; KANNAUJIYA, M. K.; GARVITA, S.; RAJESHWAR, P. S. Biotechnological potentials of phycobiliproteins. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, 2011.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**, 2 ed. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK, 2013.

ROE, S. **Protein Purification Techniques – A Practical Approach**. Oxford University Press. 2nd ed. New York, 2006

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

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; GARCIA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from bluegreen algae. **Inflamm Res.**, v. 47, p. 36-41, 1998.

SABA, H.; ZHU, X.; CHEN, Y.; ZHANG, Y. Determination of physical properties for the mixtures of [BMIM]Cl with different organic solvents. **Chemical Engineering Thermodynamics**, v. 23, p. 804-811, 2015.

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

SANTOS, D.; COSTA, F.; FRANCESCHI, E.; SANTOS, A.; DARIVA, C.; MATTEDI, S. Synthesis and physico-chemical properties of two protic ionic liquids based on stearate anion. **Fluid Phase Equilib.**, v. 376, p. 132-140, 2014.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M.. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **J. Appl. Phycol.**, v. 20, p. 113-136, 2008.

SELMI, C.; LEUNG, P. S.; FISCHER, L.; GERMAN, B.; YANG, C. Y.; KENNY, T. P.; CYSEWSKI, G. R.; GERSHWIN, M. E. The effects of *Spirulina* on anemia and immune function in senior citizens. **Cell Mol Immunol.**, v. 8, p. :248-254, 2011.

SHELDON, R. A. Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. **Chemistry a European Journal**, v. 22, p. 12984-12999, 2016.

SHI-GAN Y.; PING Z.; HAI-NAN, S.; XI-YING, Z.; XIU-LAN, C.; BAI-CHENG, Z.; YU-ZHONG, Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **J Appl Phycol**, v. 23, p. 1-6, 2011.

SIDLER, W. Phycobilisomes and phycobiliprotein structure. **In The Molecular Biology of Cyanobacteria**. 11. ed. Kluwer, Dordrecht, 1997.

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.

SONANI, R. R. L.; SINGH, N. K.; AWASTHI, A.; PRASAD, B.; KUMAR, J.; MADAMWAR, D. Phycoerythrin extends life span and health span of *Caenorhabditis elegans*. **Age (Dordr)**, v. 36 (5), p. 9717, 2014.

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

SONI, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from

Phormidium fragile and its characterization for antioxidant property. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 188-194, 2008.

SØRENSEN, L.; HANTKE, A.; ERIKSEN, N. T. Purification of the photosynthetic pigment C-phycoyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. **J Sci Food Agric**, v. 93, p. 2933-2938, 2013.

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.

STIZENBERGER, E. *Spirulina* und *Arthrospira* (nov. gen.). **Hedwigia**, v. 1, p. 32–34, 1852.

SU, C. H.; LIU, C. S.; YANG, P. C.; SYU, K. S.; CHIUH, C. C. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: kinetic modeling of influential factors. **Sep. Purif. Technol**, v. 123, p. 64-68, 2014.

SU, J.; CHEN, J-S. Synthetic porous materials applied in hydrogenation reactions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 237, p. 246-259, 2017.

SUDHAKAR, M. P.; JAGATHEESAN, A.; PERUMAL, K.; ARUNKUMAR, K. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. **Algal Research**, v. 8, p. 115-120, 2015.

SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; ZHAO, M.; FU, X.; WANG, L. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**, v. 64, p. 146-154, 2009.

TALLING, J. F.; PROSSER, M. V.; BAXTER, R. M.; WOOD, R. B. The upper limit of photosynthetic productivity by phytoplankton: evidence from Ethiopian soda lakes. **Freshwater Biol.**, v. 3, p. 53-76, 1973.

TANDEAU DE MARSAC, N.; COHEN-BAZIRE, G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. **Proc. Natl Acad.Sci.**, v. 74, p. 1635-1639, 1977.

TEÓFILO, R.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. **Química Nova (Quim. Nova)**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TOMASELLI, L. **Morphology, ultrastructure and taxonomy.** In: **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology** (ed. A. Vonshak), p. 1-15, 1997.

TSUBAKI, S.; SAKAMOTO, M.; AZUMA, J. I. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from tea residues under autohydrolytic conditions. **Food Chem.**, v. 123, p. 1255-1258, 2010.

TSUCHIHASHI, N.; WATANABE, T.; TAKAI, Y. Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats. **Bull Chiba Hyg Coll.**, v. 5, p. 27-30, 1987.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Microwave Assisted Extraction and Green Chemistry. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p.1713-1725, 2014.

ULLMAN, E. F.; SCHWARZBERG, M.; RUBENSTEIN, K. E. Fluorescent excitation transfer immunoassay, a general method for determination of antigens. **J Biol Chem**, v. 251, p. 4172-4178, 1976.

UPASANI, C. D.; BALARAMAN, R. Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. **Phytother. Res.**,v. 17, p. 330-334, 2003.

VAN EYKELENBURG, C.; FUCHS, A. Rapid reversible macromorphological changes in *Spirulina platensis*. **Naturwissenschaften**, v. 67, 1980.

VASANTHA, T.; KAVITHA, T.; KUMAR, A.; VENKATESU, P.; RAMA DEVI, R. S. Evaluating the transfer free energies of amino acids from water to ammonium-based ionic liquids at 298.15 K. **Journal of Molecular Liquids**, v. 208, p. 130-136, 2015.

VEGA, M. R. O.; KUNST, S. R.; DA SILVA, J. A. T.; MATTEDI, S.; DE FRAGA MALFATTI, C. Influence of anion chain length of protic ionic liquids on the corrosion resistance of API X70 steel, **Corrosion Engineering Science and Technology**, v. 50, p. 547-558, 2015.

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.

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.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 263-271, 2003.

WANG, L.; QU, Y.; FU, X.; ZHAO, M.; WANG, S.; SUN, L. Isolation, purification and properties of an R-phycocyanin from the phycobilisomes of a marine red macroalga *Polysiphonia urceolata*. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

WANG, P.; ZAKEERUDDIN, S. M.; MOSER, J. E.; GR€ATZEL, 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.

WARNER, L.; GJERSING, E.; FOLLET, S. E.; ELLIOTT, K. W.; DZYUBA, S. V.; VARGA, K. The effects of high concentrations of ionic liquid on GB1 protein structure and dynamics probed by high-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.8, p. 75-80, 2016.

WENDLER, J.; JOHN, W.; SCHEER, H.; HOLZWARATH, A. R. Energy transfer in trimeric C-phycocyanin studied by picosecond fluorescence kinetics. **Photochem. Photobiol.**, v. 44, p. 79-85, 1986.

WESTERMANN, M.; REUTER, W.; SCHIMEK, C.; WEHRMEYER, W. Presence of both hemidiscoidal and ellipsoidal phycobilisomes in a *Phormidium* species (cyanobacteria). **Z. Naturforsch.** **C48**, p. 28-34, 1993.

WOOD, R. B.; TALLING, J. F. Chemical and algal relationships in a salinity series of ethiopian inland waters. **Hydrobiologia**, v. 158, p. 29-67, 1988.

WU, Q.; LIU, L.; MIRON, A.; KLÍMOVÁ, B.; WAN, D., KUČA, K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. **Arch Toxicol.**, v. 90, p. 1817-1840, 2016.

YAMAMOTO, C.; SHIMADA, S.; FUJIWARA, Y.; LEE, J. B.; HAYASHI, T.; KAJI, T. Proteoglycans released from cultured bovine aortic endothelial cell layers by sodium spirulan are both perlecan and biglycan. **Biol Pharm Bull.**, v. 28, p. 32-36, 2005.

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

YANG, Z.; ZHAI, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays L.*) cob and identification with HPLC–MS. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 11, 470-476, 2010.

YU, M. H.; GLAZER, A. N.; WILLIAMS, R. C. Cyanobacterial phycobilisomes. Phycocyanin assembly in the rod substructure of *Anabaena variabilis* phycobilisomes. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 13130-13136, 1981.

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.

ZHU, L-P.; YAN, S-G. Lv, A-J. Efficient purification and active configuration investigation of R-phycocyanin from *Polysiphonia urceolata*. **Advances in Applied Biotechnology**, v. 332, p. 489-496, 2015.

ZHU, C.; LING, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; HOFFMAN, P. R.; ZHENG, W.; ZHOU, T.; HUANG, Z. Selenium-containing phycocyanin from Se-enriched *Spirulina platensis* reduces inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting NF- κ B activation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 5060-5070, 2016.

ZOLLA, L. BIANCHETTI, M., RINALDUCCI, S. Functional studies of the Synechocystis phycobilisomes organization by high performance liquid chromatography on line with a mass spectrometer. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 1534-1542, 2002.

APÊNDICE A – DADOS ESTATÍSTICOS DOS DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL

TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO

Tabela A.1 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o tampão fosfato de sódio como solvente pelo método convencional (35 °C, pH 6,5, razão S:B 6,59 mL.g⁻¹)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}
Ficocianina				
Regressão	2,0157	9	0,2240	6,26
Resíduo	0,2505	7	0,0358	
Falta de ajuste	2,2662	16	0,1416	
Erro puro	0,2493	5	0,0499	
Total	2,2662	16	0,1416	
R^2	0,89			
F_{tab}				^a F(9,7) = 3,68
Aloficocianina				
Regressão	0,9067	9	0,1007	8,10
Resíduo	0,0871	7	0,0124	
Falta de ajuste	0,9937	16	0,0621	
Erro puro	0,0860	5	0,0172	
Total	0,9937	16	0,0621	
R^2	0,91			
F_{tab}				^a F(9,7) = 3,68
Ficoeritrina				
Regressão	0,0824	9	0,0092	20,28
Resíduo	0,0032	7	0,0005	
Falta de ajuste	0,0856	16	0,0054	
Erro puro	0,0030	5	0,0006	
Total	0,0856	16	0,0054	
R^2	0,96			
F_{tab}				^a F(9,7) = 3,68
(95% de confiança)				^a F(9,7) = 3,68

(a) $F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$

Equações do modelo de extração de ficobiliproteínas com tampão fosfato de sódio pelo método convencional:

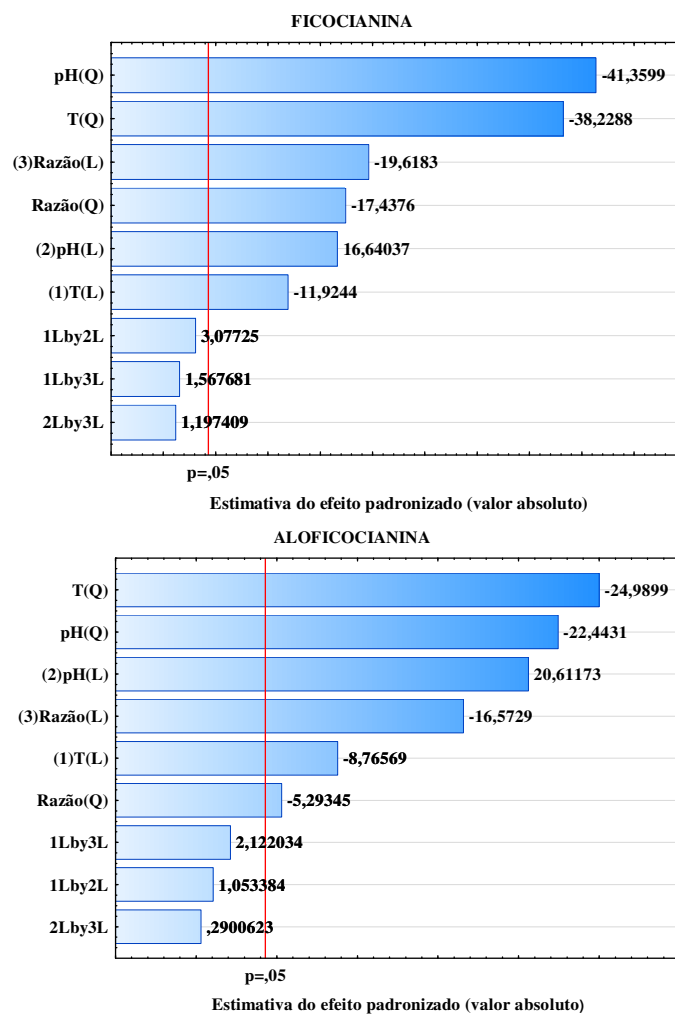
$$C_{ficocianina} = -0,61pH^2 - 0,56T^2 - 0,26Razões:b^2 + 0,22pH - 0,16T - 0,26Razão b:s + 0,99$$

(15)

$$Caloficocianina = -0,31pH^2 - 0,34T^2 - 0,07Razão b:s^2 + 0,26pH - 0,11T - 0,21Razão b:s + 0,6 \quad (16)$$

$$Cficoeritrina = -0,03pH^2 - 0,08T^2 + 0,12pH - 0,04T - 0,04Razão b:s + 0,16 \quad (17)$$

Figura A.1 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com tampão fosfato de sódio pelo método convencional (35 °C, pH 6,5, razão S:B 6,59 mL.g⁻¹)



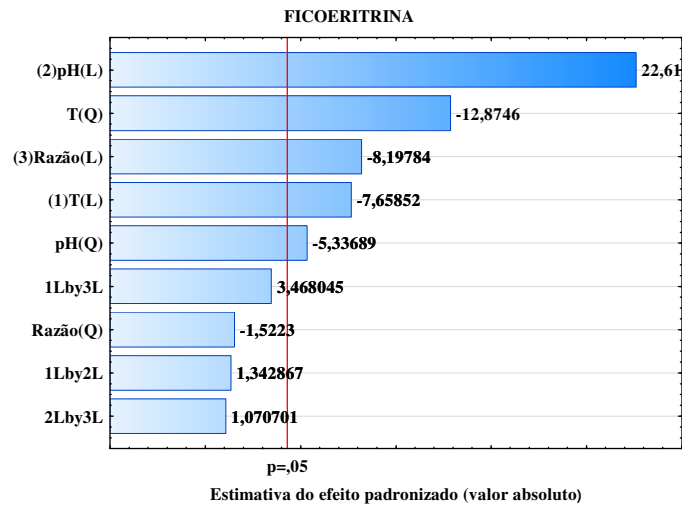


Figura A.2 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o tampão fosfato como solvente pelo método convencional (500 rpm)

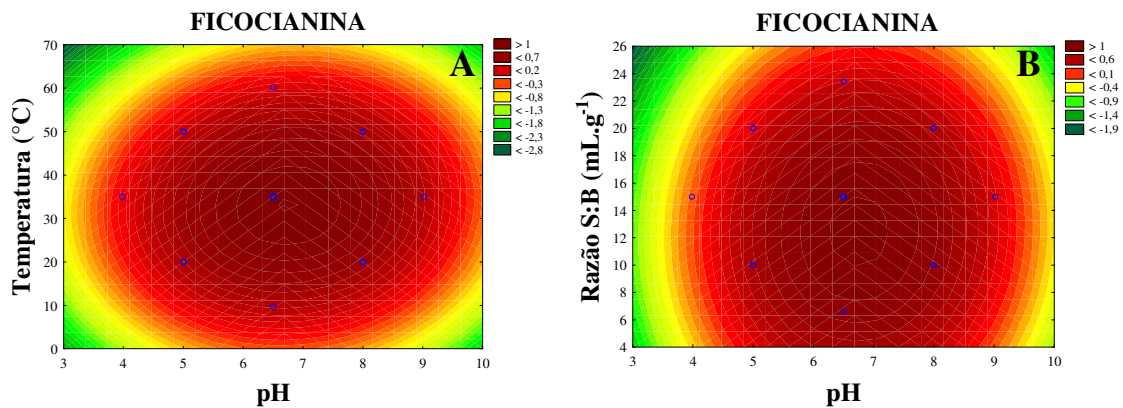


Figura A.3 – Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o tampão fosfato como solvente pelo método convencional (500 rpm)

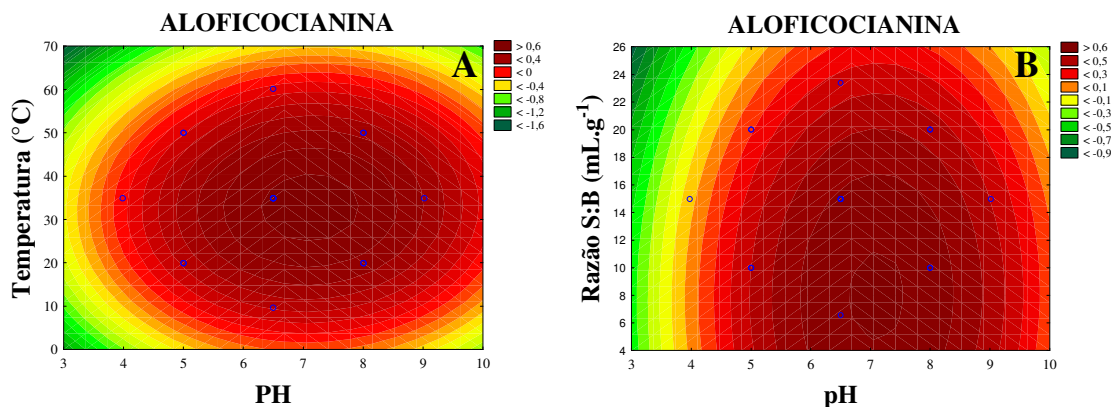
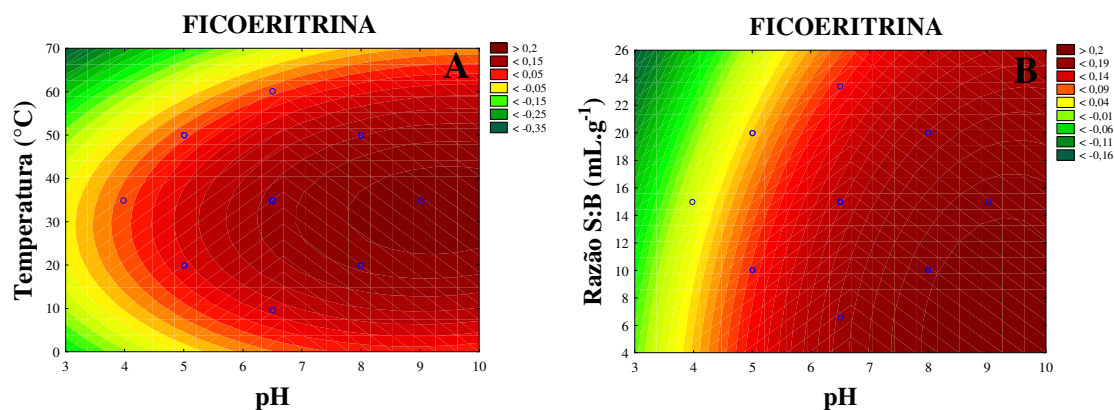


Figura A.4 – Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o tampão fosfato como solvente pelo método convencional (500 rpm)



2-HEAA

Tabela A.2 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}
Ficocianina				
Regressão	4,2816	9	0,4757	${}^aF(9,7) = 3,68$
Resíduo	0,4925	7	0,0704	
Falta de ajuste	4,7741	16	0,2984	
Erro puro	0,4899	5	0,0980	
Total	4,7741	16	0,2984	
R^2	0,90			
F_{tab}				
Aloficocianina				
Regressão	3,4259	9	0,3807	${}^aF(9,7) = 3,68$
Resíduo	0,4449	7	0,0636	
Falta de ajuste	3,8707	16	0,2419	
Erro puro	0,4432	5	0,0886	
Total	3,8707	16	0,2419	
R^2	0,88			
F_{tab}				
Ficoeritrina				
Regressão	1,3748	9	0,1528	${}^aF(9,7) = 3,68$
Resíduo	0,1857	7	0,0265	
Falta de ajuste	1,5605	16	0,0975	
Erro puro	0,1840	5	0,0368	

Total	1,5605	16	0,0975
R^2	0,88		
F_{tab}			
(95% de confiança)			${}^aF(9,7) = 3,68$
(a) $F_{calc} = MQ_{regr}/MQ_{res}$			

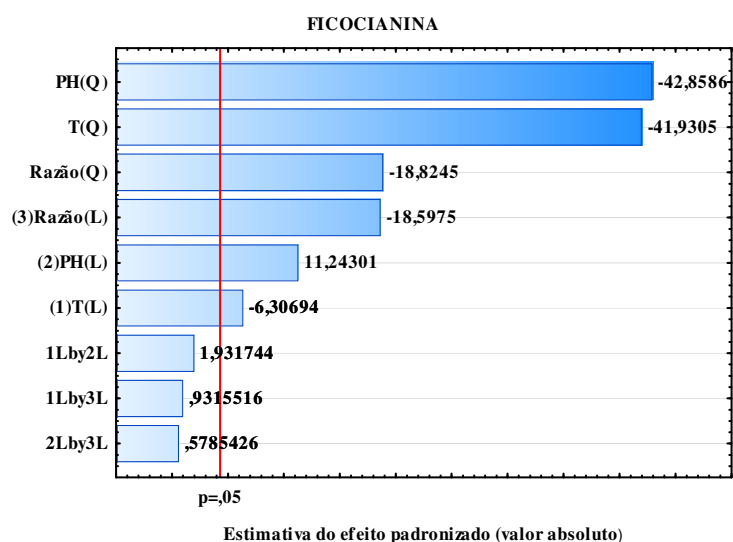
Equações do modelo de extração de ficobiliproteínas com 2-HEAA pelo método convencional:

$$C_{ficocianina} = -0,92pH^2 - 0,90T^2 - 0,40Razão\ s:b^2 + 0,21pH - 0,12T - 0,36Razão\ s:b + 1,40 \quad (18)$$

$$C_{aloficocianina} = -0,80pH^2 - 0,79T^2 - 0,35Razão\ s:b^2 + 0,26pH - 0,10T - 0,37Razão\ s:b + 1,24 \quad (19)$$

$$C_{ficoeritrina} = -0,50pH^2 - 0,53T^2 - 0,25Razão\ s:b^2 + 0,12pH - 0,22Razão\ s:b + 0,77 \quad (20)$$

Figura A.5 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo método convencional



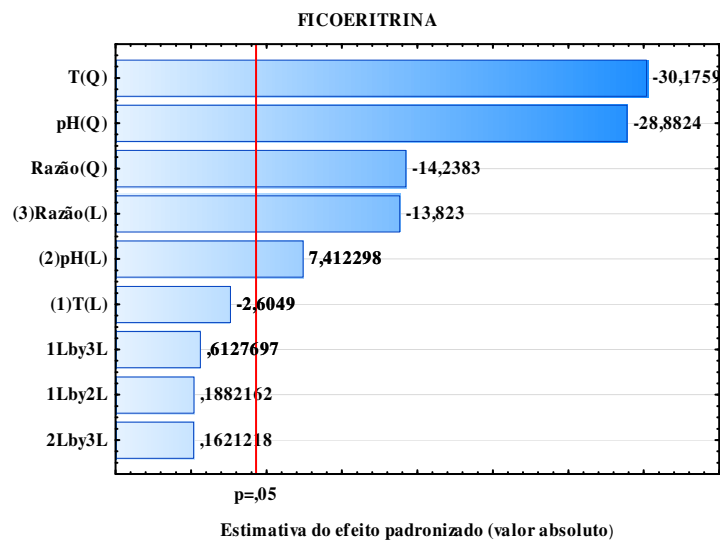
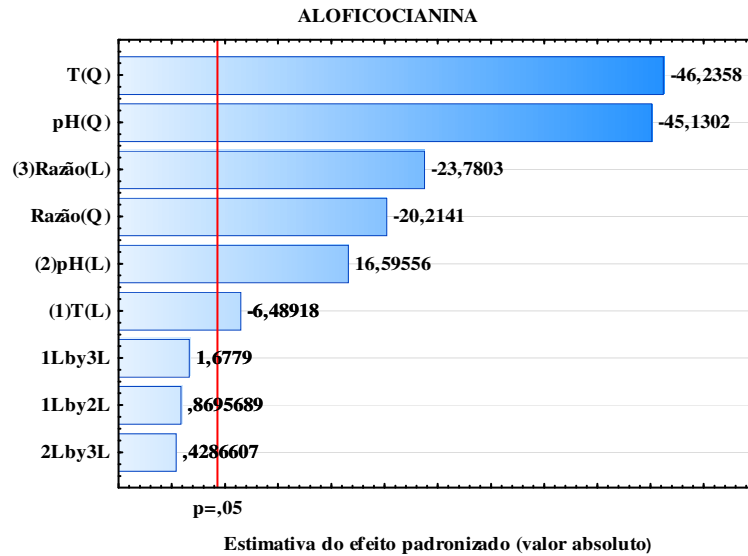


Figura A.6 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional (500 rpm)

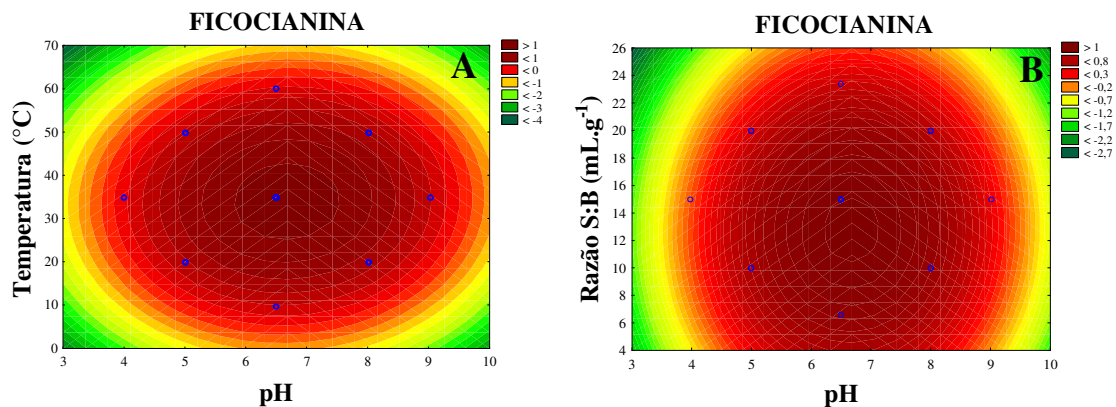


Figura A.7 – Superfícies de contorno para a extração de alofococianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional (500 rpm)

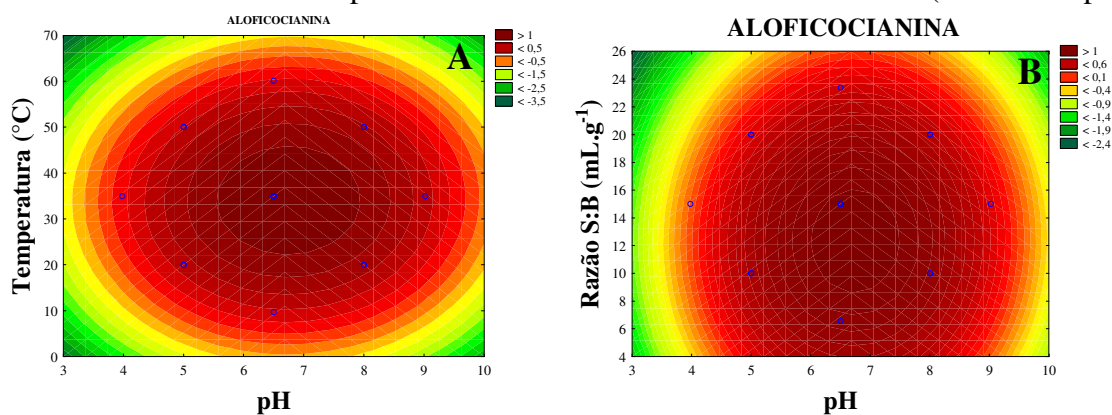
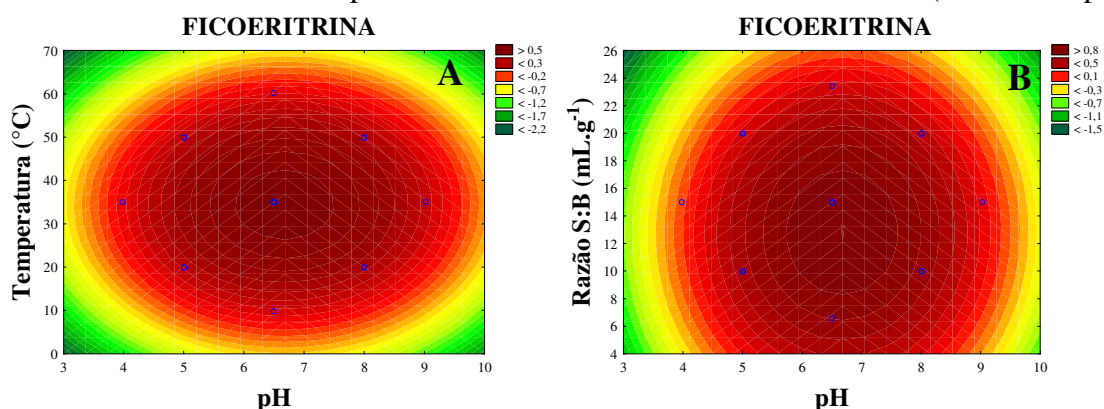


Figura A.8 – Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAA como solvente pelo método convencional (500 rpm)



2-HEAF

Tabela A.3 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, alofococianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}
Ficocianina				
Regressão	3,7044	9	0,4116	22,52
Resíduo	0,1279	7	0,0183	
Falta de ajuste	3,8323	16	0,2395	
Erro puro	0,1279	5	0,0256	
Total	3,8323	16	0,2395	
R^2	0,97			
F_{tab}				^a F(9,7) = 3,68

Aloficocianina				
Regressão	3,5410	9	0,3934	18,30
Resíduo	0,1505	7	0,0215	
Falta de ajuste	3,6915	16	0,2307	
Erro puro	0,1496	5	0,0299	
Total	3,6915	16	0,2307	
R ²	0,96			
F _{tab}				^a F(9,7) = 3,68
Ficoeritrina				
Regressão	0,6354	9	0,0706	13,15
Resíduo	0,0376	7	0,0054	
Falta de ajuste	0,6730	16	0,0421	
Erro puro	0,0370	5	0,0074	
Total	0,6730	16	0,0421	
R ²	0,94			
F _{tab}				^a F(9,7) = 3,68

(95% de confiança)

(a) $F_{calc} = MQ_{regr}/MQ_{res}$

Equações do modelo de extração de ficobiliproteínas com 2-HEAF pelo método convencional:

$$C_{ficocianina} (g.L^{-1}) = -0,76pH^2 - 0,53T^2 + 0,10pH \times T - 0,05pH \times Razão\ s:b - 0,05T \times Razão\ s:b + 0,50pH - 0,43T - 0,17Razão\ s:b + 1,37 \quad (21)$$

$$C_{aloficocianina} (g.L^{-1}) = -0,56pH^2 - 0,55T^2 + 0,33pH \times T + 0,56pH - 0,41T - 0,23Razão\ s:b + 1,41 \quad (22)$$

$$C_{ficoeritrina} (g.L^{-1}) = -0,24pH^2 - 0,24T^2 - 0,08Razão\ s:b^2 + 0,17pH \times T + 0,07pH \times Razão\ s:b - 0,07T \times Razão\ s:b + 0,20pH - 0,17T - 0,13Razão\ s:b + 0,62 \quad (23)$$

Figura A.9 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAF pelo método convencional

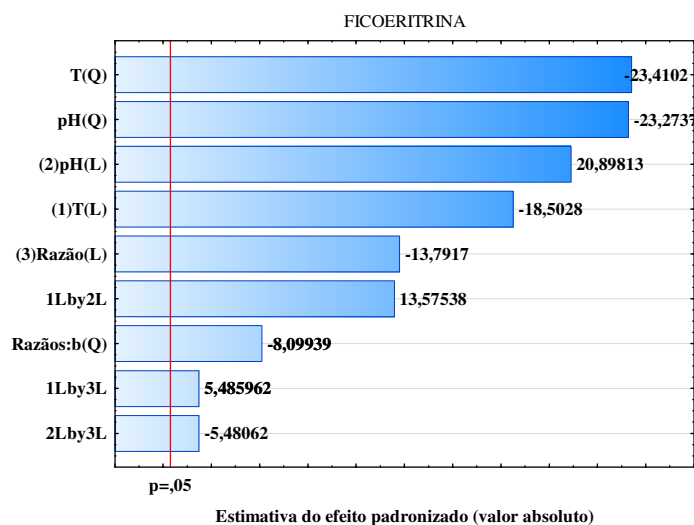
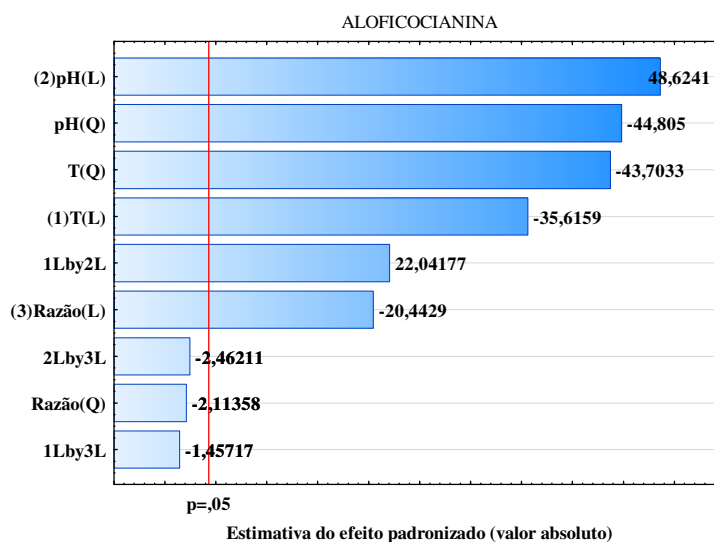
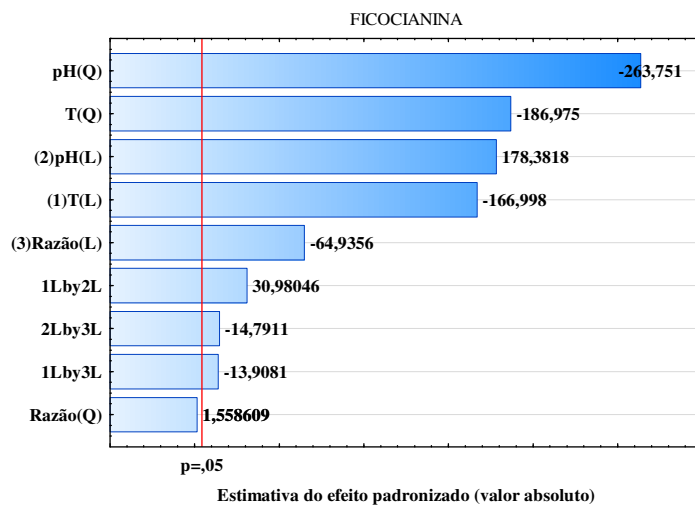


Figura A.10 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional (500 rpm)

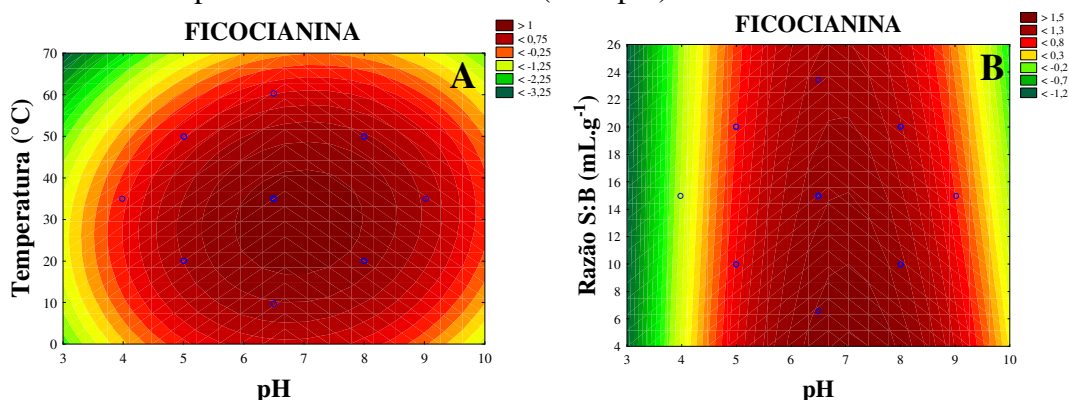


Figura A.11 – Superfícies de contorno para a extração de aloficocianina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional (500 rpm)

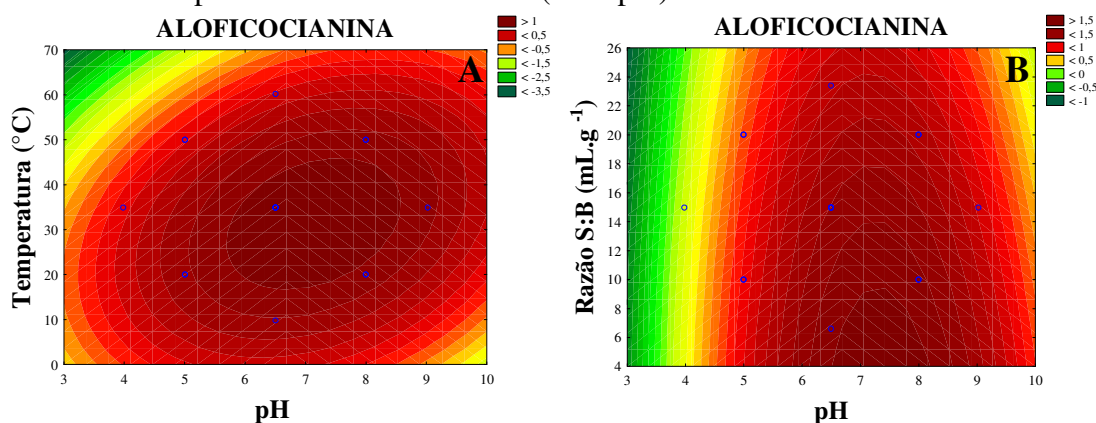
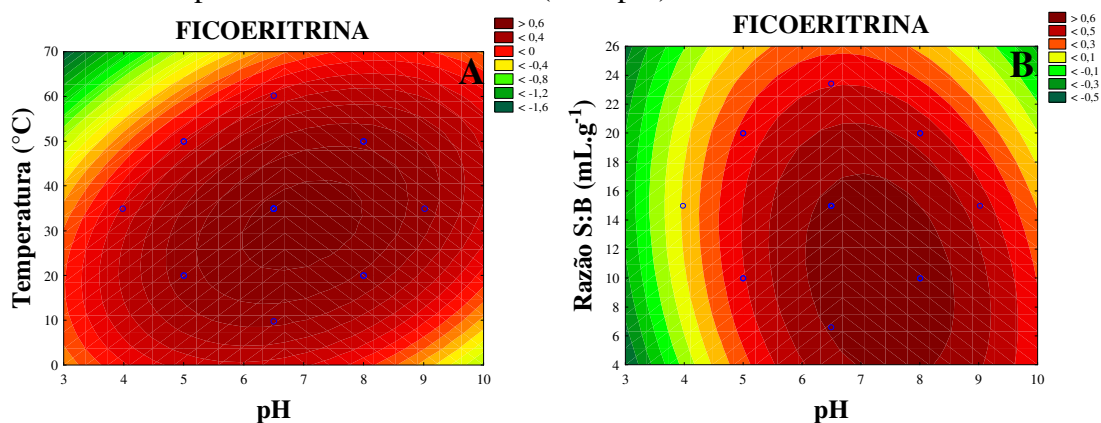


Figura A.12 – Superfícies de contorno para a extração de ficoeritrina, em função do pH pela temperatura fixando a razão solvente:biomassa em 15 mL.g^{-1} (A) e do pH pela razão solvente:biomassa fixando a temperatura em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (B), utilizando o 2-HEAF como solvente pelo método convencional (500 rpm)



APÊNDICE B – DADOS ESTATÍSTICOS DOS DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

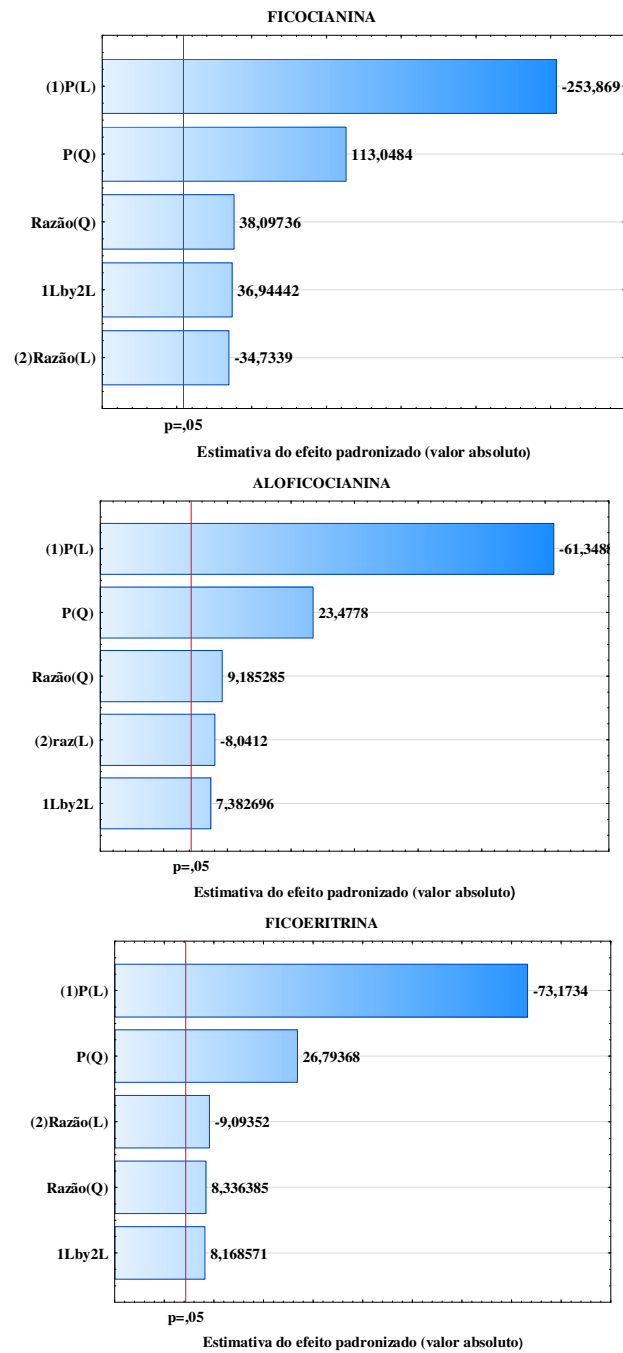
TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO

Tabela B.1 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo micro-ondas

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,0309	5	0,0062	3,40
Resíduo	0,0092	5	0,0018	
Falta de ajuste	0,0401	10	0,0040	
Erro puro	0,0092	3	0,0030	
Total	0,0401	10	0,0040	
R^2	0,78			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,0137	5	0,011	3,04
Resíduo	0,0045	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0182	10	0,0073	
Erro puro	0,0045	3	0,006	
Total	0,0182	10	0,0073	
R^2	0,75			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Ficoeritrina				
Regressão	0,0091	5	0,011	3,15
Resíduo	0,0029	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0121	10	0,0073	
Erro puro	0,0029	3	0,006	
Total	0,0121	10	0,0073	
R^2	0,76			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
(95% de confiança)				${}^a F(5,5) = 5,05$

(a) $F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$

Figura B.1 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com tampão fosfato pelo micro-ondas



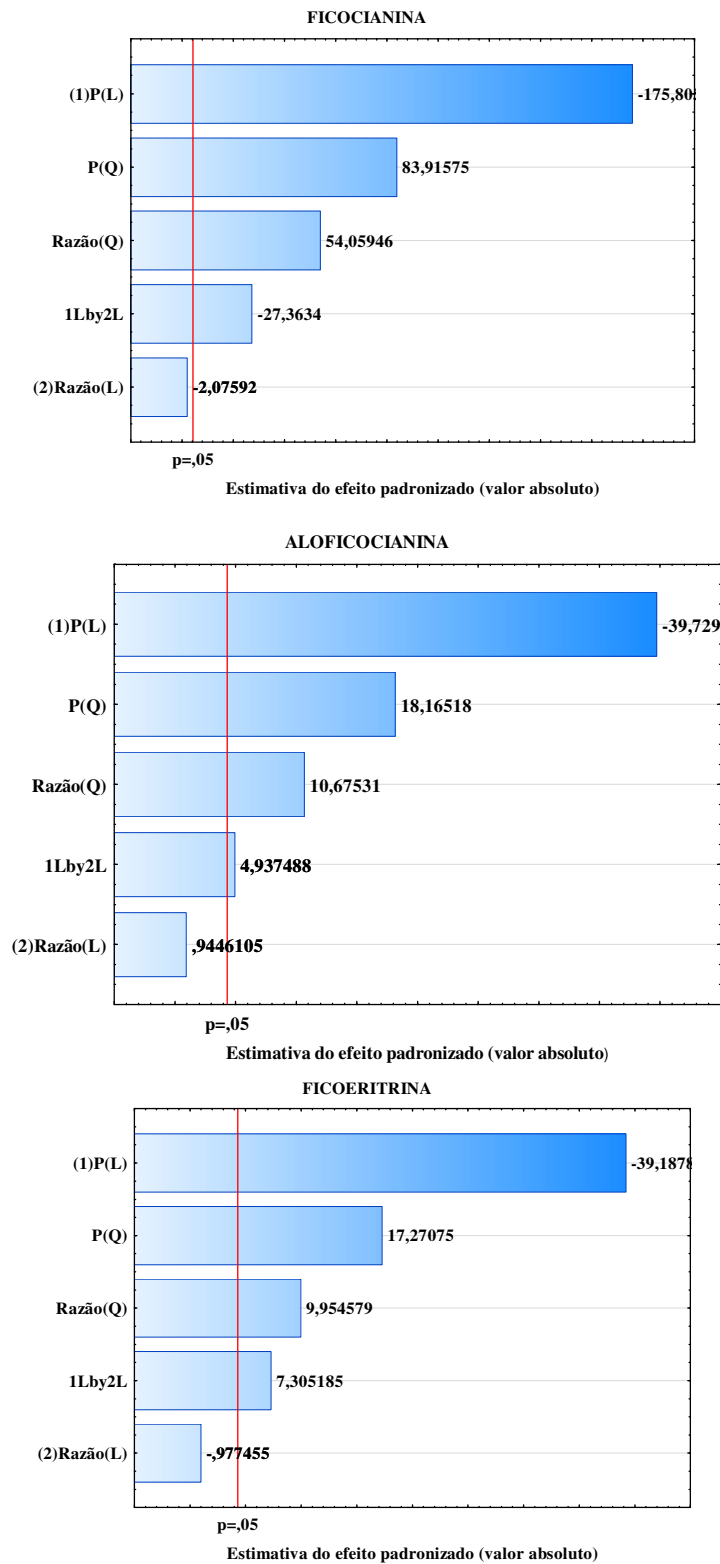
2-HEAA

Tabela B.2 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA como solvente pelo micro-ondas

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,0198	5	0,011	2,00
Resíduo	0,0102	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0300	10	0,0073	
Erro puro	0,0102	3	0,006	
Total	0,0300	10	0,0073	
R^2	0,66			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,0228	5	0,0110	4,06
Resíduo	0,0056	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0284	10	0,0073	
Erro puro	0,0056	3	0,0060	
Total	0,0284	10	0,0073	
R^2	0,80			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
(95% de confiança)				
Ficoeritrina				
Regressão	0,0137	5	0,0110	3,57
Resíduo	0,0038	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0175	10	0,0073	
Erro puro	0,0038	3	0,0060	
Total	0,0175	10	0,0073	
R^2	0,78			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
(95% de confiança)				

$$(a) F_{calc} = MQ_{reg} / MQ_{res}$$

Figura B.2 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo método convencional



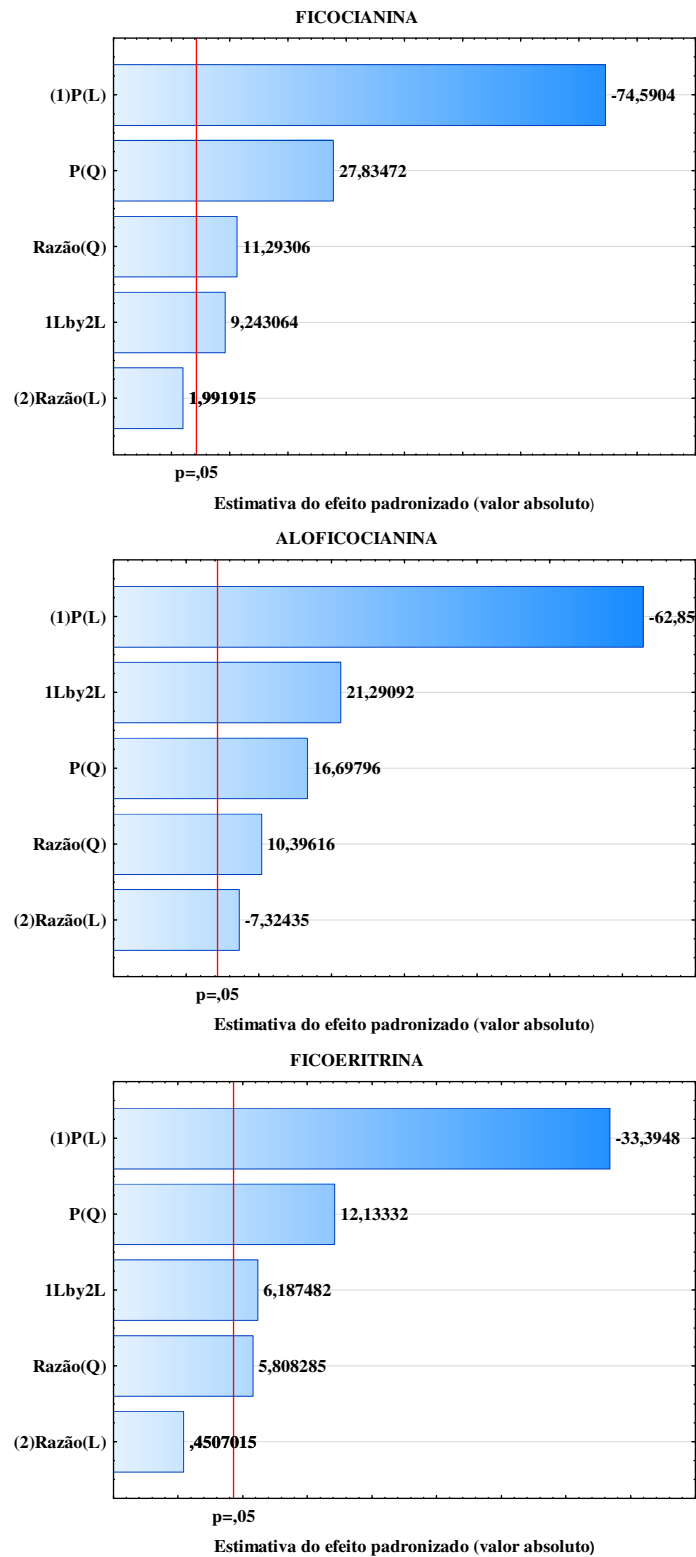
2-HEAF

Tabela B.3 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAF como solvente pelo micro-ondas

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,0536	5	0,011	4,30
Resíduo	0,0126	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0661	10	0,0073	
Erro puro	0,0126	3	0,006	
Total	0,0661	10	0,0073	
R^2	0,81			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,0845	5	0,011	2,30
Resíduo	0,0367	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,1212	10	0,0073	
Erro puro	0,0367	3	0,006	
Total	0,1212	10	0,0073	
R^2	0,70			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Ficoeritrina				
Regressão	0,0133	5	0,011	3,33
Resíduo	0,0040	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0173	10	0,0073	
Erro puro	0,0040	3	0,006	
Total	0,0174	10	0,0073	
R^2	0,77			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
(95% de confiança)				${}^a F(5,5) = 5,05$

(a) $F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$

Figura B.3 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAF pelo método convencional



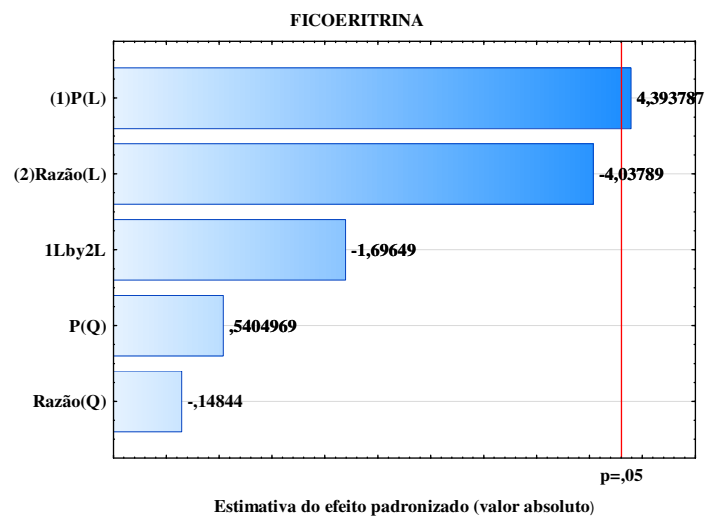
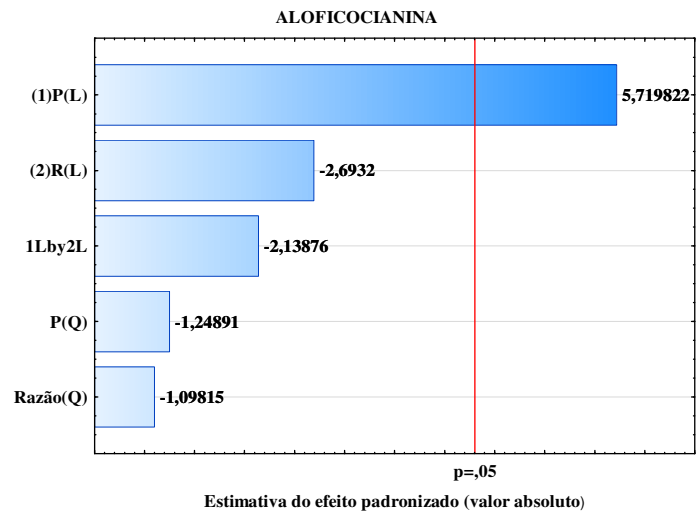
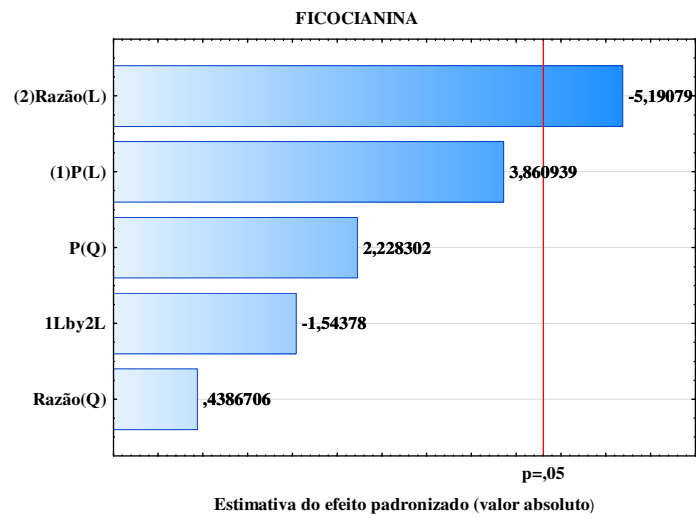
[Bmim][Cl]

Tabela B.4 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o [Bmim][Cl] como solvente pelo micro-ondas

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,0105	5	0,0110	3,54
Resíduo	0,0029	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0134	10	0,0073	
Erro puro	0,0025	3	0,0060	
Total	0,0134	10	0,0073	
R^2	0,78			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,0033	5	0,0110	3,40
Resíduo	0,0008	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0041	10	0,0073	
Erro puro	0,0007	3	0,0060	
Total	0,0041	10	0,0073	
R^2	0,80			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Ficoeritrina				
Regressão	0,0032	5	0,0110	6,62
Resíduo	0,0005	5	0,0036	
Falta de ajuste	0,0036	10	0,0073	
Erro puro	0,0003	3	0,0060	
Total	0,0036	10	0,0073	
R^2	0,87			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
(95% de confiança)				${}^a F(5,5) = 5,05$

(a) $F_{calc} = MQ_{regr}/MQ_{res}$

Figura B.4 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com [Bmim][Cl] pelo micro-ondas



APÊNDICE C – DADOS ESTATÍSTICOS DOS DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO

Tabela C.1 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o tampão fosfato como solvente pelo ultrassom

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,2701	5	0,0540	24,75
Resíduo	0,0317	5	0,0063	
Falta de ajuste (FA)	0,3018	10	0,0302	
Erro puro (EP)	0,0270	3	0,0090	
Total	0,3018	10	0,0302	
R^2	0,90			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,1341	5	0,0268	4,18
Resíduo	0,0321	5	0,0064	
Falta de ajuste (FA)	0,1661	10	0,0166	
Erro puro (EP)	0,0278	3	0,0093	
Total	0,1661	10	0,0166	
R^2	0,81			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Ficoeritrina				
Regressão	0,0112	5	0,0022	3,65
Resíduo	0,0031	5	0,0006	
Falta de ajuste (FA)	0,0143	10	0,0014	
Erro puro (EP)	0,0031	3	0,0010	
Total	0,0143	10	0,0014	
R^2	0,80			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$

95% de confiança

$$(a) F_{calc} = MQ_{regr}/MQ_{res}$$

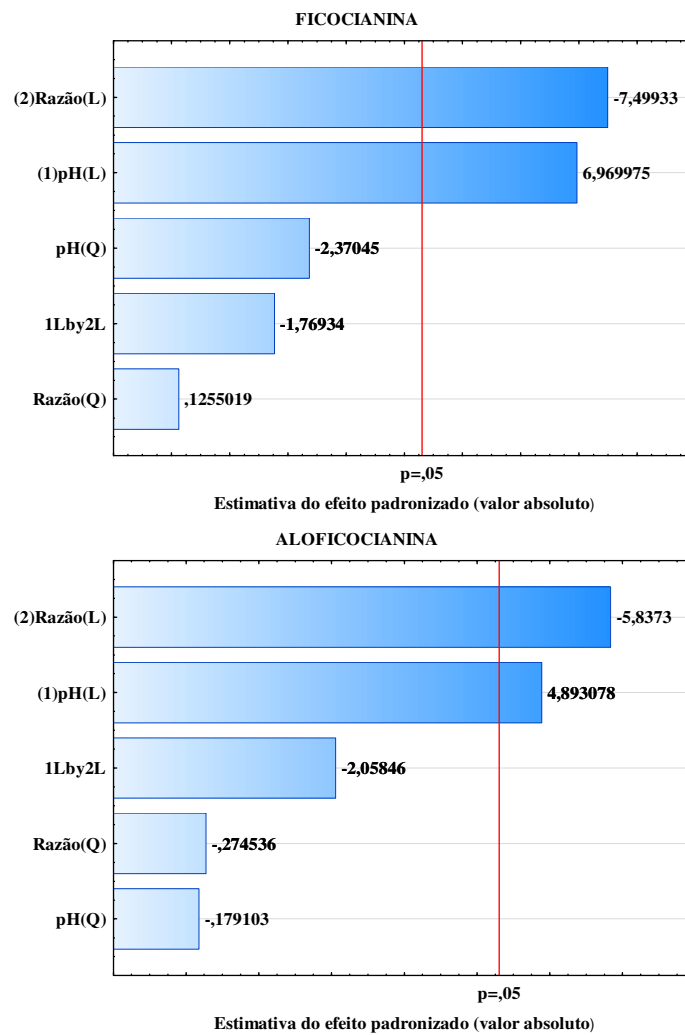
Equações do modelo de extração de ficobiliproteínas com tampão fosfato de sódio pelo ultrassom:

$$C_{ficocianina} = 0,24pH - 0,26Razão\ s:b + 0,46 \quad (24)$$

$Caloficocianina=0,16pH-0,19Razão\ s:b+0,22$ (25)

$Cfïcoeritrina=0,014pH^2-0,03pHxRazão\ s:b+0,04pH-0,06Razão\ s:b+0,05$ (26)

Figura C.1 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com tampão fosfato pelo ultrassom



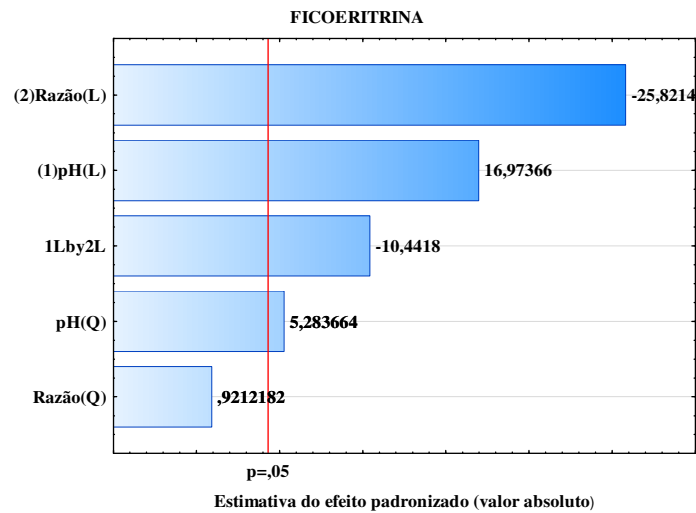
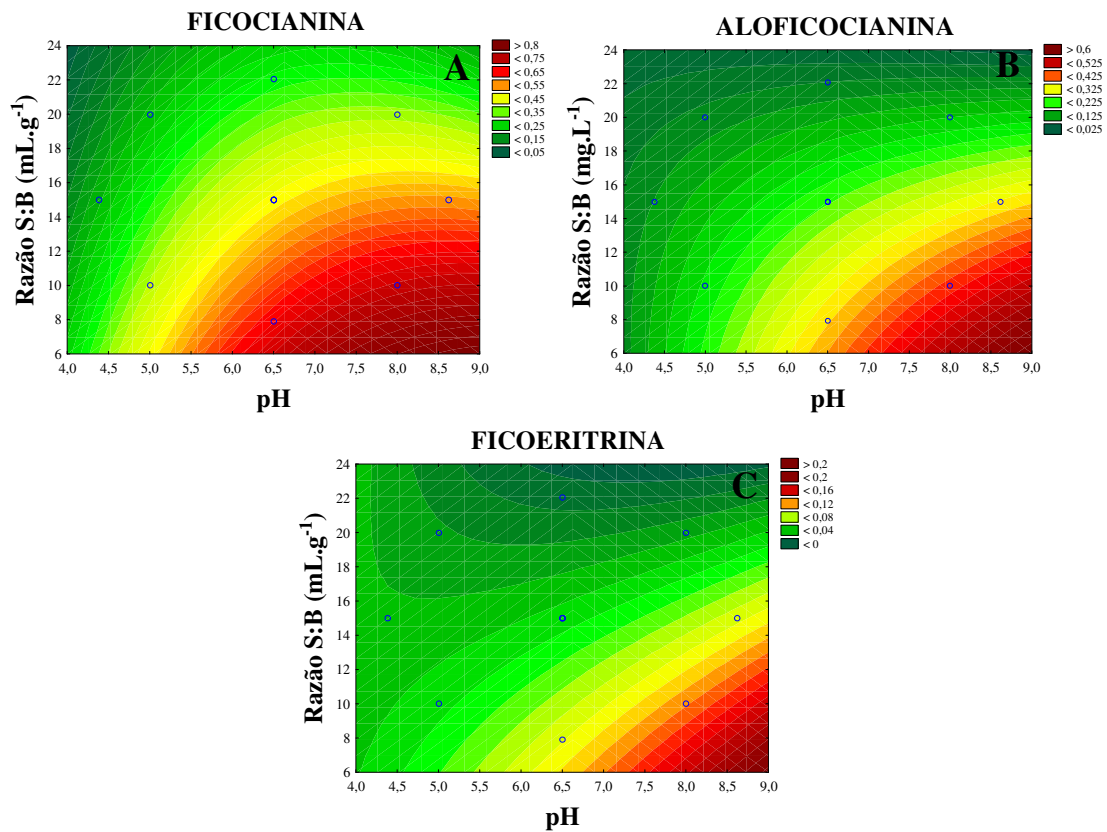


Figura C.2 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o tampão fosfato como solvente no ultrassom



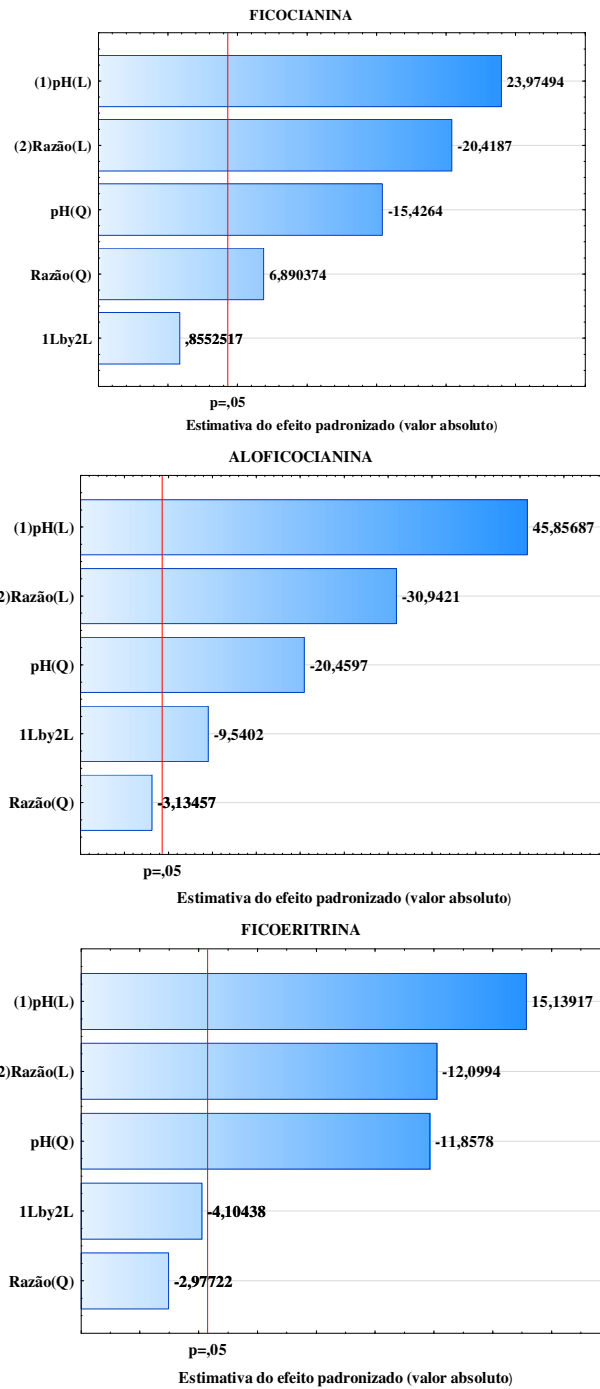
2-HEAA

Tabela C.2 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAA como solvente pelo ultrassom

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,2038	5	0,0408	2,32
Resíduo	0,0885	5	0,0177	
Falta de ajuste (FA)	0,2924	10	0,0292	
Erro puro (EP)	0,0882	3	0,0294	
Total	0,2924	10	0,0292	
R^2	0,70			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,4461	5	0,0892	2,09
Resíduo	0,2132	5	0,0426	
Falta de ajuste	0,6594	10	0,0659	
Erro puro	0,2130	3	0,0710	
Total	0,6594	10	0,0659	
R^2	0,68			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Ficoeritrina				
Regressão	0,0839	5	0,0168	3,40
Resíduo	0,0247	5	0,0049	
Falta de ajuste	0,1086	10	0,0109	
Erro puro	0,0244	3	0,0081	
Total	0,1086	10	0,0109	
R^2	0,77			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$

(a) $F_{calc} = MQ_{regr}/MQ_{res}$

Figura C.3 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAA pelo ultrassom



2-HEAF

Tabela C.3 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o 2-HEAF como solvente pelo ultrassom

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	^a F _{calc}
Ficocianina				
Regressão	0,3945	5	0,0789	111,02
Resíduo	0,0036	5	0,0007	
Falta de ajuste	0,3981	10	0,0398	
Erro puro	0,0028	3	0,0009	
Total	0,3981	10	0,0398	
R ²	0,99			
F _{tab}				^a F(5,5) = 5,05
Aloficocianina				
Regressão	0,3925	5,0000	0,0785	61,90
Resíduo	0,006343	5	0,0013	
Falta de ajuste	0,398878	10	0,0399	
Erro puro	0,004111	3	0,001370	
Total	0,398878	10	0,0399	
R ²	0,98			
F _{tab}				^a F(5,5) = 5,05
Ficoeritrina				
Regressão	0,0678	5	0,0136	40,52
Resíduo	0,0017	5	0,0003	
Falta de ajuste	0,0695	10	0,0069	
Erro puro	0,0015	3	0,0005	
Total	0,0695	10	0,0069	
R ²	0,97			
F _{tab}				^a F(5,5) = 5,05

95% de confiança

(a) $F_{calc} = MQ_{regr}/MQ_{res}$

Equações do modelo de extração de ficobiliproteínas com 2-HEAA pelo ultrassom:

$$C_{ficocianina} = -0,17pH^2 + 0,14Razão^2 - 0,14pH \times Razão + 0,20pH - 0,31Razão + 0,36 \quad (27)$$

$$C_{aloficocianina} = -0,16pH^2 + 0,15Razão^2 - 0,12pH \times Razão + 0,11pH - 0,35Razão + 0,34 \quad (28)$$

$$C_{ficoeritrina} = 0,08Raz\tilde{a}o(L) - 0,06pH(Q) + 0,05Raz\tilde{a}o(Q) - 0,15pH(L) + 0,12Lby2L \quad (29)$$

Figura C.4 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com 2-HEAF pelo ultrassom

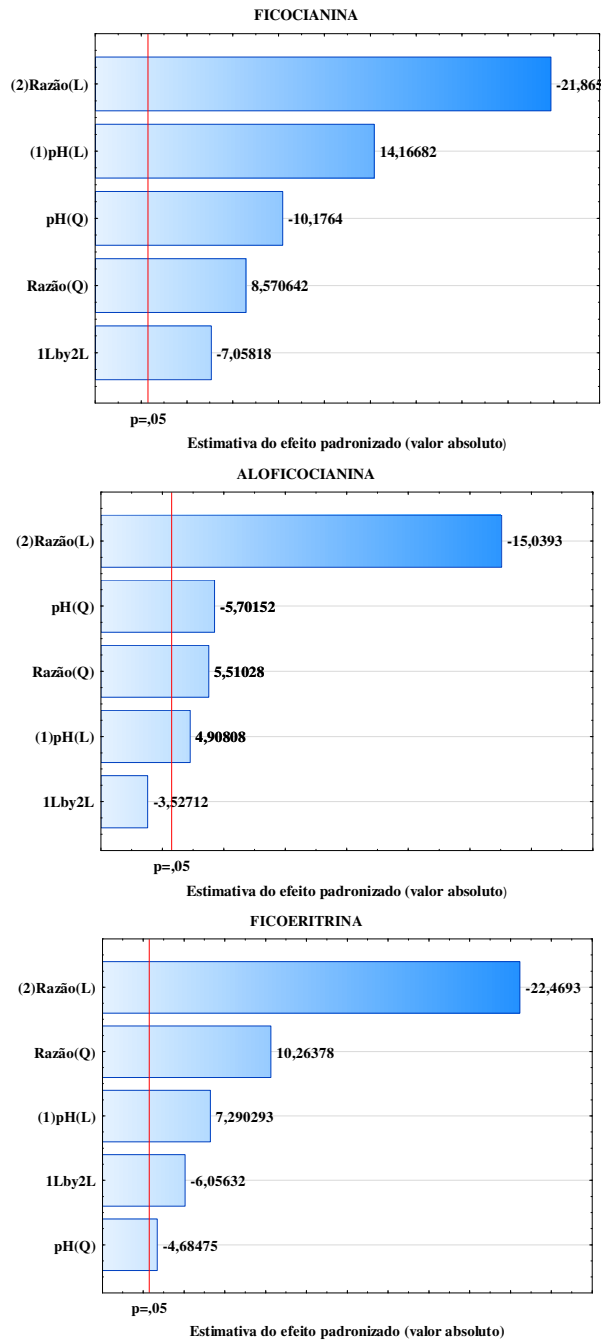
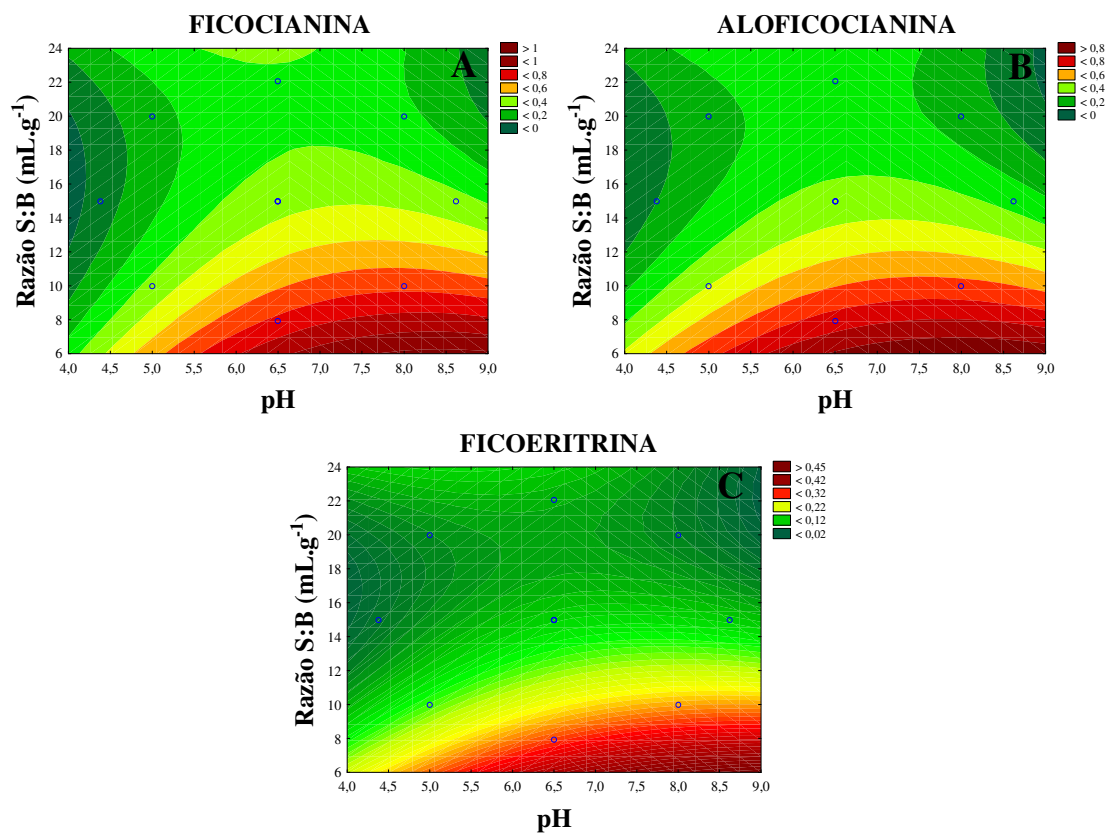


Figura C.5 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o 2-HEAF como solvente no ultrassom



[Bmim][Cl]

Tabela C.4 – ANOVA para o modelo de extração de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina utilizando o [Bmim][Cl] como solvente pelo ultrassom

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	${}^a F_{calc}$
Ficocianina				
Regressão	0,0520	5	0,0104	7,90
Resíduo	0,0066	5	0,0013	
Falta de ajuste	0,0586	10	0,0059	
Erro puro	0,0044	3	0,0015	
Total	0,0586	10	0,0059	
R^2	0,89			
F_{tab}				${}^a F(5,5) = 5,05$
Aloficocianina				
Regressão	0,0201	5	0,0040	12,21
Resíduo	0,0017	5	0,0003	

Falta de ajuste	0,0217	10	0,0022
Erro puro	0,0014	3	0,0005
Total	0,0217	10	0,0022
R^2	0,92		
F_{tab}			

$${}^aF(5,5) = 5,05$$

Ficoeritrina				
Regressão	0,0031	5	0,0006	4,38
Resíduo	0,0007	5	0,0001	
Falta de ajuste (FA)	0,0038	10	0,0004	
Erro puro (EP)	0,0007	3	0,0002	
Total	0,0038	10	0,0004	
R^2	0,81			
F_{tab}				
95% de confiança				${}^aF(5,5) = 5,05$

$$a)F_{calc} = MQ_{reg}/MQ_{res}$$

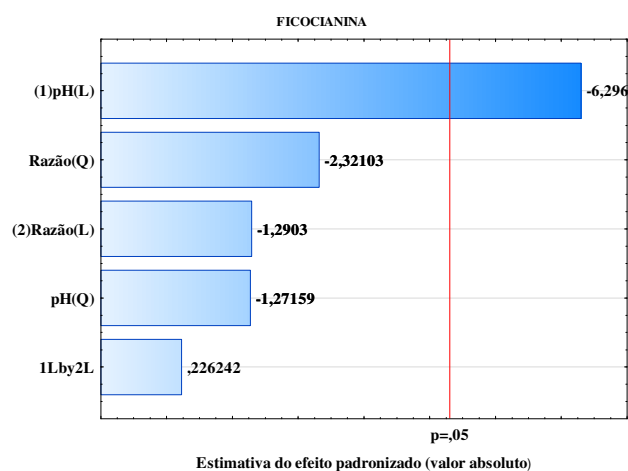
Equações do modelo de extração de ficobiliproteínas com [Bmim][Cl] pelo ultrassom:

$$C_{ficocianina} = -0,15pH + 0,26 \quad (30)$$

$$C_{caloficocianina} = -0,05Razão^2 - 0,08pH + 0,10 \quad (31)$$

$$C_{ficoeritrina} = -0,03Razão^2 - 0,02pH + 0,06 \quad (32)$$

Figura C.6 – Gráficos de Pareto das ficobiliproteínas extraídas com [Bmim][Cl] pelo ultrassom



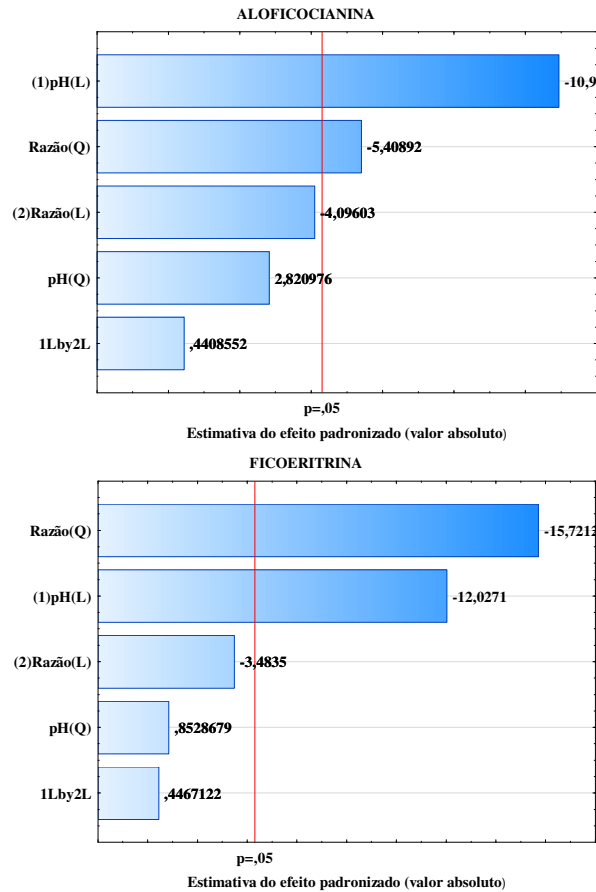


Figura C.7 – Superfícies de contorno para a extração de ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C) em função do pH pela razão solvente:biomassa utilizando o [Bmim][Cl] como solvente no ultrassom

