



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

THALITA ADRIELLY VIANA CARLOS

**EXTRAÇÃO PRESSURIZADA DE FICOBILIPROTEÍNAS DA MICROALGA
Arthrospira platensis E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
CITOTOXICIDADE *in vitro* EM LINHAGENS CANCERÍGENAS**

FORTALEZA

2020

THALITA ADRIELLY VIANA CARLOS

EXTRAÇÃO PRESSURIZADA DE FICOBILIPROTEÍNAS DA MICROALGA *Arthrospira platensis* E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE *in vitro* EM LINHAGENS CANCERÍGENAS

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientador: Prof. Dr. Filipe Xavier Feitosa.

FORTALEZA
2020

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)

- C28e Carlos, Thalita Adrielly Viana.
Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis* e avaliação da sua atividade antioxidante e citotoxicidade in vitro em linhagens cancerígenas / Thalita Adrielly Viana Carlos. – 2020.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Maria Valderéz Ponte Rocha.
Coorientação: Prof. Dr. Filipe Xavier Feitosa.
1. Ficocianina. 2. Aloficocianina. 3. Extração. 4. Atividade Antioxidante.. 5. Atividade Anticâncer.. I.
Título.

CDD 660

THALITA ADRIELLY VIANA CARLOS

EXTRAÇÃO PRESSURIZADA DE FICOBILIPROTEÍNAS DA MICROALGA *Arthrospira platensis* E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE *in vitro* EM LINHAGENS CANCERÍGENAS

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 19/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Maria Valdevez Ponte Rocha (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Professora Dra. Ana Karine Pessoa Bastos
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Professora Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha família, meu marido Mateus e meu filho
Luiz Müller.

Ao meu pai amado, Gerhard Müller (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ouvir nos meus apelos e por cuidar tão bem de mim.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Professora Dra. Maria Valdevez Ponte Rocha, pela oportunidade de me tornar mestre, pela paciência com meus descontroles emocionais.

Ao Professor Dr. Filipe Xavier Feitosa, por sua disponibilidade e sua infinita paciência comigo, por acompanhar durante toda essa etapa da minha vida.

Ao Professor Dr. Hosiberto Batista de Sant'ana, por todas suas brincadeiras e incentivos e seus “bom dia” descontraídos. Pela parceria para que o trabalho acontecesse e pelas oportunidades que a mim foram oferecidas.

Aos laboratórios de Planctologia da Engenharia de Pescas e oncologia experimental do curso de Farmácia pela parceria.

Ao meu filho, Luiz Müller, por me dar razão para acordar todas as manhãs, tudo é por ele.

Ao meu marido, Mateus Cavalcante, por me incentivar quando preciso, por me apoiar em meus momentos de crise e por entender todos os momentos que vivemos, sem sua paciência talvez a minha não existisse.

À minha amiga especial que o mestrado me deu e que levarei para vida toda, Evelheyn Rebouças, por me ouvir nos desesperos, por me dar os melhores conselhos e por fazer parte da minha vida sempre.

À minha família, pelo suporte de sempre, por acreditarem no meu potencial mesmo quando eu me sinto fraca não me deixando desistir. Mae, Vanuza Viana, meus sogros, cunhada e irmãs.

Ao meu pai Gerhard Müller (*in memoriam*), que mesmo não se fazendo presente, mas que está presente em todas as minhas conquistas.

Aos meus colegas de laboratório por fazerem parte dessa jornada e pelos cafés. Carlos Alberto, Juliana Serpa, Layanne Guedes, Francisco Edvan, Natan Câmara, Bruna, Ticiane, Ravena e todo grupo de pesquisa GPBio.

Aos meus colegas do GPTA e todo grupo, pelo apoio, pela ajuda, por sempre estarem prontos a ajudar, pela simplicidade, pelo companheirismo e por me receberem tão bem, Peterson, Ailton, José e Regiane.

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

RESUMO

As microalgas são consideradas uma potencial matéria-prima sustentável para a produção de compostos bioquimicamente ativos como as ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas são um grupo de cromoproteínas presente em cianobactérias como nas algas azul-esverdeadas e vermelhas. Comercialmente, as ficobiliproteínas são produtos naturais de alto valor com aplicações biotecnológicas, por exemplo, nutracêuticas e farmacêuticas, nas indústrias de alimentos e cosméticos, bem como em pesquisas biomédicas e diagnósticos clínicos. O uso de ficobiliproteínas como corantes naturais não-tóxicos e não-cancerígenos está ganhando importância em todo o mundo em vista do potencial de toxicidade e carcinogenicidade dos corantes alimentares sintéticos. Para obtenção das ficobiliproteínas deve-se escolher um método de extração eficiente que possa obter altos valores de rendimento de extração como também de pureza. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o método de extração pressurizada, aplicando diferentes condições para obter ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*, utilizando como solvente de extração o tampão fosfato de sódio. As ficobiliproteínas foram caracterizadas e avaliou-se seu potencial antioxidante e de citotoxicidade. O aumento de pressão favoreceu o aumento de rendimento de extração e não influenciou a biofuncionalidade das moléculas extraídas. Os resultados mostraram que o método de extração é muito promissor, principalmente para a extração de ficocianina e aloficocianina, obtendo concentrações de 4,44 g.L⁻¹ e 1,63 g.L⁻¹ após 360 min respectivamente, no processo conduzido a 100 bar. O extrato obtido nesta pressão apresentou altos valores de pureza com de 3,59 para ficocianina e 1,72 para aloficocianina, e com rendimento de extração de 44,44 mg.g⁻¹ e 16,33 mg.g⁻¹, respectivamente. Após o processo de purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE sepharose, com apenas uma etapa, obteve-se um extrato rico em ficocianina com pureza de 4,76 e 2,19 para aloficocianina. Além disso, o extrato de ficobiliproteínas purificado apresentou elevada atividade antioxidante com 98 % na redução dos radicais de DPPH e de 100 % na quelação dos íons ferrosos como também apresentou atividade anticancerígena em testes *in vitro* para células leucêmicas HL60. Com isso, o método de extração pressurizada mostra-se eficiente para obtenção de ficobiliproteínas sem causar danos a sua biofuncionalidade.

Palavras-chave: Ficocianina. Aloficocianina. Extração. Atividade Antioxidante. Atividade Anticâncer.

ABSTRACT

Microalgae are considered a potential sustainable raw material for the production of biochemically active compounds such as phycobiliproteins. Phycobiliproteins are a group of chromoproteins present in cyanobacteria such as blue-green and red algae. Commercially, phycobiliproteins are natural products of high value with biotechnological applications, for example, nutraceuticals, and pharmaceuticals, in the food and cosmetics industries, as well as in biomedical research and clinical diagnostics. The use of phycobiliproteins as natural non-toxic and non-cancerous dyes is gaining importance worldwide due to the potential for toxicity and carcinogenicity of synthetic food dyes. To obtain phycobiliproteins, an efficient extraction method must be selected than allows obtain high values of extraction yield and purity index. In this context, the objective of the present study was to evaluate the pressurized extraction method, applying different conditions, to obtain phycobiliproteins from microalgae *Spirulina (Arthrospira platensis)*, using sodium phosphate buffer as the extraction solvent. Phycobiliproteins extracts were characterized and their antioxidant and cytotoxicity potential was determined. The increase in pressure favored the increase of the extraction yield and did not influence the biofunctionality of the extracted molecules. The results showed that the extraction method is very promising, mainly for the extraction of phycocyanin and allophycocyanin, obtaining concentrations of 4.44 g.L⁻¹ and 1.63 g.L⁻¹ after 360 min, respectively, in the process conducted at 100 bar. The extract obtained at this pressure showed a high purity index, 3.59 for phycocyanin and 1.72 for allophycocyanin, and with an extraction yield of 44.44 mg.g⁻¹ and 16.33 mg.g⁻¹, respectively. After the purification process by ion exchange chromatography in DEAE sepharose, with only one step, was obtained an extract rich in phycocyanin with a purity of 4.76 and 2.19 for allophycocyanin. Besides, the purified phycobiliprotein extract showed high antioxidant activity, with 98% in the reduction of DPPH radicals and 100% in the chelation of ferrous ions, as well as showing an anti-cancer activity in *in vitro* tests for HL60 leukemic cells. Thus, the pressurized extraction method is efficient for obtaining phycobiliproteins without damaging their biofunctionality using non-toxic solvent, being an environmentally friendly process.

Keywords: Phycocyanin, Allophycocyanin, Extraction, Antioxidant activity, Anti-cancer activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Possíveis aplicações de biomassa de algas	18
Figura 2	– <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i> (UTEX 1926)	20
Figura 3	– Organização estrutural do ficobilissoma	22
Figura 4	– Fórmulas estruturais dos grupos cromóforos (bilinas) das ficobiliproteínas ...	24
Figura 5	– Comparação estrutural entre a ficocianina e a bilirrubina. a) Estrutura química do cromóforo ficobilina da ficocianina (tetrapirrol de cadeia aberta); b) Bilirrunina	28
Figura 6	– Sistema de extração pressurizado de ficobiliproteínas da microalga <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	35
Figura 7	– Fluxograma do processo de obtenção de ficobiliproteínas da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	40
Figura 8	– Perfil de concentração de ficobiliproteínas obtidas por extração pressurizada da microalga <i>Arthrospira platensis</i> sob diferentes pressões. a) Concentração de ficocianina e b) Concentração de aloficocianina. (■) 15 bar; (●) 25 bar; (▲) 50 bar; (▼) 100 bar	41
Figura 9	– Microscópia da biomassa de <i>Arthrospira platensis</i> antes e após extração pressurizada a 100 bar apresentadas com um zoom optico de 100x. (a) estrutura celular da <i>A. platensis</i> , (b) após 10 minutos de pressurização e (c) após 360 minutos pressurização	42
Figura 10	– Índice de pureza de ficobiliproteínas extraídas de <i>Arthrospira platensis</i> por extração pressurizada após 360 min. Letras iguais representam que não há diferença significativa com base na análise de Tukey, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$). Letras minúsculas são da análise para ficocianina e letras maiúsculas para a aloficocianina. (■) Ficocianina; (■) Aloficocianina	43
Figura 11	– Rendimento de extração de ficobiliproteínas extraídas de <i>Arthrospira platensis</i> por extração pressurizada após 360 min. Letras iguais representam	

	que não há diferença significativa e diferentes que há diferença significativa com base na análise de Tukey, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) Letras minúsculas são da análise para ficocianina e letras maiúsculas para a aloficocianina. (■) Ficocianina; (■) Aloficocianina	43
Figura 12	– Produtividade de extração da ficocianina de <i>Arthrospira platensis</i> por extração pressurizada sob diferentes condições de pressão. (■) 15 bar; (●) 25 bar; (▲) 50 bar; e (▼) 100 bar	48
Figura 13	– Comparação entre os perfis de concentrações das ficobiliproteínas, ficocianina (a) e aloficocianina (b), obtidas por pressurização a 100 bar de modo estático (n = 3) e com agitação (n = 2), números de ensaios. (■) estático; (●) com agitação	49
Figura 14	– Atividade antioxidante do extrato bruto de ficobiliproteínas obtido após 240 min de pressurização a diferentes pressões pelo método de DPPH, usando amostras com concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50
Figura 15	– Perfil eletroforético das ficobiliproteínas extraídas de <i>Arthrospira platensis</i> a 100 bar por 360 min. 1. Marcador de peso molecular; 2. Padrão de ficocianina (Sigma Aldrich); 3. Extrato bruto de ficobiliproteínas; 4. Extrato purificado de Ficobiliproteínas	51
Figura 16	– Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do extrato purificado por cromatografia de troca iônica das ficobiliproteínas extraídas de <i>Arthrospira platensis</i> a 100 bar por 360 min de pressurização e grupos moleculares observados. (-) Extrato purificado de ficobiliproteínas; (- -) Padrão de ficocianina (Sigma Aldrich)	52
Figura 17	– Atividade antioxidante do extrato purificado de ficobiliproteínas extraída da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , por diferentes técnicas de medição e em diferentes concentrações. (a) Sequestro dos radicais de DPPH; (b) Quelação do íon ferroso. (■) Extrato purificado, (■) Ácido Ascórbico e (■) EDTA	53
Figura 18	– Percentual de inibição do crescimento de células cancerígenas utilizando o extrato de ficobiliproteínas da microalga <i>Arthrospira platensis</i> obtidos por extração pressurizada. (●) Glioblastoma-SF295; (■) Colorretal-HCT116; (▲) Próstata-PC3 e (▼) Leucêmico-HL60	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Análise nutricional média de <i>Spirulina (Arthrospira platenis)</i> por 100g	21
Tabela 2	– Efeitos da ficocianina em diferentes órgãos	29
Tabela 3	– Comparação da extração de ficobiliproteínas de <i>Arthrospira platenis</i> de trabalhos mais recentes, por diferentes métodos e diferentes solventes, com o apresentado neste estudo	46
Tabela 4	Pureza e rendimento de recuperação do processo de purificação do extrato de ficobiliproteínas de <i>Arthrospira platenis</i> obtido por extração pressurizada a 100 bar por 360 min	51
Tabela 5	– Valores da IC ₅₀ em µg/mL das ficobiliproteínas extraídas de <i>Arthrospira platenis</i> avaliadas pelo método MTT nas linhagens glioblastoma (SF295), câncer de colorretal (HCT116), próstata (PC3) e leucêmico (HL60) com incubação de 72 horas. Maior concentração testada: 150 µg/mL	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OJETIVOS	16
2.1	Geral	16
2.2	Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	ALGAS	17
3.1.1	<i>Microalgas</i>	18
3.2	<i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	19
3.2.1	<i>Composição nutricional da Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	20
3.2.1.1	<i>Vitaminas</i>	21
3.2.1.2	<i>Minerais</i>	21
3.2.1.3	<i>Proteínas</i>	21
3.3	Ficobiliproteínas	22
3.4	Aplicação das ficobiliproteínas	25
3.4.1	<i>Corante</i>	25
3.4.2	<i>Agente Fluorescente</i>	26
3.4.3	<i>Agente Farmacêutico</i>	27
3.5	Métodos de extração e purificação de ficobiliproteínas	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Cultivo da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	34
4.2	Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	34
4.2.1	<i>Quantificação das ficobiliproteínas extraídas da microalga <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i></i>	35
4.3	Purificação do extrato de ficobiliproteínas da microalga <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	36
4.4	Caracterização dos extratos obtidos de ficobiliproteínas da microalga <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	37
4.4.1	<i>Eletroforese (SDS-PAGE) das ficobiliproteínas extraídas da microalga <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i></i>	37
4.4.2	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	38

4.4.3	<i>Atividade Antioxidante</i>	38
4.4.3.1	<i>Sequestro do radical de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil)</i>	38
4.4.3.2	<i>Ensaio de quelação do íon ferroso</i>	38
4.5	Análise Estatística	39
4.6	Cultura de células, ensaio de citotoxicidade in vitro e determinação do IC50	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Extração das ficobiliproteínas de <i>Arthrospira platensis</i>	41
5.2	Purificação do extrato de ficobiliproteínas de <i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	50
5.3	Efeitos citotóxicos do extrato de ficobiliproteínas obtidas por extração pressurizada	54
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

As microalgas, incluindo as cianobactérias, estão entre os organismos fotossintéticos mais antigos da terra, juntamente com os protistas, são os principais produtores nos ecossistemas aquáticos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). A capacidade das microalgas de converter carbono inorgânico atmosférico em biomassa orgânica com a ajuda da luz solar é sua característica marcante. A natureza unicelular das microalgas simplifica o cultivo em larga escala e a biomassa de microalgas com seus componentes constituintes têm aplicações em diversos setores, desde produtos farmacêuticos, nutracêuticos e de produtos de saúde (MARTINS; CAETANO; MATA, 2010).

Dentre diversas espécies estudadas na literatura, a *Arthrospira platensis*, também conhecida como *Spirulina platensis*, tem se destacado principalmente por possuir em sua composição macro e micronutrientes. Sua composição química em peso seco pode variar de 60 a 70% de proteínas sendo os demais componentes, carboidratos, lipídios, vitaminas (como provitamina A, vitamina C e vitamina E) e minerais (como, por exemplo, ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco). Ácidos graxos essenciais como o ácido γ -linolênico (GLA), pigmentos como clorofila a, ficobiliproteínas e carotenos também estão presentes (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

De acordo com Hsie-Lo *et al.* (2019), as microalgas são uma fonte importante de corantes naturais que estão ganhando mais interesse sobre os corantes sintéticos devido às suas características não-tóxicas e não-carcinogênicas, ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) são um exemplo desses corantes.

As ficobiliproteínas são solúveis em água, possuem cores brilhantes e são altamente fluorescentes. Além disso, exibem características qualitativas e quantitativas diferentes e únicas, incluindo um amplo espectro de absorção de luz visível e alto coeficiente de absorção (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2012, GLAZER; STRYER, 1984). Estes pigmentos são comumente utilizados nas indústrias cosméticas (PANDEY V.; PANDEY A.; SHARMA, 2013), farmacêuticas (LIU; XU; CHENG, 2000; CHERNG *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2007) e de alimentos (BATISTA *et al.*, 2006; JESPERSEN *et al.*, 2005; MISHRA K.; SHRIVASTAV A.; MISHRA S, 2008), pois apresentam propriedades fisiológicas importantes como atividade antioxidante (BHAT; MADYASTHA, 2000; ROMAY *et al.*, 1998; DASGUPTA *et al.*, 2001; UPASANI; BALARAMAN, 2003; BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008; SONI; TRIVEDI; MADANWAR, 2008), anti-inflamatória (ZHU *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016) e anticâncer (ROJAS; JUÁREZ; CHAVERRI, 2014; PAGELS *et al.*, 2019). Também são utilizados como

sondas fluorescentes em histoquímica, citometria de fluxo, microscopia e imunoenaios de fluorescência (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

A pureza das ficobiliproteínas é quem determina a possível aplicação, considera-se grau alimentar quando com pureza maior ou igual a 0,7; grau de reagente quando está entre 0,7 e 3,9 e grau analítico quando maior ou igual a 4,0. O preço no mercado pode depender da pureza e da aplicação final pretendida como, por exemplo, a ficocianina de grau alimentar tem preço de aproximadamente US\$ 0,13 por miligrama, enquanto o grau de reagente analítico pode ser de até US\$ 16,90 por miligrama (HSIE-LO *et al.*, 2019; SIGMA ALDRICH, 2020).

Um dos pigmentos mais estudados da classe das ficobiliproteínas é a ficocianina, que possui várias propriedades terapêuticas, incluindo atividades antioxidante (20 vezes mais ativa do que o ácido ascórbico), anti-inflamatória e anticancerígena (MORAES *et al.*, 2007). Como também a aloficocianina que é amplamente utilizada como etiqueta fluorescente devido as suas propriedades fotofísicas e a capacidade de rotular biomoléculas (CHEN; JIANG, 2018).

O maior aproveitamento biotecnológico de ficobiliproteínas passa pelo desenvolvimento de métodos de extração que sejam tanto eficientes quanto seguros ambientalmente. Existem diversos protocolos para extração, quantificação e purificação de ficobiliproteínas diferindo consideravelmente entre si. Alguns desses métodos utilizam solventes caros e ainda possuem alto consumo energético. Alguns exemplos são congelamento/descongelamento com tampão fosfato ou acetado em água destilada ou nitrogênio líquido ou em carbonato de cálcio, técnicas de rompimento celular como homogeneizador mecânico de tecidos, sonicação e também a técnica de extração assistida por micro-ondas. No entanto, esses métodos nem sempre fornecem extratos com alta pureza nem proporcionam altos rendimentos de extração.

Visto isso faz-se necessário estudos que possam enriquecer ainda mais os extratos obtidos, aumentando pureza das biomoléculas extraídas para baratear processamento das biomoléculas assim como processos que possam ter ampliação de escala para produção industrial. O uso de alta pressão é uma ferramenta poderosa para obter proteínas significativas, pois esse processo retém as propriedades naturais dos produtos finais (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016) e sendo uma realidade já inserida em indústrias de alimentos juntamente com as tecnologias químicas convencionais (SERRAT *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Definir um processo de extração de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis* utilizando pressão e caracterizar e determinar a sua atividade antioxidante e citotoxicidade.

2.2 Específicos

- Avaliar as melhores condições de extração das ficobiliproteínas sem causar desnaturamento proteico em temperatura ambiente.
- Avaliar o método de extração em diferentes condições de pressão em termos de rendimento e pureza.
- Determinar atividade antioxidante *in vitro* do extrato de ficobiliproteínas.
- Analisar a atividade anticancerígena *in vitro* das biomoléculas extraídas nas células de câncer de colorretal, próstata, leucêmica e glioblastoma.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Algas

As algas são organismos aquáticos fotossintéticos. O termo "algas" refere-se a um conjunto polifilético artificial de organismos (APT; BEHRENS, 1999). Eles podem ser unicelulares (microalgas) ou multicelulares (macroalgas). As algas são muito diversas em termos evolutivos. Com mais de 40.000 espécies já identificadas e com muitas outras ainda a serem identificadas, as algas são classificadas em vários grandes grupos, como segue: Cyanobacteria (Cyanophyceae), algas verdes (Chlorophytas), algas vermelhas (Rhodophytas), algas pardas (Ochophyta). Algas verdes-azuladas (Cyanobacteria), Dinoflagelados (Miozoa) e diatomáceas (Bacillariophyta) (ALGAEBASE, 2020)

As algas têm um grande potencial para produzir uma ampla gama de bioquímicos importantes para alimentos, pesquisas médicas e outros usos, e muitos bioquímicos interessantes e importantes ainda devem ser descobertos em microalgas. As algas têm três atributos fundamentais que podem ser convertidos em vantagens técnicas e comerciais, segundo SUGANYA *et al.* (2016) e BECKER (1994):

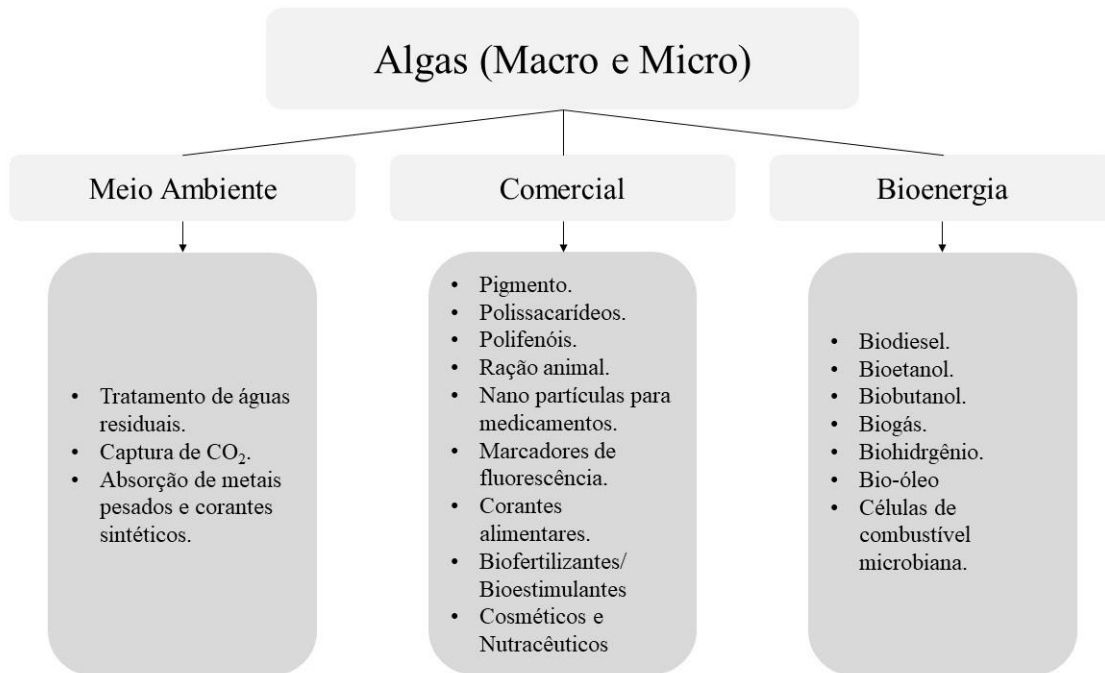
I. São geneticamente um grupo muito diversificado de organismos com uma ampla gama de características fisiológicas e bioquímicas; assim elas produzem naturalmente muitas gorduras, açúcares, compostos bioativos diferentes e incomuns.

II. Podem incorporar de maneira econômica os isótopos estáveis ^{13}C , ^{15}N e ^2H em sua biomassa e, portanto, nos vários compostos que produzem.

III. Compreendem um grupo grande e inexplorado de organismos e, portanto, fornecem uma fonte praticamente inexplorada de produtos.

Muitas são as aplicações das microalgas. Elas podem ser aplicadas em diversas áreas como, no meio ambiente quando usadas para tratamento de águas residuais, comercial quando utilizadas como marcadores de fluorescência e também na bioenergia na produção de biodiesel (SUDHAKAR *et al.*, 2019). Outras aplicações podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 – Possíveis aplicações de biomassa de algas.



Fonte: SUDHKAR *et al.* (2019), adaptada.

3.1.1 Microalgas

Ao contrário das plantas superiores, as microalgas não têm raízes, caules e folhas. As microalgas são capazes de realizar a fotossíntese, por isso são importantes para a vida na terra, pois produzem aproximadamente metade do oxigênio atmosférico e usam simultaneamente o dióxido de carbono um dos gases de efeito estufa para crescer (SUGANYA *et al.*, 2016). O termo “microalgas” inclui cianobactérias procarióticas e microrganismos fotossintéticos eucarióticos (JOHNSON *et al.*, 2018). Micrófitas ou microalgas são algas microscópicas, normalmente encontradas em sistemas marinhos e de água doce (SCOTT *et al.*, 2010; RIZWAN *et al.*, 2018). São espécies unicelulares, que existem individualmente ou formando colônias. Dependendo da espécie, seus tamanhos podem variar de alguns micrômetros (µm) a algumas centenas de micrômetros.

As microalgas possuem fotossistemas e ficobilissomas contendo clorofila para absorção da energia luminosa. Além disso, dependendo das condições de luz e disponibilidade de carbono, podem usar um ou mais de seus três modos metabólicos (fotoautotrofia, heterotrofia ou mixotrofia). Essas características permitem que elas cresçam em uma gama de ambientes, incluindo temperaturas extremas, pH e salinidade (GEADA *et al.*, 2018). As primeiras

linhagens a serem estudadas incluíram *Chlamydomonas*, *Chlorella* e *Spirulina*, sendo as duas últimas as mais cultivadas atualmente (GARRIDO-CARDENAS *et al.*, 2018).

Microalgas têm sido reconhecidas como fonte de ingredientes com efeitos positivos à saúde, pois produzem ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, pigmentos naturais, minerais essenciais, vitaminas, enzimas e peptídeos bioativos (CUELLAR-BERMUDEZ *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2017). 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 produtos com ingredientes funcionais, e as microalgas têm se destacado.

3.2 *Spirulina* (*Arthrospira platensis*)

A *Spirulina* está na terra há aproximadamente 3,6 bilhões de anos e é uma das primeiras formas de vida fotossintética que criou a atmosfera de oxigênio para que toda a vida pudesse evoluir. (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Spirulina foi descoberta pela primeira vez pelo cientista espanhol Hernando Cortez e Conquistadores em 1519. Cortez observou que a *Spirulina* era comida nas mesas dos astecas durante sua visita no Lago Texcoco, no Vale do México. Pierre Dangeard descobriu os benefícios desse consumo para a saúde, observaram que os flamingos sobreviviam consumindo algas verde azuladas. O botânico Jean Leonard apoiou as descobertas de Dangeard e as pessoas logo começaram a comercializar a *Spirulina* para colher seus benefícios (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

Essas microalgas contêm clorofila *a*, como plantas superiores, portanto são classificadas como microalgas de acordo com botânicos pertencentes à classe Cyanophyceae e bactéria devido à sua estrutura procariótica de acordo com bacteriologistas (KORU, 2009; SUDHAKAR; PREMALATHA, 2015).

As duas espécies mais importantes de *Spirulina* são *Arthrospira máxima* e *Arthrospira platensis*. Essa última possui um alto conteúdo considerável de micro e macronutrientes. Sua composição química de peso seco inclui 60 a 70% de proteínas, sendo os demais componentes carboidratos, vitaminas (por exemplo, provitamina A, vitamina C e E, e minerais (como ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco). Ácidos graxos essenciais, como ácido γ -linolênico (GLA), pigmentos como clorofila *a*, ficobiliproteínas e carotenos também estão presentes (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Tomaselli (1997) afirmou que a *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) é uma cianobactéria multicelular, filamentosa, composta por células cilíndricas dispostas na forma de tricomas helicoidais não ramificados, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) (UTEX 1926).



Fonte: LÉON (2010).

A *Spirulina* é o alimento mais nutritivo e concentrado conhecido pela humanidade que contém antioxidantes, fitonutrientes, nutracêuticos podendo ser utilizados com probióticos (PAGELS *et al.*, 2019). A *Spirulina* está emergindo rapidamente como uma resposta completa às diversas demandas devido à sua imponente composição de nutrientes que pode ser usada para usos terapêuticos. O mundo das Nações Unidas na conferência de alimentos declarou que a *Spirulina* é a melhor comida para o futuro e está ganhando popularidade (PULZ; GROSS, 2004). Segundo Soni, Sudhakar e Rana (2017), a Organização Mundial de Saúde descreveu a *Spirulina* como o melhor produto de saúde da humanidade além da Instituição intergovernamental (IIMSAM) permitiu a utilização de microalga *A. platensis* contra desnutrição.

3.2.1 Composição nutricional da *Spirulina* (*Arthrospira platensis*)

Como já mencionado a *Spirulina* contém praticamente todos os componentes encontrados para interesse industrial. Uma proporção considerável de proteínas, vitaminas, sais minerais, carboidratos, pigmentos, oligoelementos e ácidos graxos essenciais estão presentes.

3.2.1.1 Vitaminas

As vitaminas naturalmente encontradas na *Spirulina* são B₁, B₂, B₁₂, E e um precursor de vitamina A que é o β -caroteno. Seu conteúdo de β -caroteno é incomumente alto, cerca de 30 vezes maior do que o encontrado em uma cenoura. Também é excepcionalmente rica em vitamina B₁₂, que é a mais difícil de obter de uma dieta vegetariana porque nenhuma fruta, vegetal, grão ou leguminosa a contém. Tem quatro vezes mais vitamina B₁₂ do que fígado cru, que foi considerada a melhor fonte deste nutriente. É reconhecida como uma excelente fonte de vitamina E comparável à encontrada na grama de trigo (YIN *et al.*, 2017).

3.2.1.2 Minerais

A *Spirulina* contém minerais como ferro, magnésio, cálcio e fósforo. O ferro é um mineral que está presente principalmente em alimentos de origem animal, como carne e peixe (BALASUBRAMANI *et al.*, 2016; PARRA-SALDIVAR, 2015). Uma análise média nutricional por 100 g de *Spirulina* é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Análise nutricional média de *Spirulina* (*Arthrospira platenis*) por 100g.

Componentes	Valor nutricional (mg)	Componentes	Valor nutricional (mg)
Proteína Vegetal	63000	Cálcio	1000
Carboidratos	22000	Fósforo	800
Gordura	2200	Magnésio	400
Minerais	8000	Ferro	58
Fibra dietética	7000	Zinco	3
Vitamina A	212	Cobre	1,2
Clorofila	600	Manganês	0,5
Vitamina E	10	Crômio	0,03
Vitamina B ₁	3,5	Potássio	1,4
Vitamina B ₂	0,4	Ácido gama linoleico	1
Vitamina B ₃	1,3	Vitamina B ₈	0,005
Vitamina B ₅	0,2	Vitamina B ₉	0,05
Vitamina B ₆	6	Vitamina B ₁₂	0,35

Fonte: PARRA-SALDIVAR (2015); SONI, SUDHAKAR E RANA (2017).

3.2.1.3 Proteínas

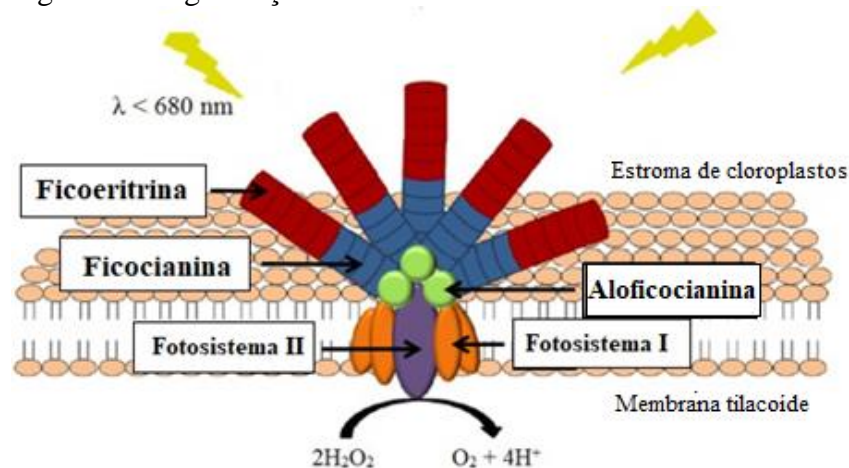
A *Spirulina* é abundante em proteínas vegetais, que representam de 60% a 70% do seu peso. Farinha de soja contém cerca de 35% de proteína. Qualitativamente, a *Spirulina*

fornece proteínas completas, pois contém toda a gama de aminoácidos que representam 47% do peso total da proteína (BALASUBRAMANI *et al.*, 2016). Dentre essas proteínas estão as ficobiliproteínas, que são um grupo de proteínas solúveis em água com um cromóforo associado, responsável pela coleta de luz nas cianobactérias.

3.3 Ficobiliproteínas

Praticamente todas as plantas e algas contêm clorofila *a* que absorve luz na faixa de ($\lambda \approx 430$ e 680 nm) como por exemplo as algas verdes que possuem clorofila *a* e *b*, as pardas e as diatomáceas *a* e *c* e as algas vermelhas possuem *a* e *d*. Esses organismos são fotossinteticamente ativos em uma faixa de comprimento de onda de 400 a 700 nm. As cianobactérias e as algas vermelhas não possuem clorofila *b*, absorvendo luz principalmente nas regiões azul e vermelha do espectro visível devido à clorofila *a*. Para compensar a grande lacuna de absorção e otimizar a coleta de energia luminosa, os complexos supramoleculares conhecidos como ficobilissomas são montados na membrana tilacoide, que possui uma faixa de absorção de 500-660 nm (SCHULZE *et al.*, 2014; Hsie-Lo *et al.*, 2019). Cada ficobilissoma é composto de proteínas coloridas chamadas ficobiliproteínas, como a ficocianina, a ficoeritrina e aloficocianina. Essas moléculas são dispostas em forma de antena (Figura 3), de modo que a energia absorvida seja canalizada para o centro da reação do fotossistema II com eficiência superior a 95 %. A ordem de absorção dá-se inicialmente pela ficoeritrina que encontra-se mais externa do ficobilissoma até a aloficocianina mais internamente (PAGELS *et al.*, 2019). Como resultado, cianobactérias e algas vermelhas podem utilizar luz vermelha, amarela, verde e, em menor medida, azul (MANIRAFASHA *et al.*, 2016; HSIEH-LO *et al.*, 2019).

Figura 3 – Organização estrutural do ficobilissoma.



Fonte: HSIEH-LO, 2019; ZILINSKAS e GREENWALD, 1986, adaptada.

Os ficobilissomas permitem que os pigmentos sejam arranjados geometricamente de uma maneira que ajude a otimizar a captura de luz e a transferência de energia. Todas as ficobiliproteínas absorvem a luz incidente diretamente, mas, além disso, participam de uma cadeia de transferência de energia no interior do ficobilissoma. A transferência de energia ocorre na sequência de ficoeritrina → ficocianina → aloficocianina → clorofila *a* (MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

Baseadas em suas cores, as ficobiliproteínas são classificadas em dois grandes grupos: ficoeritrina (vermelho) e ficocianina (azul); sendo as ficocianinas subdivididas em C-ficocianina, R-ficocianina e aloficocianina (MANIRAFASHA *et al.*, 2016). Além disso, as ficobiliproteínas são solúveis em água, muito estáveis em pH fisiológicos, são proteínas altamente fluorescentes nas quais podem constituir até 60% do teor de proteína solúvel (VISKARI; COLYER, 2003).

Informações sobre a organização supramolecular de ficobilissomas advêm da microscopia eletrônica que mostrou que cianobactérias contêm vários tipos estruturais de ficobilissomas, podendo ser classificados em três tipos morfológicos: hemi-elipsoidal, hemidiscoidal e em forma de feixe (GANTT; LIPSCHULTZ, 1972; LI *et al.*, 2019). Mas, o ficobilissoma hemidiscoidal com um núcleo tricilíndrico e seis hastes é encontrado extensivamente na maior parte delas (SIDLER, 1994).

A ficocianina é tida como pigmento principal das cianobactérias, pois pode chegar a 20% em massa seca da proteína celular da mesma (PATEL *et al.*, 2005). Caetano (2018) afirma que dentre diversas espécies de cianobactérias o maior nível de ficocianina é encontrado na *A. platensis*, quando apresenta cerca de 17,5% e 3,8% para aloficocianina com apenas 1,2% de ficoeritrina.

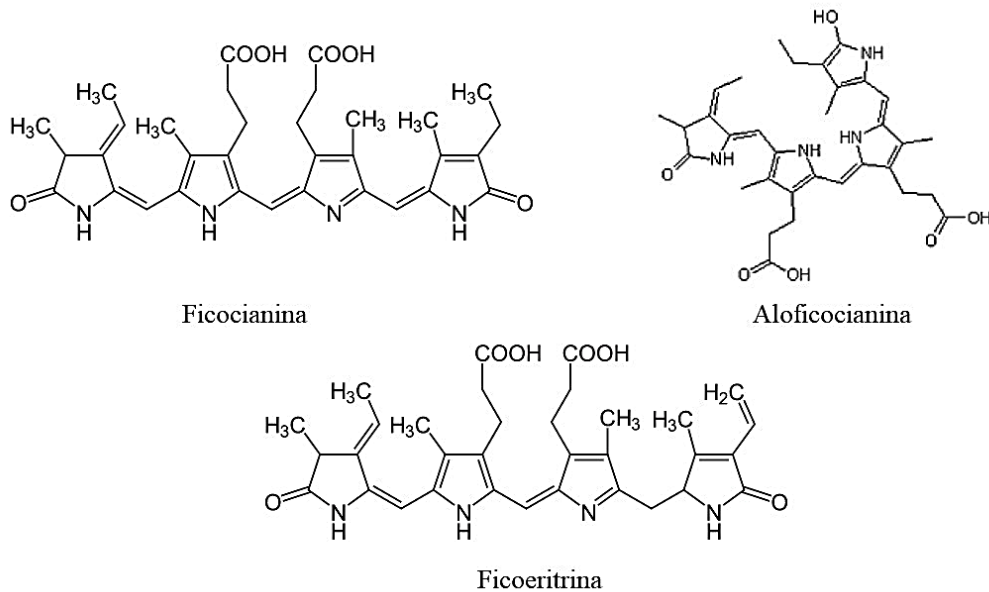
A ficocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 610\text{-}620$ nm) é a maior constituinte dos ficobilissomas, enquanto a aloficocianina detém os pigmentos ponte entre os ficobilissomas e as lamelas fotossintéticas. Ambas, ficocianina e aloficocianina, são compostas de duas cadeias polipeptídicas, α e β , de cerca de 17.000 e 18.000 Da. Os polipéptidos 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. A relativa estabilidade do complexo biliproteína – ligante varia entre as biliproteínas de diferentes fontes (GLAZER; STRYER, 1984; WESTERMANN *et al.*, 1993; RODRIGUES, 2017).

A aloficocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 650\text{-}660$ nm) é organizada na forma de trímero, em pH neutro, apresenta três α e três β polipeptídios, cada um deles com cromóforo (bilina). Trímeros

($\alpha_3\beta_3$), são conjuntos de três monômeros de ($\alpha\beta$) com simetria tripla. Ficocianina é encontrada em solução, como uma mistura complexa entre ($\alpha_3\beta_3$) e ($\alpha_6\beta_6$) e outros oligômeros. Os hexâmeros ($\alpha_6\beta_6$) tem forma de disco e são formados pela associação face-a-face de trímeros. As hastes são formadas pela associação desses discos (ZOLLA; BIANCHETTI; RINALDUCCI, 2002; RODRIGUES, 2017).

Ficoeritrinas, especialmente de algas vermelhas, tem 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 hexômeros mais estáveis [($\alpha\beta$)- γ -($\alpha\beta$)₃] (240-260 KDa). Portanto, usualmente as ficoeritrinas existem na forma de hexômeros em solução, bem como nos ficobilissomas, contudo, ficocianina e aloficocianina apresentam-se na forma de trímeros somente em solução (SUN *et al.*, 2009; RODRIGUES, 2017). As formulas estruturais de cada ficobiliproteína podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4 – Fórmulas estruturais dos grupos cromóforos (bilinas) das ficobiliproteínas.



Fonte: GOLDSMITH e MOERNER, 2010.

As ficobiliproteínas cianobacterianas ganharam importância no setor comercial, pois possuem diversas aplicações. O potencial primário dessas moléculas é como corantes naturais, mas várias investigações demonstraram suas propriedades promotoras de saúde e uma gama de aplicações farmacêuticas (ZHU *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016; ROJAS *et al.*, 2014). Uma das aplicações da ficocianina é como pigmento alimentar, substituindo os pigmentos sintéticos atuais. Sendo usada como corante em chicletes, picolés, doces, refrigerantes,

laticínios e cosméticos, como batons e delineadores (GOURAJI; ZAD; GHIACI, 2019; SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018). Além disso, as ficobiliproteínas são amplamente utilizadas em laboratórios de pesquisa clínica e imunológica (SPOLAORE; CASSAN; DURAN, 2006; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; LI *et al.*, 2019). São úteis como marcadores para anticorpos, receptores e outras moléculas biológicas em um classificador de células ativado por fluorescência, e são usadas em experimentos de identificação imunológica, microscopia de fluorescência e diagnóstico (CHEN; JIANG, 2018).

3.4 Aplicações das ficobiliproteínas

3.4.1 Corante

Há uma demanda crescente por cores naturais que são utilizadas em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, têxteis e como corantes de impressão. No entanto, sua utilidade é limitada a poucos deles, uma vez que os corantes naturais têm baixos valores tintoriais e persistência (SEKAR; CHADRAMOHAN, 2008).

Devido ao efeito tóxico de vários corantes sintéticos, há uma preferência crescente pelo uso de cores naturais para vários usos finais. As ficobiliproteínas são usadas como corante natural na indústria de alimentos (C-ficocianina) e na indústria de cosméticos (C-ficocianina e R-ficoeritrina). A ficocianina derivada de *Calothrix sp.* é usada como pigmento natural em alimentos como goma de mascar, laticínios e geleias (SANTOS *et al.*, 2004). Apesar de sua menor estabilidade ao calor e à luz, a ficocianina é considerada mais versátil que a gardênia e o índigo, mostrando uma cor azul brilhante na goma de gelatina e balas moles revestidas (LONE *et al.*, 2005).

Elas também são usadas na coloração de muitos outros produtos alimentícios como produtos lácteos fermentados, sorvetes, refrigerantes, sobremesas, decoração de bolos e doces e cosméticos. Tonalidade de azul produzido a partir da microalga vermelha *Phorphyridium aeruginosum* não muda com o pH. A cor é estável sob a luz, mas sensível ao calor. Dentro de uma faixa de pH de 4 a 5, a cor azul produzida é estável a 60 °C por 40 min. Essa propriedade é importante para usos alimentares, pois muitos itens alimentares são ácidos, principalmente bebidas e confeitados (SEKAR; CHADRAMOHAN, 2008).

Visto isso, experimentos mostram que a cor azul adicionada às bebidas sem aplicação de calor (Pepsi® e Bacardi Brezzer®) não perderam a cor por pelo menos 1 mês em temperatura ambiente. A cor ficou estável em preparações secas. Flores de açúcar para

decoreção de bolos mantiveram suas cores por anos de armazenamento. Os alimentos preparados com as ficobiliproteínas incluem gelatina e sorvete (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; SUDHAKAR; PREMALATHA, 2015).

Além de suas propriedades corantes, a ficoeritrina possui uma fluorescência amarela. Uma variedade de alimentos que fluorescem sob luz natural e luz UV foi preparada e testada. Isso inclui pirulitos transparentes feitos de solução açucarada, balas de gotas de açúcar secas para decoreção de bolos (que fluorescem sob luz UV) e refrigerantes e bebidas alcoólicas que fluorescem em pH 5-6. A cor fluorescente também foi adicionada às bebidas alcoólicas que contêm até 30% (v/v) de álcool, mas o prazo de validade desses produtos é curto (DUFOSSE *et al.*, 2005).

3.4.2 *Agente fluorescente*

As ficobiliproteínas desempenham um papel importante em sistemas de detecção baseados em fluorescência, particularmente para citometria de fluxo, técnica usada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas em meio líquido em fluxo. As propriedades espectrais como (1) excitação e emissão na extremidade vermelha do espectro, onde a interferência de matrizes biológicas tende a ser menor; (2) grande mudança de Stokes, de modo que a interferência da dispersão de Rayleigh e Raman e outros componentes fluorescentes é menos significativo ou inexistente; (3) imunidade à têmpera por substâncias biológicas que ocorrem naturalmente; (4) alta solubilidade em ambiente aquoso, para que efeitos de ligação não específicos sejam mínimos e (5) rendimento quântico de fluorescência independente do pH das ficobiliproteínas, particularmente R -ficoeritrina e aloficocianina, tornaram-nos reagentes dominantes nessa classe de fluorocromos (KRONICK; GROSSMAN, 1983). Estudos como o de Chen e Jiang (2018) mostram a aloficocianina sendo utilizada como marcador de fluorescência em ensaios de imunofluorescência para detectar α -fetoproteína, proteína sintetizada pelo fígado sendo a principal do soro fetal

Síntese de conjugados de ficobiliproteínas com moléculas com especificidade biológica, como imunoglobulinas, proteína A, biotina e avidina, foram relatados e mostraram que os conjugados de ficobiliproteínas são excelentes reagentes para a análise de fluorescência em duas cores de células únicas usando classificador de células ativadas por fluorescência (FACS) (OI; GLAZER; STRYER, 1982).

Os reagentes de rotulagem fluorescente são um componente essencial de uma enorme indústria construída com base na detecção sensível de fluorescência. Este poderoso

reagente de marcação de proteínas multicromóforos mudou a indústria da citometria de fluxo e permitiu a análise sensível de subconjuntos de linfócitos de duas cores com um único laser de íon argônio (TELFORD *et al.*, 2001; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008). A ficoeritrina excita muito fortemente a 488 nm, mas a emissão é deslocada para 580 nm por eventos de transferência de energia entre os cromóforos na proteína. Ficoeritrina como segunda cor funciona bem com anticorpos marcados com fluoresceína. Eles também podem ser excitados a 488 nm, mas são detectados separadamente a 525 nm para fornecer a segunda cor de detecção. O monitoramento do HIV e o diagnóstico de câncer foram uma forte força motriz para o crescimento desse reagente. A ficoeritrina é também um reagente muito importante em proteômica e genômica e forma a base do sistema de detecção em chips Affymetrix (microarranjos de DNA). A estreptavidina marcada com ficoeritrina é adicionada após a ligação completa e produz um forte sinal a partir de elementos da matriz contendo as sondas de DNA ou proteína marcadas com biotina (DE ROSA; BRENCHLEY; ROEDERER, 2003; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; LI *et al.*, 2019).

3.4.3 Agente farmacêutico

A triagem de microalgas, especialmente as cianobactérias, para antibióticos e compostos ativos tem recebido um interesse cada vez maior. A propriedade farmacológica atribuída pela ficocianina, por exemplo, inclui atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora e hepatoprotetora entre outras (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; NAGARAJ *et al.*, 2012; ROJAS; JUÁREZ; CHAVERRI, 2014; GAMMOUDI *et al.*, 2019).

Pesquisas sobre a atividade fisiológica das ficobiliproteínas são realizadas há mais de 10 anos como é o caso de trabalhos como o de Huang *et al.* (2007) e de Ramirez *et al.* (2003). Muitos dos estudos mostram que as ficobiliproteínas possuem um forte efeito antioxidante, eliminando o excesso de espécies reativas de oxigênio e aumentando a quantidade de enzimas antioxidantes (WU *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2019).

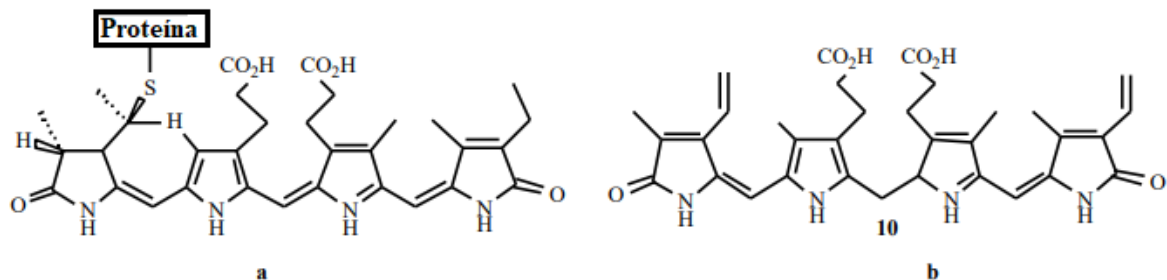
Os radicais livres e outros oxidantes são causadores de doenças cardiovasculares, câncer, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais, entre outras (CHERNG *et al.*, 2007). Quando em excesso, podem gerar o estresse oxidativo. Essa produção ocorre naturalmente pelo organismo durante ações catalíticas de enzimas no metabolismo celular. Quando ocorre um desequilíbrio em sistemas prooxidantes e antioxidantes o organismo encontra-se em estresse oxidativo, sendo as substâncias pro-oxidantes predominantes

(NASCIMENTO *et al.*, 2011). O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos naturalmente ou por reposição com substâncias que possuam essa característica.

Portanto, o uso terapêutico de antioxidantes naturais ou sintéticos parece ser promissor (ROMAY *et al.*, 2003). Um exemplo desse efeito é visto no estudo de Memije-Lázaro *et al.* (2018), no qual os autores avaliaram a progressão das doenças renais e cardiovasculares utilizando a *Spirulina (Arthrospira maxima)* e a C-ficocianina.

A estrutura química dos cromóforos da ficocianina (Figura 5A) é muito semelhante à bilirrubina (Figura 5B). A bilirrubina é considerada um antioxidante fisiologicamente importante contra espécies reativas, inibe a modificação oxidativa de proteínas plasmáticas e resíduos de aminoácidos aromáticos (ROMAY *et al.*, 2003). A eliminação de radicais de oxigênio pela bilirrubina mostrou proteger a albumina sérica, bem como outros alvos biológicos.

Figura 5 – Comparação estrutural entre a ficocianina e a bilirrubina. a) Estrutura química do cromóforo ficobilina da ficocianina (tetrapirrol de cadeia aberta); b) Bilirrubina.



Fonte: ROMAY *et al.*, (2003), adaptada.

Pesquisadores cubanos descreveram pela primeira vez em 1998 a atividade antioxidante da ficocianina (ROMAY *et al.*, 1998), esses autores determinaram que a ficocianina foi capaz de eliminar o ânion hidroxila (OH^-), radical alcoxila (RO^*) e ânion superóxido (O_2^{*-}), também foi capaz de inibir a peroxidação lipídica, sendo descrito também pela primeira vez as propriedades anti-inflamatórias. ROJAS; JUÁREZ e CHAVERRI (2014) afirmam que existem diversos estudos no qual comprovam que a ficocianina também é capaz de eliminar outros tipos de radicais, tais como o peroxil (ROO^*), peroxinitrito (ONOO^-), óxido nítrico (NO^*), também sendo capaz de eliminar radicais não naturais, como o sal diamônio do 2,2-azinobis (ácido 3-ethylbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS^+) e o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Uma vez que as propriedades antioxidantes foram demonstradas, esta proteína foi submetida a várias condições oxidantes para avaliar sua eficácia biológica contra algum distúrbio patológico em modelos *in vitro* e *in vivo*. Rojas; Juarez e Chaverri (2014) discutiram diversas aplicações em ambos os modelos. Nos estudos *in vitro* avaliaram o efeito da ficocianina em células cancerígenas e em células não cancerígenas como, macrófagos, sanguíneas, neuronais, hepáticas entre outras. No modelo *in vivo* a maioria das pesquisas foi conduzida em ratos e camundongos, e foi relatado diversas aplicações, sendo algumas expostas na Tabela 2.

Tabela 2 –Efeitos da ficocianina em diferentes órgãos.

Órgão	Efeito da Ficocianina
Fígado	Preveniu necrose hepática induzida pela galactosamina,
Coração	Atenua os danos induzidos por reperfusão de isquemia cardíaca diminuindo a formação de espécies reativas do oxigênio.
Pulmão	A lesão pulmonar aguda induzida pela inalação de lipopolissacarídeos foi evitada pelo tratamento com ficocianina.
Rim Pâncreas	Preveniu o dano renal induzido pela cisplatina. O exame histológico revelou que a ficocianina reajusta o número de células β das glândulas secretoras de insulina promovendo a regeneração de células beta danificadas pelo aloxano pancreático.

Fonte: ROJAS; JUÁREZ; CHAVERRI, 2014.

Outras aplicações podem ser observadas para a ficocianina como no tratamento com terapia fotodinâmica utilizando um complexo de ficocianina-albumina sérica bovina para tratar células MDA-MB-231, câncer de mama (BHARATHIRAJA *et al.*, 2018), o efeito citotóxico em células de câncer de pulmão (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016), o efeito inibitório na proliferação de células de câncer de ovário SKOV-3 (YING *et al.*, 2016), em lesões osteoartríticas (YOUNG *et al.*, 2016), possui potencial anti-hiperglicêmico (SETYANINGSIH; BINTANG; MADINA, 2015), melhora a encefalomielite autoimune e induz células T-reguladoras (PENTON-ROL *et al.*, 2011), impede a carcinogênese do cólon (SAINI; SANYAL 2014), atividade anti-inflamatória (CHERNG *et al.*, 2007), etc. A atividade de C-ficocianina na indução da apoptose das células cancerígenas e a baixa toxicidade relativa em células não

cancerosas a tornam um candidato muito bom como agente de quimioprevenção do câncer (WANG *et al.*, 2007).

O uso de ficocianina tem sido proposto como um agente em terapias fotodinâmicas que podem fornecer uma possível terapia tumoral (LI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012). No entanto a ficocianina já vem sendo sugerida como agente complementar a medicamentos tradicionais utilizados como anticâncer, projetados para limitar o crescimento das células cancerígenas e reduzir efeitos colaterais tóxicos desses medicamentos. Com o conhecimento das propriedades fotodinâmicas e principalmente sua capacidade de ligação a células cancerígenas foi sugerido o uso para co-localização de tumores *in vivo* (MORCOS; BERNS; HENRY, 1998; THANGAM *et al.*, 2013; ROJAS; JUÁREZ; CHAVERRI, 2014).

3.5 Métodos de extração e purificação de ficobiliproteínas

O primeiro passo para obter ficobiliproteínas é escolher a técnica para extraí-las das células, mantendo suas estruturas e funções não afetadas significativamente. Em geral, quanto maior a proporção de células de algas rompidas, maior será o rendimento de ficobiliproteínas. No entanto, perturbações violentas podem ter um efeito negativo nas estruturas e nas funções (LI *et al.*, 2019).

Na literatura existem relatos de diferentes procedimentos de extração de ficocianina de cianofíceas, nos quais são combinados diferentes métodos de rompimento da parede celular da alga, com a posterior extração das ficobiliproteínas. Geralmente as técnicas de extração envolvem a ressuspensão da biomassa algal úmida ou seca em meios aquosos, como água destilada ou tampões de caráter ácido, neutro ou básico (ABALDE *et al.*, 1998; SABOYA; RODRIGUES; FARIAS, 2017).

Vários aspectos devem ser considerados durante o processo de extração. Além das próprias especificidades de cada abordagem, existem outros fatores intrínsecos que devem ser levados em consideração. A temperatura da extração exerce fundamental importância sobre os rendimentos, tendo em vista que temperaturas mais elevadas decrescem o percentual de pigmento obtido. Além disso, fatores como o tipo de método de rompimento celular aplicado, o tipo de solvente utilizado, o tempo de extração e a relação biomassa solvente (SILVA, 2008).

Na literatura é possível observar diferentes técnicas de extração de ficobiliproteínas, em alguns casos a extração pode até ser bem-sucedida com altos valores de rendimento, mas com algumas desvantagens como baixo teor de pureza, consumo energético elevado entre outros fatores. Existem vários métodos físicos e químicos de ruptura celular e extração de

proteínas como, por exemplo: sonicação (ÍLTER *et al.*, 2018), ciclos de congelamento e descongelamento (TAVANANDI; CHANDRALEKHA; RAGHAVARAO, 2018), assistida por micro-ondas (RATHNASAMY *et al.*, 2019), convencional (aquecimento com agitação) (RODRIGUES *et al.*, 2019) e fluidos supercríticos (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016).

O tratamento de congelamento-descongelamento está entre os métodos mais amplamente usados para extrair ficobiliproteínas, o que é muito eficaz para a maioria das cianobactérias e algumas algas vermelhas. Após o tratamento com congelamento e descongelamento, a barreira de permeação das células é danificada e materiais internos são liberados (CALCOTT; MACLEOD, 1975; LI *et al.*, 2019). Geralmente, cianobactérias ou algas vermelhas são congeladas a cerca de -20 °C por várias horas e depois descongeladas a 4 °C ou à temperatura ambiente. Para uma melhor eficiência de extração, geralmente são utilizadas várias rodadas de congelamento e descongelamento.

Na extração assistida por ultrassom, também conhecido como sonicação, a cavitação é o principal fenômeno e é caracterizado 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. A frequência de operação, pH e razão solvente:biomassa são variáveis importantes nesse tipo de extração (GREENLY; TESTER, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2018). No entanto, esse método não é considerado adequado para a extração em larga escala de ficobiliproteínas, porque é difícil transmitir energia suficiente para grandes volumes de suspensão de células (BALASUNDARAM. HARRISON; BRACEWELL, 2009; LI *et al.*, 2019).

A extração assistida por micro-ondas (EAM) ocorre durante a exposição às micro-ondas e os principais processos ocorridos são o aquecimento dos materiais, com base em suas constantes dielétricas, seguido por condução iônica e rotação das moléculas dipolo. A condução iônica é a migração eletroforética de íons na presença de um campo magnético. O atrito produzido como resultado da resistência da solução para esta migração de íons gera o aquecimento da mesma (RODRIGUES, 2017). Uma desvantagem desse método seria o custo elevado e difícil ampliação de escala, mas por outro lado o método utiliza baixos volumes de solventes e mostrou-se eficiente na extração de ficocianina (RATHNASAMY *et al.*, 2018).

O método convencional alia aquecimento e 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). A utilização de diferentes solventes foi avaliada por Rodrigues *et al.* (2019) utilizando a extração

convencional. Em seu estudo, os líquidos iônicos próticos foram eficientes na extração de ficobiliproteínas apresentando melhor desempenho que o tampão fosfato de sódio. As principais desvantagens desse método são o maior consumo energético e o (largo) tempo de extração empregado, fatores que dificultam a ampliação de escala.

A extração com fluídos supercríticos (EFS) utiliza principalmente o dióxido de carbono como solvente extrator. O dióxido de carbono (condições críticas 30,9 °C e 73,8 bar) é de baixo custo, ecológico e geralmente reconhecido como seguro. Uma desvantagem desse método é que predominantemente é usado um fluido de extração não polar, como o CO₂, uma das alternativas para diminuir essa apolaridade é aumentar seu poder de solvatação em relação ao analito de interesse empregando modificadores polares (co-solventes) (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016).

A extração líquida pressurizada (ELP) ocorre quando a pressão é aplicada para permitir que os solventes líquidos de extração possam aumentar o seu ponto de ebulição normal com a variação da temperatura. Os processos ELP podem ser utilizados no modo dinâmico e estático. O uso combinado de altas pressões e temperaturas fornece processos de extração mais rápidos que requerem pequenas quantidades de solventes. Além disso, o ELP é amplamente reconhecido como uma técnica de extração verde devido ao baixo consumo de solvente orgânico (MENDIOLA *et al.*, 2007). Essa metodologia é muito usada na extração de compostos como carotenoides, lipídios, óleos essenciais, compostos fenólicos entre outros, mas pouco tem sido aprofundada com relação a extração de ficobiliproteínas.

Dando sequência à extração, após o rompimento é necessária a separação do extrato com uma nova centrifugação. O precipitado é descartado, pois contém células rompidas (debris) e compostos que não são de interesse. Por sua vez, o sobrenadante contém os pigmentos de interesse (ficocianina, aloficocianina e a ficoeritrina) e outras proteínas. Esse sobrenadante é reservado para o próximo passo, a purificação (SILVA, 2008).

Diversos métodos são utilizados na literatura para a purificação das ficobiliproteínas como centrifugação, precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) (BURGUES, 2009), sistema aquoso bifásico (NASCIMENTO *et al.*, 2019), cromatografia de troca iônica, cromatografia em gel e de filtração, cromatografia em hidroxiapatia e cromatografia de adsorção em leito expandido (LIU *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2011; SORENSEN; HANTKE; ERIKSEN, 2013; KUMAR *et al.*, 2014). Grande parte dos custos de produção estão nos passos de purificação, por isso a necessidade de técnicas de bioseparação eficientes, efetivas e econômicas para aplicação em maior escala. Deste modo, para determinar o método específico de extração e de purificação deve-se verificar qual a

microalga de trabalho, qual o extrato de interesse além da pureza desejada para o mesmo (PATIL; RAGHAVARAO, 2007; SILVA, 2008).

4 MATERIAS E MÉTODOS

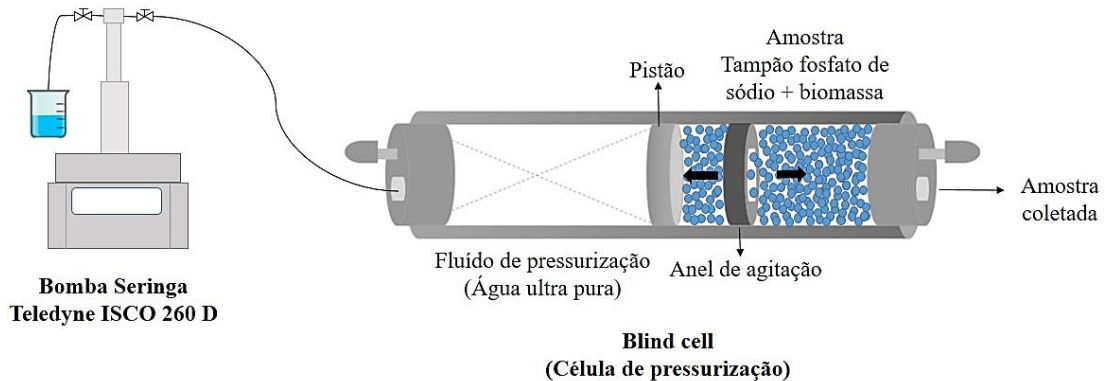
4.1 Cultivo da microalga *Arthrospira platensis*

A biomassa da cianofícea *Arthrospira platensis* foi obtida a partir de um cultivo unialgal realizado em ambiente externo no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em tanques de ferrocimento, utilizando meio Venkataraman (VENKATARAMAN; BECKER, 1985), modificado, constituído por reagentes agrícolas, tendo como fonte de nitrogênio a ureia ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e superfosfato triplo $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), como fonte de fósforo. A alcalinidade do meio (pH 10) foi garantida com a inclusão de bicarbonato de sódio (3 g L^{-1}) e a salinidade mantida em 10. O crescimento da cultura foi monitorado, diariamente, por densidade óptica com o auxílio de um espectrofotômetro (HACH, DR2700, Alemanha) a 680 nm e a biomassa de filtrada, em manta sintética de fibra de vidro com $60 \mu\text{m}$, quando a absorvância atingia valores superiores a 0,800. Em seguida, a biomassa úmida foi desidratada em estufa com recirculação de ar a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e triturada até a obtenção de um pó fino que foi armazenado à vácuo ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) até a realização dos estudos.

4.2 Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*

A extração das ficobiliproteínas ocorreu em um sistema de pressurização composto por uma bomba seringa (Teledyne ISCO 260 D) e uma *blind cell apparatus* (cilindro de pressurização) de acordo com a Figura 6. Os experimentos foram avaliados utilizando uma razão de 10% (m/v) de biomassa de *A. platensis*, em 50 mL do tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7 e foi estudado o comportamento da extração nas seguintes pressões 15, 25, 50 e 100 bar. Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo definidos até 360 minutos de pressurização. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, em condição de pressão atmosférica.

Figura 6 – Sistema de extração pressurizado de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*



Fonte: A autora 2020.

4.2.1 Quantificação das ficobiliproteínas extraídas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*

Para quantificação das ficobiliproteínas extraídas, a densidade óptica dos sobrenadantes foi determinada por espectrofotometria (BIOCHROM, LIBRA S11, REINO UNIDO) nos comprimentos de onda máximo de absorção desses pigmentos 562, 615 e 652 nm e as concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram estimadas de acordo Bennet e Bogorad (1973) usando as Equações 1, 2 e 3, respectivamente.

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

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

$$CFE = \frac{DO_{562} - 2,42 \times CF - 0,849 \times CAF}{9,62} \quad (3)$$

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

Também determinou-se a pureza dos extratos obtidos de ficobiliproteínas realizando uma leitura de absorbância no comprimento de onda de 280 nm (demais componentes que foram extraídos) e calculado o fator de pureza usando as Equações 4, 5 e 6 para ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina, respectivamente (ABALDE *et al.*, 1998).

$$F = \frac{A_{615}}{A_{280}} \quad (4)$$

$$AF = \frac{A_{652}}{A_{280}} \quad (5)$$

$$FE = \frac{A_{562}}{A_{280}} \quad (6)$$

Em que: F é o fator de pureza da ficocianina; A_{615} é a densidade óptica da amostra determinada a 615 nm; A_{280} é a densidade óptica da amostra medida em 280 nm; AF é o fator de pureza da aloficocianina; A_{652} é a densidade óptica da amostra medida em 652 nm, FE é o fator de pureza da ficoeritrina, A_{562} é a densidade óptica da amostra medida em 562 nm.

O rendimento e a produtividade de extração das ficobiliproteínas foram avaliados de acordo com as seguintes Equações 7 e 8, respectivamente.

$$R = \frac{C_{pigmento} \times V_{solvente}}{m_{microalga}} \quad (7)$$

$$P = \frac{C_{pigmento}}{t} \quad (8)$$

Em que: R é o rendimento (mg g^{-1}); $C_{pigmento}$ é a concentração do pigmento extraído (g L^{-1}); V é o volume do solvente em litros; m é a massa em gramas de microalga; P é a produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) e t é o tempo em horas.

Ainda foram feitas análises microscópicas em zoom óptico de 100x (OLYMPUS, CX21, JAPÃO) da biomassa de *A. platensis* antes e após pressurização a 100 bar.

4.3 Purificação do extrato de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*

A purificação das ficobiliproteínas foi realizada segundo o método de Silveira *et al.* (2008) por cromatografia de troca-iônica em uma coluna, utilizando a resina DEAE sephorase. A coluna foi previamente equilibrada com tampão tris-HCl pH 7,5 durante 20 min, em seguida foi injetada a amostra de extrato com vazão de 4 mL min^{-1} a fim de eliminar possíveis contaminantes. Após a injeção do extrato foi feita a etapa de lavagem com tampão tris-HCl pH 7,5 até saírem todas as impurezas e as biomoléculas que não foram adsorvidas à matriz, logo em seguida foi feita a eluição usando uma solução de NaCl em uma concentração gradiente de 0,2 M a 0,5 M. Então, a amostra purificada foi caracterizada.

4.4 Caracterização dos extratos obtidos de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*

Para identificação e caracterização das ficobiliproteínas extraídas foram realizadas análises de atividade antioxidante, eletroforese e uma espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

4.4.1 Eletroforese (SDS-PAGE) das ficobiliproteínas extraídas da microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*

O extrato bruto e purificado de ficobiliproteínas foram caracterizados em termo de massa molecular segundo a metodologia de Schagger e Jagow (1987). As amostras de extrato bruto e purificado contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol foram submetidos a 100 °C em banho maria durante 10 minutos. Alíquotas contendo 15 μ L de solução foram distribuídas nos poços do gel de empilhamento composto por soluções de acrilamida + bis-acrilamida, solução de tampão do gel com trisma base e SDS e água bidestilada. Foi aplicada uma corrente de 10 mA inicialmente, seguida de um aumento para 20 mA, quando as amostras atingiram o gel espaçador composto pelas mesmas soluções do gel de empilhamento acrescidas de persulfato de amônio e Temed (Tetrametiletildenodiamina). Por fim as alíquotas atingiram o gel separador contendo solução de acrilamida + bisacrilamida, solução do gel com trisma base e SDS, glicerol, água bidestilada, persulfato de amônio e Temed.

Em seguida, os géis foram expostos à solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10% e água Milli-Q 40%) por 60 minutos. Então, foram lavados com água Milli-Q e transferidos para a solução corante Coomassie Brilhante Blue G- 250 (50 mg de coomassie brilliant blue G-250 dissolvidos em 200 mL de ácido acético 10%), agitados por 30 minutos, seguido de filtração por aproximadamente 16 h. Logo após, o gel foi transferido para solução descorante composta por ácido acético 1% (v/v), realizando lavagens a cada 30 minutos ou até se observar a formação das bandas de proteínas. Os marcadores de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences) utilizados compreendiam entre 11 – 245 kDa (SCHAGGER; JAGOW, 1987).

4.4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Todos os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos usando o equipamento FTIR Cary 630 (AGILENT TECHNOLOGIES, AUSTRÁLIA) e os espectros foram adquiridos na região 4000-400 cm^{-1} , com um total de 32 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas para o extrato purificado de ficobiliproteínas e usou-se a ficocianina como padrão obtida da Sigma Aldrich.

4.4.3 Atividade Antioxidante

Foram avaliados dois métodos de determinação de atividade antioxidante, *in vitro*, sendo eles o sequestro do radical de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e a quelação do íon ferroso.

4.4.3.1 Sequestro do radical de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante dos extratos de ficobiliproteínas obtidos foi medida pelo branqueamento da solução de DPPH em metanol. Os ensaios foram realizados adicionando 3 mL da amostra do extrato em diferentes concentrações variando de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com 1 mL da solução da solução de DPPH a 0,01 mM em seguida, foram medidas as absorvâncias a 517 nm, após 30 min de reação na ausência de luz. A redução pode ser observada por mudança na coloração de púrpura para amarelo e a capacidade de redução desse radical pode ser avaliada pela diminuição na absorvância medida. O percentual da atividade antioxidante é calculado utilizando a Equação 9, segundo Renugadevi *et al.* (2018).

$$\text{Atividade Antio.} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100 \quad (9)$$

Em que, A_0 é a absorvância de DPPH sem amostra dos pigmentos, A é a absorvância contendo a amostra de pigmento com DPPH. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão.

4.4.3.2 Ensaio de quelação do íon ferroso

O ensaio de quelação do íon ferroso foi analisado de acordo com método descrito por Souza (2015) e Chew *et al.* (2008). Misturou-se 1,0 mL de sulfato ferroso (FeSO_4) 0,1 mM, 1,0 mL da amostra contendo as ficobiliproteínas em diferentes concentrações variando de 5 μg

mL⁻¹ a 200 µg mL⁻¹ com 1,0 mL de ferrozina (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4 triazina-p-p'-disulfônico) 0,25 mM. Os tubos foram agitados por 1 min e após 10 min de tempo reacional foram realizadas as leituras a 562 nm. O branco foi realizado substituindo-se a amostra pelo solvente utilizado para todas as amostras. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi utilizado como material de referência. Os resultados foram expressos como habilidade de quelação do íon ferroso (%) e calculado de acordo com a Equação 10.

$$\text{Habilidade de quelação do íon ferroso (\%)} = \left[\frac{(A_0 - A)}{A_0} \right] \times 100 \quad (10)$$

Em que, A₀ é a absorbância de FeSO₄ com a Ferrosina sem amostra dos pigmentos, A é a absorbância contendo a amostra de pigmento com FeSO₄ e ferrozina.

4.5 Análise Estatística

Foi realizado a análise estatística para os perfis de concentração de extração das ficobiliproteínas extraídas em cada tempo estudado e nas diferentes pressões e também para pureza das ficobiliproteínas após 360 min nas diferentes condições de pressão. Os experimentos foram comparados pelo teste de Tukey utilizando o nível de confiança de 95%.

4.6 Cultura de células, ensaio de citotoxicidade *in vitro* e determinação do IC₅₀

As linhagens tumorais utilizadas foram: HCT-116 (côlon - humano), SF295 (glioblastoma - humano), PC3 (câncer de próstata) e HL-60 (Leucêmica). Todas foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) tendo estas sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram testadas por meio de diluição seriada que iniciou com a maior concentração de 150 e a mínima de 1,17 µg mL⁻¹.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening do National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo

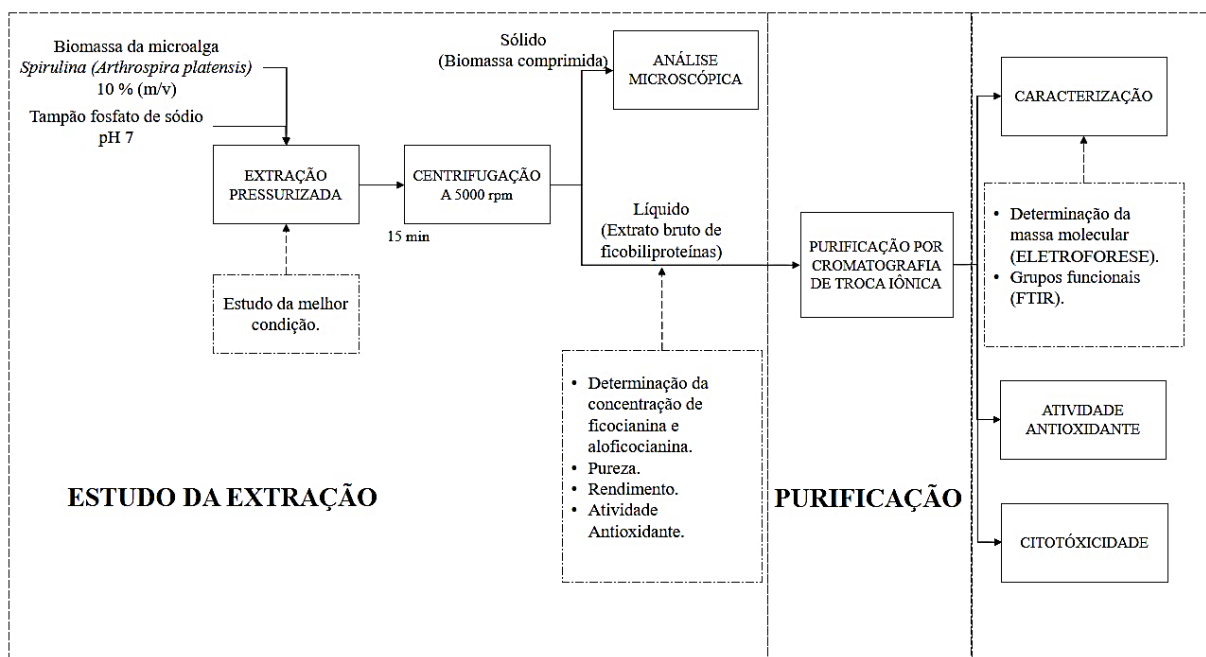
citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para as linhagens PC3 e SF295, $0,7 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para a linhagem HCT-116 e $0,3 \times 10^6$ cel mL⁻¹ para a linhagem HL60. As células aderidas foram tratadas com o composto teste no dia seguinte após o plaqueamento (HL60 células suspensa foi plaqueada e tratada no mesmo dia) e posteriormente as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 100 mL da solução de MTT, e as placas foram incubadas por 3 h em estufa. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 6.1*.

Para melhor compreensão dos estudos realizados e da sequência experimental, construiu-se um fluxograma do processo de obtenção das ficobiliproteínas, o qual está ilustrado na Figura 7, desde a extração até as análises de citotoxicidade.

Figura 7 - Fluxograma do processo de obtenção de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis*.



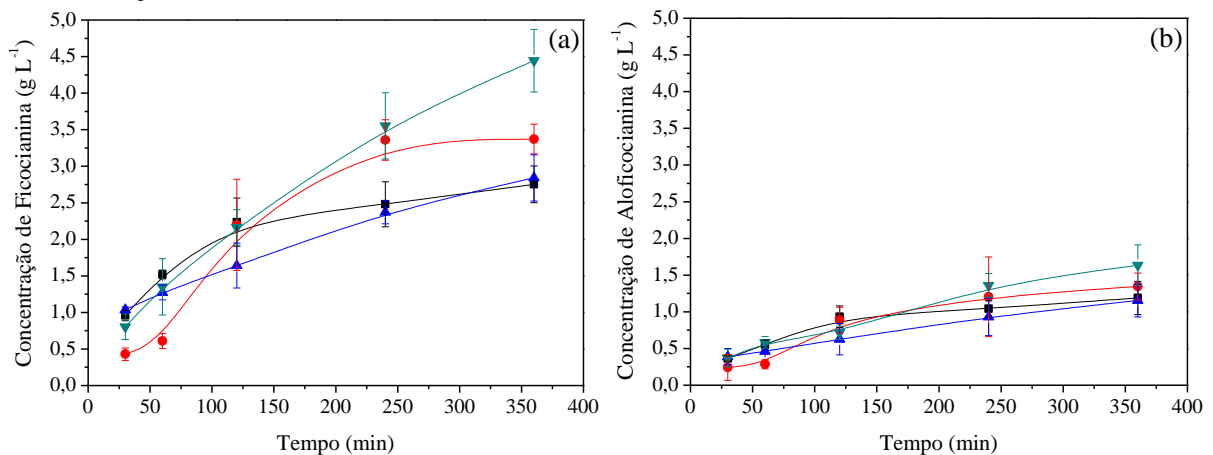
Fonte: A autora 2020.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração das ficobiliproteínas de *Arthrospira platensis*

A Figura 8 mostra o comportamento da concentração das ficobiliproteínas extraídas durante 360 minutos de pressurização. Foi possível extrair dois tipos de ficobiliproteínas, a ficocianina, representado na Figura 8a e a aloficocianina, representado na Figura 8b, nesse estudo não foi possível extrair ficoeritrina. Em alguns métodos de extração é possível obter ficoeritrina em baixas quantidades (ou até mesmo não extrair devido ao baixo índice na composição dessa ficobiliproteína com apenas 1,2%). Outro fator importante é que *A. platensis* é uma espécie de microalga verde azulada e de acordo com Sun *et al.* (2009), a ficoeritrina é uma ficobiliproteína bem característica de espécies de algas vermelhas.

Figura 8 – Perfil de concentração de ficobiliproteínas obtidas por extração pressurizada da microalga *Arthrospira platensis* sob diferentes pressões. a) Concentração de ficocianina e b) Concentração de aloficocianina. (■) 15 bar; (●) 25 bar; (▲) 50 bar; (▼) 100 bar.



Fonte: A autora 2020.

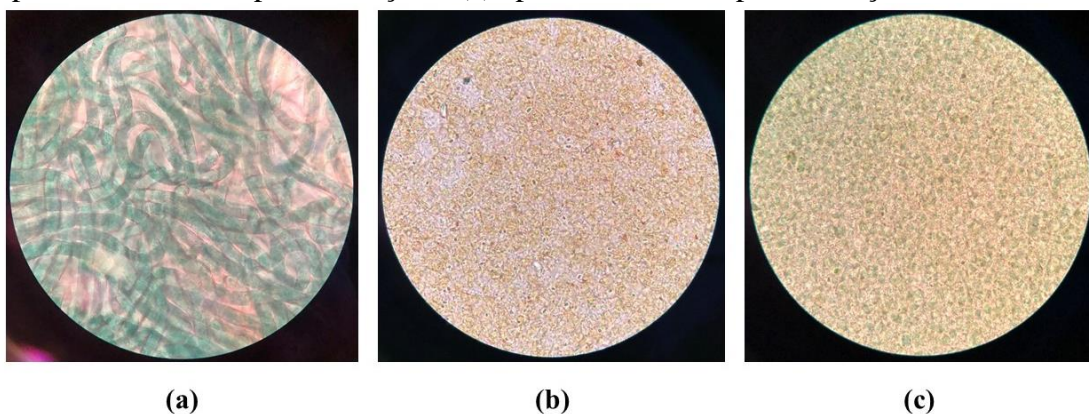
Pelos perfis apresentados na Figura 8 pode-se perceber que a pressão favoreceu a extração de ficobiliproteínas podendo estar relacionado ao rompimento celular. A ficocianina foi extraída em maior quantidade do que a aloficocianina, obtendo concentrações de 4,4 g L⁻¹ e 1,6 g L⁻¹ para a ficocianina e a aloficocianina, respectivamente, na pressão de 100 bar com 360 min de extração, sendo o extrato mais concentrado em ficocianina em todas as pressões aplicadas. A diferença na extração das duas ficobiliproteínas está relacionada a maior disponibilidade de ficocianina nessa espécie de microalga. Percebe-se com as análises estatísticas, que não há uma diferença significativa na concentração obtida de aloficocianina nas pressões estudadas. Além disso, é importante ressaltar que a ficocianina é o pigmento de

mais fácil acesso de acordo com a morfologia dos ficobilissomas (Figura 3), enquanto a aloficocianina está localizada mais internamente, sendo necessárias condições mais severas para a extração desta.

Analisando o perfil de extração da ficocianina, nota-se que durante os primeiros 30 min de extração não há diferença estatística nas concentrações deste pigmento entre as pressões, com exceção de 25 bar. Essa diferença pode ser observada entre as pressões de 100 bar e 15 bar em todos os tempos avaliados, 100 bar e 50 bar em 240 min e também entre 50 bar e 25 bar, já em 360 min obteve-se diferença significativa na concentração extraída a 100 bar em relação as demais pressões. Os dados estatísticos podem ser observados nas tabelas reportadas no anexo.

O rompimento da parede celular pode ser observado pela mudança da estrutura da *A. platensis* (Figura 9). É perceptível a diferença entre as imagens quando se observa a estrutura celular da microalga na Figura 9a e após 10 min de pressurização (Figura 9b). Na Figura 9c, após 360 minutos, não se observa estruturas semelhantes à estrutura celular da *A. platensis*. Porém elevadas pressões podem causar efeitos adversos em algumas proteínas, por isso, neste estudo também foi avaliado a biofuncionalidade destes extraídos e os resultados são apresentados no decorrer deste trabalho. De acordo com os estudos de Brands *et al.* (1970) foi possível perceber a degradação de proteínas demonstrada para ribonuclease A, uimotripsinogênio (HAWLEY, 1971) e metimoglobina (ZIPP; KAUZMANN, 1973).

Figura 9 – Microscópio da biomassa de *Arthrospira platensis* antes e após extração pressurizada a 100 bar apresentadas com um zoom óptico de 100x. (a) estrutura celular da *A. platensis*, (b) após 10 minutos de pressurização e (c) após 360 minutos pressurização.

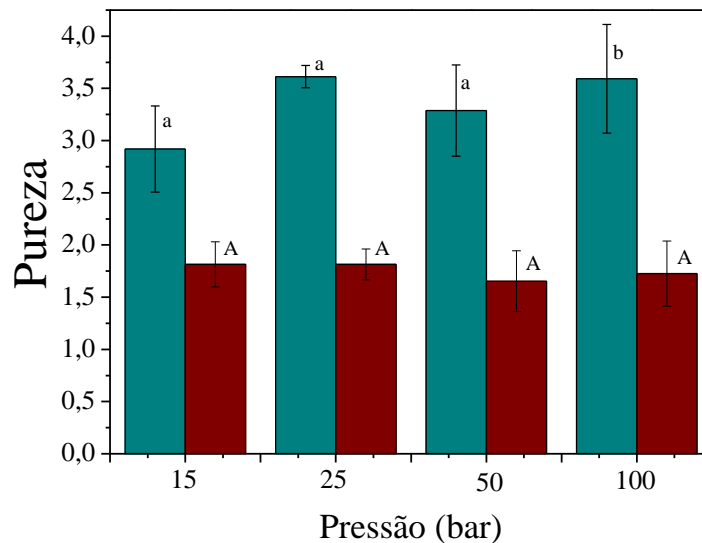


Fonte: A autora 2020.

Utilizando a pressurização para extração das ficobiliproteínas foram obtidos extratos com altos valores de índice de pureza (Figura 10), obtendo um índice de pureza de $3,59 \pm 0,5$ em 100 bar após 360 min para a ficocianina, o que indica um valor de grau reagente, segundo Hsie-lo *et al.* (2019), sendo uma aplicação considerada nobre, e $1,72 \pm 0,3$ para

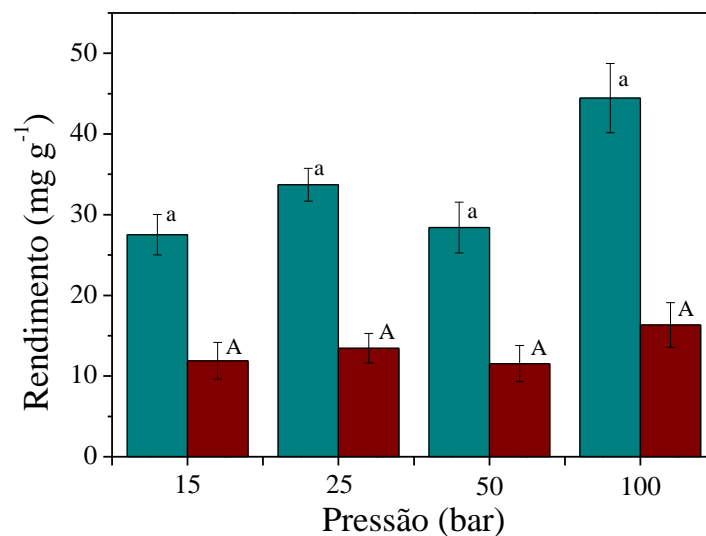
aloficocianina. Na extração conduzida a 100 bar, após 360 min obteve-se os maiores rendimentos, $44,44 \pm 4,2 \text{ mg g}^{-1}$ e $16,33 \pm 2,7 \text{ mg g}^{-1}$ de ficocianina e alofocianina (Figura 11), respectivamente.

Figura 10 – Índice de pureza de ficobiliproteínas extraídas de *Arthrospira platensis* por extração pressurizada após 360 min. Letras iguais representam que não há diferença significativa com base na análise de Tukey, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$). Letras minúsculas são da análise para ficocianina e letras maiúsculas para a alofococianina. (■) Ficocianina; (■) Alofococianina.



Fonte: A autora 2020.

Figura 11 – Rendimento de extração de ficobiliproteínas extraídas de *Arthrospira platensis* por extração pressurizada após 360 min. Letras iguais representam que não há diferença significativa e diferentes que há diferença significativa com base na análise de Tukey, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$). Letras minúsculas são da análise para ficocianina e letras maiúsculas para a alofococianina. (■) Ficocianina; (■) Alofococianina.



Fonte: A autora 2020.

Os dados estatísticos mostram que não houve diferença significativa para o grau de pureza da ficocianina nas pressões avaliadas, obtendo um grau de pureza elevado, ao contrário do rendimento, que apresentou uma diferença significativa entre as pressões de 25 bar e 50 bar com os valores dos rendimentos obtidos quando a pressão aplicada é de 100 bar. No entanto, para aloficocianina não há diferença estatística entre as purezas e o rendimento de extração, na faixa de pressão estudadas.

Estudos anteriores avaliaram a extração dessas biomoléculas utilizando métodos diferentes, como é o caso de Pan-utai e Iamtham (2019), que estudaram a extração de ficobiliproteínas com método ultrassônico utilizando o mesmo solvente estudado nesse trabalho. Estes autores reportaram os rendimentos de 84,34 mg g⁻¹ para ficocianina e 17,75 mg g⁻¹ para aloficocianina. Embora os rendimentos reportados por Pan-utai & Iamtham (2019) tenham sido superiores ao presente estudo que foram de 44,44 mg g⁻¹ e 16,33 mg g⁻¹, respectivamente, as ficobiliproteínas apresentaram baixo índice de pureza obtendo 0,51 e 0,19 para ficocianina e aloficocianina, respectivamente. Enquanto que com a extração pressurizada, os valores de pureza alcançados foram 3,59 pra ficocianina e de 1,72 para aloficocianina.

O que pode estar causando baixos valores no índice pureza do estudo de Pan-utai e Iamtham (2019), está relacionado ao método ultrassônico pois é caracterizado pelo colapso violento de bolhas, que provoca aumento de temperatura, gerando perturbações na parede celular dos tecidos biológicos. Esse método pode ocasionar cavitação das bolhas nas soluções que produzem temperaturas mais severas de curta duração, podendo ocasionar o efeito de desnaturação das ficobiliproteínas, além disso podem ser extraídas outras moléculas que não são de interesse.

Já a extração pressurizada é um método com menor abrasividade, sem afetar com tanta intensidade, por exemplo, a temperatura durante o processo de extração das ficobiliproteínas, diferindo dos métodos que utilizam ultrassom e micro-ondas. Dessa forma, diminui a extração de componentes indesejados e o efeito de desnaturação. O método também se mostrou altamente seletivo na faixa de pressão estudada, quando a finalidade é obter um extrato rico em ficocianina, o que permitiu obter altos índices de pureza desta biomolécula, visto que a quantidade de aloficocianina extraída não é afetada com o aumento de pressão. Vale salientar que o método também mostrou valores de pureza de aloficocianina maiores do que os reportados por Tavanandi *et al.* (2018) e Shi-Gan *et al.* (2011).

Os maiores custos na produção industrial de ficocianina, por exemplo, estão associados aos processos de purificação (SILVA, 2008; CAETANO, 2018), tendo em vista que muitos dos métodos de extração comumente utilizados não possuem extratos com alto teor de

pureza, fazendo-se necessário, portanto, várias etapas de purificação, o que pode ser evitado no caso do extrato de ficobiliproteínas obtido pelo método de extração pressurizada.

Assim, pode-se dizer que o efeito da pressão é favorável à extração das ficobiliproteínas e que as condições aplicadas neste estudo favoreceram a extração de ficocianina. A melhor condição foi 100 bar por 360 min, na qual se obteve o maior rendimento. Mesmo a aloficocianina não sendo favorecida com as pressões estudadas, obteve valores de pureza e rendimento considerados bons, podendo-se perceber a diferença nos resultados obtidos pelo método de pressurização quando comparado aos já mencionados na literatura (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação da extração de ficobiliproteínas de *Arthrospira platensis* de trabalhos mais recentes, por diferentes métodos e diferentes solventes, com o apresentado neste estudo.

FICOBILIPROTEÍNA EXTRAÍDA	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	SOLVENTE	RESULTADOS OBTIDOS	REFERÊNCIA
Ficocianina e aloficocianina	Extração pressurizada	Tampão fosfato de sódio	$C_F = 4,44 \text{ g L}^{-1}$ $C_{AF} = 1,63 \text{ g L}^{-1}$; $P_F = 3,59$ $P_{AF} = 1,72$; $\gamma_F = 44,44 \text{ mg g}^{-1}$ $\gamma_{AF} = 16,33 \text{ mg g}^{-1}$	Presente estudo
Ficocianina	Extração assistida por micro-ondas	Solvente eutético	$C_F = 0,208 \text{ g L}^{-1}$; $P_F = 1$	Rathnasamy <i>et al.</i> (2019)
Ficocianina e aloficocianina	Agitação aquecimento	Tampão fosfato de sódio	$C_F = 1,15 \text{ g L}^{-1}$ $C_{AF} = 0,86 \text{ g L}^{-1}$	Rodrigues <i>et al.</i> (2019)
Ficocianina e aloficocianina	Extração assistida por ultrassom	Líquido iônico (2-HEAA + 2-HEAF)	$C_F = 1,65 \text{ g L}^{-1}$ $C_{AF} = 1,70 \text{ g L}^{-1}$; $P_F = 0,53$ $P_{AF} = 0,41$; $\gamma_F = 10,87 \text{ mg g}^{-1}$ $\gamma_{AF} = 11,20 \text{ mg g}^{-1}$	Rodrigues <i>et al.</i> (2019)
Ficocianina	Extração assistida por ultrassom	Tampão fosfato de sódio	$\gamma_F = 3,00 \text{ mg g}^{-1}$	Ílter <i>et al.</i> (2018)
Aloficocianina	Congelamento e descongelamento	Tampão fosfato	$\gamma_{AF} = 34,55 \text{ mg g}^{-1}$ $P_{AF} = 0,35$	Tavanandi <i>et al.</i> (2018)

Nota: C_F – concentração de ficocianina; C_{AF} – concentração de aloficocianina; P_F – pureza de ficocianina; P_{AF} – pureza de aloficocianina; γ_F – rendimento de extração ficocianina; γ_{AF} – rendimento de extração aloficocianina; HEAA – acetato de N-metil-2-hidroxietilamônio; 2-HEAF – formiato de N-metil-2-hidroxietilamônio.

FICOBILIPROTEÍNA EXTRAÍDA	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	SOLVENTE	RESULTADOS OBTIDOS	REFERÊNCIA
Ficocianina	Agitação + Pulso Elétrico	Biomassa tratada com pulso elétrico + água destilada	$\gamma_F = 151,94 \text{ mg g}^{-1}$ $P_F = 0,51$	Martínez <i>et al.</i> (2017)
Ficocianina	Agitação + aquecimento	Tampão fosfato de sódio	$C_F = 2,2 \text{ g L}^{-1}$	Su <i>et al.</i> (2014)
Ficocianina	Congelamento e descongelamento	Tampão acetato	$C_F = 77,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ $P_F = 0,75$	Kumar <i>et al.</i> (2014)
Ficocianina e aloficocianina	Congelamento e descongelamento	Tampão fosfato de sódio	$P_F = 0,97$ $P_{AF} = 0,37$	Shi-Gan <i>et al.</i> (2011)
Ficocianina	Alta pressão (200 kgf cm^{-2} a 400 kgf cm^{-2}) + Sistema aquoso bifásico (PEG/ tampão fosfato de potássio)	Pré-tratamento com água para rompimento celular com homogeneização e pressão + sistema aquoso bifásico composto por (PEG/ tampão fosfato de sódio)	$C_F = 0,92 \text{ mg ml}^{-1}$ $P_F = 1,18$ $\gamma_F = 66\%$	Patil <i>et al.</i> (2006)

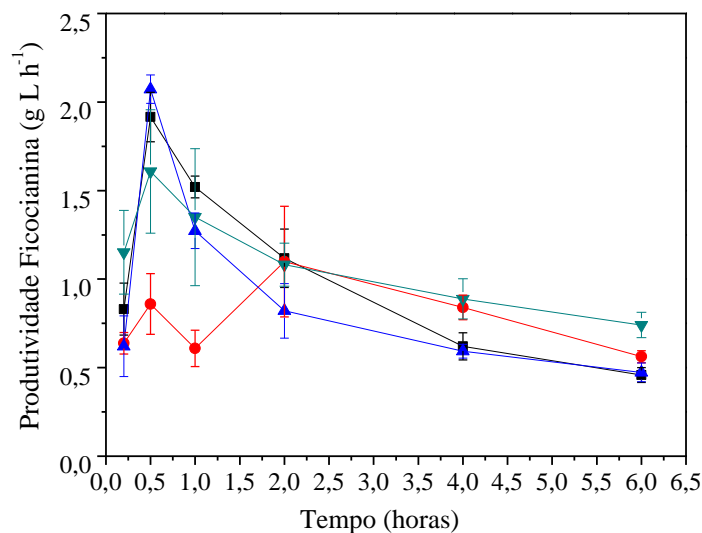
Fonte: A autora 2020.

Nota: C_F – concentração de ficocianina; C_{AF} – concentração de aloficocianina; P_F – pureza de ficocianina; P_{AF} – pureza de aloficocianina; γ_F – rendimento de extração ficocianina; γ_{AF} – rendimento de extração aloficocianina; HEAA – acetato de N-metil-2-hidroxietilamônio; 2-HEAF – formiato de N-metil-2-hidroxietilamônio.

Embora muitos dos métodos aqui mencionados tragam altos valores de rendimento de extração, a maioria deles mostra que o extrato bruto de ficobiliproteínas é obtido com baixo índice de pureza. Por isso, muitos utilizam etapas de pré-purificação com sulfato de amônio e em seguida etapas de purificação para elevar a pureza das biomoléculas.

A produtividade de extração de ficocianina foi calculada para o extrato, pois foi a ficobiliproteína mais extraída (Figura 12).

Figura 12 – Produtividade de extração da ficocianina de *Arthrospira platensis* por extração pressurizada sob diferentes condições de pressão. (■) 15 bar; (●) 25 bar; (▲) 50 bar; e (▼) 100 bar.



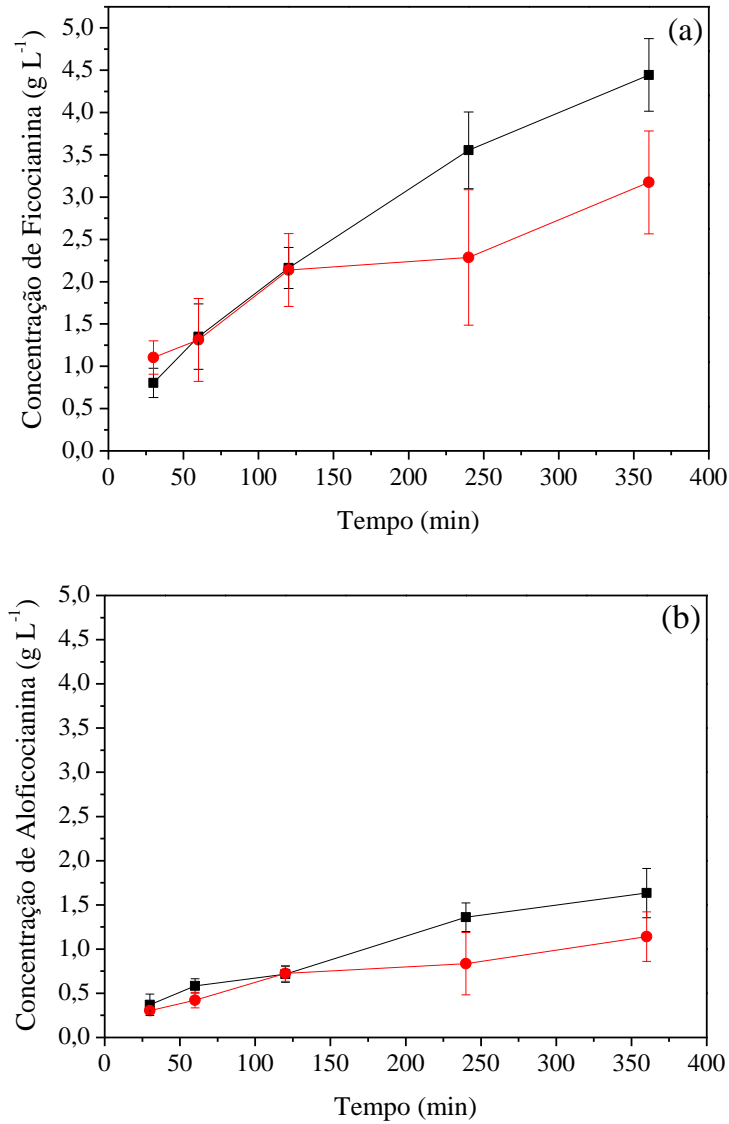
Fonte: A autora 2020.

O pico de produtividade de ficocianina pode ser observado no tempo de 30 min de extração para todas as condições de pressão, com exceção de 25 bar, na qual a maior produtividade foi observada em 120 min. A produtividade foi diminuindo ao longo do tempo de extração, visto que, a concentração de extração da mesma não aumentou proporcionalmente.

Também foi feito um teste para avaliar o efeito da agitação na extração dessas biomoléculas na melhor pressão (100 bar), e os resultados estão apresentados na Figura 13.

Analisando a Figura 13, ficou evidente que o efeito de agitação não favoreceu o processo de extração das biomoléculas de interesse, sendo um resultado não esperado pois a agitação pode permitir um maior contato entre o solvente e a biomassa de *A. platensis* promovendo uma maior transferência de massa. O efeito contrário ao esperado pode estar relacionado ao sistema de agitação utilizado que se deu através de “anel perfurado”, como pode ser observado na Figura 6. Devido a presença de biomassa, o curso do anel pode ser comprometido e reduzir a eficiência da mistura.

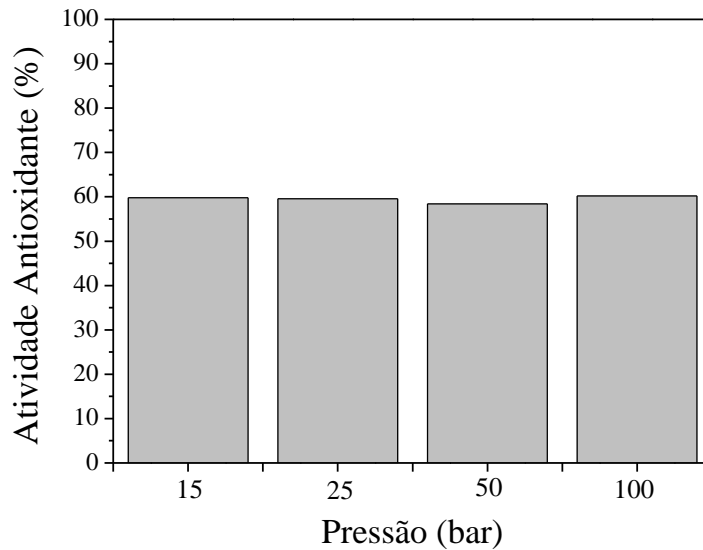
Figura 13 – Comparação entre os perfis de concentrações das ficobiliproteínas, ficocianina (a) e aloficocianina (b), obtidas por pressurização a 100 bar de modo estático (n = 3) e com agitação (n = 2), números de ensaios. (■) estático; (●) com agitação.



Fonte: A autora 2020.

Para verificar que o efeito de pressão não desnaturou as ficobiliproteínas, não modificando a funcionalidade, foram realizados testes de atividade antioxidante usando os extratos obtidos a diferentes pressões de extração. Análise da atividade antioxidante para o extrato de ficobiliproteínas foi realizada através da redução dos radicais de DPPH (Figura 14).

Figura 14 – Atividade antioxidante do extrato bruto de ficobiliproteínas obtido após 240 min de pressurização a diferentes pressões pelo método de DPPH, usando amostras com concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: A autora 2020.

Os resultados das atividades antioxidantes reportados na Figura 14 demonstram que a pressão não ocasionou uma perda de atividade, mantendo o percentual de sequestro dos radicais de DPPH praticamente constante, ou seja, não afetou a estrutura conformacional das ficobiliproteínas e assim sua biofuncionalidade, também a atividade antioxidante reportada apresentou percentual semelhante ao padrão de ácido ascórbico (98%), mostrando que o método de extração pressurizada é promissor para as ficobiliproteínas.

5.2 Purificação do extrato de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira platensis)*

Após a etapa de extração foi feita a purificação das ficobiliproteínas pelo método de cromatografia de troca iônica usando resina DEAE, a fim de eliminar possíveis contaminantes que podem ser extraídos juntamente com os pigmentos. O processo de purificação teve rendimento de 38 % para aloficocianina e de 35 % para ficocianina (Tabela 4). Obteve-se um índice de pureza de 51% a mais em apenas com uma etapa de purificação para a ficocianina, biomolécula extraída em maior quantidade e 56% para aloficocianina. Kumar *et al.* (2014) estudaram a purificação da ficocianina obtida de *Spirulina (A. platensis)*, realizando precipitação com sulfato de amônio ((NH_4) $_2$ SO_4) como uma etapa de pré-purificação das ficobiliproteínas; em seguida, realizaram diálise e por fim foi feita a cromatografia de troca iônica em coluna DEAE. O extrato purificado obtido no final deste processo tinha uma pureza de 4,58, com rendimento de purificação de 14 %. Percebe-se que para obter uma pureza

semelhante, Kumar *et al.* (2014) necessitaram de várias etapas. Com a extração pressurizada, essas etapas não foram necessárias. Vale ressaltar que cada uma delas afeta o processo de recuperação global, assim como a economia, aumentando os custos de produção, o tempo e em geral, dificultam o escalonamento.

Tabela 4 – Pureza e rendimento de recuperação do processo de purificação do extrato de ficobiliproteínas de *Arthrospira platensis* obtido por extração pressurizada a 100 bar por 360 min.

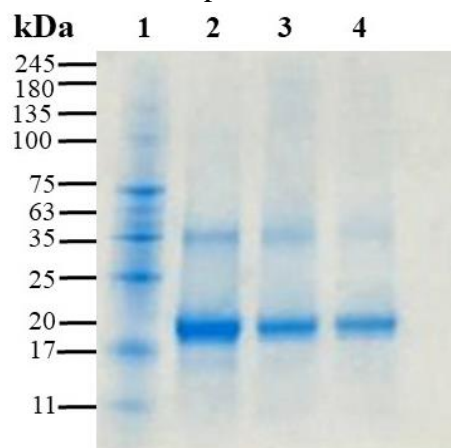
Etapa	Volume (mL)	Ficobiliproteína	C (g.L ⁻¹)	Pureza (A _{máx} /A ₂₈₀)	Rendimento (%)
Extrato bruto	15	F	2,93	3,14	100
		AF	0,93	1,40	
Amostra Purificada	3	F	5,18	4,76	35
		AF	1,77	2,19	38

Fonte: A autora 2020.

Nota: FC – ficocianina; AF – Aloficocianina; C – Concentração.

Em seguida, foi realizado uma eletroforese SDS-PAGE dos extratos brutos e purificados para determinar a massa molecular, verificar os processos de purificação e confirmar se o pigmento mais extraído foi de fato a ficocianina (Figura 15).

Figura 15 – Perfil eletroforético das ficobiliproteínas extraídas de *Arthrospira platensis* a 100 bar por 360 min. 1. Marcador de peso molecular; 2. Padrão de ficocianina (Sigma Aldrich); 3. Extrato bruto de ficobiliproteínas; 4. Extrato purificado de Ficobiliproteínas.



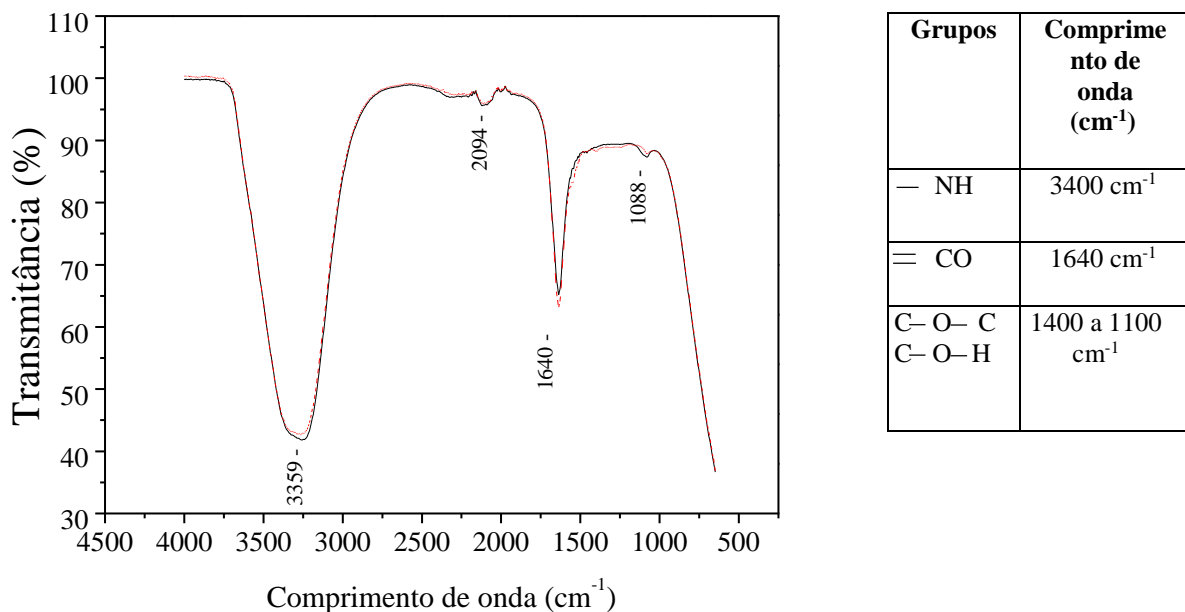
Fonte: A autora 2020.

Na Figura 15 é observado uma banda bem intensa próximo a 20 KDa nas colunas 3 e 4, revelando a presença de ficocianina tanto no extrato bruto como na amostra purificada, segundo o padrão de ficocianina comercial, coluna 2. Sonani *et al.* (2014) relataram pesos moleculares, para as subunidades α e β , próximos de 17,5 e 19 KDa para a ficocianina e de

15,5 a 17 KDa para aloficocianina. As bandas referentes a aloficocianina podem estar sobrepostas as observadas pois ambas podem ter unidade em 17 KDa.

Para efeitos de caracterização foi realizada a espectroscopia de infravermelho. Os espectros apresentaram bandas semelhantes para a ficocianina padrão e para o extrato purificado de ficobiliproteínas (Figura 16). Estas bandas correspondem à amida I (1640 cm^{-1}) e bandas proteicas características da amida A (aproximadamente 3400 cm^{-1}). A amida A é a banda afetada pelas vibrações -NH em uma molécula de proteína, enquanto a amida I é contribuída pelas vibrações de =CO (RODRIGUES *et al.*, 2019; COATS, 2000; BHAYANI *et al.*, 2016). A amida I, banda em 1640 cm^{-1} , indica a α -hélice como o elemento principal de sua estrutura secundária. As bandas 1400 a 1000 cm^{-1} estão associados aos alongamentos simétricos e assimétricos de vibrações, C-O-C e C-O-H (CHENTIR *et al.*, 2018). A semelhança entre os espectros mostra que a ficocianina está presente no extrato purificado das ficobiliproteínas, mas não descarta a presença de aloficocianina já que ambas possuem contribuição de grupamentos semelhantes.

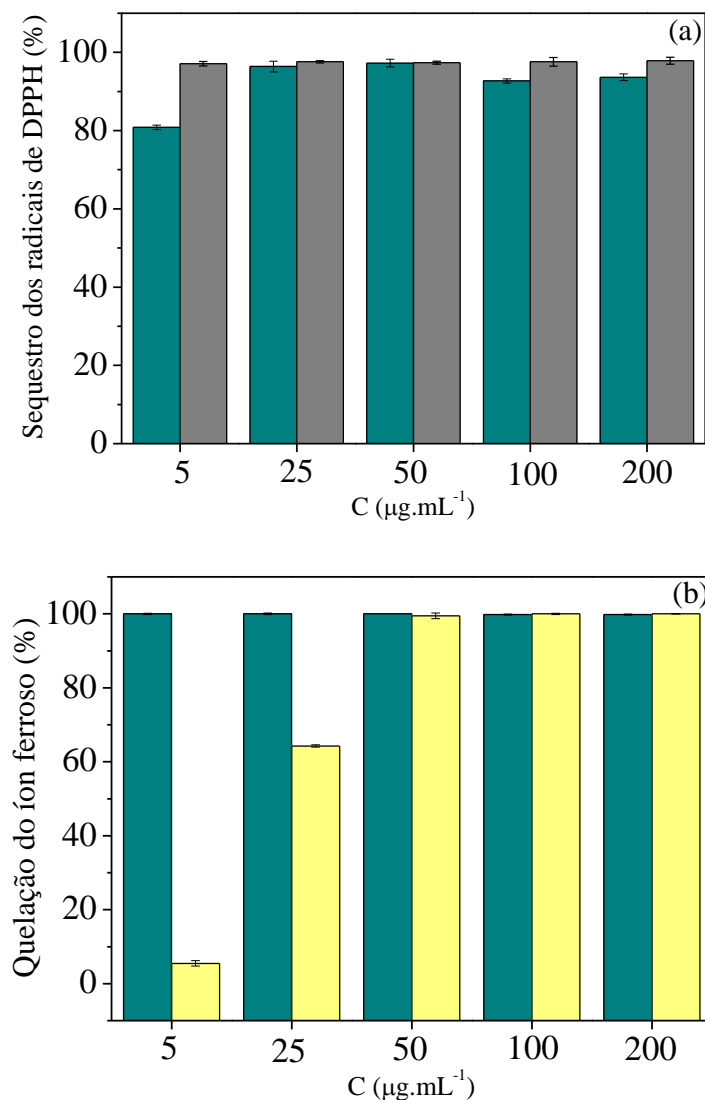
Figura 16 – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do extrato purificado por cromatografia de troca iônica das ficobiliproteínas extraídas de *Arthrospira platensis* a 100 bar por 360 min de pressurização e grupos moleculares observados. (-) Extrato purificado de ficobiliproteínas; (--) Padrão de ficocianina (Sigma Aldrich).



Fonte: A autora 2020.

Foram realizados testes de atividade antioxidante no extrato purificado de ficobiliproteínas utilizando os métodos de sequestro dos radicais de DPPH: ácido ascórbico como padrão antioxidante; quelação do íon ferroso, sendo utilizado o EDTA como padrão quelante, em diferentes concentrações do extrato, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, vide Figura 17.

Figura 17 – Atividade antioxidante do extrato purificado de ficobiliproteínas extraída da microalga *Arthrospira platensis*, por diferentes técnicas de medição e em diferentes concentrações. (a) Sequestro dos radicais de DPPH; (b) Quelação do íon ferroso. (■) Extrato purificado, (■) Ácido Ascórbico e (■) EDTA.



Fonte: A autora 2020.

O método de sequestro dos radicais de DPPH baseia-se na transferência de elétrons na qual, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da

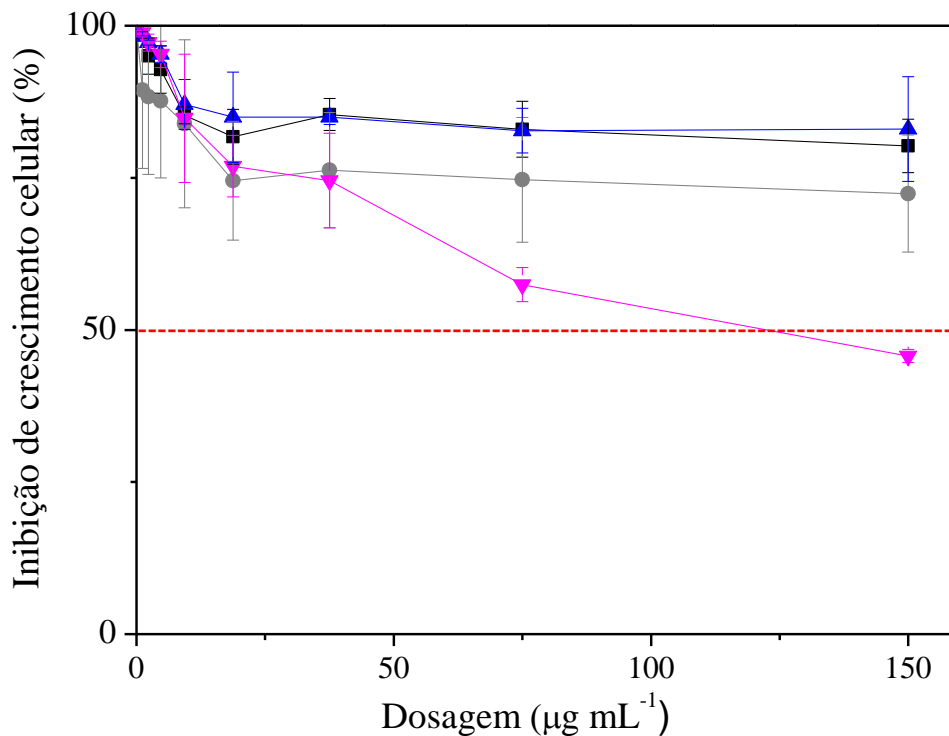
absorbância (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Para o extrato purificado de ficobiliproteínas, a eliminação dos radicais de DPPH se mostrou promissora quando comparado ao padrão de atividade antioxidante, ácido ascórbico, nas concentrações estudadas, atingindo valores de até 96% de atividade. Outros estudos reportaram atividade de 80%, como é o caso do estudo de Wu *et al.* (2016) com ficocianina extraída da mesma espécie de microalga estudada nesse trabalho e Renugadevi *et al.* (2018) com ficocianina extraída da cianobactéria *Geitlerinema* sp. TRV₅₇.

A quelação do íon ferroso é baseada na utilização do reagente ferrozina que, na presença do íon Fe²⁺, forma um complexo de cor rosa, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 562 nm. O potencial antioxidante é monitorado pela diminuição da absorbância, visível pela descoloração da reação. O método determina a quantidade remanescente de íons ferro não quelados na mistura de reação (MIN *et al.*, 2011). Assim, quanto menor a absorbância, ou menor intensidade da coloração rosa, maior será o potencial antioxidante e, portanto, maior a capacidade de quelar os íons ferro. O extrato de ficobiliproteínas purificado atingiu 100 % de atividade antioxidante mostrando-se um excelente quelante dos íons ferro mesmo em concentrações baixas (5 e 25 µg mL⁻¹), quando comparado ao padrão quelante utilizado. No estudo de Chentir *et al.* (2018), um poder quelante de 78% para ficocianina do extrato bruto com teor de pureza 1,62, extraída da mesma espécie, foi reportado, mas com menor condição de pureza utilizada nesse trabalho. Logo, pode-se dizer que o método de extração é eficiente na extração de ficobiliproteínas não alterando sua característica antioxidante.

5.3 Efeitos citotóxicos do extrato de ficobiliproteínas obtidas por extração pressurizada

O extrato de ficobiliproteínas purificado foi avaliado quanto a inibição de crescimento celular das linhagens de câncer de glioblastoma (SF295), câncer de colorretal (HCT116), próstata (PC3) e leucêmico (HL60) e os resultados estão apresentados na Figura 18, e a concentração média inibitória (IC 50%) das amostras está apresentada na Tabela 5.

Figura 18 - Percentual de inibição do crescimento de células cancerígenas utilizando o extrato de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis* obtidos por extração pressurizada. (●) Glioblastoma-SF295; (■) Clorretal-HCT116; (▲) Próstata-PC3 e (▼) Leucêmico-HL60.



Fonte: A autora 2020.

Tabela 5 - Valores da IC₅₀ em µg/mL das ficobiliproteínas extraídas de *Arthrospira platensis* avaliadas pelo método MTT nas linhagens glioblastoma (SF295), câncer de colorretal (HCT116), próstata (PC3) e leucêmico (HL60) com incubação de 72 horas. Maior concentração testada: 150 µg/mL.

Linhagem Celular testadas	IC ₅₀ (Intervalo de confiança)
HCT 116	> 150
SF295	> 150
PC3	> 150
HL60	112,6 (92,29-137,40)

Fonte: A autora 2020.

O extrato de ficobiliproteínas testado apresentou as menores IC₅₀ de 112,6 µg/mL na linhagem leucêmica HL60 após 72 horas de incubação. Porém, para as linhagens de Glioblastoma, câncer de colorretal e próstata a IC₅₀ foi superior a maior concentração testada de 150 µg/mL (Tabela 5 e Figura 18). Estudos anteriores relataram, principalmente para

ficocianina, atividade anticancerígena. Deniz *et al.* (2016) mostrou que a ficocianina apresentou atividade para células de câncer de pulmão dependente da dosagem dessa biomolécula, assim como visto nesse trabalho para as células de HL60. Também em outros tipos de câncer, melanoma A375 (Hao *et al.*, 2018), ovário SKOV3 (Pan *et al.*, 2015), adenocarcinoma A549 (Pattarayan *et al.*, 2017).

Outros estudos relataram atividade também da ficocianina em linhagens leucêmicas como é o caso de Liu *et al.* (2000), que estudaram células do tipo K562 mostrando que a ficocianina apresentou IC₅₀ de 80 µg/mL com 96 horas de incubação. Já Subhashini *et al.* (2004) mostraram para esse mesmo tipo de célula uma dosagem menor de ficocianina com 50 µg/mL em 48 horas. A diferença nos resultados está relacionada à pureza da biomolécula quando os últimos autores utilizaram ficocianina com pureza acima de 95%.

Hernandez *et al.* (2017) estudaram a viabilidade de extratos de *A. platensis* para tratamento das células Kasumi-1 e K562 também leucêmicas. Esses pesquisadores mostraram que os extratos obtidos com diferentes solventes apresentaram IC₅₀ com doses maiores ao presente estudo, no qual os autores reportaram que quando as ficobiliproteínas foram extraídas com água apresentaram IC₅₀ de 15 µg/mL e com etanol 0,31 µg/mL.

Assim pode-se dizer que as ficobiliproteínas apresentam atividade anticancerígena para a linhagem leucêmica e que o método de extração pressurizado não afetou o potencial dessas biomoléculas para uma possível aplicação em quimioprevenção, ainda possibilitando que o extrato de ficobiliproteínas possa ser mais explorado na atividade anticâncer.

6 CONCLUSÃO

O método de extração pressurizada foi eficiente na extração de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis*. A ficocianina e a aloficocianina foram extraídas com fator de pureza de 3,59 e 1,72 e rendimentos de 44,44 e 16,32 mg.g⁻¹, respectivamente, nas condições selecionadas de 100 bar e 360 min, e este método não alterou a biofuncionalidade das moléculas extraídas. Após o processo de purificação, o extrato de ficobiliproteínas apresentou uma elevada atividade antioxidante comparado aos padrões, obtendo valores de 96 % no sequestro dos radicais de DPPH e de 100 % no ensaio de quelação do íon ferroso, como também apresentou atividade anticâncer para a linhagem leucêmica HL60 com IC50 de 112,6 µg/mL.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Scient.**, Espanha, v.136, n.1, p.109–20, 1998.
- ALGAEBASE, 2020. **AlgaeBase is a global algal database of taxonomic, nomenclatural and distributional information.** Disponível em: < <https://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 25 fev. 2020.
- APT, K. E.; BEHRENS, P. W. Commercial Developments in Microalgal biotechnology. **Journal of phycology**, Colombia, v.35, p.215–226, 1999.
- BALASUBRAMANI, R.; GUPTA, S. K.; CHO, W.; KIM, J.; LEE, S.; JEONG, K.; CHOI, H. Microalgae potential and multiple roles-current progress and future prospects- an overview. **Sustainability**, Índia, v.8 n.1215, p.1–16, 2016.
- BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, South Africa, v.27 n.8, p. 477–485, 2009.
- 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.**, Portugal, v.20, p.44–52, 2006.
- BECKER, E. W.; **Microalgae. Biotechnology and microbiology.** Cambridge: Cambridge University Press; 1994. ISBN: 978-0-521-06113.
- BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous bluegreen 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.**, Espanha, v.110 n.2, p.436–445, 2008.
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, p.14–19, 1996.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Índia, v.275, p.20–25, 2000.
- BHARATHIRAJA, S.; MANIVASAGAN, P.; SANTHA MOORTHY, M.; BUI, N. Q.; JANG, B.; PHAN, T. T. V.; JUNG, W. K.; KIM, Y. M.; LEE, K. D.; OH, J. Photo-based PDT/PTT dual model killing and imaging of cancer cells using phycocyanin-polypyrrole nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.123, p.20–30, 2018.

BHAYANI, K., MITRA, M.; GHOSHAB, T.; MISHRA, S. C-Phycocyanin as a potential biosensor for heavy metals like Hg²⁺ in aquatic system. **RSC Advances**, Bhavnagar, n.112, p.01–27, 2016.

BRANDTS J. F.; OLIVEIRA R. J.; WESTORT, C. Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation on ribonuclease A. **Biochemistry.**, Massachusetts, v.9 n.4, p.1038–1047, 1970.

BURGUES, R. R. Protein Precipitation Techniques. **Methods Enzymol.**, v.463, p.331–342, 2009.

CAETANO, R. K. M. **Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da Biomassa de *Arthrospira platensis***. 2018. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

CALCOTT, P. H.; MACLEOD, R. A. The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage. **Can. J. Microbiol.**, Montreal, v.21 n.12, p. 1960–1968, 1975.

CHATTOPADHYAY, P. K.; GAYLORD, B.; PALMER, A.; JIANG, N.; RAVEN, M. A.; LEWIS, G.; REUTER, M.; NUR-UR, A. K. M.; PRICE, D.; ROEDERER, M. Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. **Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, California, v.81 n.6, p.456–466, 2012.

CHEN, H.; JIANG, P. Combinational biosynthesis and characterization of fusion proteins with tandem repeats of allophycocyanin holo-a subunits, and their application as bright fluorescent labels for immunofluorescence assay. **Journal of Bio. and Bioengi.**, China, v.126 n.6, p.778–782, 2018.

CHENTIR, I.; HAMDY, M.; LI, S.; DOUMANDJI, A.; MARKOU, G.; NASRI, M. Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. **Algal Research**, v.35, p.395–406, 2018.

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.**, Taiwan, v.81, p.1431–1435, 2007.

CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT- Food Science and Technology**, v.41 n.6, p.1067–1072, 2008.

COATES J. Interpretation of Infrared Spectra: A Practical Approach. In: Meyers, R.A., Ed., **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, p.10815–10837, 2000.

CUELLAR, B. S. P.; AGUILAR, H. I.; CARDENAS, C. D. L.; ORNELAS, S. N.; ROMERO, O. M. A.; PARRASALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microbial iotechnology**, México, v.8 n.2, 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 ptatensis*. **Mol. Cell Biochem.**, v.226, p.27–38, 2001.

DENIZ, I.; OZEN, M. O.; YESIL-CELIK TAS. The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.108, p.13–18, 2016.

DUFOSSE, L.; GALAUP, P.; YARNON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as source of pigments for use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends. Food Sci. Technol.**, v.16 n.9, p.389–406, 2005.

GAMMOUDI, S.; ATHMOUNI, K.; NASRI, A.; DIWANI, N.; GRATI, I.; BELHAJ, D.; KETADA, H. B.; FKI, L.; FEKI, A.; AYADI, H. Optimization, isolation, characterization and hepatoprotective effect of a novel pigment-protein complex (phycocyanin) producing microalga: *Phormidium versicolor* NCC-466 using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.137, p.647–656, 2019.

GANTT, E.; LIPSCHULTZ, A. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*: I. Isolation. **J. Cell. Bio.**, v.54, p.313–324, 1972.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F., ACIEN-FERNANDEZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Microalgae research worldwide. **Algal Research**, Espanha, v.35, p.50–60, 2018.

GEADA, P.; RODRIGUES, R.; LOUREIRO, L.; PEREIRA, R.; FERNANDES, B.; TEIXEIRA, J. A.; VASCONCELOS, V.; VICENTE, A. A. Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology – Applications, techniques and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Portugal, v.94, p.656–668, 2018.

GLAZER, A. N.; STRYER, L. Phycofluor probes. **Trends in biochemical Sciences**, v. 9, n.10, p.423–427, 1984.

GOLDSMITH, R. H.; MOERNER, W. E. Watching conformational and photodynamics of single fluorescent proteins in solution. **Nature chemistry**, v. 2, p.179–186, 2010.

GOURAJI, M. E.; ZAD, S. S.; GHIACI, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. **LWT- Food science and technology**, v.102, p.230–236, 2019.

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

HAWLEY S. Reversible pressure–temperature denaturation of chymotrypsinogen, **Biochemistry**, v.10, p.2436–2442, 1971.

HAO, S.; LI, S.; WANG, J.; ZHAO, L.; ZHANG, C.; HUANG, W.; WANG, C. Phycocyanin Reduces Proliferation of Melanoma Cells through Downregulating GRB2/ERK Signaling. **J. agricultural and food chemistry**, v.66, p.10921–10929, 2018.

- HERNANDEZ, F. Y. F.; KHANDUAL, S.; LÓPEZ, I. G. R. Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. **Asian pacific J. of tropical biomedicine**, v.7 n.1, p.14–19, 2017.
- HUANG, Z.; GUO, B. J.; WONG, R. N. S.; JIANG, Y. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v.100 n.3, p.1137–1143, 2007.
- HSIE-LO, M.; CASTILLO, G.; BECERRA-OCHOA, M. A.; MOJICA, L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability, **Algal research**, México, v.42, p.1–11, 2019.
- İLTER, I.; AKYIL, S.; DEMIREL, Z.; KOÇ, M.; CONK-DALAY, M.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.70, p.78–88, 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.
- JOHNSON, T. J.; KATUWAL, S.; ANDERSON, G. A.; GU, L.; ZHOU, R.; GIBBONS, WR. Photobioreactor cultivation strategies for microalgae and cyanobacteria **Biotechnol. Prog.**, v.34 n.4, p. 811–827, 2018.
- KEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.82 n.13, p.1107–1112, 1990.
- KORU, E. Earth food *Spirulina (Arthrospira)*: Production and quality standards. **Turkey Journal of Agriculture**, Turquia, v.11, p.191–202, 2009.
- KRONICK M. N.; GROSSMAN P. D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. **Clin Chem**, v.29 n.9 p.1582– 1588, 1983.
- 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.**, Índia, v.252, p.67–75, 2007.
- 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.**, Índia, v.19, p.184–188, 2014.
- LÉON, IVÁN ALEJANDRO ÁVILA. **Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**. 2010. Dissertação (Mestrado) Curso de Bioquímico-farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- LI, B.; CHU, X.; GAO, M.; LI, W. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. **Acta Biochimica et Biophys Sinica**, v.42 n.1, p.80–89, 2010.

LI, W.; SU, H.; PU, Y.; CHEN, J.; LIU, L.; LIU, Q.; QIN, S. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. **Biotechnology Advances**, China, v.37 n.2, p.340–353, 2019.

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

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*. **J. of biotechnology**, v.116, p.91–100, 2005.

LONE, J.; LENE, D. S.; KARSTEN, O.; SKIBSTED, L. H.; Heat and light stability of three natural blue colourants for use in confectionery and beverages. **Eur. Food Res. Technol.**, Dinamarca, v.220 n3–4, p.261–266, 2005.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v.109, p.282–296, 2016.

MARTINS, A.; CAETANO, N. S.; MATA, T. M. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Ren. Sustain. Ener. Rev.**, v.14, p.217–232, 2010.

MARTÍNEZ, J. M.; LUENGO, E.; SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. C-phycoerythrin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. **Food Research International**, v.99, p. 1042–1047, 2017.

MEMIJE-LAZARO, I. N.; BLAS-VALDIVIA, V.; FRANCO-COLÍN, M.; CANO-EUROPA, E. *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) and C-phycoerythrin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. **Journal of Functional Foods**, v.43, p.37–43, 2018.

MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v.1152 n.1–2, p.234–246, 2007.

MIN, B.; MCCLUNG, A. M.; CHEN, M. H. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. **Journal of Food Science**, v.76, p.117–126, 2011.

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.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, A. V.; KALIL, J. S. Extração de ficocianina a partir de diferentes biomassas de *Spirulina* sp. **R. Bras. Agrociência. Pelotas**, v.13 n.4, p.529–532, 2007.

MORCOS, N. C.; BERNS, M.; HENRY, W. L. Phycocyanin: Laser Activation, Cytotoxic Effects, and Uptake in Human Atherosclerotic Plaque. **Lasers in Surgery and Medicine**, California, v.8, p.10–17, 1998.

- NASCIMENTO, J.; LAGE, L.; CAMARGOS, C.; AMARAL, J.; COSTA, L.; SOUSA, A.; OLIVEIRA, F. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.92 n.4, p.327–332, 2011.
- NASCIMENTO, S. S.; SANTOS, V. S. V.; WANTANABE, E. O.; FERREIRA, J. S. Assessment of the purification of phycobiliproteins in cyanobacteria through aqueous two-phase systems with different proportions of PEG/salt. **Food and Bioproducts Processing**, Brasil, v.119, p.345–349, 2019.
- NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycocyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v.2 n. 2, p.81–85, 2012.
- OI V. T.; GLAZER A. N.; STRYER L. Fluorescent phycobiliproteins conjugates for analysis of cells and molecules. **J. Cell Biol.**, v.93, p.981–986, 1982.
- PAGELS F.; GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; KIJOA, A.; VASCONCELOS, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances.**, v.32 n.3, p.422–443, 2019.
- PAN, R.; LU, R.; ZHANG, Y.; ZHU, M.; ZHU, W.; YANG, R.; ZHANG, E.; YING, J.; XU, T.; YI, H.; LI, J.; SHI, M.; ZHOU, LI.; XU, Z.; LI, P.; BAO, Q. *Spirulina* phycocyanin induces differential protein expression and apoptosis in SKOV-3 cells. **International J. of macromolecules**, v.81, p.951–959, 2015.
- PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. **Process Biochemistry**, v.82, p.189–198, 2019.
- PANDEY, V. D.; PANDEY, A.; SHARMA, V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v.2, p. 89–97, 2013.
- PARRA-SALDIVAR, R. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: An approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53-65, 2015.
- PATTARAYAN, D.; RAJARAJAN, D.; SIVANANTHAM, A.; PALANICHAMY, R.; RAJASEKARAN, S. C-phycocyanin suppresses transforming growth factor- β 1-induced epithelial mesenchymal transition in human epithelial cells. **Pharmacological reports**, v.69 n.3, p.426–431, 2017.
- PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248-255, 2005.
- PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v.1127, p.76–81, 2006.

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

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

RATHNASAMY, S. K.; RAJENDRAN, D. sri.; BALARAMAN, H. B.; VISWANATHAN, G. Functional deep eutectic solvent-based chaotic extraction of phycobiliprotein using microwave-assisted liquid-liquid micro-extraction from *Spirulina (Arthrospira platensis)* and its biological activity determination. **Algal Research**, v.44, p.1–9, 2019.

REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; ROMAY, C.; LEDON, N. 327 Anti-inflammatory and antioxidant properties of C-phycoyanin. **Toxicology Letters**, v.144, p.s89, 2003

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

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.92, p.394–404, 2018.

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

RODRIGUES, R. D. P.; LIMA, P. F. de; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. de. Evaluation of protic ionic liquids as potential solvents for the heating extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Algal Research**, v.38, p.1-10, 2019.

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

ROJAS, F. B.; JUÁREZ, H. J.; CHAVERRI, P. J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, México, v.11, p. 375–392, 2014.

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

ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. **Current Protein & Peptide Science**, v.4 n.3, p. 207–216, 2003.

ROSA, S. C de; BRENCHLEY J. M.; ROEDERER M. Beyond six colours: a new era in flow cytometry. **Nat Med**, v.9, p.112–117, 2003.

SABOYA, J. P. S.; RODRIGUES, J. A. G.; FARIAS, W. R. L. Extração de ficocianinas de *Spirulina platensis*: opções metodológicas. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5 n.2, p. 25–32, 2017.

SAINI, M. K.; SANYAL, S. N. Inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt / b - catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR g. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v.68 n.5, p.537–550, 2014.

SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and chemical toxicology**, v.120, p.616–624, 2018.

SANTOS, M. C.; NOYALO, P. T.; OLVERA, R. R.; LOPEZ, J. O.; CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycoyanin from *Calothrix* spp. **Process Bio- chem.**, v.39 n.12, p.2047–2052, 2004.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORS, T. I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Curr Opin Biotechnol**, v.21, p.277–86, 2010.

SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production, **Trends Biotechnol**. v.32 n.8, p. 422–430, 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.

SERRAT, M. C. R.; CHRISTENSEN, K.V.; HOURI, R. B. E.; FRETTE, X.; CHRISTENSEN, L. P. Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring. **Food Chemistry**, v.240, p.655–661, 2018.

SETYANINGSIH, I.; BINTANG, M.; MADINA, N. Potentially Antihyperglycemic from Biomass and Phycocyanin of *Spirulina fusiformis* Voronikhin by *in vivo* Test. **Procedia Chemistry**, v.14, p. 211–215, 2015.

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

SIDLER. **Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures**. Springer, Netherlands, 1994. ISBN 978-0-7923-3273- 2

SILVA, L. A. **Estudo do Processo Biotecnológico de Produção, Extração e Recuperação do pigmento Ficocianina da spirulina platensis**. 2008. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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.

SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. M.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Biop. Biosyst eng.**, v.31, p.477–482, 2008.

SIGAMA ALDRICHG, **Milipore sigma**, Estados Unidos, 2019, Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=PHYCOCYANIN&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=US&focus=product>>.

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 n.5, p.9717, 2014.

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.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.69, p. 157–171, 2017.

SORENSEN, 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, W. M. de. **Efeito antioxidante e gastroprotetor de uma fração polissacarídica sulfatada isolada da alga vermelha *Solieria filiformis***. 2015. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E. Commercial application of microalgae. **J. Biosci. Bioeng.**, v.101 n.2, p.87–96, 2006.

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, N-H.; XIE, B-B.; CHEN, X-L.; WANG, J-X.; ZHANG, X-Y, ZHOU, B-C.; YU, Z-Z. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **J. applied of phycology**, v.22 n.1, p.65–70, 2010.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDY, M. C.; REDDY, M. M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562 **Biochem. Pharmacol**, v. 68, p.453–462, 2004.

SUDHAKAR, M. P.; KUMAR, B. R.; MATHIMANI, T.; ARUNKUMAR, K. A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. **Journal of Cleaner Production**, v.228, p. 1320–1333, 2019.

SUDHAKAR, K.; PREMALATHA, M. Characterization of micro algal biomass through FTIR/TGA/CHN Analysis: Application to *Scenedesmus* sp. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v.37 n.21, p.2330–2337, 2015.

SUDHAKAR, M. P.; JAGATHEESAN, A.; PERUMANAL, K.; ARUNKUMAR, K. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. **Algal Research**, Índia, v.8, p.115–20, 2015.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.55, p. 909–941, 2016.

TAVANANDI, H. A.; CHANDRALEKHA DEVI, A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. A newer approach for the primary extraction of allophycocyanin with high purity and yield from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **Separation and Purification Technology**, v.204, p. 162–174, 2018.

TELFORD, W. G.; MOSS, M. W.; MOSERMAN, J. P.; ALLNUT, F. C. T. Cryptomonad algal phycobiliproteins as fluorochromes for extracellular and intracellular antigen detection by flow cytometry. **Cytometry**, v. 44, p. 16–23, 2001.

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

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology***. London: Taylor & France. ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v.99 n.10, p. 4021–4028, 2008.

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.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algae: from aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. **Quim. Nova**, v. 27 n.1, p.139–145, 2004.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v.319 n.2, p. 263–271, 2003.

WANG, C.; WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, T.; BAI, Y.; LI, Y.; HUANG, B. Photosensitization of phycocyanin extracted from *Microcystis* in human hepatocellular carcinoma cells: Implication of mitochondria-dependent apoptosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.117, p.70–79, 2012.

WANG, H.; LIU, Y.; GAO, X.; CARTER, C. L.; LIU, Z. The recombinant b subunit of C-phycoyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis, **Cancer letters**, v.247, 150–158, 2007.

WESTERMANN, M.; REUTER, W.; SCHIMEK, C.; WEHRMEYER, W. Presence of both hemidiscoidal and hellipsoidal phycobilisomes in a *Phormidium* species (cyanobacteria). **Z. Naturforsch**, v.48, p.28–34, 1993.

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

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-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of applied Phycology**, v.23 n.1, p.1–6, 2011.

YIN, C.; DAOUST, K.; YOUNG, A.; TEBBS, E. J.; HARPER, D. M. Tackling community undernutrition at Lake Bogoria, Kenya: The potential of *spirulina (Arthrospira fusiformis)* as a food supplement. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.17 n.1, p.11603–11615, 2017.

YING, J.; WANG, J.; JI, H.; LIN, C.; PAN, R.; ZHOU, L.; LI, P. Transcriptome analysis of phycoyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. **Gene**, v.585 n.1, p.58–64, 2016.

YOUNG, I.; CHUANG, S.; HSU, C.; SUN, Y. International Journal of Biological Macromolecules C-phycoyanin alleviates osteoarthritic injury in chondrocytes stimulated with H₂O₂ and compressive stress. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.93, p. 852–859, 2016.

ZHU, C.; LING, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; HOFFMAN, P. R.; ZHENG, W.; ZHOU, T.; HUANG, Z. Selenium-containing phycoyanin 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.

ZIPP, A.; KAUZMANN, W. Pressure denaturation of metmyoglobin, **Biochemistry, biochemistry**, v.12, p. 4217–4228, 1973.

ZILINSKAS, B. A.; GREENWALD, L. S. Mini review. Phycobilisome structure and function. **Photosynthesis Research**, v.35 n.10, p.7–35, 1986.

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.

ANEXOS

- Análise estatística perfil de concentração para extração de ficocianina tempo de 30 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 19:38:43)

+ Notes									
+ Input Data									
- Descriptive Statistics									
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean					
15	3	0,93562	0,06964	0,04021					
25	3	0,40282	0,08539	0,0493					
50	3	1,0344	0,04031	0,02327					
10	3	0,89839	0,17426	0,10061					
- One Way ANOVA									
- Overall ANOVA									
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F				
Model	3	0,71851	0,2395	21,70783	3,36762E-4				
Error	8	0,08826	0,01103						
Total	11	0,80678							
<p>Null Hypothesis: The means of all levels are equal Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different At the 0.05 level, the population means are significantly different.</p>									
- Fit Statistics									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean					
	0,8906	0,12844	0,10504	0,8178					
- Means Comparisons									
- Tukey Test									
		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar	15 bar	-0,5328	0,08576	8,78571	0,00116	0,05	1	-0,80745	-0,25816
50 bar	15 bar	0,09879	0,08576	1,62898	0,67059	0,05	0	-0,17586	0,37343
50 bar	25 bar	0,63159	0,08576	10,41469	3,61441E-4	0,05	1	0,35694	0,90623
100 bar	15 bar	-0,03723	0,08576	0,61391	0,97087	0,05	0	-0,31187	0,23742
100 bar	25 bar	0,49557	0,08576	8,17181	0,00186	0,05	1	0,22093	0,77022
100 bar	50 bar	-0,13602	0,08576	2,24289	0,43678	0,05	0	-0,41066	0,13863
<p>Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level. Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.</p>									

- Análise estatística perfil de concentração para extração de ficocianina tempo de 60 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 19:43:44)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	1,52596	0,06134	0,03542
25	3	0,62788	0,1028	0,05935
50	3	1,27626	0,10081	0,0582
100	3	1,47293	0,38638	0,22308

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	1,53366	0,51122	11,76675	0,00265
Error	8	0,34757	0,04345		
Total	11	1,88122			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,81524	0,17005	0,20844	1,22576

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	-0,89807	0,17019	7,46273	0,00332	0,05	1	-1,44308	-0,35307
50 bar 15 bar	-0,2497	0,17019	2,07491	0,49712	0,05	0	-0,7947	0,2953
50 bar 25 bar	0,64838	0,17019	5,38782	0,02153	0,05	1	0,10337	1,19338
100 bar 15 bar	-0,05303	0,17019	0,44063	0,98873	0,05	0	-0,59803	0,49198
100 bar 25 bar	0,84505	0,17019	7,0221	0,00482	0,05	1	0,30005	1,39005
100 bar 50 bar	0,19667	0,17019	1,63428	0,6685	0,05	0	-0,34833	0,74167

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística perfil de concentração para extração de ficocianina tempo de 120 min.

ANOVA OneWay (11/27/2019 19:51:44)

+ Notes									
+ Input Data									
- Descriptive Statistics									
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean					
15	3	2,2793	0,32932	0,19014					
25	3	2,30358	0,62462	0,36062					
50	3	1,96785	0,28465	0,16434					
100	3	1,91712	0,4253	0,24555					
- One Way ANOVA									
- Overall ANOVA									
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F				
Model	3	0,37006	0,12335	0,64878	0,60547				
Error	8	1,52103	0,19013						
Total	11	1,89108							
Null Hypothesis: The means of all levels are equal									
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different									
At the 0,05 level, the population means are not significantly different.									
- Fit Statistics									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean					
	0,19568	0,20597	0,43604	2,11696					
- Means Comparisons									
- Tukey Test									
		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar	15 bar	0,02428	0,35602	0,09644	0,99988	0,05	0	-1,11583	1,16439
50 bar	15 bar	-0,31145	0,35602	1,23716	0,81775	0,05	0	-1,45156	0,82866
50 bar	25 bar	-0,33573	0,35602	1,3336	0,78367	0,05	0	-1,47584	0,80438
100 bar	15 bar	-0,36218	0,35602	1,43869	0,74459	0,05	0	-1,5023	0,77793
100 bar	25 bar	-0,38646	0,35602	1,53512	0,70746	0,05	0	-1,52657	0,75365
100 bar	50 bar	-0,05073	0,35602	0,20153	0,99888	0,05	0	-1,19084	1,08938
Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.									
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.									

- Análise estatística perfil de concentração para extração de ficocianina tempo de 240 min.

ANOVAOneWay (11/29/2019 10:44:26)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	2,52781	0,30673	0,17709
25	3	3,34825	0,27824	0,16064
50	3	2,42906	0,15776	0,09108
100	3	3,41716	0,45381	0,26201

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	2,47485	0,82495	8,20168	0,00799
Error	8	0,80466	0,10058		
Total	11	3,27952			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,75464	0,10822	0,31715	2,93057

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	0,82044	0,25895	4,48069	0,05245	0,05	0	-0,00881	1,64969
50 bar 15 bar	-0,09875	0,25895	0,53933	0,97982	0,05	0	-0,928	0,7305
50 bar 25 bar	-0,91919	0,25895	5,02002	0,03078	0,05	1	-1,74844	-0,08994
100 bar 15 bar	0,88934	0,25895	4,85699	0,03612	0,05	1	0,06009	1,71859
100 bar 25 bar	0,0689	0,25895	0,3763	0,99288	0,05	0	-0,76035	0,89815
100 bar 50 bar	0,9881	0,25895	5,39632	0,02136	0,05	1	0,15885	1,81735

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística perfil de concentração para extração de ficocianina tempo de 360 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 20:12:13)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	2,66285	0,24588	0,14196
25	3	3,4408	0,20323	0,11734
50	3	2,95844	0,31509	0,18192
100	3	4,54538	0,42879	0,24756

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	6,15572	2,05191	21,32384	3,5857E-4
Error	8	0,76981	0,09623		
Total	11	6,92552			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0,05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,88884	0,09119	0,3102	3,40186

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	0,77795	0,25328	4,34375	0,06013	0,05	0	-0,03314	1,58904
50 bar 15 bar	0,29559	0,25328	1,65045	0,6621	0,05	0	-0,5155	1,10668
50 bar 25 bar	-0,48236	0,25328	2,6933	0,29834	0,05	0	-1,29345	0,32873
100 bar 15 bar	1,88253	0,25328	10,51128	3,38819E-4	0,05	1	1,07144	2,69362
100 bar 25 bar	1,10458	0,25328	6,16753	0,01034	0,05	1	0,29349	1,91567
100 bar 50 bar	1,58694	0,25328	8,86084	0,00109	0,05	1	0,77585	2,39803

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística perfil de concentração para extração de alofocianina tempo de 30 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 20:20:49)

+ Notes								
+ Input Data								
- Descriptive Statistics								
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean				
15	3	0,42581	0,08125	0,04691				
25	3	0,36143	0,16455	0,09501				
50	3	0,40168	0,16654	0,09615				
100	3	0,32214	0,04643	0,02681				
- One Way ANOVA								
- Overall ANOVA								
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F			
Model	3	0,01873	0,00624	0,39276	0,76171			
Error	8	0,12714	0,01589					
Total	11	0,14587						
Null Hypothesis: The means of all levels are equal								
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different								
At the 0,05 level, the population means are not significantly different.								
- Fit Statistics								
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean				
	0,12838	0,33372	0,12607	0,37776				
- Means Comparisons								
- Tukey Test								
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	-0,06439	0,10293	0,88463	0,92099	0,05	0	-0,39402	0,26524
50 bar 15 bar	-0,02413	0,10293	0,33154	0,99509	0,05	0	-0,35376	0,3055
50 bar 25 bar	0,04026	0,10293	0,55309	0,97832	0,05	0	-0,28937	0,36988
60 bar 15 bar	-0,10368	0,10293	1,42441	0,75	0,05	0	-0,4333	0,22595
60 bar 25 bar	-0,03929	0,10293	0,53978	0,97977	0,05	0	-0,36891	0,29034
60 bar 50 bar	-0,07954	0,10293	1,09287	0,86458	0,05	0	-0,40917	0,25008
Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.								
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.								

- Análise estatística perfil de concentração para extração de alofocianina tempo de 60 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 20:24:23)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	0,54304	0,05985	0,03456
25	3	0,30277	0,06213	0,03587
50	3	0,47799	0,02873	0,01658
100	3	0,55579	0,082	0,04734

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	0,12217	0,04072	10,86547	0,00341
Error	8	0,02998	0,00375		
Total	11	0,15216			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,80294	0,13029	0,06122	0,46989

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	-0,24027	0,04999	6,79759	0,00587	0,05	1	-0,40034	-0,08019
50 bar 15 bar	-0,06505	0,04999	1,84039	0,58698	0,05	0	-0,22513	0,09502
50 bar 25 bar	0,17522	0,04999	4,9572	0,03273	0,05	1	0,01514	0,33529
100 bar 15 bar	0,01275	0,04999	0,36077	0,99371	0,05	0	-0,14732	0,17283
100 bar 25 bar	0,25302	0,04999	7,15837	0,00429	0,05	1	0,09294	0,41309
100 bar 50 bar	0,0778	0,04999	2,20117	0,45138	0,05	0	-0,08227	0,23788

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística perfil de concentração para extração de aloficocianina tempo de 120 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 20:29:12)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	0,94298	0,14672	0,08471
25	3	0,84442	0,17551	0,10133
50	3	0,70983	0,21282	0,12287
100	3	0,74386	0,09084	0,05245

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	0,09983	0,03328	1,25725	0,35218
Error	8	0,21175	0,02647		
Total	11	0,31158			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are not significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,32041	0,20079	0,16269	0,81027

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	-0,09857	0,13284	1,04937	0,87755	0,05	0	-0,52396	0,32682
50 bar 15 bar	-0,23316	0,13284	2,48224	0,35865	0,05	0	-0,65855	0,19223
50 bar 25 bar	-0,13459	0,13284	1,43287	0,7468	0,05	0	-0,55998	0,2908
100 bar 15 bar	-0,19912	0,13284	2,11988	0,48058	0,05	0	-0,62451	0,22627
100 bar 25 bar	-0,10055	0,13284	1,07051	0,87132	0,05	0	-0,52594	0,32484
100 bar 50 bar	0,03404	0,13284	0,36236	0,99363	0,05	0	-0,39135	0,45943

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística perfil de concentração para extração de aloficocianina tempo de 240 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 20:36:52)

+ Notes									
+ Input Data									
- Descriptive Statistics									
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean					
15	3	1,06172	0,1077	0,06218					
25	3	1,02672	0,54201	0,31293					
50	3	0,87429	0,25463	0,14701					
100	3	1,28146	0,1605	0,09267					
- One Way ANOVA									
- Overall ANOVA									
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F				
Model	3	0,25391	0,08464	0,85496	0,50229				
Error	8	0,79195	0,09899						
Total	11	1,04586							
Null Hypothesis: The means of all levels are equal Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different At the 0,05 level, the population means are not significantly different.									
- Fit Statistics									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean					
	0,24277	0,29653	0,31463	1,06105					
- Means Comparisons									
- Tukey Test									
		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar	15 bar	-0,035	0,2569	0,19266	0,99902	0,05	0	-0,85767	0,78768
50 bar	15 bar	-0,18742	0,2569	1,03175	0,88263	0,05	0	-1,01009	0,63525
50 bar	25 bar	-0,15242	0,2569	0,8391	0,9313	0,05	0	-0,9751	0,67025
100 bar	15 bar	0,21974	0,2569	1,20967	0,82709	0,05	0	-0,60293	1,04241
100 bar	25 bar	0,25474	0,2569	1,40233	0,7583	0,05	0	-0,56793	1,07741
100 bar	50 bar	0,40716	0,2569	2,24142	0,43729	0,05	0	-0,41551	1,22983
Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level. Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.									

- Análise estatística perfil de concentração para extração de aloficocianina tempo de 360 min.

ANOVAOneWay (11/27/2019 20:40:17)

+	Notes																																																															
+	Input Data																																																															
-	Descriptive Statistics																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sample Size</th> <th>Mean</th> <th>Standard Deviation</th> <th>SE of Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>15</td> <td>3</td> <td>1,2813</td> <td>0,22623</td> <td>0,13061</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>3</td> <td>1,3188</td> <td>0,18318</td> <td>0,10576</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>3</td> <td>1,13481</td> <td>0,22424</td> <td>0,12947</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>3</td> <td>1,74836</td> <td>0,2775</td> <td>0,16021</td> </tr> </tbody> </table>		Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	15	3	1,2813	0,22623	0,13061	25	3	1,3188	0,18318	0,10576	50	3	1,13481	0,22424	0,12947	100	3	1,74836	0,2775	0,16021																																						
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean																																																												
15	3	1,2813	0,22623	0,13061																																																												
25	3	1,3188	0,18318	0,10576																																																												
50	3	1,13481	0,22424	0,12947																																																												
100	3	1,74836	0,2775	0,16021																																																												
-	One Way ANOVA																																																															
-	Overall ANOVA																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Prob>F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>3</td> <td>0,62687</td> <td>0,20896</td> <td>3,94211</td> <td>0,05362</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>8</td> <td>0,42405</td> <td>0,05301</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>11</td> <td>1,05092</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Null Hypothesis: The means of all levels are equal Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different At the 0.05 level, the population means are not significantly different.</p>		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	Model	3	0,62687	0,20896	3,94211	0,05362	Error	8	0,42405	0,05301			Total	11	1,05092																																										
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F																																																											
Model	3	0,62687	0,20896	3,94211	0,05362																																																											
Error	8	0,42405	0,05301																																																													
Total	11	1,05092																																																														
-	Fit Statistics																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R-Square</th> <th>Coeff Var</th> <th>Root MSE</th> <th>Data Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,5965</td> <td>0,16795</td> <td>0,23023</td> <td>1,37082</td> </tr> </tbody> </table>	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean	0,5965	0,16795	0,23023	1,37082																																																							
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean																																																													
0,5965	0,16795	0,23023	1,37082																																																													
-	Means Comparisons																																																															
-	Tukey Test																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>MeanDiff</th> <th>SEM</th> <th>q Value</th> <th>Prob</th> <th>Alpha</th> <th>Sig</th> <th>LCL</th> <th>UCL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>25 bar 15 bar</td> <td>0,0375</td> <td>0,18798</td> <td>0,28208</td> <td>0,99695</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-0,56449</td> <td>0,63948</td> </tr> <tr> <td>50 bar 15 bar</td> <td>-0,1465</td> <td>0,18798</td> <td>1,10212</td> <td>0,86175</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-0,74849</td> <td>0,45549</td> </tr> <tr> <td>50 bar 25 bar</td> <td>-0,18399</td> <td>0,18798</td> <td>1,38421</td> <td>0,76507</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-0,78598</td> <td>0,41799</td> </tr> <tr> <td>100 bar 15 bar</td> <td>0,46705</td> <td>0,18798</td> <td>3,51369</td> <td>0,13734</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-0,13493</td> <td>1,06904</td> </tr> <tr> <td>100 bar 25 bar</td> <td>0,42956</td> <td>0,18798</td> <td>3,23161</td> <td>0,18073</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-0,17243</td> <td>1,03155</td> </tr> <tr> <td>100 bar 50 bar</td> <td>0,61355</td> <td>0,18798</td> <td>4,61581</td> <td>0,04586</td> <td>0,05</td> <td>1</td> <td>0,01156</td> <td>1,21554</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level. Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.</p>		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	25 bar 15 bar	0,0375	0,18798	0,28208	0,99695	0,05	0	-0,56449	0,63948	50 bar 15 bar	-0,1465	0,18798	1,10212	0,86175	0,05	0	-0,74849	0,45549	50 bar 25 bar	-0,18399	0,18798	1,38421	0,76507	0,05	0	-0,78598	0,41799	100 bar 15 bar	0,46705	0,18798	3,51369	0,13734	0,05	0	-0,13493	1,06904	100 bar 25 bar	0,42956	0,18798	3,23161	0,18073	0,05	0	-0,17243	1,03155	100 bar 50 bar	0,61355	0,18798	4,61581	0,04586	0,05	1	0,01156	1,21554
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL																																																								
25 bar 15 bar	0,0375	0,18798	0,28208	0,99695	0,05	0	-0,56449	0,63948																																																								
50 bar 15 bar	-0,1465	0,18798	1,10212	0,86175	0,05	0	-0,74849	0,45549																																																								
50 bar 25 bar	-0,18399	0,18798	1,38421	0,76507	0,05	0	-0,78598	0,41799																																																								
100 bar 15 bar	0,46705	0,18798	3,51369	0,13734	0,05	0	-0,13493	1,06904																																																								
100 bar 25 bar	0,42956	0,18798	3,23161	0,18073	0,05	0	-0,17243	1,03155																																																								
100 bar 50 bar	0,61355	0,18798	4,61581	0,04586	0,05	1	0,01156	1,21554																																																								

- Análise estatística de Pureza de ficocianina, em 360 min de pressurização.

ANOVAOneWay (11/29/2019 14:24:09)

+ Notes									
+ Input Data									
- Descriptive Statistics									
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean					
15	3	3,37435	0,39477	0,22792					
25	3	3,52471	0,20809	0,12014					
50	3	3,30555	0,45775	0,26428					
100	3	3,42567	0,70022	0,40427					
- One Way ANOVA									
- Overall ANOVA									
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F				
Model	3	0,07668	0,02556	0,11373	0,94959				
Error	8	1,79797	0,22475						
Total	11	1,87466							
Null Hypothesis: The means of all levels are equal Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different At the 0.05 level, the population means are not significantly different.									
- Fit Statistics									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean					
	0,04091	0,13912	0,47407	3,40757					
- Means Comparisons									
- Tukey Test									
		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar	15 bar	0,15036	0,38708	0,54933	0,97873	0,05	0	-1,08921	1,38992
50 bar	15 bar	-0,06881	0,38708	0,25139	0,99784	0,05	0	-1,30837	1,17076
50 bar	25 bar	-0,21916	0,38708	0,80072	0,93939	0,05	0	-1,45873	1,0204
100 bar	15 bar	0,05131	0,38708	0,18748	0,9991	0,05	0	-1,18825	1,29088
100 bar	25 bar	-0,09904	0,38708	0,36186	0,99365	0,05	0	-1,33861	1,14052
100 bar	50 bar	0,12012	0,38708	0,43887	0,98886	0,05	0	-1,11945	1,35969
Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level. Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.									

- Análise estatística de Pureza de alofocianina, em 360 min de pressurização.

ANOVAOneWay (11/29/2019 14:41:26)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	1,71087	0,21694	0,12525
25	3	1,75159	0,14689	0,08481
50	3	1,58902	0,29112	0,16808
100	3	1,79455	0,31099	0,17955

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	0,07052	0,02351	0,37595	0,77295
Error	8	0,5002	0,06252		
Total	11	0,57072			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are not significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,12356	0,1461	0,25005	1,71151

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	0,04072	0,20416	0,28209	0,99695	0,05	0	-0,61308	0,69453
50 bar 15 bar	-0,12185	0,20416	0,844	0,93023	0,05	0	-0,77565	0,53196
50 bar 25 bar	-0,16257	0,20416	1,12609	0,85431	0,05	0	-0,81638	0,49124
100 bar 15 bar	0,08368	0,20416	0,57966	0,97523	0,05	0	-0,57012	0,73749
100 bar 25 bar	0,04296	0,20416	0,29757	0,99643	0,05	0	-0,61085	0,69677
100 bar 50 bar	0,20553	0,20416	1,42366	0,75028	0,05	0	-0,44828	0,85934

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística de Rendimento de ficocianina, em 360 min de pressurização.

ANOVA OneWay (11/29/2019 14:29:46)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
15	3	26,73929	2,50381	1,44558
25	3	34,40797	2,03231	1,17335
50	3	29,58437	3,15087	1,81916
100	3	45,45376	4,28795	2,47565

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	610,68641	203,56214	21,0325	3,76303E-4
Error	8	77,42765	9,67846		
Total	11	688,11407			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,88748	0,09138	3,11102	34,04635

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 bar 15 bar	7,66868	2,54014	4,26951	0,06475	0,05	0	-0,46574	15,80309
50 bar 15 bar	2,84508	2,54014	1,58399	0,68833	0,05	0	-5,28934	10,9795
50 bar 25 bar	-4,8236	2,54014	2,68552	0,30042	0,05	0	-12,95801	3,31082
100 bar 15 bar	18,71447	2,54014	10,41922	3,60345E-4	0,05	1	10,58005	26,84889
100 bar 25 bar	11,04579	2,54014	6,14971	0,01051	0,05	1	2,91138	19,18021
100 bar 50 bar	15,86939	2,54014	8,83523	0,00111	0,05	1	7,73497	24,00381

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Análise estatística de Rendimento de ficocianina, em 360 min de pressurização.

ANOVA OneWay (11/29/2019 14:45:30)

+	Notes																																																															
+	Input Data																																																															
-	Descriptive Statistics																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sample Size</th> <th>Mean</th> <th>Standard Deviation</th> <th>SE of Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>15</td> <td>3</td> <td>15,75686</td> <td>4,75356</td> <td>2,74447</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>3</td> <td>13,30117</td> <td>1,67128</td> <td>0,96491</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>3</td> <td>11,23489</td> <td>2,21988</td> <td>1,28165</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>3</td> <td>14,53978</td> <td>2,33916</td> <td>1,35051</td> </tr> </tbody> </table>		Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	15	3	15,75686	4,75356	2,74447	25	3	13,30117	1,67128	0,96491	50	3	11,23489	2,21988	1,28165	100	3	14,53978	2,33916	1,35051																																						
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean																																																												
15	3	15,75686	4,75356	2,74447																																																												
25	3	13,30117	1,67128	0,96491																																																												
50	3	11,23489	2,21988	1,28165																																																												
100	3	14,53978	2,33916	1,35051																																																												
-	One Way ANOVA																																																															
-	Overall ANOVA																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Prob>F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>3</td> <td>33,51433</td> <td>11,17144</td> <td>1,24859</td> <td>0,35481</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>8</td> <td>71,57816</td> <td>8,94727</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>11</td> <td>105,09249</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Null Hypothesis: The means of all levels are equal Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different At the 0.05 level, the population means are not significantly different.</p>		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	Model	3	33,51433	11,17144	1,24859	0,35481	Error	8	71,57816	8,94727			Total	11	105,09249																																										
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F																																																											
Model	3	33,51433	11,17144	1,24859	0,35481																																																											
Error	8	71,57816	8,94727																																																													
Total	11	105,09249																																																														
-	Fit Statistics																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R-Square</th> <th>Coeff Var</th> <th>Root MSE</th> <th>Data Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,3189</td> <td>0,21821</td> <td>2,9912</td> <td>13,70817</td> </tr> </tbody> </table>	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean	0,3189	0,21821	2,9912	13,70817																																																							
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean																																																													
0,3189	0,21821	2,9912	13,70817																																																													
-	Means Comparisons																																																															
-	Tukey Test																																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>MeanDiff</th> <th>SEM</th> <th>q Value</th> <th>Prob</th> <th>Alpha</th> <th>Sig</th> <th>LCL</th> <th>UCL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>25 bar 15 bar</td> <td>-2,45569</td> <td>2,4423</td> <td>1,42197</td> <td>0,75092</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-10,27681</td> <td>5,36542</td> </tr> <tr> <td>50 bar 15 bar</td> <td>-4,52196</td> <td>2,4423</td> <td>2,61844</td> <td>0,31879</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-12,34308</td> <td>3,29915</td> </tr> <tr> <td>50 bar 25 bar</td> <td>-2,06627</td> <td>2,4423</td> <td>1,19647</td> <td>0,83151</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-9,88739</td> <td>5,75484</td> </tr> <tr> <td>100 bar 15 bar</td> <td>-1,21708</td> <td>2,4423</td> <td>0,70475</td> <td>0,95721</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-9,03819</td> <td>6,60404</td> </tr> <tr> <td>100 bar 25 bar</td> <td>1,23861</td> <td>2,4423</td> <td>0,71722</td> <td>0,95509</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-6,5825</td> <td>9,05973</td> </tr> <tr> <td>100 bar 50 bar</td> <td>3,30489</td> <td>2,4423</td> <td>1,91369</td> <td>0,55837</td> <td>0,05</td> <td>0</td> <td>-4,51623</td> <td>11,126</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level. Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.</p>		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	25 bar 15 bar	-2,45569	2,4423	1,42197	0,75092	0,05	0	-10,27681	5,36542	50 bar 15 bar	-4,52196	2,4423	2,61844	0,31879	0,05	0	-12,34308	3,29915	50 bar 25 bar	-2,06627	2,4423	1,19647	0,83151	0,05	0	-9,88739	5,75484	100 bar 15 bar	-1,21708	2,4423	0,70475	0,95721	0,05	0	-9,03819	6,60404	100 bar 25 bar	1,23861	2,4423	0,71722	0,95509	0,05	0	-6,5825	9,05973	100 bar 50 bar	3,30489	2,4423	1,91369	0,55837	0,05	0	-4,51623	11,126
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL																																																								
25 bar 15 bar	-2,45569	2,4423	1,42197	0,75092	0,05	0	-10,27681	5,36542																																																								
50 bar 15 bar	-4,52196	2,4423	2,61844	0,31879	0,05	0	-12,34308	3,29915																																																								
50 bar 25 bar	-2,06627	2,4423	1,19647	0,83151	0,05	0	-9,88739	5,75484																																																								
100 bar 15 bar	-1,21708	2,4423	0,70475	0,95721	0,05	0	-9,03819	6,60404																																																								
100 bar 25 bar	1,23861	2,4423	0,71722	0,95509	0,05	0	-6,5825	9,05973																																																								
100 bar 50 bar	3,30489	2,4423	1,91369	0,55837	0,05	0	-4,51623	11,126																																																								