



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

FELIPE CAROLINO DE CASTRO

**EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE FICOCIANINA DE *Arthospira
platensis* USANDO LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO (2-HEAF): MODELAGEM DOS
DADOS EXPERIMENTAIS**

FORTALEZA

2018

FELIPE CAROLINO DE CASTRO

EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE FICOCIANINA DE *Arthospira platensis* USANDO
LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO (2-HEAF): MODELAGEM DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

FORTALEZA

2018

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)

C351e Castro, Felipe Carolino de.
Extração sólido-líquido de ficocianina de *Arthrospira platensis* usando líquido iônico prótico (2-HEAF) :
modelagem dos dados experimentais / Felipe Carolino de Castro. – 2018.
43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Maria Valderez Ponte Rocha.

1. Ficocianina. 2. Líquido iônico. 3. *Arthrospira (spirulina) plantensis*. I. Título.

CDD 660

FELIPE CAROLINO DE CASTRO

EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE FICOCIANINA DE *Arthospira platensis* USANDO
LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO 2-HEAF: MODELAGEM DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Eng. José Edvan Marques Junior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Edivardo e Gorete.

A minha irmã, Amanda.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Gorete Carolino, por todo amor, carinho e ensinamentos, por ser uma fonte de inspiração e por sempre ter me apoiado na minha vida pessoal e acadêmica.

Ao meu pai, Francisco Edivardo, por todo esforço e investimento na minha educação, por ser um exemplo de vida de superação e conquistas.

A minha irmã, Amanda Carolino, minha melhor amiga, por todo companheirismo, amor e compreensão.

Ao meu vô, Alcides Carolino, já falecido, por tudo que me ensinou e representa na minha vida.

A minha orientadora e coordenadora do curso, professora Valderez Rocha, por toda paciência, carinho e atenção.

A minha co-orientadora, doutora Renata Débora, por todo carinho e ensinamento.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química, Samuel Cartaxo, Ivanildo Junior, André Casimiro, Diana Azevedo, Fabiano Fernandes, Rílvia Santiago Aguiar, Murilo Tavares, Vitor Moreira por todo profissionalismo e qualidade de ensino.

A todos aqueles que fizeram e fazem parte da minha vida pessoal e a acadêmica.

RESUMO

O pigmento protéico ficocianina é um composto de alto valor agregado e de grande interesse da indústria farmacêutica devido as suas propriedades terapêuticas, como anti-inflamatório, antioxidante e hepatoprotetora, sendo ainda usado como corante natural de cor azul na indústria alimentícia, de cosméticos, além de outras aplicações como marcadores de fluorescência. A ficocianina é um grupo das ficobiliproteínas, que são pigmentos de natureza protéica que captam energia luminosa e a transferem para o centro reativo da fotossíntese. São encontrados na microalga marinha como, por exemplo, *Arthrospira (Spirulina) plantensis*. No entanto, a extração desse composto é dificultada devido às multicamadas da parede celular da microalga e da grande quantidade de contaminantes presentes. O solvente tradicionalmente utilizado na extração dessas biomoléculas é o tampão fosfato de sódio, no entanto, outros solventes como os líquidos iônicos estão ganhando notoriedade na comunidade científica, devido suas propriedades benéficas ao meio ambiente e ao processo de extração. A qualidade da cor, das propriedades da ficocianina e a eficiência da extração é influenciada pela temperatura, pH, solvente, entre outros. Diante disso, o presente trabalho de conclusão de curso teve como objetivo principal avaliar o efeito da temperatura e dos solventes utilizados, tampão fosfato de sódio a pH 7 e tampão de fosfato de sódio + líquido iônico prótico formiato de N-metil-2-hidroxietilamônio (2-HEAF) a pH 7,73 em razão biomassa:solvente de 2:30 m/v, no processo de extração sólido-líquido, além de obter os parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Nas condições ótimas, as concentrações e rendimento obtidos foram de 1,29 g.L⁻¹ e 0,86 g.L⁻¹; 19,3 e 12,93 mg.g⁻¹ em tampão e tampão + (2-HEAF), respectivamente. A adição do líquido iônico no tampão aumentou a energia de ativação de 179,24 KJ.mol⁻¹ para 225,93 KJ.mol⁻¹, diminuindo a velocidade da reação. O aumento da temperatura aumentou a taxa de extração, k, e a constante de equilíbrio, Ce, no entanto, o contínuo aumento mostrou degradação protéica da ficocianina. Os valores de entalpia de ativação, energia livre de Gibb's e entropia de ativação mostraram que o tampão apresentava maior estabilidade do que o líquido iônico para o método utilizado.

Palavras-chave: Ficocianina. Líquido iônico. , *Arthrospira (Spirulina) plantensis*

ABSTRACT

The phycocyanin protein's pigment is a compound of high value. It has great interest of the pharmaceutical industry due to its therapeutic properties. It is an anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective product, and also used as blue natural colorant in the food and cosmetic industry. Furthermore, this pigment has other applications, as fluorescence markers. Phycocyanin is a group of phycobiliproteins, which are pigments that capture light energy and transfer it to the reactive center of photosynthesis. They are found in the marine micro-algae, such as *Arthrospira* (*Spirulina*) *plantensis*. However, the extraction of this compound is difficult due to the multilayer cell wall of the microalga and the large amount of contaminants. The solvent traditionally used in the extraction of these biomolecules is sodium phosphate buffer. However, other solvents such as ionic liquids are gaining notoriety in the scientific community due to their beneficial properties to the environment and to the extraction process. The color quality, the phycocyanin properties and the efficiency of the extraction are influenced by temperature, pH, solvent and another parameters and properties. The aim of this work was to evaluate the effect of temperature and solvents. Sodium phosphate buffer at pH 7 and sodium phosphate buffer + protonic ionic liquid N-methyl-2- (2-HEAF) at pH 8 were used. The biomass/solvent ratio was 2:3 m / v in the solid-liquid extraction process. The kinetic and thermodynamic parameters were obtained. Under optimum conditions, the concentrations and yield obtained were 1.29 g L⁻¹ and 0.86 g L⁻¹; 19.3 mg g⁻¹ and 12.93 mg g⁻¹ in buffer and buffer + (2-HEAF), respectively. The addition of the ionic liquid in the buffer increased the activation energy from 179.24 KJ mol⁻¹ to 225.93 KJ mol⁻¹, slowing the reaction rate. The increase in temperature increased the extraction rate, k, and the equilibrium constant, C_e. However, the continuous temperature increase showed protein degradation. The enthalpy values of activation, free energy of Gibbs and entropy of activation showed that the buffer presented greater stability than the ionic liquid for the used method.

Keywords: Phycocyanin. Ionic liquid. *Spirulina* (*Arthrospira*) *Plantensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Micrografia de luz de <i>Arthrospira platensis</i>	17
Figura 2	– Eletro micrografia de <i>Arthrospira platensis</i> em corte transversal mostrando a organização da estrutura fina do Citoplasma Membranas de tilacóide (t), áreas isentas de tilacóides (tf) preenchidas com associados de ficobilissomas, grânulos osmiofílicos e ribossomos.....	17
Figura 3	– Estrutura do ficobilissoma	18
Figura 4	– Fórmula estrutural da ficocianina	19
Figura 5	– Cátions e ânions mais utilizados na elaboração dos LIs	24
Figura 6	– Estrutura química do líquido iônico 2-HEAF.....	25
Figura 7	– Foto dos equipamentos utilizados no processo de extração.....	26
Figura 8	– Efeito da temperatura na extração de ficocianina utilizando tampão fosfato de sódio (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◀) 50 °C.....	30
Figura 9	– Efeito da temperatura na extração de ficocianina utilizando tampão fosfato de sódio e tampão fosfato de sódio + líquido iônico (2-HEAF) (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◀) 50°C	31
Figura 10	– Influência da temperatura e do solvente na concentração máxima de ficocianina extraída de <i>Arthrospira Plantesis</i>	31
Figura 11	– Efeito da temperatura no parâmetro cinético (k), constante de extração, para os solventes tampão fosfato de sódio e tampão fosfato de sódio + líquido iônico (2-HEAF).....	33
Figura 12	– Efeito da temperatura no parâmetro cinético (h), taxa de extração inicial, para os solventes tampão fosfato de sódio e tampão fosfato de sódio + o líquido iônico (2-HEAF).....	34
Figura 13	– Efeito da temperatura no parâmetro cinético (C _e), concentração de equilíbrio, para os solventes tampão fosfato de sódio e tampão fosfato de sódio + líquido iônico (2-HEAF).....	34

- Figura 14 – Modelo cinético para estimar a taxa de extração (k) e o equilíbrio de concentração (C_e) para a faixa de temperatura de extração de ficocianina utilizando o solvente tampão fosfato de sódio pH 7. (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◀) 50 °C..... 35
- Figura 15 – Modelo cinético para estimar a taxa de extração (k) e o equilíbrio de concentração (C_e) para faixa de temperatura de extração de ficocianina utilizando o solvente tampão fosfato de sódio + líquido iônico (2-HEAF) pH 7,73 (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◀) 50 °C..... 35
- Figura 16 – Equação de Arrhenius-Van't Hoff plotada para extração de ficocianina utilizando solvente tampão fosfato de sódio nas temperaturas 20 °C, 25 °C, 35 °C e 40 °C..... 36
- Figura 17 – Equação de Arrhenius-Van't Hoff plotada para extração de ficocianina utilizando solvente tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) nas temperaturas 30 °C, 35 °C e 40 °C 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Funções e aplicações de ficocianina de acordo com o grau de pureza.....	19
Tabela 2 – Preço médio de ficocianina em pó liofilizado (publicado pelo Instituto Soley).....	20
Tabela 3 – Principais espécies de microalgas e alguns métodos de extração e purificação de ficocianina.....	20
Tabela 4 – Características físico-química do líquido iônico (2-HEAF) na temperatura de 25 °C.....	25
Tabela 5 – Comparação dos solventes utilizados no processo de extração através dos parâmetros rendimento e produtividade.....	32
Tabela 6 – Parâmetros do modelo cinético de segunda ordem (k e Ce) e taxa da velocidade inicial (h) para a extração com solvente tampão fosfato de sódio pH 7.....	33
Tabela 7 – Parâmetros do modelo cinético de segunda ordem (k e Ce) e taxa da velocidade inicial (h) para a extração com solvente tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) pH 7,73	33
Tabela 8 – Parâmetros do modelo de Arrhenius (Ea) e o coeficiente de determinação (R ²).....	37
Tabela 9 – Parâmetros termodinâmicos: entalpia de ativação (ΔH), energia livre de Gibb's (ΔG) e entropia de ativação (ΔS) para a extração com solvente tampão fosfato e com solvente tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) pH 7,73	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 <i>Spirulina (Arthrospira) Plantesis</i>	16
3.2 Ficocianina	18
3.3 Extração e purificação da ficocianina	20
3.4 Líquido Iônico	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Cultivo da microalga	25
4.2 Síntese do líquido iônico	26
4.3 Extração e análise da ficocianina	26
4.4 Rendimento e produtividade	27
4.5 Modelo cinético	27
4.6 Parâmetros termodinâmicos	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 Efeito do solvente e da temperatura de extração	30
5.2 Estudo do modelo cinético	32
5.3 Estudo da energia de ativação	32
5.4 Estudos dos parâmetros termodinâmicos	37
6. CONCLUSÃO	38
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	39
8. REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A microalga marinha *Arthrospira (Spirulina) platensis* é uma cianobactéria capaz de concentrar uma diversidade de compostos bioquímicos, como polissacarídeos, β -caroteno, clorofila a, entre outros pigmentos como as ficobiliproteínas (Su *et al.*, 2014).

Esses micro-organismos realizam fotossíntese de forma similar as plantas terrestres, sendo que metade da luz requerida é capturada pelas ficobiliproteínas, que são pigmentos protéicos que auxiliam nessa fotossíntese. As ficobiliproteínas podem ser divididas em três subgrupos de acordo com a cor característica conferida pelos cromóforos e pela capacidade de absorção da luz: ficocianina (azul brilhante), ficoeritrina (vermelho) e aloficocianina (verde-azul). Entre esses pigmentos, a ficocianina é o mais importante para a indústria alimentícia e cosmética, utilizada como um corante natural (Santiago-Santos *et al.*, 2004).

A ficocianina possui numerosas aplicações devido seu atributo de corante natural, como em sorvetes, bolos e outros produtos da indústria alimentícia (Batista *et al.*, 2006; Jespersen *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2008), além de batom e delineadores por exemplo, da indústria de cosméticos (Pandey *et al.*, 2013), possui também propriedades fluorescentes, sendo utilizado em menor proporção como marcadores bioquímicos em imunoenaios (Sekar e Chandramohan, 2008). Apresenta funções bioativas, incluindo 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-inflamatório (Zhu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016) e anticancerígeno (Fernández-Rojas *et al.*, 2014), podendo ser utilizado em produtos farmacêuticos (Liu *et al.*, 2000; Cherng *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007). A ficocianina pode constituir até 20% do peso seco da *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Chaiklahan *et al.*, 2011), que segundo (Wan *et al.*, 2016) é uma das principais microalgas estudadas sobre extração e produção de ficocianina.

Apesar da elevada atratividade deste pigmento, a sua extração é dificultada pela parede celular rígida da microalga, além da presença de contaminantes, sendo necessário um procedimento eficiente para causar a ruptura celular e obter o produto desejado. A eficiência da extração dos componentes das biomoléculas vai depender de diversos fatores, como o método de extração e o equipamento utilizado (Rodrigues *et al.*, 2018).

Na indústria, a obtenção desses componentes a partir desses micro-organismos como a microalga estudada, ocorre por meio de prensagem mecânica, moagem,

homogeneização e extração por solvente. Esses métodos de extração utilizam aquecimento e solventes tóxicos para o meio ambiente, como o clorofórmio-metanol e o hexano (Sousa e Silva *et al.*, 2017).

Segundo (Su *et al.*, 2014) um dos principais métodos de extração utilizados é o sólido-líquido, no qual o tipo de solvente, a temperatura, o pH e a relação biomassa: solvente são fatores relevantes no processo.

Com a tendência mundial de pesquisas científicas e indústrias direcionado para produtos ambientalmente corretos, com maior produtividade e valor agregado, se vê necessário aprimorar os métodos de extração. Nesse cenário, solventes alternativos como os líquidos iônicos se apresentam como uma perspectiva interessante para a extração dessas biomoléculas (Rodrigues *et al.*, 2018).

Os líquidos iônicos (LIs) são sais orgânicos líquidos em uma ampla faixa de temperatura. Possui diversas características atrativas para serem usadas como solvente, como não possuir pressão de vapor mensurável, de maneira que evita emissões poluentes, possuem estabilidade térmica e química, alta condutividade iônica e podem ser reutilizados (Santiago, 2009).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal analisar o efeito da temperatura na extração de ficocianina da microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis* no método de extração sólido-líquido utilizando o líquido iônico prótico formiato de N-metil-2-hidroxiethylamônio (2-HEAF) como solvente. Neste estudo, também foi verificado se um modelo cinético de segunda ordem descreve adequadamente o processo de extração deste pigmento, e o efeito da temperatura e dos solventes nos parâmetros cinéticos, foi realizado os cálculos para rendimento e produtividade além do estudo da energia de ativação e dos parâmetros termodinâmicos, afim de obter um panorama completo da influência do líquido iônico no método de extração convencional utilizado.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da temperatura e dos solventes utilizados, tampão fosfato de sódio a pH 7 e tampão de fosfato de sódio + líquido iônico prótico formiato de N-metil-2-hidroxiethylamônio (2-HEAF) a pH 7,73 no processo de extração de ficocianina da microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

2.2 Objetivo Específicos

- a) Avaliar o efeito da temperatura.
- b) Avaliar a influência do solvente na concentração obtida.
- c) Obtenção do rendimento e produtividade dos solventes utilizados.
- d) Obtenção dos parâmetros cinéticos, para uma ordem de reação igual a 2, k , taxa de extração, C_e , concentração de equilíbrio de ficocianina, e h , extração inicial.
- e) Obtenção da E_a , energia de ativação.
- f) Obtenção dos parâmetros termodinâmicos, ΔH , entalpia de ativação, ΔG , energia livre de Gibb's, e ΔS , entropia de ativação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Arthrospira (Spirulina) platensis*

Arthrospira (Spirulina) platensis é uma cianobactéria planctônica que se aglomera em zonas aquáticas tropicais e subtropicais que possuem elevados níveis de carbonato, bicarbonato e pH até 11. Esta espécie é encontrada principalmente na África, Ásia e na América do Sul (Vonshak, 1997).

Na atualidade, a produção anual de biomassa seca excede as 3 mil toneladas, sendo realizada por empresas ao redor do mundo, esta microalga possui uma composição química rica em proteínas, ácidos graxos e vitaminas, no qual 60% da sua biomassa seca é de proteínas, como pigmentos benéficos e de alto valor agregado, como a ficocianina e o β -caroteno, com diversas aplicações além de outros produtos (Papadaki *et al.*, 2017).

Outro fator atrativo da *Arthrospira (Spirulina) platensis* é a sua característica de fixação de CO₂, devido à presença da enzima de anidrase carbônica (CA) na sua estrutura celular com elevada atividade, que catalisa a reação de combustão do gás carbônico servindo como fonte de crescimento, que é acelerado em condições alcalinas. Uma das desvantagens no cultivo em larga escala da microalga, é que utiliza imensas quantidades de água, o que compromete os recursos hídricos, dificultando a sua comercialização. No entanto, já existem alguns estudos visando utilizar água reciclada ou residual no meio de cultura, além de outros sobre a fonte da luz, como o LED, para aumentar o crescimento celular (Ho *et al.*, 2018).

Além da elevada absorção de dióxido de carbono e taxa de crescimento, *Arthrospira platensis* também possui um alto conteúdo lipídico, tornando-se uma matéria prima promissora para biocombustíveis. Estima-se que seja capaz de fornecer aproximadamente 25% dos requisitos globais de energia (Chang *et al.*, 2013)

Em relação a sua morfologia, é reconhecida pela característica principal do gênero: arranjo do tricomas cilíndricos multicelulares em uma hélice esquerda aberta ao longo de todo o comprimento, seus filamentos são flutuantes e solitários e possuem mobilidade (Vonshak, 1997), como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Micrografia de luz de *Arthrospira platensis*. Barra representa 20 μm .

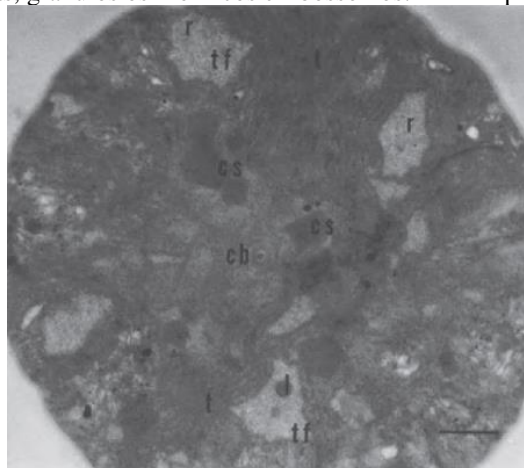


Fonte: Vonshak (1997)

A estrutura celular da *Arthrospira platensis* é característica dos organismos procariontes: destituída de um núcleo morfologicamente limitado e de plastídios, sendo envolvido por uma parede celular do tipo gram-negativa. Os tricomas em forma helicoidal estão rodeados por uma bainha fina e difusa, que possui cerca de 0,5 μm de espessura e tem uma estrutura semelhante a uma rede fibrilar. As multicamadas da parede celular são finas, com cerca de 40-60 nm, e possui uma camada de peptidoglicano (Vonshak, 1997).

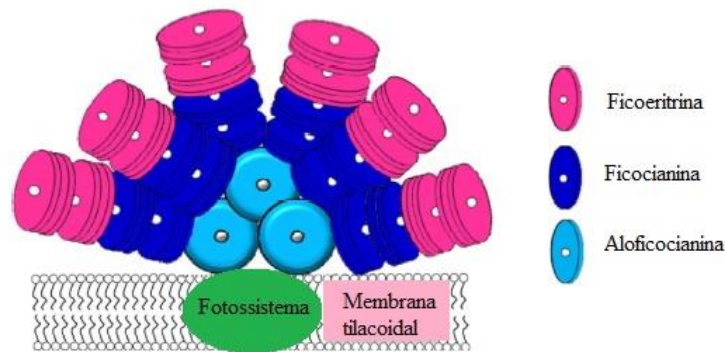
As ficobiliproteínas fazem parte de um complexo proteico conhecido como ficobilissomas e estão localizadas nas membranas tilacóides, como pode ser visualizado na Figura 2, funcionam como fotorreceptor principal para a fotossíntese da microalga (Sun *et al.*, 2009).

Figura 2 - Eletro micrografia de *Arthrospira platensis* em corte transversal mostrando a organização da estrutura fina do citoplasma. Membranas de tilacóide (t), áreas isentas de tilacóides (tf) preenchidas com associados de ficobilissomas, grânulos osmiofílicos e ribossomos. Barra representa 0,5 μm .



Fonte: Vonshak (1997)

Figura 3 - Estrutura do ficobilissoma.



Fonte: Adaptado Sonani *et al* (2016)

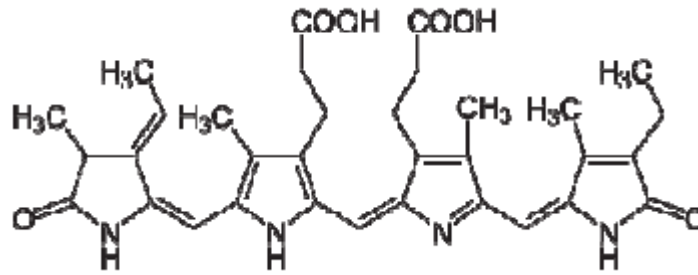
A estrutura dos ficobilissomas, representada na Figura 3, contém um núcleo composto por aloficocianina envolto de ficocianina, que é o principal constituinte, enquanto na parte mais externa se encontra a ficoeritrina. A ligação entre a lamela fotossintética e o ficobilissoma é realizado pela aloficocianina. Apesar de todos os pigmentos absorverem luz diretamente, existe uma cadeia de transferência de energia bem estruturada e na seguinte ordem: ficoeritrina > ficocianina > aloficocianina > clorofila a (Kuddus *et al.*, 2013).

3.2 FICOCIANINA

A ficocianina foi descrita pela primeira vez em 1836 por Nees Esenbeck como um pigmento brilhante azulado, sensível a luz e solúvel em água, mas só recebeu essa dominação atual em 1843, por Kützing. No ano de 1854, a intensa fluorescência dessas moléculas foi observada em análises espectroscópicas. Em meados de 1881 a 1884, Engelmann realizou pesquisas sobre a fotossíntese em cianobactérias, mostrando que as ficobiliproteínas, como a ficocianina, eram utilizadas pelas algas para capturar luz e estimular a produção de oxigênio fotossintético, ao invés do carotenóides. No entanto, as suas teorias só ganharam respaldo após 60 anos, quando as atividades das ficobiliproteínas foram confirmadas e quantificadas. Em 1894 surgiu a teoria da natureza proteica desses pigmentos (Marsac, 2003).

Segundo (Santiago-Santos *et al.*, 2004), os pigmentos de ficocianina apresentam massa molecular aparente de 140 a 210 kDa e duas subunidades, α e β , que possuem estruturas tridimensionais bastante similares. Essas subunidades estão relacionadas em um $(\alpha\beta)$ protômeros, que podem ser associados em trimômeros $(\alpha\beta)_3$ e hexâmeros $(\alpha\beta)_6$.

Figura 4 - Fórmula estrutural da ficocianina



Fonte: Adaptado de GOLDSMITH e MOERNER (2010)

Podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com as suas propriedades de absorção, no caso: ficoeritrina, que absorve a luz na faixa de 490 a 570 nm, ficocianina que absorve na faixa de 610 a 625 nm, e aloficocianina em 650 a 660 nm (Sun *et al.*, 2009).

A ficocianina é utilizada como corante natural, devido sua coloração azul brilhante, sendo o pigmento natural mais importante utilizado na indústria alimentícia (geleias, produtos lácteos, etc) (Kumar *et al.*, 2014). Possui propriedades terapêuticas como anti-inflamatório, hepatoprotetora e é capaz de fornecer até 20 vezes mais atividade antioxidante do que o ácido ascórbico (Santiago-Santos *et al.*, 2004; Romay, 1998), além de outras funções bioativas como anticancerígeno e antimicrobiano, possuindo assim funcionalidades diversas e sendo aproveitado amplamente no comércio, podendo ser utilizado em suplementos nutricionais e produtos farmacêuticos (Ho *et al.*, 2018). Também possui propriedades espectroscópicas, como estabilidade, elevado coeficiente de absorção e rendimento quântico, usado como reagentes em pesquisas biomédicas (Glazer, 1993).

A diversidade de aplicações da ficocianina deriva principalmente por causa do seu grau de pureza, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Funções e aplicações de ficocianina de acordo com o grau de pureza.

Pureza (A620/A280)	Função	Aplicação
0,50 - 1,50	Alimentar	Corante
1,50 - 2,50	Cosmético	Corante
2,50 - 3,50	Reagente	Corante e Biomarcador
> 4	Análítico e anticorpos	Biomarcador, Terapeutico e em Tratamentos

Fonte: Adaptado de Guan (2016)

Outro fator atrativo para o desenvolvimento de novos métodos de extração de ficocianina é o seu valor agregado. No caso do pigmento vendido como corante natural para alimentos, o preço varia de 100 a 500 dólares por kg de pó liofilizado. A média de preço no mercado é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Preço médio de ficocianina em pó liofilizado (publicado pelo instituto Soley)

Pureza (A620/A280)	25 mg	1 g	10 g	100g	1kg
>4	\$ 155,00	\$ 4.657,00	\$ 37.275,00	\$ 297.750,00	\$ 2.212.500,00
3,4 - 2,5	-	-	\$ 15.050,00	\$ 120.400,00	\$ 959.000,00
2,5 - 1.5	-	-	-	\$ 13.600,00	\$ 108.800,00
1,50 - 0,75	-	-	-	-	\$ 300,00

Fonte: Adaptado de Guan (2016)

3.3 Extração e purificação de ficocianina

A ficocianina é um pigmento solúvel em água, sendo extraído como um complexo pigmento-proteína (Rodrigues, 2017).

Existem diversos métodos de extração encontradas na literatura, com combinações de técnicas e solventes diferentes, alguns desses métodos de extração e purificação de ficocianina podem ser vistas na Tabela 3.

Para alguns autores (Su *et al.*, 2014, Silveira *et al.*, 2007), a utilização de aquecimento e agitação permite bons resultados de extração, no entanto, apresentam desvantagens como o tempo e o consumo de energia devido as altas temperaturas.

Tabela 3 - Principais espécies de microalgas e alguns métodos de extração e purificação de ficocianina.

Espécie	Método de extração/purificação	Resultados obtidos	Referência
<i>Arthrospira platensis</i>	Aquecimento+agitação em tampão fosfato (10 mM, pH 7,0).	C _{máx} = 2,2 g.L ⁻¹	Su <i>et al.</i> , (2014)
<i>Arthrospira platensis</i>	Aquecimento+agitação (30 °C/150 rpm/4 h) em água destilada, cromatografia troca iônica com a matriz Q-Sepharose fast flow	A615/A280 = 3,43 R = 77,30%	Silveira <i>et al.</i> , (2007)
<i>Synechocystis Aqualitis</i>	Agitação em água e tampão com 0,01% de azida de sódio, cromatografia leito expandido (Streamline-DEAE), cromatografia de leito fixo (DEAECelulose).	Melhor solvente: tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) Stremaline-DEAE: A615/A280 = 2,61%, R = 91% DEAE celulose: A615	Ramos <i>et al.</i> , (2011)

<i>Arthrospira platensis</i>	Congelamento/descongelo em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 5,0), precipitação em sulfato de amônio com 25% e 60%, cromatografia troca iônica com a matriz DEAE-Sepharose fast flow.	Ficocianina: A618/A280 = 5,59 R = 67,04%	Shi-Gan <i>et al.</i> , (2011)
<i>Spirulina platensis</i> (CCC540)	Congelamento/descongelo 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 DEAECellulose.	C _{máx} = 413 µg.mL ⁻¹ A620/A280 = 4,58 R = 14%	Kumar <i>et al.</i> , (2014)
<i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	Congelamento/descongelo 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 _{máx} = 18,81 mg.mL ⁻¹ A620/A280 = 3,31	Soni <i>et al.</i> , (2006)
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Congelamento/descongelo 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).	A620/A280 = 4,5 R = 40%	Sørensen <i>et al.</i> , (2013)
<i>Gracilaria crassa</i>	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 (DEAECellulose).	Melhor solvente: água destilada (pH 7,0) Ficocianina = 0,28 mg.g ⁻¹	Sudhakar <i>et al.</i> , (2015)
<i>Arthrospira platensis</i>	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).	A620/A280 = 3,84	Leema <i>et al.</i> , (2010)

<i>Calothrix sp</i>	Agitação+aquecimento (24 h/30 °C) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) contendo 13,6 mM EDTA e 2 mg de lisozima/g biomassa, filtração por membrana (PD 10), cromatografia de troca iônica (QSepharose 4 fast flow), cromatografia de interação hidrofóbica (metil macro-pep, Biologic LP low-pressure).	A620/A280 = 3,50 R = 80%	Santiago-Santos <i>et al.</i> , (2004)
<i>Arthrospira platensis</i>	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>Arthrospira platensis</i>	Alta pressão, sistema aquosos bifásico (PEG 600, 1.500, 4.000, 6.000 e 20.000/fosfato de potássio), cromatografia de troca iônica (DEAESephadex).	Melhor sistema: PEG 4.000/fosfato de potássio Cmáx = 1,11mg.mL ⁻¹ A620/A280 = 5,10 R = 66%	Patil <i>et al.</i> , (2006)
<i>Nostoc sp.</i>	Ultrassonicação com tampão fosfato (pH 7,0), centrifugação, cromatografia em camada delgada (Sílica gel 60 F254), cromatografia de troca iônica (DEAESephadex).	R = 0,13g.g ⁻¹ A620/A280 = 3,55	Johnson <i>et al.</i> , (2014)
<i>Synechococcus sp. IO9201</i>	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 (QSepharose 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 A620/A280 = 4,85	Abalde <i>et al.</i> , (1998)
<i>Synechococcus sp.</i>	8 métodos físicos e 8 métodos químicos.	Melhor método: cavitação com N ₂ Melhor solvente: ácido propanosulfônico+ asolecitina	Viskari <i>et al.</i> , (2003)

<i>Arthrospira platensis</i>	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: micro-ondas Melhor solvente: tampão fosfato, Ph 7,0 C _{máx} = 4, 54 mg.L-1 A615/A280 = 1,27	<i>Aftari et al.</i> , (2015)
<i>Arthrospira platensis</i>	Sistema aquoso bifásico (PEG/fosfato de sódio, 25 °C, pH 7,0).	A620/A280 = 4,32 R = 80%	<i>Chetana et al.</i> , (2015)

Fonte: Adaptado de Rodrigues (2017)

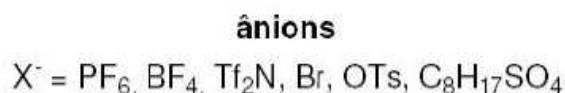
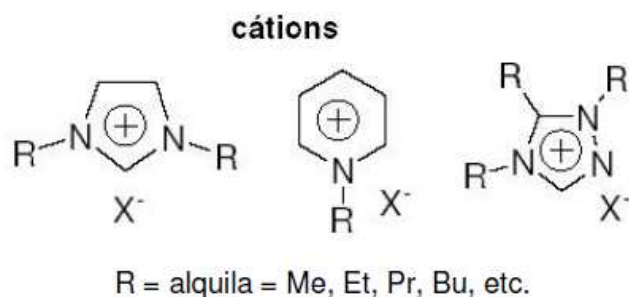
Com o objetivo de aumentar a eficiência da extração e da qualidade da ficocianina, novos métodos de extração devem ser desenvolvidos. Além de buscar alternativas ecologicamente e financeiramente interessantes. Nesse contexto, os líquidos iônicos se apresentam como um solvente promissor, devido a sua capacidade de reuso (Oliveira *et al.*, 2016), e propriedades desejáveis, como baixa pressão de vapor e estabilidade térmica e química (Reis *et al.*, 2017).

3.4 Líquido Iônico

Os líquidos iônicos (LIs), ou sais fundidos, são líquidos eletrolíticos formados apenas de íons, cátions e ânions orgânicos ou inorgânicos volumosos e assimétricos. Carregam no nome o sal existente no estado líquido, referente ao ânion presente na sua estrutura, enquanto a espécie catiônica é abreviada. No entanto, diferente dos sais fundidos que possuem alto ponto de fusão e são corrosivos, os líquidos iônicos são menos viscosos e, normalmente, possuem ponto de fusão abaixo de 100°C, desta forma, os LIs são uma nova classe de sais fundidos (Santiago, 2009).

Os LIs podem ser divididos em duas categorias: aprótico e prótico, que é produzido por meio de uma reação envolvendo uma base orgânica de Brønsted e um ácido de Brønsted, no qual as diferentes combinações de cátions e ânions, como pode ver visto na Figura 5, produzem líquidos com propriedades e aplicações diversas (Bittencourt *et al.*, 2017).

Figura 5. Cátions e ânions mais utilizados na elaboração dos LIs.



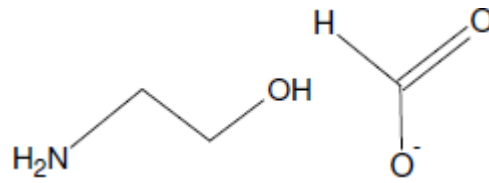
Fonte: Santiago (2009)

Devido as suas características e variações, o líquido iônico mostrou-se um solvente ecologicamente correto com inúmeras aplicações, como na remoção de poluentes como o petróleo bruto e gases como H_2S , CO_2 e hidrocarbonetos pesados (Chennuri e Gardas, 2016). Também podem ser usados em síntese orgânica (Wang *et al.*, 2003), catálise (Souza *et al.*, 2003), em dispositivos eletroquímicos (Jiang *et al.*, 2004), imobilização enzimática (Souza *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014), processos de separação, como de proteínas (Desai *et al.*, 2014; Liya Ge *et al.*, 2010; Yuanchao Pei *et al.*, 2009; Vasantha *et al.*, 2015) e de íons metálicos (Chennuri e Gardas, 2016).

Apesar da variedade de aplicações e características atrativas, os líquidos iônicos comerciais possuem dois problemas principais: a sua baixa biodegradabilidade, tornando-se um potencial poluente resistente, e o preço elevado, que dificulta os estudos no âmbito acadêmico e a utilização no meio industrial. No entanto, os líquidos iônicos práticos como o 2-hidroxietilamônio (2-HEAF), sintetizado a partir da reação de monoetanolamina com ácido fórmico, possuem baixo custo e novas aplicações, além de apresentar uma toxicidade desprezível (Alvarez *et al.*, 2011).

O líquido iônico (2-HEAF), representado na Figura 6, é reconhecido pela produção simples e pelas características de solvatação. Devido a sua elevada capacidade de solvatação, pode ser utilizada para remoção de CO_2 ou SO_2 dos gases de combustão. Também é altamente polar, particularidade desejável para alguns tipos de sínteses, como a de cerâmicas termicamente estáveis (Hosseini *et al.*, 2018).

Figura 6. Estrutura química do líquido iônico (2-HEAF).



Fonte: Rodrigues (2017).

A extração pelo método convencional utilizando os líquidos iônicos próticos 2-HEAF e 2-HEAA já foi realizada na tese de doutorado de Rodrigues (2017), no entanto, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos não foram avaliados. Portanto, o mesmo LI (2-HEAF) produzido e caracterizado na sua tese foi utilizado para obter os parâmetros desejados neste trabalho. As características físico-química do solvente utilizado se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 – Características físico-química do líquido iônico 2-HEAF na temperatura de 25 °C

Solvente	Densidade (g.cm ⁻³)	Viscosidade (mPa.s)	pH
2-HEAF	1,1936	81,8	7,73

Fonte: Adaptado de Rodrigues (2017)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo da microalga

A microalga *Spirulina platensis* utilizada no presente estudo foi cultivada no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. O inóculo foi preparado em um meio contendo cloreto de sódio (30 g/L), bicarbonato de sódio (10 g/L) e os fertilizantes agrícolas NPK (1 g/L) e superfosfato triplo (0,1 g/L). Inicialmente, o inóculo foi mantido sob iluminação constante de 1.000 $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sendo periodicamente agitado. A cada dois dias, 250 mL de meio de cultivo eram adicionados até que o volume final de 800 mL fosse atingido. Passados seis dias, a cultura foi submetida à aeração constante (2 L/min) e luminosidade de 20 $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A temperatura da sala de cultivo foi mantida constante em 28 ± 2 °C. Após vinte dias, as células foram separadas do meio de cultivo por floculação química (90 mL de NaOH 2N). A completa floculação foi monitorada através de espectrofotometria. O sobrenadante contendo o meio de cultivo foi sifonado e a biomassa úmida foi lavada e seca em estufa (60 °C/24 horas). Após a secagem, a biomassa foi triturada e selecionada por meio de peneiramento para obtenção de partículas com o mesmo diâmetro.

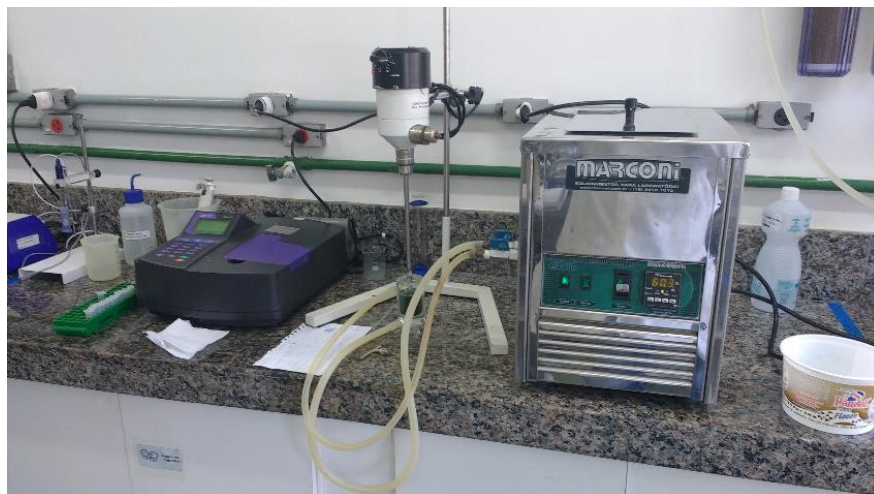
4.2 Síntese do Líquido Iônico

O líquido iônico prótico formiato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF) foi sintetizado através de uma reação de neutralização ácido-base (Álvarez *et al.*, 2010). Foi utilizado ácido fórmico e monoetanolamina realizada sob agitação a 35 °C por 24 horas. Após a preparação, o líquido iônico foi armazenado em recipiente protegido da luz a fim de evitar qualquer degradação.

4.3 Extração e análise de ficocianina

A extração protéica ocorreu com as soluções tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7) e tampão fosfato de sódio mais o líquido iônico (2-HEAF), na proporção 2:1. O processo foi realizado em um reator encamisado de 50 mL acoplado a um banho termostático (Tecnal, TE-2005) sob agitação mecânica constante em diferentes temperaturas: 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 50 °C. Utilizou-se uma razão biomassa: solvente 15 g/mL, 2 gramas da biomassa com 30 mL do solvente. As amostras foram retiradas em alíquotas de 0,5 mL em intervalos de tempo pré-definidos e centrifugadas a 6000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído em balões volumétricos de 5 mL e completadas até o menisco com o solvente utilizado, em seguida a densidade ótica foi lida 3 vezes utilizando um espectrofotômetro (Biochrom, libra S11), nos comprimentos de onda 615 nm e 652 nm.

Figura 7. Foto dos equipamentos utilizados no processo de extração.



Fonte: O autor (2018)

As concentrações de ficocianina foram determinadas usando a equação proposta por Bennett e Bogorad (1973), que está representada na Equação 1.

$$C_{Ficocianina} = \frac{DO_{615} - 0,474 * DO_{652}}{5,34} \quad (1)$$

No qual, $C_{Ficocianina}$ é a concentração de ficocianina (g.L^{-1}); DO_{615} e DO_{652} a densidade óptica das amostras a 615 nm e 652 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias.

4.4 Rendimento e Produtividade

O rendimento de ficocianina para ambos os solventes foi calculado conforme a Equação 2.

$$R = \frac{C_{ficocianina} \times V_{solvente}}{m_{microalga}} \quad (2)$$

No qual, R é o rendimento (mg.b^{-1}); $C_{ficocianina}$ é a concentração de ficocianina extraído (g.L^{-1}); V é o volume do solvente (L) e $m_{microalga}$ é a massa em gramas da microalga.

A produtividade é a razão da concentração do pigmento pelo tempo no respectivo momento da sua extração, calculada pela Equação 3:

$$P = \frac{C_{ficocianina}}{t} \quad (3)$$

Sendo, P é a produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$); $C_{ficocianina}$ é a concentração de ficocianina extraído (g.L^{-1}) e t é o tempo em horas.

4.5 Modelo cinético

O modelo cinético de segunda ordem foi escolhido para retratar o processo de extração da biomolécula de interesse, visto que propende a representar adequadamente o procedimento utilizado de extração sólido-líquido (Su *et al.*, 2014). O modelo geral pode ser expresso, conforme a Equação 4:

$$\frac{dC_t}{dt} = k(C_e - C_t)^2 \quad (4)$$

No qual $\frac{dC_t}{dt}$, corresponde a razão de extração (g.L⁻¹.min⁻¹), k é a constante de extração (L.g⁻¹.min⁻¹), C_e é a concentração de equilíbrio de ficocianina, C_t é a concentração de ficocianina em suspensão em um determinado tempo, t .

Os parâmetros cinéticos k e C_e podem ser obtidos integrando a Equação 4 nas condições de contorno para o tempo inicial e de fronteira, tal qual; $C_t = 0$ para $t = 0$ e $C_t = C_t$ para $t=t$. A Equação 5 é rearranjada de forma linear ($y=ax+b$) e, a partir de um gráfico $\frac{t}{C_t}$ vs t , pode-se determinar a inclinação da reta e o seu coeficiente angular.

$$\frac{t}{C_t} = \frac{1}{kC_e^2} + \frac{t}{C_e} \quad (5)$$

A taxa de extração inicial pode ser obtida quando t e C_t se aproximam de zero, a partir da Equação 6, sendo esse parâmetro titulado de h .

$$h = kC_e^2 \quad (6)$$

O efeito da temperatura de extração no modelo cinético foi avaliado por meio da Equação 7, de Arrhenius-Van't Hoff reformulada da seguinte maneira:

$$\ln k = \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln k_o \quad (7)$$

No qual, E_a representa a energia de ativação do processo de extração, k é a constante de extração, R é a constante dos gases (8,324 J. K⁻¹.mol⁻¹) e k_o é o fator pré-exponencial para taxa de extração constante.

4.6 Parâmetros Termodinâmicos

Considerando a natureza proteica da ficocianina, pode-se determinar os parâmetros termodinâmicos, a entalpia de ativação (ΔH) e a energia livre de Gibb's da atividade da proteína para cada valor de temperatura estudado de acordo com as Equações 8 e 9, propostas por Mostafa *et al.*, (2018).

$$\Delta H = E_a - RT \quad (8)$$

$$\Delta G = -RT \ln\left(\frac{k h_p}{k_b T}\right) \quad (9)$$

Na qual E_a é a energia de ativação, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura em K, k é a taxa de extração de ficocianina, $h_p = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ J.s é a constante de Plank, e $k_b = 1,3806 \cdot 10^{-23}$ é a constante de Boltzman. Além disso, a entropia de ativação (ΔS) da ficocianina foi calculada de acordo com a Equação 10.

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (10)$$

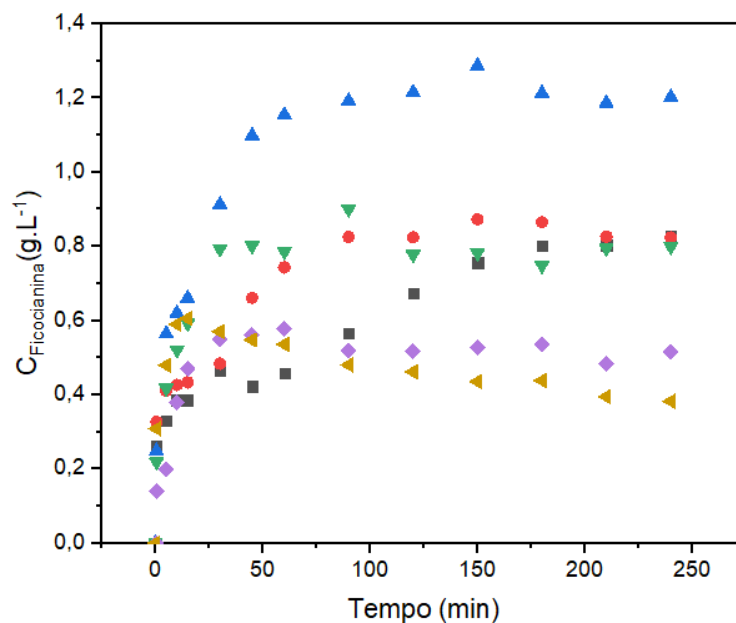
A obtenção dos parâmetros termodinâmicos pode fornecer informações importantes sobre o gasto energético do processo, da transferência de massa e do risco de alterações estruturais nas proteínas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito do solvente e da temperatura de extração

A extração do pigmento foi realizada para uma faixa de temperatura de 20 °C a 50 °C durante um período de 240 min (4 horas) para ambos os solventes estudados. Na Figura 8, observa-se a evolução da extração de ficocianina no processo utilizando o solvente tampão fosfato de sódio, que tende a aumentar com o aumento da temperatura até certo ponto, atingindo uma concentração máxima de 1,28 g.L⁻¹ em 150 min na temperatura de operação de 30 °C. Esse aumento da extração nas temperaturas de 20 °C, 25 °C e 30 °C pode ser explicado pelo aumento do coeficiente de difusão de solutos devido as temperaturas mais altas e pelo aumento da solubilidade aquosa das proteínas. No entanto, com o contínuo aumento para as temperaturas de 35 °C, 40 °C e 50 °C, os valores das concentrações extraídas foram afetados negativamente, o que pode ser atribuído a degradação de ficocianina pelo calor durante o processo. Esse comportamento de degradação térmica da proteína já era previsto, de acordo com estudos passados (Su *et al.*, 2014).

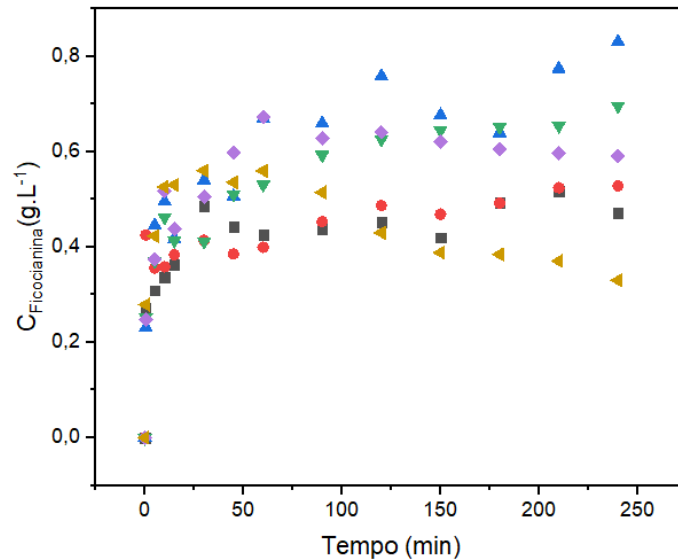
Figura 8 - Efeito da temperatura na extração de ficocianina utilizando tampão fosfato de sódio. (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◄) 50 °C.



Na Figura 9, é observado que o efeito da temperatura na extração do pigmento utilizando tampão fosfato de sódio mais o líquido iônico prótico (2-HEAF) tem comportamento similar ao procedimento utilizando apenas o solvente tampão fosfato de sódio, o aumento da temperatura provoca a diminuição da viscosidade e o aumento na difusividade do solvente, no

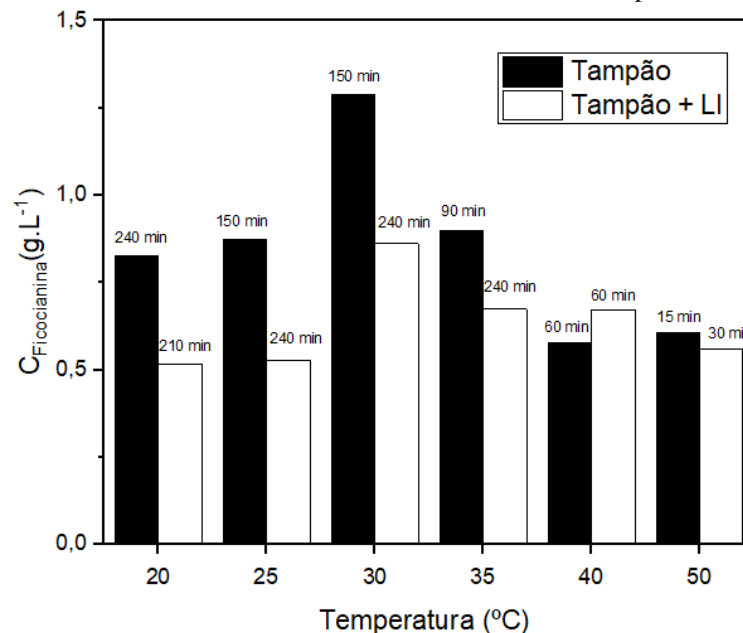
entanto, na temperatura de 50 °C, a biomolécula sofre desnaturação. Assim, notou-se que o solvente tampão + LI foi menos eficiente do que o solvente tampão de fosfato de sódio. A concentração máxima obtida foi de 0,86 g.L⁻¹ na temperatura de 30 °C.

Figura 9 - Efeito da temperatura na extração de ficocianina utilizando tampão fosfato de sódio e tampão fosfato de sódio + (2-HEAF). (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◄) 50 °C.



Outra discrepância foi no tempo que o processo levou para atingir os picos máximos de concentrações, conforme pode ser observado na Figura 10, no qual a presença do líquido iônico fez com que esses eventos demorassem mais tempo. Esse desempenho menor pode estar associado a alta viscosidade do líquido iônico.

Figura 10 - Influência da temperatura e do solvente na concentração máxima de ficocianina extraída de *Spirulina (Arthrospira) Plantesis*. Os valores em cima de cada coluna referem-se ao tempo de extração correspondente.



Em suma, o tipo de solvente e a temperatura apresentaram-se como fatores relevantes no processo de extração sólido-líquido. Ambos os solventes estudados tiveram bons resultados, bem como o solvente tampão. Apesar do solvente tampão mais líquido iônico ser menos eficiente, ele apresenta diversas características já citadas neste trabalho, como a vantagem de ser reutilizável, mostrando-se como uma alternativa viável e promissora.

5.2 Rendimento e Produtividade

A tabela 5 apresenta os melhores resultados para os solventes utilizados no método de extração sólido-líquido. A maior concentração, rendimento e produtividade foi do solvente tampão fosfato de sódio, mesmo possuindo menor força iônica do que o líquido iônico.

Tabela 5 – Comparação dos solventes utilizados no processo de extração através dos parâmetros rendimento e produtividade.

Solvente	Condição ótima	C (g.L ⁻¹)	R (mg.g ⁻¹)	P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Tampão	30 C 150min	1,287	19,3	0,51
Tampão + LI	30 C 240 min	0,862	12,93	0,21

5.3 Estudo do modelo cinético

O modelo cinético de segunda ordem se ajustou bem aos dados experimentais. O coeficiente de determinação, R², apresentou resultados ligeiramente melhores, quando R² se aproximava de 1, para a extração que utilizou o solvente tampão fosfato de sódio.

Nas tabelas 6, 7 e na Figura 11, pode ser visto o comportamento do parâmetro k , constante de extração, que, para o solvente tampão fosfato de sódio, aumenta com o aumento da temperatura e diminui ao alcançar a temperatura extrema de 50 °C. O parâmetro h , taxa de extração inicial, apresenta esse mesmo comportamento para a extração com tampão. Enquanto o comportamento desses parâmetros (k e h) só foi similar para o tampão fosfato de sódio mais líquido iônico nas temperaturas de 30 a 50 °C (Figura 11 e 12).

Tabela 6. Parâmetros do modelo cinético de segunda ordem (k e Ce) e taxa da velocidade inicial (h) para a extração com solvente tampão fosfato de sódio pH 7.

Parâmetros do Modelo	Tampão Fosfato de Sódio					
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C
k (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	0,0556	0,1305	0,1373	0,7782	8,2806	0,3495
Ce (g.L ⁻¹)	0,8551	0,8740	1,2483	0,7957	0,5150	0,3960
h (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)	0,0407	0,0997	0,2139	0,4928	2,1959	0,0548
R ²	0,9602	0,9929	0,9966	0,9967	0,9957	0,9902

Tabela 7. Parâmetros do modelo cinético de segunda ordem (k e Ce) e taxa da velocidade inicial (h) para a extração com solvente tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) pH 7,79.

Parâmetros do Modelo	Tampão Fosfato de Sódio + (2-HEAF)					
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C
k (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	0,4818	0,2563	0,1282	0,1973	2,2400	0,3014
Ce (g.L ⁻¹)	0,4859	0,5233	0,7958	0,6903	0,6071	0,3521
h (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)	0,1137	0,0702	0,0780	0,0728	0,8256	0,0374
R ²	0,9907	0,9927	0,9757	0,9932	0,9976	0,9814

É interessante observar que, para as temperaturas em condições ótimas (30 °C, 35 °C e 40 °C), a constante de extração (k) foi maior para a extração solvente tampão do que para a extração com solvente tampão + líquido iônico. Esse parâmetro é um indicativo da velocidade da reação e é dependente da energia de ativação, mostrando que a extração com o líquido iônico é mais lenta, o que pode estar associado a suas propriedades coligativas e maior viscosidade, dificultando a transferência de massa.

Figura 11. Efeito da temperatura no parâmetro cinético (k), constante de extração, para os solventes tampão fosfato de sódio (■) e tampão fosfato de sódio + líquido iônico (2-HEAF) (●)

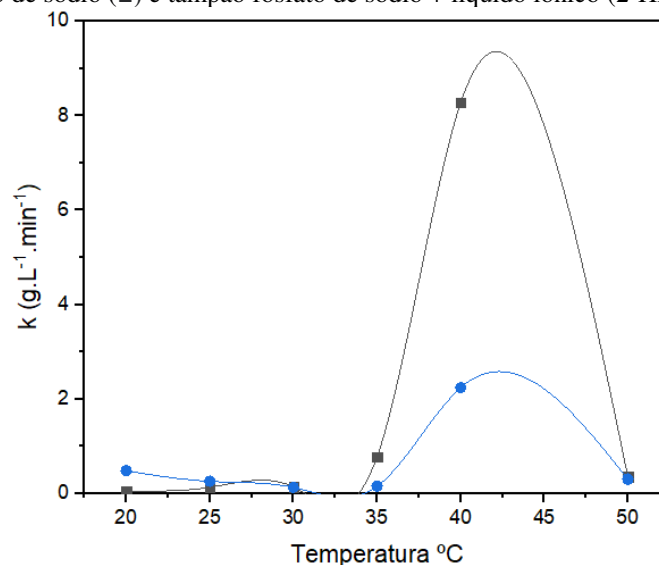
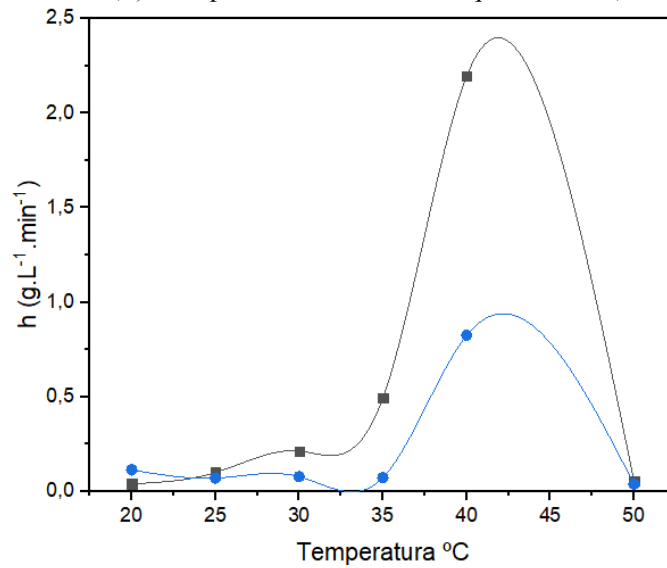


Figura 12. Efeito da temperatura no parâmetro cinético (h), taxa de extração inicial, para os solventes tampão fosfato de sódio (■) e tampão fosfato de sódio + líquido iônico (2-HEAF) (●)



A constante de equilíbrio, C_e , apresenta duas etapas distintas, um aumento até a temperatura de 30°C seguido de um declínio até a temperatura de 50°C, para ambos os solventes. Constatando a influência da temperatura na quantidade de ficocianina extraída, com eficiência máxima na temperatura de 30 °C e indicando degradação da proteína com o contínuo aumento da temperatura (Figura 13).

Figura 13. Efeito da temperatura no parâmetro cinético (C_e), concentração de equilíbrio, para os solventes tampão fosfato de sódio (■) e tampão fosfato de sódio + o líquido iônico (2-HEAF) (●)

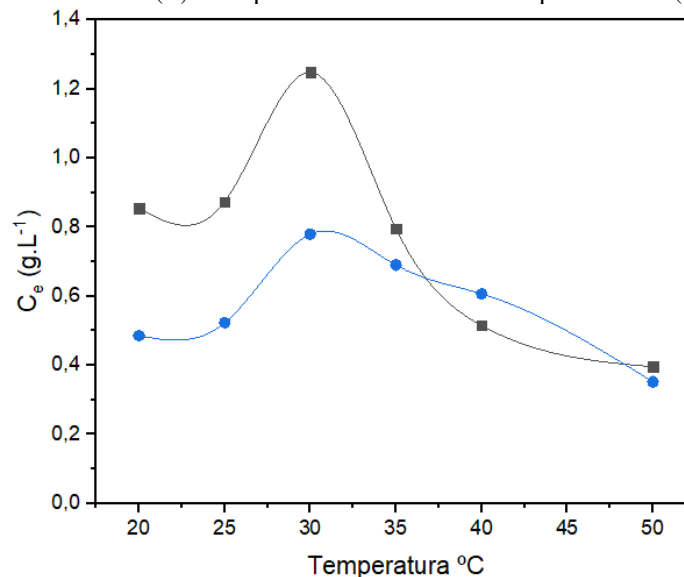


Figura 14. Modelo cinético para estimar a taxa de extração (k) e o equilíbrio de concentração (C_e) para faixa de temperatura de extração de ficocianina utilizando tampão fosfato de sódio. (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◄) 50 °C.

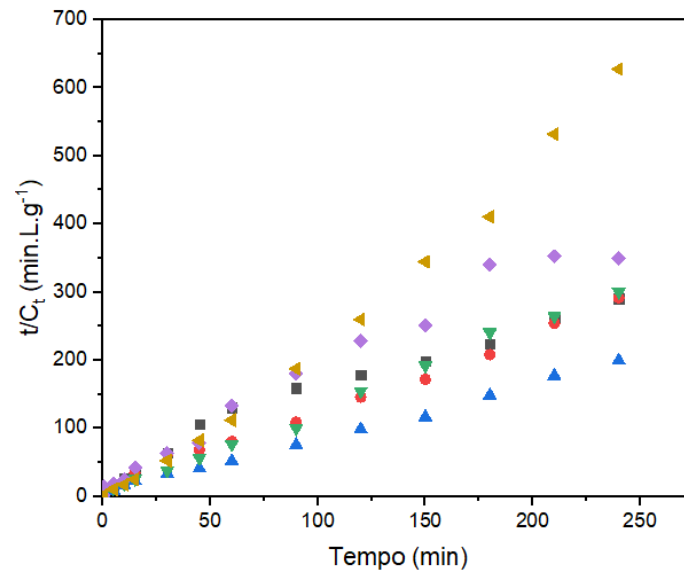
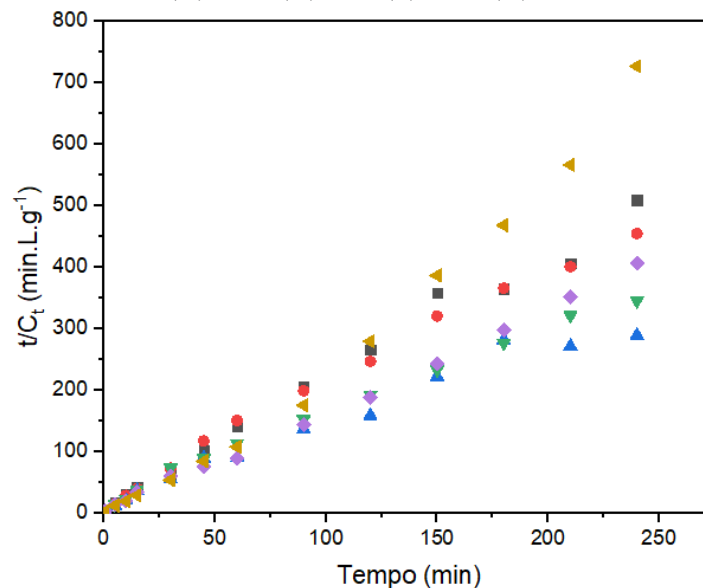


Figura 15. Modelo cinético para estimar a taxa de extração (k) e o equilíbrio de concentração (C_e) para faixa de temperatura de extração de ficocianina utilizando tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) pH 7,73. (■) 20 °C (●) 25 °C (▲) 30 °C (▼) 35 °C (◆) 40 °C (◄) 50 °C.



5.3 Estudo da energia de ativação

Como observado, a extração de ficocianina mostra duas fases ou comportamentos, devido o aumento da temperatura, pois, segundo (Wan *et al.*, 2016), a ficocianina da *Spirulina (Arthrospira) plantesis* desativa em temperatura superiores a 46 °C. Desta forma, utilizou-se apenas os dados experimentais referente a faixa de aceleração de extração. No caso do solvente tampão + LI, as concentrações nas temperaturas iniciais (20 °C e 25 °C) ficaram muito próximas, impossibilitando a análise da energia de ativação destes dados experimentais.

Figura 16. Equação de Arrhenius-Van't Hoff plotada para extração de ficocianina utilizando solvente tampão fosfato de sódio nas temperaturas 20 °C, 25 °C, 35 °C e 40 °C.

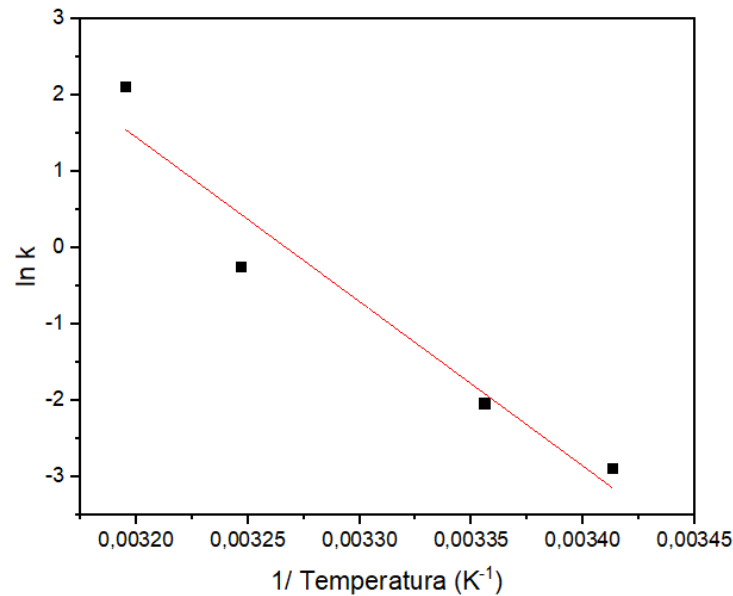
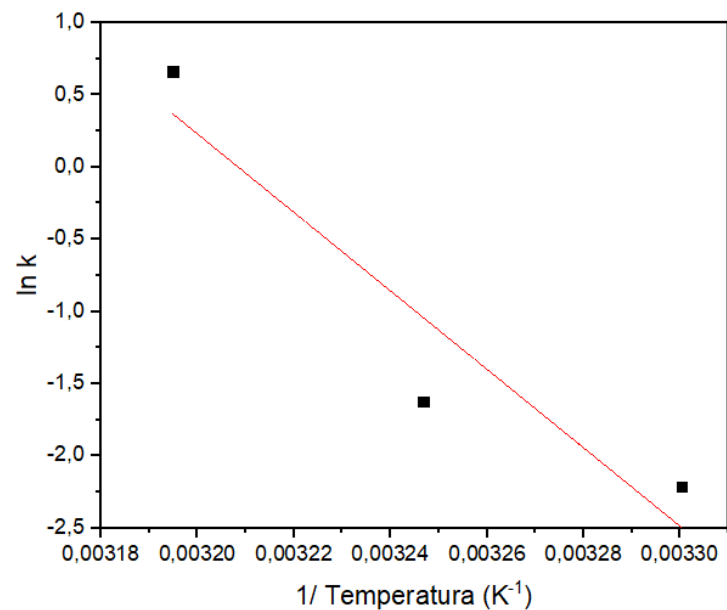


Figura 17. Equação de Arrhenius-Van't Hoff plotada para extração de ficocianina utilizando solvente tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) nas temperaturas 30 °C, 35 °C e 40 °C



Por conseguinte, a E_a para o processo com solvente tampão fosfato de sódio a pH 7 foi de 179,24 KJ.mol⁻¹, enquanto para a extração com solvente tampão fosfato de sódio + líquido iônico de ácido fórmico a pH 7,73 foi de 225,93 KJ.mol⁻¹. Com a adição do líquido iônico no solvente na proporção 2:1, a energia de ativação aumentou como esperado, visto que possui uma taxa de extração menor devido a uma barreira energética maior imposta pela reação de extração do processo.

Tabela 8 - Parâmetros do modelo de Arrhenius (Ea) e o coeficiente de determinação (R²)

Parâmetros	Tampão Fosfato de Sódio	Tampão Fosfato de Sódio + (2-HEAF)
Ea (KJ.mol ⁻¹)	179,24	225,93
k _o (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	4,25	4,46
R ²	0,9410	0,8902

5.4 Estudo dos parâmetros termodinâmicos

Os valores de entalpia de ativação (ΔH) são positivos indicando que o processo é endotérmico, conforme previsto por outros estudos relacionados a extração de ficocianina como o de (Su *et al.*, 2014). O líquido iônico apresenta os maiores valores para ΔH , mostrando que foi gasto mais energia para a extração da proteína em comparação ao solvente com tampão fosfato de sódio. Em relação a energia livre de Gibb's (ΔG) os valores são positivos, indicando que o processo não é espontâneo e oferece uma certa resistência a transferência de massa, o que já era esperado, visto que se trata de um processo de extração, onde é necessário romper a parede celular da microalga para obtenção da ficocianina. No caso dos valores da entropia de ativação (ΔS), se aproximam de zero, indicando que não houve mudança significativa na estrutura da proteína. O solvente com tampão fosfato de sódio + líquido iônico apresentou resultados ligeiramente maiores, provavelmente devido a sua maior força iônica e maior interação com a ficocianina. Esses resultados foram semelhantes ao de outros autores, como o de (Liang *et al.*, 2018).

Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos: entalpia de ativação (ΔH), energia livre de Gibb's (ΔG) e entropia de ativação (ΔS) para a extração com solvente tampão fosfato de sódio pH 7 e com solvente tampão fosfato de sódio + (2-HEAF) pH 7,73

T °C	ΔH (kJ.mol ⁻¹)		ΔG (kJ.mol ⁻¹)		ΔS (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	
	Tampão	Tampão + LI	Tampão	Tampão + LI	Tampão	Tampão + LI
20	176,81	-	78,75	-	0,3346	-
25	176,76	-	78,07	-	0,3312	-
30	-	223,41	-	79,82	-	0,4739
35	176,68	223,37	76,16	79,67	0,3264	0,4666
40	176,64	223,33	71,28	75,06	0,3366	0,4737

As temperaturas de 20 °C e 25 °C dos experimentos realizados com o solvente tampão + líquido iônico foram suprimidas dos cálculos para obtenção dos parâmetros cinéticos e da energia de ativação, pois os resultados foram semelhantes e o coeficiente de determinação R² da reta para o gráfico da equação de Arrhenius-Van't Hoff foi baixo.

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados evidenciou que as variáveis temperatura e solvente influenciaram na quantidade de ficocianina extraída, nos parâmetros cinéticos e termodinâmicos. O modelo de segunda ordem se ajustou bem para ambos os solventes, e a energia de ativação para o solvente com líquido iônico a pH 7,73 foi maior do que para o solvente com tampão fosfato de sódio. O aumento contínuo da temperatura aumenta a taxa de extração, ao mesmo tempo que a concentração de equilíbrio da ficocianina também cresce até uma certa temperatura e, em seguida, começa a diminuir, indicando degradação da proteína extraída para temperaturas elevadas. O solvente tampão fosfato de sódio apresentou os melhores resultados de extração, rendimento e produtividade, além de maior estabilidade termodinâmica. No entanto o líquido iônico prótico de ácido fórmico mostrou-se um solvente promissor, considerando principalmente que é reutilizável e possui elevado poder difusional.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar de bastante importante, existem poucos estudos termodinâmicos sobre a extração da ficocianina e das outras ficobiliproteínas. Acredito que deva ser um tema mais explorado, pois fornece informações importantes sobre as interações que ocorrem entre os solventes utilizados e os produtos desejados, principalmente utilizando métodos de extrações diferentes.

8 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.
- ALVAREZ, V.H., Mattedi, S., Pastor, M.M., Aznar, M., Iglesias, M. **Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}.** J. Chem. Thermodynamics. 43, 997–1010, 2011;
- 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.
- BENNET, A., BOGORAD, L. **Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga.** J. Cell Biol. 58, 419-435, 1973.
- BERMEJO, P.; PINERO, E.; VILLAR, Á. M. **Iron-chelating ability and antioxidante 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.
- BITTENCOURT, S.S., Hoga, H.E., Torres, R.B., Angelo, J.V.H. **Thermodynamic and spectroscopic properties of binary mixtures of n-butylammonium butanoate ionic liquid with alcohols at T = (293.15–313.15) K.** J. Chem. Thermodynamics. 105, 238-252, 2017.
- CHAIKLAHAN, R.; Chirasuwan, N.; Loha, V.; Tia, S.; Bunnag, B. **Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process.** Bioresour. Technol. 102, 7159–7164, 2011.
- CHANG, Y., Wu, Z., Bian, L., Feng, D., Leung, D.Y.C., 2013. **Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine.** Applied Energy. 102, 427-431.
- CHANG, Y., Show, P.L., Lan, J.C.W., Tsai, J.C., Huang, C.R. **Isolation of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* microalga using Ionic liquid based aqueous two-phase system.** Bioresour. Technol. v 270, 320 – 327, 2018.

CHENNURI, B.K., GARDAS, R.L. **Measurement and correlation for the thermophysical properties of hydroxyethyl ammonium based protic ionic liquids: Effect of temperature and alkyl chain length on anion.** *Fluid Phase Equilibria*. 427, 282-290, 2016.

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.

DASGUPTA, T.; BANERJEE, S.; YADAV, P. K.; RAO, A. R. **Chemomodulation of carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina ptatensis*.** *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.

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

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.

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

GUAN, S. **Extracting phycocyanin from *Spirulina* and hydrothermal liquefaction of its residues to produce bio-crude oil.** Master of Science in Agricultural and Biological Engineering in the Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign, 2016.

HO, S.H., Liao, J.F., Chen, C.Y., Chang, J.S. **Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*.** *Bioresource Technology*, 247. 669–675, 2018.

HOSSEINI, S.M., Alavianmehr, M.M., Gutiérrez, A., Moghadasi, J., Aparicio, S. **On the properties and structure of 2-hydroxyethylammonium formate ionic liquid.** *Journal of Molecular Liquids*. 249, 233–244, 2018.

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 parameters optimization, and purification of phycoliproteins from the isolated Nostoc sp.** *Bioresource Technol.*, v. 166, p. 541-547, 2014.

KUDDUS, M., Singh, P., Thomas, G., Al-Hazimi, A., **Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin.** *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 742859, 9 pages, 2013.

KUMAR, D., Dhar, D.W., Pabbi, S. et al. **Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540).** *Ind J Plant Physiol* 19, 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 phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats.** *J. Neurol. Sci.*, v. 252, p. 67-75, 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.

LIANG, Y.; Kaczmarek, M.B.; Kasprzak, A.K.; Tang, J.; Shah, M.M.R.; Jin, P.; Klepacz-Smólka, A.; Cheng, J.J.; Ledakowicz, S.; Daroch, M. **Thermosynechococaceae as a source of thermostable C-phycocyanins: properties and molecular insights.** *Algal Research*. v. 35, p 223-235, 2018.

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.

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.

MARSAC, N.T, 2003. **Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations.** *Photosynthesis Research*. 76, 197-205, 2003.

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.

MOSTAFA, F.A.,; WAHAB, W.A.A.; SALAH, H.A.; NAWWAR, G.A.M.; ESAWY. M.A. **Kinetic and thermodynamic characteristic of *Aspergillus awamori* EM66 levansucrase.** *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 119, p. 232 – 239, 2018.

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 na additive.** *Acta Sci. Technol.*, v. 36, p. 445-451, 2014.

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

PAPADAKI, S., Kyriakopoulou, K., Tzovenis, I., Krokida, M., 2017. **Environmental impact of phycocyanin recovery from *Spirulina platensis* cyanobacterium.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 44, 217–223, 2017.

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

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

REIS, C.L.B.; SILVA, L.M.A.; RODRIGUES, R.D.P.; SOARES, T.H.; FÉLIX, A.K.N.; 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.

RODRIGUES, R. D. P.; Santiago-Aguiar, R.S.; Rocha, M. V. P.; Castro, F.C.; Farias, W. R.L. de. **Extração Líquido-Sólido de ficocianina de *Spirulina platensis* com líquido iônico prótico: feito da temperatura.** *Anais de Simpósio. XX SINAFERM - XI SHEB.* Fortaleza – Ceara, 2015.

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

RODRIGUES, R. D. P.; Castro, F.C Santiago-Aguiar, R.S.; Rocha, M. V. P. **Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent.** *Algal Research.* 31, 454-462, 2018.

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

SANTIAGO AGUIAR, R. S. **Modelagem termodinâmica de equilíbrio líquido-líquido em sistemas envolvendo líquidos iônicos com modelos de composição local/contribuição de grupo e estruturas moleculares determinadas via química quântica.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

SANTIAGO - SANTOS, M.C.; Noyola,T.P; Ramírez,R.O; López,J.O;Villanueva,R.O.C. **Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp.** *Process Biochemistry.* 39, 2047–2052, 2004.

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

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-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis***. J Appl Phycol, v. 23, p. 1-6, 2011.

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.

SONI, B.; KALAWADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. . 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-phycocyanin 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.

SOUSA e SILVA, A., Moreira,L.M., Magalhães,W.T., Lobo Farias,W.R., Rocha,M.V.P., Bastos, A.K.P. **Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents**. Jor. Env. Chemical Eng. 5, 2101-2106, 2017.

SU, C.H., Liu, C.S., Yang, P.C., Syu, K.S., Chiu, C.C.,2014. **Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: kinetic modeling of influential factors**. Sep. Purif. Technol. 123, 64-68., 2014.

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., 2009. **Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica***. Protein Expression and Purification. 64, 146–154, 2009.

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.

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.

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

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis; 1997. p. 233.

WAN, M.X., Wang, Z.Y., Zhang, Z., Wang, J., Li, S.L., Yu, A.Q., Li, Y.G. **A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from Galdieria sulphuraria**. *Bioresour. Technol.* 218, 272–278, 2016.

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.

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

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

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-κB activation**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, p. 5060-5070, 2016.