



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

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DA ENZIMA ANIDRASE CARBÔNICA E DE**  
**FICOBILIPROTEÍNAS A PARTIR DE MICROALGAS**

**MSc. JOANA DA COSTA ORES**

**PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> SUSANA JULIANO KALIL**  
**Orientadora**

**RIO GRANDE, RS**

**2014**

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

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DA ENZIMA ANIDRASE CARBÔNICA E DE  
FICOBILIPROTEÍNAS A PARTIR DE MICROALGAS**

**MSc. JOANA DA COSTA ORES**

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de doutora em Engenharia e  
Ciência de Alimentos da Universidade Federal  
do Rio Grande.

**PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> SUSANA JULIANO KALIL**  
**Orientadora**

**RIO GRANDE, RS**

**2014**

Dedico este trabalho aos meus pais, Leia e José, meus irmãos, Matheus e Liliane, e ao meu  
sobrinho Henrique

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e por ter colocado no meu caminho pessoas especiais, as quais agradeço, pois sem elas o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

À professora Susana Kalil, um exemplo de profissional e de ser humano raro nos dias de hoje. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação, amizade, imenso carinho, por todos esses anos de convívio e por ter acreditado em mim. É a principal responsável por eu ter chegado tão longe.

À minha família, especialmente meus pais, pelo amor e apoio incondicional e por compreenderem minhas ausências. Ao meu sobrinho, anjinho que veio iluminar as nossas vidas, a cada dia aprendo mais e mais com ele.

Aos meus bolsistas Sibebe, Marina, Bibiana e Alexandre, sem a ajuda de vocês este trabalho não estaria concluído. Um agradecimento especial à Sibebe e a Marina, obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, pela imensa dedicação e pelos momentos de descontração.

À Ana Paula Manera, pelos ensinamentos, pelo apoio e incentivo constantes e principalmente pela sua amizade e carinho. Obrigada por ter plantado a sementinha da pesquisa em mim.

Aos amigos/irmãos Anna Rafaela, Ailton e Luisa, meus anjos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, por vibrarem comigo nas conquistas e pela força nos momentos difíceis. Obrigada pelas risadas, pelo carinho, amizade e pela diversão que só vocês me proporcionam, levo vocês em meu coração.

À amiga Dai, pelo imenso carinho, amizade, companheirismo, apoio, pelas risadas e momentos de diversão. Meu exemplo de perseverança e força.

À Carol, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelo apoio e incentivo.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Biosseparação (LMB), Elida, Felipe, Juliana, Thaís, Fabrício, Gabi, pelos bons e inesquecíveis momentos vividos no laboratório. Em especial à Deborah, pelo carinho, amizade, apoio nas horas difíceis e pelos momentos de descontração.

À Ana Sanzo, pela ajuda na realização do trabalho, pelo carinho e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, especialmente à Elisane pela amizade, apoio e pelas conversas acolhedoras. Um agradecimento especial, também, para a Michele Paludo, pelo carinho e pelo auxílio com os cultivos.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG e ao Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA pelo fornecimento das algas e auxílio técnico.

À Islanda, secretária da Pós-Graduação, por toda ajuda.

Aos membros da banca Prof. Dr. Adriano Brandelli, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francine Antelo, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaína Burkert, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michele Souza e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Rafaela Braga pelas contribuições com o trabalho.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

*Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.*

*(Isaac Newton)*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características morfológicas, químicas e reprodutivas fundamentais dos principais grupos modernos de algas. ....	9
Tabela 1. Características morfológicas, químicas e reprodutivas fundamentais dos principais grupos modernos de algas ( <i>continuação</i> ). ....	10
Tabela 2 – Alguns produtos obtidos de microalgas e suas aplicações .....	13
Tabela 3 – Comparação das características das diferentes condições de cultivo .....	14
Tabela 4 – Resumo das diferentes famílias de anidrase carbônica.....	18

### ARTIGO 1

Tabela 1 – Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de extração da enzima por diferentes tratamentos .....	39
Tabela 2 – Valores experimentais de atividade (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de extração com diferentes concentrações de biomassa.....	41
Tabela 3 – Resultados (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de extração com baixas concentrações de biomassa.....	42

### ARTIGO 2

Tabela 1 – Atividade volumétrica máxima (U/L) e valores de atividade específica (U/g) biomassa ( $X$ ) e produtividade ( $P$ ) obtidos no ponto de máxima U/L .....	61
Tabela 2 – Atividade específica máxima (U/g) e parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para as sete microalgas estudadas.....	62

### ARTIGO 3

Tabela 1 – Atividade volumétrica máxima (U/L) e valores de atividade específica (U/g), biomassa ( $X$ ) e produtividade ( $P$ ) obtidos no ponto de máxima U/L .....	81
Tabela 2 – Concentrações de ficobiliproteínas obtidas no ponto de atividade máxima (U/L). 81	
Tabela 3 – Atividade específica máxima (U/g) e parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para cianobactérias estudadas .....	82

### ARTIGO 4

Tabela 1 – Concentrações de ficobiliproteínas (média $\pm$ desvio padrão) obtidas a partir da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 utilizando diferentes tratamentos .....	100
---	-----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos microscópicas de algumas das algas estudadas: (a) <i>Chlorella vulgaris</i> , (b) <i>Dunaliella tertiolecta</i> , (c) <i>Isochysis galbana</i> , (d) <i>Nannochloropsis oculata</i> , (e) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , (f) <i>Tetraselmis suecica</i> , (g) <i>Scenedesmus obliquus</i> , (h) <i>Spirulina platensis</i> LEB 52 e (i) <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (todas com aumento de 400 vezes) .....	11
Figura 2 – Esquema do mecanismo catalítico da anidrase carbônica.....	19
Figura 3 – Classificação das técnicas ruptura celular.....	28
Figura 4 – Relação entre seletividade do produto liberado e facilidade de recuperação de diferentes técnicas de ruptura conhecidos .....	29

### ARTIGO 1

Figura 1 – Microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (a) antes da extração da enzima; e biomassa após extração por (b) tratamento ultrassônico, (c) agitação com abrasivo e (d) homogeneização com gral e pistilo; todas com aumento de 400 vezes (*amostra diluída).....	39
Figura 2 – Extração da enzima anidrase carbônica em função (a) da concentração de biomassa e (b) do tempo (letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias, $p > 0,05$ , $n=3$ ) .....	42
Figura 3 – Cinética de precipitação do carbonato de cálcio .....	44

### ARTIGO 2

Figura 1 – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo das microalgas <i>P. tricornutum</i> , <i>T. suecica</i> e <i>I. galbana</i> ( $n=3$ ).....	56
Figura 2 – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo das microalgas <i>D. tertiolecta</i> e <i>N. oculata</i> ( $n=3$ ).....	57
Figura 3 – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo das microalgas <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> ( $n=3$ ).....	58

### ARTIGO 3

Figura 1 – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i> LEB 52 ( $n=3$ ).....	75
Figura 2 – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 ( $n=3$ ) .....	76
Figura 3 – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo da microalga <i>Synechococcus nidulans</i> ( $n=3$ ) .....	77

Figura 4 – Cinética de precipitação do carbonato de cálcio .....	84
--	----

#### ARTIGO 4

Figura 1 – Rendimento em extração de anidrase carbônica a partir da biomassa de <i>P. tricornutum</i> utilizando diferentes tratamentos: 1 – homogeneizador ultrassônico; 2 – sonicador com pérolas de vidro; 3 – vórtex com pérola de vidro; 4 – maceração com gral e pistilo; 5 – congelamento/descongelamento 2 ciclos; 6 – congelamento/descongelamento 4 ciclos; 7 – Secagem e maceração; 8 – secagem, congelamento e maceração .....	99
--	----

Figura 2 – Rendimento em extração de anidrase carbônica a partir da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 utilizando diferentes tratamentos: 1 – homogeneizador ultrassônico; 2 – sonicador com pérolas de vidro; 3 – vórtex com pérola de vidro; 4 – maceração com gral e pistilo; 5 – congelamento/descongelamento 2 ciclos; 6 – congelamento/descongelamento 4 ciclos; 7 – Secagem e maceração; 8 – secagem, congelamento e maceração.....	100
---	-----

Figura 3 – Microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (a) antes da extração e biomassa após (b) homogeneizador ultrassônico, (c) sonicação com pérola de vidro, (d) agitação em vórtex com pérola de vidro, (e) maceração com gral e pistilo, (f) congelamento/descongelamento 2 ciclos, (g) congelamento/descongelamento 4 ciclos, (h) secagem e maceração e (i) secagem, congelamento e maceração (todas com aumento de 400 vezes) .....	101
--	-----

Figura 4 – Microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a) antes da extração e biomassa após (b) homogeneizador ultrassônico, (c) sonicação com pérola de vidro, (d) agitação em vórtex com pérola de vidro, (e) maceração com gral e pistilo, (f) congelamento/descongelamento 2 ciclos, (g) congelamento/descongelamento 4 ciclos, (h) secagem e maceração e (i) secagem, congelamento e maceração (todas com aumento de 400 vezes) .....	102
---	-----



## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	4
1.2 Objetivo geral.....	6
1.3 Objetivos específicos .....	6
CAPÍTULO II.....	7
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	8
2.1 Microalgas.....	8
2.2 Cultivo de microalgas .....	14
2.3 Enzima anidrase carbônica.....	16
2.4 Captura e sequestro de dióxido de carbono.....	20
2.5 Produção de anidrase carbônica em microalgas.....	23
2.6 Ficobiliproteínas.....	24
2.7 Produção de ficobiliproteínas em cianobactérias.....	26
2.8 Extração de biomoléculas intracelulares .....	27
2.9 Extração de anidrase carbônica e ficobiliproteínas.....	30
2.10 Considerações finais.....	31
CAPÍTULO III .....	32
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....	32
ARTIGO 1: EXTRAÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA DA MICROALGA <i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i> : POTENCIALIDADE PARA USO EM CAPTURA DE CO <sub>2</sub> .....	33
RESUMO .....	34
1 INTRODUÇÃO.....	34
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Microalga e meio de cultivo.....	36
2.2 Cultivo.....	36
2.3 Extração da anidrase carbônica.....	36
2.4 Captura enzimática do CO <sub>2</sub> .....	37
2.5 Métodos analíticos .....	37
2.6 Análise estatística.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1 Extração da anidrase carbônica.....	38

3.2 Captura enzimática do CO <sub>2</sub> .....	44
4 CONCLUSÕES .....	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA POR MICROALGAS MARINHAS E DULCÍCOLAS .....	50
RESUMO .....	51
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Microalgas e meios de cultivo.....	53
2.2 Cultivo.....	53
2.3 Extração da anidrase carbônica.....	53
2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento.....	54
2.5 Métodos analíticos .....	54
2.6 Análise estatística.....	55
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4 CONCLUSÃO.....	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ARTIGO 3: CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA E FICOBILIPROTEÍNAS POR CIANOBACTÉRIAS.....	68
RESUMO .....	69
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 Microalgas e meio de cultivo .....	71
2.2 Cultivo.....	72
2.3 Extração da anidrase carbônica e ficobiliproteínas.....	72
2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento.....	72
2.5 Captura enzimática do CO <sub>2</sub> .....	73
2.6 Métodos analíticos .....	73
2.7 Análise estatística.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
4 CONCLUSÃO.....	84
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
ARTIGO 4: EXTRAÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA E FICOBILIPROTEÍNAS DE MICROALGAS POR DIFERENTES MÉTODOS.....	92

RESUMO .....	93
1 INTRODUÇÃO.....	93
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1 Microalga e meio de cultivo.....	95
2.2 Obtenção da biomassa.....	96
2.3 Extração da anidrase carbônica e ficobiliproteínas.....	96
2.4 Métodos analíticos .....	97
2.5 Análise estatística.....	98
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	98
4 CONCLUSÃO.....	105
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
CAPÍTULO IV .....	111
CONCLUSÃO GERAL .....	112
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....	114
CAPÍTULO V .....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	116
APÊNDICE 1 .....	132
APÊNDICE 2 .....	135

**CAPÍTULO I**  
**RESUMO, ABSTRACT E INTRODUÇÃO GERAL**

## RESUMO

Muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos, dentre elas a anidrase carbônica e as ficobiliproteínas. A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato com alta eficiência, sendo utilizada para captação de CO<sub>2</sub> através de sistemas biológicos. A C-ficocianina e a aloficocianina, corantes naturais, são os dois principais componentes das ficobiliproteínas em cianobactérias e apresentam diversas aplicações dentro da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. O objetivo principal desta tese foi avaliar a produção e a extração da anidrase carbônica e das ficobiliproteínas a partir de diferentes microalgas. Para isso, primeiramente foi realizada uma investigação da produção da anidrase carbônica pela microalga *Dunaliella tertiolecta*, onde foi estudada a extração da enzima e sua aplicação em sistemas de captura enzimática de CO<sub>2</sub>. Posteriormente foi avaliada a produção da enzima ao longo do cultivo de diferentes microalgas marinhas e dulcícolas (*Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochysis galbana*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*). A produção da enzima e de ficobiliproteínas, também, foi estudada para as cianobactérias *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*. Todos os cultivos foram acompanhados em termos de biomassa e pH. Por último, foi realizado um estudo de extração da enzima de *P. tricornutum* e extração conjunta da anidrase carbônica e de ficobiliproteínas da cianobactéria *S. sp.* LEB 18. Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyer contendo os meios Conway (marinhas), BG-11 (dulcícolas) e Zarrouk 20% (cianobactérias). Na avaliação da ruptura celular foram testadas as técnicas de maceração em gral e pistilo, agitação em vórtex com pérolas de vidro, sonicação com pérolas de vidro, homogeneizador ultrassônico, secagem, congelamento e descongelamento e a combinação de tratamentos. Maiores rendimentos de extração da enzima a partir da microalga *D. tertiolecta* foram obtidos utilizando tratamento ultrassônico, juntamente com baixas concentrações de biomassa úmida (0,1 e 0,2 g/L), e a mesma apresentou potencial para aplicação em processos de captação enzimática do CO<sub>2</sub>. Durante os cultivos, a microalga *C. vulgaris* se destacou como maior produtora da enzima anidrase carbônica, atingindo valores de atividade enzimática de 44,0 U/L. As cianobactérias apresentaram valores de atividade entre 41,6 e 45,9 U/L, sendo que a *S. sp.* LEB 18 foi a que apresentou maiores produções de C-ficocianina e aloficocianina no ponto de máxima atividade volumétrica, 65,9 e 82,2 µg/mL, respectivamente. A enzima extraída da biomassa de *S. platensis* LEB 52 catalisou a hidratação do CO<sub>2</sub> que precipitou na forma de CaCO<sub>3</sub>. Maiores rendimentos de extração da enzima a partir das microalgas *P. tricornutum* e *S. sp.* LEB 18 foram obtidos utilizando homogeneizador ultrassônico, que foram 31,3 U/g e 25,5 U/g, respectivamente. A biomassa de *S. sp.* LEB 18, também apresentou potencial para a extração de ficobiliproteínas, obtendo-se altas concentrações de C-ficocianina (100,5 mg/g) e aloficocianina (69,9 mg/g). Através dos resultados obtidos, pode-se verificar a potencialidade das microalgas e das cianobactérias para produção da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas, biomoléculas de alto valor industrial. Este trabalho apresenta processos eficientes para a extração da enzima e de ficobiliproteínas tanto para escala laboratorial como industrial.

**Palavras-chave:** anidrase carbônica, cultivo, captura enzimática de CO<sub>2</sub>, biomassa microalgal, extração conjunta, ficobiliproteínas.

---

## PRODUCTION AND EXTRACTION OF THE CARBONIC ANHYDRASE ENZYME AND PHYCOBILIPROTEINS FROM MICROALGAE

### ABSTRACT

Much interest has been focused on the biotechnological potential of microalgae, mainly due to the identification of several substances, such as carbonic anhydrase and phycobiliproteins, which are synthesized by these organisms. Carbonic anhydrase is a metalloenzyme that catalyzes the reversible hydration of CO<sub>2</sub> to form bicarbonate efficiently, is used for capturing CO<sub>2</sub> in biological systems. Both C-phycoerythrin and allophycocyanin, which are natural dyes and the main components of phycobiliproteins in cyanobacteria, have been widely used in food, cosmetic and pharmaceutical industries. This thesis aimed at evaluating the production and extraction of carbonic anhydrase and phycobiliproteins from different microalgae. Firstly, an investigation of the carbonic anhydrase production by the microalga *Dunaliella tertiolecta* was carried out and the enzyme extraction and its application to CO<sub>2</sub> enzymatic capture systems were studied. Secondly, the enzyme production was evaluated during cultivation of different marine and freshwater algae (*Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornerum*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*). The enzyme and phycobiliprotein production by cyanobacteria *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina* sp. LEB 18 and *Synechococcus nidulans* was also studied. Biomass and pH were monitored in all cultivations. Finally, a study of the enzyme extraction from *P. tricornerum* and of the combined extraction of carbonic anhydrase and phycobiliproteins from cyanobacteria *S. sp.* LEB 18 was carried out. Cultivations were performed in Erlenmeyer flasks with the mediums Conway (marine), BG-11 (freshwater) and Zarrouk 20% (cyanobacteria). For the evaluation of cell disruption, the following techniques were tested: mortar and pestle maceration, agitation with glass beads, sonication with glass beads, ultrasonic homogenizer, drying, freezing and thawing and a combination of treatments. The highest extraction yields of the enzyme from the microalga *D. tertiolecta* were obtained by ultrasonic treatment with low concentrations of wet biomass (0.1 and 0.2 g/L), and the enzyme showed potential for application in enzymatic processes of CO<sub>2</sub> capture. During the cultivations, the microalga *C. vulgaris* stood out as the greatest producer of the carbonic anhydrase enzyme since its values of enzyme activity reached 44.0 U/L. The cyanobacteria reached values of activity between 41.6 and 45.9 U/L, whereas *S. sp.* LEB 18 had the highest yields of C-phycoerythrin and allophycocyanin at the point of maximum volumetric activity, 65.9 and 82.2 mg/mL, respectively. The enzyme from *S. platensis* LEB 52 catalyzed the hydration of CO<sub>2</sub> that precipitates as CaCO<sub>3</sub>. The highest yields of enzyme extraction from the microalgae *P. tricornerum* and *S. sp.* LEB 18 were obtained by using an ultrasonic homogenizer; they were 31.3 U/g and 25.5 U/g, respectively. The biomass of *S. sp.* LEB 18 also had potential for the phycobiliprotein extraction and got high concentrations of C-phycoerythrin (100.5 mg/g) and allophycocyanin (69.9 mg/g). Results show the potential of microalgae and cyanobacteria for the production of the carbonic anhydrase enzyme and phycobiliproteins, valuable biomolecules in industries. This paper describes efficient processes for the extraction of the enzyme and phycobiliproteins on both laboratory and industrial scales.

**Keywords:** carbonic anhydrase, cultivation, CO<sub>2</sub> enzymatic capture, microalgal biomass, combined extraction, phycobiliproteins.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos, como ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, ficobiliproteínas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis, entre outros (RADMANN; COSTA, 2008; GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011; MORAES et al., 2011a; GERDE et al., 2012; GOO et al., 2013; JÄPELT; JAKOBSEN, 2013), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas. Nesse sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (DERNER et al., 2006). Um bioproduto, de alto valor agregado, que também pode ser obtido a partir de biomassa microalgal, é a enzima anidrase carbônica.

A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima, que contém um átomo de zinco na sua conformação, que catalisa a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato com alta eficiência:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  (KHALIFAH, 1971). Assim, desempenha papel fundamental em diversos processos fisiológicos que envolvem reações de carboxilação e descarboxilação, como fotossíntese e respiração (HENRY, 1996), entre outros. Foi primeiramente descoberta em eritrócitos de vertebrados (MELDRUM, ROUGHTON, 1933; STADIE, O'BRIEN, 1933), mas desde então tem sido encontrada em diversos organismos, como animais, plantas e algas (HEWETT-EMMETT, TASHIAN, 1996), sendo o último uma fonte potencialmente promissora para obtenção da enzima.

A importância industrial da anidrase carbônica (AC) encontra-se na sua aplicação em sistemas de captura enzimática de CO<sub>2</sub> atmosférico (BOND et al., 2001; MIRJAFARI, ASGHARI, MAHINPEY, 2007; DAVY, 2009; DILMORE et al., 2009; FAVRE, CHRIST, PIERRE, 2009; VINOBA et al., 2012), poluente considerado como maior contribuinte para o efeito estufa (IPCC, 2001). O aumento do aquecimento global tem estimulado cada vez mais o desenvolvimento de tecnologias eficazes para mitigação do CO<sub>2</sub>. Dentro deste contexto, os sistemas biológicos, utilizando a enzima anidrase carbônica, vêm ganhando cada vez mais atenção. Estes sistemas são baseados em reações que ocorrem naturalmente nos organismos vivos e são uma via potencial para a melhoria destas tecnologias (FIGUEROA et al., 2008).

Nos trabalhos de captura, geralmente, são utilizadas preparações enzimáticas altamente purificadas e/ou oriunda de sangue humano. Um fator importante para viabilidade destes processos de mitigação é a obtenção da enzima a partir de fontes viáveis e de fácil

ampliação de escala. Nessa perspectiva, pesquisadores vêm estudando diferentes fontes de anidrase carbônicas, como bactérias e, mais recentemente, biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* (SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; SHARMA; BHATTACHARYA; SHRIVASTAVA, 2011; LI et al., 2012). O grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações já vêm desenvolvendo estudos com fontes alternativas desta biomolécula, como eritrócitos bovinos oriundos de sangue de abatedouros (ORES et al., 2012).

As microalgas apresentam-se como uma fonte potencialmente atrativa para obtenção da anidrase carbônica, devido à ampla diversidade de espécies disponíveis, além da variedade de usos e aplicações da biomassa microalgal e do elevado número de compostos sintetizados por estes organismos. Nesse sentido, destacam-se as cianobactérias, pois podem ser extraídos da mesma biomassa uma série de bioprodutos de alto valor agregado, como as ficobiliproteínas e a anidrase carbônica. Outra vantagem da utilização de microalgas é que a biomassa resultante do processo de extração pode ainda ser utilizada para outros fins, como produção de ração animal (CHISTI, 2008).

A C-ficocianina (C-PC), componente da família das ficobiliproteínas (PATIL E RAGHAVARAO, 2007), é um dos principais pigmentos produzidos pela *Spirulina*, microalga utilizada em muitos países como um suplemento dietético. Os pigmentos oriundos de algas possuem um valor comercial enorme como corantes naturais na indústria nutracêutica, cosmética e farmacêutica, além de apresentar benefícios para a saúde (KUDDUS et al., 2013).

A aloficocianina é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas como uma sonda fluorescente de proteínas, particularmente em citometria de fluxo (SHAPIRO et al., 1983; YEH et al., 1987). Apresenta, também, propriedade antioxidante (GE et al., 2006) e atividade anti-enterovirus (SHIH et al., 2003), entre outras. Apesar de suas propriedades, a aplicação da aloficocianina é um pouco limitada, por estar presente em menor quantidade nas cianobactérias ou algas vermelhas (SU et al., 2010).

Como a anidrase carbônica e as ficobiliproteínas estão localizados intracelularmente, um fator importante a ser considerado é a etapa de extração. O processo de ruptura celular constitui o fator chave na produção e purificação de enzimas intracelulares, o qual tem um importante efeito na recuperação e qualidade do extrato proteico obtido (BECERRA et al., 2001).

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos micro-organismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse



(FARCADE, HARRISON, PANDIT, 2005). Assim, pode se fazer uso de pressão osmótica, condições abrasivas, tratamento químico, tratamento enzimático, secagem, congelamento-descongelamento e tratamento ultrassônico, dentre outros métodos (MORAES et al., 2011a).

Com base no exposto, esta tese teve como objetivo principal a utilização da biomassa microalgal para obtenção de biocompostos de alto valor agregado importantes industrialmente, como a anidrase carbônica e as ficobiliproteínas. Para isso, foi realizada a investigação da produção da enzima anidrase carbônica por diferentes espécies de microalgas, produção de ficobiliproteínas pelas cianobactérias, avaliação de diferentes técnicas de extração, bem como a aplicação da enzima em sistemas de captura enzimática de CO<sub>2</sub>.

## 1.2 Objetivo geral

Produzir e extrair a enzima anidrase carbônica e ficobiliproteínas a partir de biomassa microalgal.

## 1.3 Objetivos específicos

- Estudar a extração da anidrase carbônica a partir de biomassa de *Dunaliella tertiolecta*, utilizando diferentes metodologias, concentrações celulares e tempos de extração;
- Avaliar a potencialidade da enzima de *Dunaliella tertiolecta* em um sistema enzimático para captura de CO<sub>2</sub>;
- Investigar a produção da anidrase carbônica ao longo do cultivo de diferentes espécies de microalgas marinhas e dulcícolas, realizando também o acompanhamento em termos de biomassa e pH;
- Avaliar a coprodução de anidrase carbônica e ficobiliproteínas pelas cianobactérias *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*;
- Estudar diferentes métodos de ruptura para extração da enzima e das ficobiliproteínas a partir da biomassa de duas microalgas potenciais produtoras de anidrase carbônica.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Microalgas

As microalgas pertencem a um grupo muito heterogêneo de organismos, predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, que podem formar colônia, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. São caracterizadas pela presença de pigmentos, responsáveis por coloração variada e por mecanismo autotrófico (OHSE et al., 2008).

Conforme descrito por Li et al. (2008) o termo microalgas pode ser usado para definir todos os micro-organismos fotossintetizantes unicelulares, compreendendo nesta definição os procarióticos (cianobactérias) e os eucarióticos (algas verdes, diatomáceas, entre outros). Trata-se de um grupo de micro-organismos que apresentam altas taxas de crescimento e de eficiência fotossintética devido à simples estrutura celular. É estimado que a produtividade de biomassa das microalgas é até 50 vezes maior que a das plantas terrestres mais eficientes. Porém, o termo microalgas não tem valor taxonômico (DERNER et al., 2006; SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012).

A caracterização (sistemática) destes micro-organismos implica na consideração de uma série de critérios. Estes micro-organismos têm sido tradicionalmente classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do(s) cloroplasto(s) e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além desses, técnicas de biologia molecular igualmente têm sido usadas (METTING, 1996). A Tabela 1 apresenta os grandes grupos de algas (divisões ou filos) e suas respectivas características e a Figura 1 apresenta algumas imagens das microalgas utilizadas no presente trabalho.

São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra. O número exato de espécies microalgas ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (PULZ; GROSS, 2004; DERNER et al., 2006).

**Tabela 1** – Características morfológicas, químicas e reprodutivas fundamentais dos principais grupos modernos de algas.

<b>Divisão/grupo</b>	<b>Principais pigmentos fotossintéticos</b>	<b>Produto de reserva</b>	<b>Cobertura celular</b>
Choroxybacteria (= Cyanophyta)	Clorofila <i>a</i> *, ficocianina, aloficocianina, $\beta$ - caroteno, xantofilas	Grânulos de cianoficina, amido das cianofíceas (glicogênio)	Peptoglicano
Chlorarachniophyta	Clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , $\beta$ -caroteno, xantofilas	Glicanos $\beta$ 1-3 hidrossolúveis	Presente**
Glaucophyta	Clorofila <i>a</i> , ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina, $\beta$ - caroteno, xantofilas	Amido	Celulose (parte das espécies)
Euglenophyta	Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , $\beta$ - caroteno, outros carotenos, xantofilas	Paramilo	Película formada por bandas proteínáceas espiraladas situada sob a MP <sup>#</sup>
Cryptophyta	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i> , ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, $\alpha$ -e $\beta$ - caroteno, xantofilas	Amido	Periplasto composto de placas proteínáceas e/ou escamas associado à MP <sup>#</sup>
Prymnesiophyta (= Haptophyta)	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i> , $\beta$ - caroteno, xantofilas	Crisolaminarina	Células nuas ou recobertas com escamas de CaCO <sub>3</sub> (cocolitoforídeos)

Fonte: modificado de LOURENÇO (2006).

\*Há pelo menos uma cianobactéria dotada de clorofila *d*: *Acaryochloris marina*.

\*\*A maioria das espécies alterna fases ameboides (sem parede celular) com outras cocoides, cuja composição química da parede celular é desconhecida.

<sup>#</sup> Membrana plasmática.

**Tabela 1.** Características morfológicas, químicas e reprodutivas fundamentais dos principais grupos modernos de algas (*continuação*).

<b>Divisão/grupo</b>	<b>Principais pigmentos fotossintéticos</b>	<b>Produto de reserva</b>	<b>Cobertura celular</b>
Dinophyta (= Pirrhophyta)	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i> , $\beta$ -caroteno, xantofilas	Amido	Placas celulósicas em vesículas abaixo da MP <sup>#</sup> ou células nuas
Ochrophyta (diatomáceas, crisofíceas, etc.)	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i> , $\beta$ -caroteno, xantofilas	Crisolaminarina, lipídeos	Algumas são nuas, outras possuem sílica ou escamas orgânicas; celulose e alginatos estão presentes em alguns grupos
Eustigmatofíceas	Clorofila <i>a</i> , $\beta$ -caroteno, xantofilas	Crisolaminarina	Presente, mas de composição química ainda desconhecida
Rhodophyta	Clorofila <i>a</i> , ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, $\alpha$ -e $\beta$ -caroteno, xantofilas	Amido das florídeas	Celulose, polissacarídeos sulfatados; algumas são calcificadas
Chlorophyta	Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , $\beta$ -caroteno, outros carotenos, xantofilas	Amido	Celulose e outros polímeros, escamas em algumas; algumas espécies são nuas, outras são calcificadas

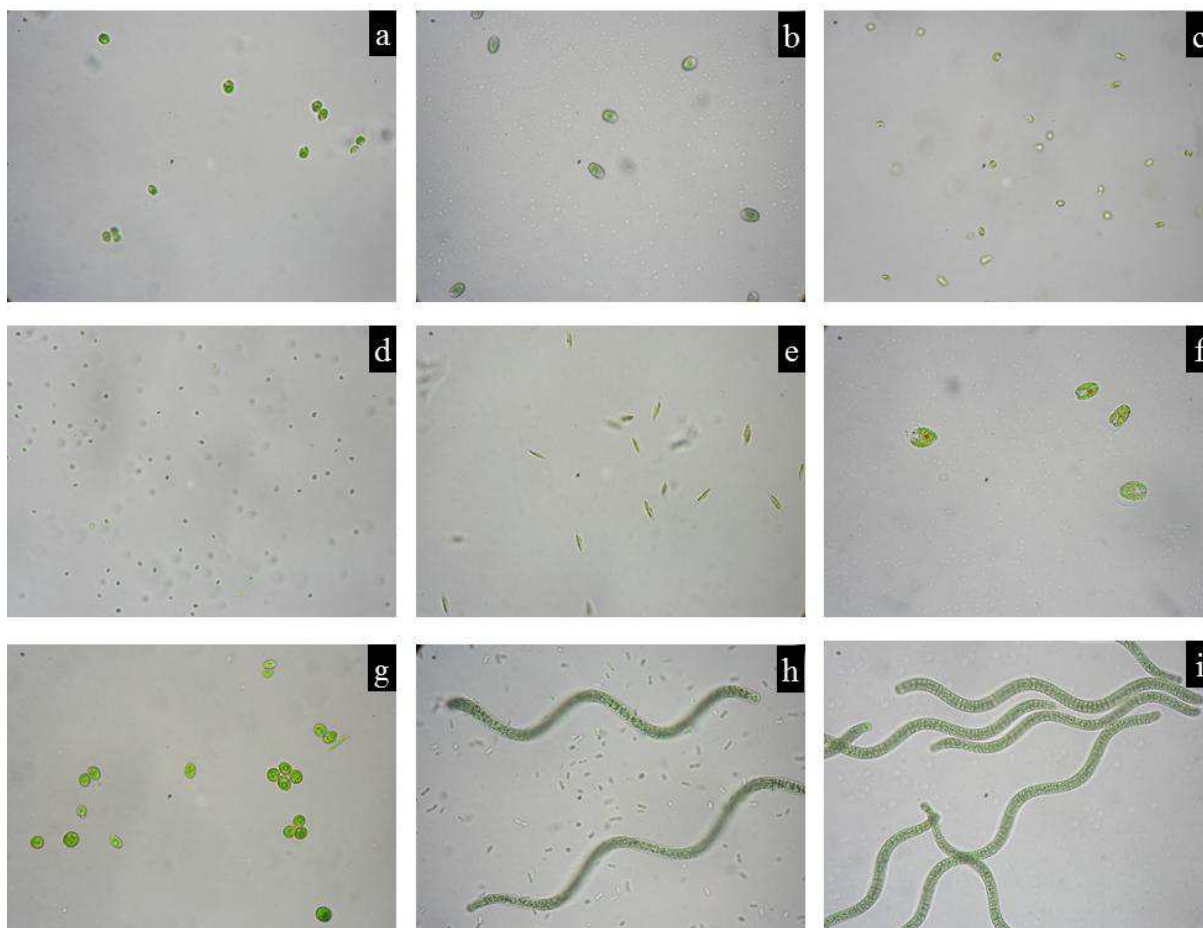
Fonte: modificado de LOURENÇO (2006).

\*Há pelo menos uma cianobactéria dotada de clorofila *d*: *Acaryochloris marina*.

\*\*A maioria das espécies alterna fases ameboides (sem parede celular) com outras cocóides, cuja composição química da parede celular é desconhecida.

<sup>#</sup> Membrana plasmática.

**Figura 1** – Fotos microscópicas de algumas das algas estudadas: (a) *Chlorella vulgaris*, (b) *Dunaliella tertiolecta*, (c) *Isochysis galbana*, (d) *Nannochloropsis oculata*, (e) *Phaeodactylum tricornutum*, (f) *Tetraselmis suecica*, (g) *Scenedesmus obliquus*, (h) *Spirulina platensis* LEB 52 e (i) *Spirulina* sp. LEB 18 (todas com aumento de 400 vezes)



As microalgas são as principais responsáveis pela absorção biológica do CO<sub>2</sub> atmosférico nos oceanos que cobrem 3/4 da superfície do globo terrestre, uma vez que estão presentes em grande número na coluna de água. Uma parte do CO<sub>2</sub> absorvido pelas microalgas é transferida para o fundo oceânico num processo conhecido como "bomba biológica". Este processo, juntamente com a difusão direta do CO<sub>2</sub> para a água, impede que o acúmulo de gases do efeito estufa seja ainda maior (BORGES et al., 2007).

Além de seu rápido crescimento, as microalgas podem ser cultivadas em águas salobra e/ou salgada, liberando o uso de água doce para o consumo humano e agricultura. Além disso, as microalgas apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços e em regiões impróprias para atividades agrícolas (KURANO et al., 1995; BORGES et al., 2007).

Microalgas constituem um recurso biológico enorme, representando uma das fontes mais promissoras para novos produtos e aplicações (PULZ; GROSS, 2004). As aplicações mais simples de microalgas compreendem seu uso na alimentação de animais e homens (SPOLAORE et al., 2006), devido à sua composição química equilibrada. Além disso, elas são cultivadas como uma fonte de moléculas altamente valiosas, tais como ácidos graxos poli-insaturados, pigmentos, antioxidantes, produtos farmacêuticos e outros compostos biologicamente ativos (GOUVEIA et al., 2008). A aplicação de biomassa e/ou metabolitos de microalgas é uma abordagem interessante e inovadora para o desenvolvimento de produtos alimentares mais saudáveis.

As principais microalgas cultivadas comercialmente são: *Spirulina* sp. e *Chlorella* sp. Para a adição em alimentos naturais, usa-se *Dunaliella salina* para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* para a obtenção de astaxantina. Todas possuem uma quantidade alta de proteína, fator determinante para o alto valor nutricional da microalga (SPOLAORE et al., 2006). A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de produtos obtidos a partir de microalgas, sendo que alguns deles são produtos de elevado valor comercial.

Entre os mais de 400 carotenoides conhecidos, poucos são usados comercialmente:  $\beta$ -caroteno, astaxantina e, de menor importância, luteína, zeaxantina, licopeno e bixina. Seus usos mais importantes são como corantes de alimentos naturais (por exemplo, suco de laranja) e como aditivo para a alimentação animal (aves, peixes). Os carotenoides também têm aplicações em cosméticos. A importância nutricional e terapêutica de certos carotenoides é devido, principalmente, à sua capacidade para atuar como provitamina A. Entre as algas produtoras de carotenoides, destaca-se a *Dunaliella salina*, pois o  $\beta$ -caroteno corresponde a 14% da sua massa seca (SPOLAORE et al., 2006).

Os principais produtores comerciais de ficobiliproteínas (isto é, ficoeritrina e ficocianina) são a cianobactéria *Arthrospira* e a alga vermelha *Porphyridium*. O potencial primário destas moléculas parece ser como corantes naturais, mas um aumento do número de investigações tem demonstrado suas propriedades terapêuticas e a ampla gama de aplicações farmacêuticas (SPOLAORE et al., 2006).

Na aquicultura, as microalgas são empregadas como fonte primária de alimento para larvas, juvenis e até de adultos de moluscos, crustáceos e peixes, bem como do zooplâncton, usado como alimento para crustáceos e peixes. Outra função na aquicultura é proporcionar a melhoria da qualidade da água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) e combate a bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas (BORGES et al. 2007).

**Tabela 2** – Alguns produtos obtidos de microalgas e suas aplicações

<b>Produto</b>	<b>Alga</b>	<b>Aplicação</b>
Alimento funcional ( <i>Spirulina</i> )	<i>Spirulina platensis</i>	Suplemento nutricional
Alimento funcional ( <i>Chlorella</i> )	<i>Chlorella</i> spp.	Suplemento nutricional
Alimento funcional ( <i>Dunaliella</i> )	<i>Dunaliella salina</i>	Suplemento nutricional
Alimento animal	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Alimentação animal
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella</i>	Alimentação de peixes
Ácido linoleico	<i>Chlorella</i>	Aditivo alimentar
Ácido linolênico	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i>	Aditivo alimentar
Ácido $\gamma$ -linolênico	<i>Spirulina</i>	Aditivo alimentar
Ácido eicosapentóico	<i>Phaeodactylum</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Chlorella</i>	Uso médico, suplemento nutricional, cosméticos
Ácido docosahexaenóico	<i>Amphiridium</i>	Uso médico, suplemento nutricional, cosméticos
Ácido araquidônico	<i>Porphyridium cruentum</i>	Uso médico, suplemento nutricional, cosméticos

Fonte: modificado e DERNER et al. (2006) e SPOLAORE et al. (2006)

Algumas aplicações mais recentes das microalgas são a biofixação de dióxido de carbono (ROSA et al. 2011; RADMANN et al., 2011) e o uso como matéria-prima para produção de biodiesel (TANG et al., 2011; SLADE; BAUEN, 2013).

Uma alternativa potencialmente atrativa, que é pouco explorada é a utilização de biomassa de microalgas para a obtenção da anidrase carbônica, enzima aplicada em sistemas biológicos de captura de CO<sub>2</sub>. Na maioria destes processos são empregadas enzimas purificadas e/ou oriundas de sangue humano (BOND et al., 2001; MIRJAFARI, ASGHARI, MAHINPEY, 2007; DAVY, 2009; DILMORE et al., 2009; FAVRE, CHRIST, PIERRE, 2009; VINOBA et al., 2012).



O uso de biomassa microalgal para a obtenção da anidrase carbônica contribui para a viabilização de processos de captura biológica de CO<sub>2</sub>. Além disso, a biomassa resultante do processo de extração da enzima pode ser utilizada para outros fins, como produção de ração animal (CHISTI, 2008), reduzindo o custo de obtenção da biomolécula.

## 2.2 Cultivo de microalgas

A cinética de crescimento e a composição das microalgas dependem significativamente das condições de cultivo (CHEN et al., 2001). As microalgas podem assumir vários tipos de metabolismo (por exemplo, autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico) e são capazes de realizar um deslocamento metabólico como uma resposta a alterações das condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2011). A diferença entre cada cultivo está fundamentada na fonte de carbono empregada e na utilização ou não de energia luminosa. A Tabela 3 apresenta um resumo das características principais destes tipos de cultivo.

**Tabela 3** – Comparação das características das diferentes condições de cultivo

<b>Condições de cultivo</b>	<b>Fonte de energia</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Densidade celular</b>	<b>Problemas associados ao aumento de escala</b>
Fotoautotrófico (Autotrófico)	Luz	Inorgânica	Baixa	Baixa densidade celular
Heterotrófico	Orgânica	Orgânica	Alta	Contaminação e alto custo do substrato
Mixotrófico	Luz e orgânica	Inorgânica e orgânica	Média	Contaminação, alto custo do substrato e de equipamento
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânica	Média	Contaminação, alto custo do substrato e de equipamento

Fonte: modificado de CHEN et al. (2011)

Nos cultivos autotróficos, há o emprego de luz como exclusiva fonte de energia, para a fixação do CO<sub>2</sub> e liberação de O<sub>2</sub>. Neste tipo de cultivo são menores os problemas com contaminação. Já nos heterotróficos, não há utilização de luz, mas há o emprego de compostos orgânicos como fonte de carbono para a biossíntese e energia (CHEN et al., 2011).

O cultivo mixotrófico utiliza, simultaneamente, uma fonte luminosa e um substrato orgânico e inorgânico como fonte de carbono. Isso significa que a microalga é capaz de viver sob condições autotróficas ou heterotróficas, ou ambas. A microalga assimila compostos orgânicos e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono, e o CO<sub>2</sub> liberado pela alga através da respiração será utilizado sob condições autotróficas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2011). Quando a microalga necessita de energia luminosa para utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono, o cultivo é chamado de fotoheterotrófico (CHEN et al., 2011).

Apesar do aumento da concentração de biomassa e de produtividade em cultivos heterotróficos, o mesmo possui pouca aplicação industrial, devido algumas desvantagens como maior contaminação, limitado número de espécies disponíveis, inibição do crescimento em substratos com baixas concentrações de compostos orgânicos e incapacidade de produzir produtos induzidos pela presença de luz, como pigmentos (CERÓN GARCÍA et al., 2000). Já os cultivos mixotróficos apresentam elevada produção de clorofilas, carotenoides e ácidos graxos, quando comparados aos cultivos autotróficos (CERÓN GARCÍA et al., 2005).

Micro-organismos fotossintéticos podem ser cultivados em fotobiorreatores abertos ou fechados. Os sistemas fechados são caracterizados por elevadas eficiências fotossintéticas associados a um preciso controle das variáveis operacionais, com destaque para um menor risco de contaminação e minimização das perdas de água por evaporação, que são muito significantes em sistemas abertos. Por outro lado, a construção dos sistemas fechados possui custo mais elevado, uma vez que necessitam de materiais transparentes, são mais complexos operacionalmente e são de difícil escalonamento. A razão entre o volume por unidade de área é outro critério a ser considerado na escolha dos sistemas, uma vez que a implementação de sistemas abertos requer grandes áreas disponíveis para elevados volumes reacionais (BOROWITZKA, 1999).

Muitos avanços surgiram no projeto e operação de fotobiorreatores. Têm-se duas configurações básicas, que são os fotobiorreatores de placa plana e os tubulares. O princípio fundamental destas configurações é reduzir a trajetória da luz de forma a aumentar a quantidade de luz disponível para cada célula da cultura. Estes biorreatores possuem uma adequada agitação para permitir uma disponibilização melhor da luz, bem como aumentar as trocas gasosas (BOROWITZKA, 1999).

Como qualquer outro micro-organismo, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas

metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (DERNER et al., 2006)

O dióxido de carbono é a fonte de carbono para o crescimento fotossintético e autotrófico de algas. O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para algas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (LOURENÇO, 2006).

O nitrogênio é um dos principais macroelementos para o desenvolvimento microalgal, constituindo as proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. Desta forma, quando o suprimento de nitrogênio é abundante, verifica-se uma tendência no aumento das concentrações de proteínas e clorofila (LOURENÇO, 2006).

A temperatura é talvez um dos mais importantes fatores ambientais que influenciam a taxa de crescimento das algas, o tamanho da célula, composição bioquímica e exigências nutricionais. Outro fator importante, também, para o cultivo de algas é o pH, uma vez que o mesmo determina a solubilidade e disponibilidade de CO<sub>2</sub> e de nutrientes essenciais, possuindo um impacto significativo sobre o metabolismo das algas. Devido à absorção de carbono inorgânico pelas algas, o pH pode subir significativamente durante o cultivo (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013).

### **2.3 Enzima anidrase carbônica**

A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima, que contém um átomo de zinco na sua conformação, e catalisa a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato com alta eficiência:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  (SHEKH et al., 2012). Por ser produzida por uma variedade de tecidos, a anidrase carbônica desempenha um papel importante em muitas funções fisiológicas que envolvem reações de carboxilação e descarboxilação, incluindo a fotossíntese, respiração (HENRY, 1996), equilíbrio ácido-básico, transporte de íons e de dióxido de carbono, reabsorção óssea, ureagênese, gluconeogênese, lipogênese, geração de fluidos corporais (BAYRAM et al., 2008), calcificação (SMITH; FERRY, 2000), formação de humor aquoso (CENTOFANTI et al., 1997) e também participa do transporte de carbono inorgânico (C<sub>i</sub>) (HENRY, 1996).

A anidrase carbônica (AC) tem a capacidade de catalisar a hidratação de 600.000 moléculas de dióxido de carbono por molécula de AC por segundo. São consideradas como as

enzimas mais rápidas que se tem conhecimento. A isoenzima HCA II do corpo humano pode catalisar  $1,4 \times 10^6$  moléculas de  $\text{CO}_2$  por segundo. A anidrase carbônica pode fixar grandes quantidades de  $\text{CO}_2$  em  $\text{CaCO}_3$  em presença de cátions e valores de pH adequados (SHEKH et al., 2012; KANTH; PACK, 2013). Pode realizar, também, a extração de  $\text{CO}_2$  do ar diluído em uma concentração inferior a 0,04 % (YAN Et al., 2007).

A anidrase carbônica (AC) foi primeiramente descoberta em eritrócitos de vertebrados (MELDRUM; ROUGHTON, 1933; STADIE; O'BRIEN, 1933), mas desde então tem sido encontrada em muitos organismos, incluindo animais, plantas, arqueobactérias, algas e eubactérias (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996).

É uma enzima amplamente distribuída na natureza e é expressa em eucariotos (por exemplo, animais e plantas), eubactérias e no domínio Archaea. É dividida em pelo menos três classes: (i)  $\alpha$ -ACs encontrada em animais (todas as ACs de mamíferos pertencem a esta classe), plantas, eubactérias, e vírus; (ii)  $\beta$ -ACs encontradas plantas, bactérias e animais; e (iii)  $\gamma$ -ACs encontradas em bactérias e plantas (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996). Existem três outras classes de possíveis:  $\delta$ -AC encontrada na diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, que é possivelmente um homólogo da  $\alpha$ -AC;  $\epsilon$ -ACs encontradas em bactérias, que provavelmente representam uma subclasse da  $\beta$ -CA; e  $\zeta$ -ACs encontradas em diatomáceas que requerem cádmio no lugar do zinco (KAUL et al., 2011). A Tabela 4 apresenta um resumo das três principais classes.

As três famílias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) não possuem uma sequência significativa de identidade, parecem ter evoluído de forma independente e são um exemplo de evolução convergente da função catalítica (HEWETT-EMMETT E TASHIAN, 1996). Embora as sequências primárias dessas famílias de AC sejam diferentes, os sítios ativos destes três tipos de anidrase carbônica contem  $\text{Zn}^{2+}$  e todos eles utilizam um mecanismo catalítico de dois passos, chamado também de mecanismo de catálise “Zn-hidróxido” (LINDSKOG, 1997). A anidrase carbônica apresenta algumas estruturas helicoidais, sendo a estrutura dominante a folha beta pregueada que se estende por toda a molécula (SARRAF et al., 2004).

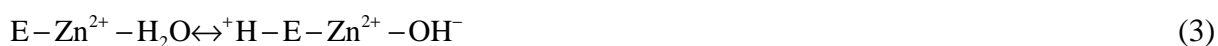
**Tabela 4** – Resumo das diferentes famílias de anidrase carbônica

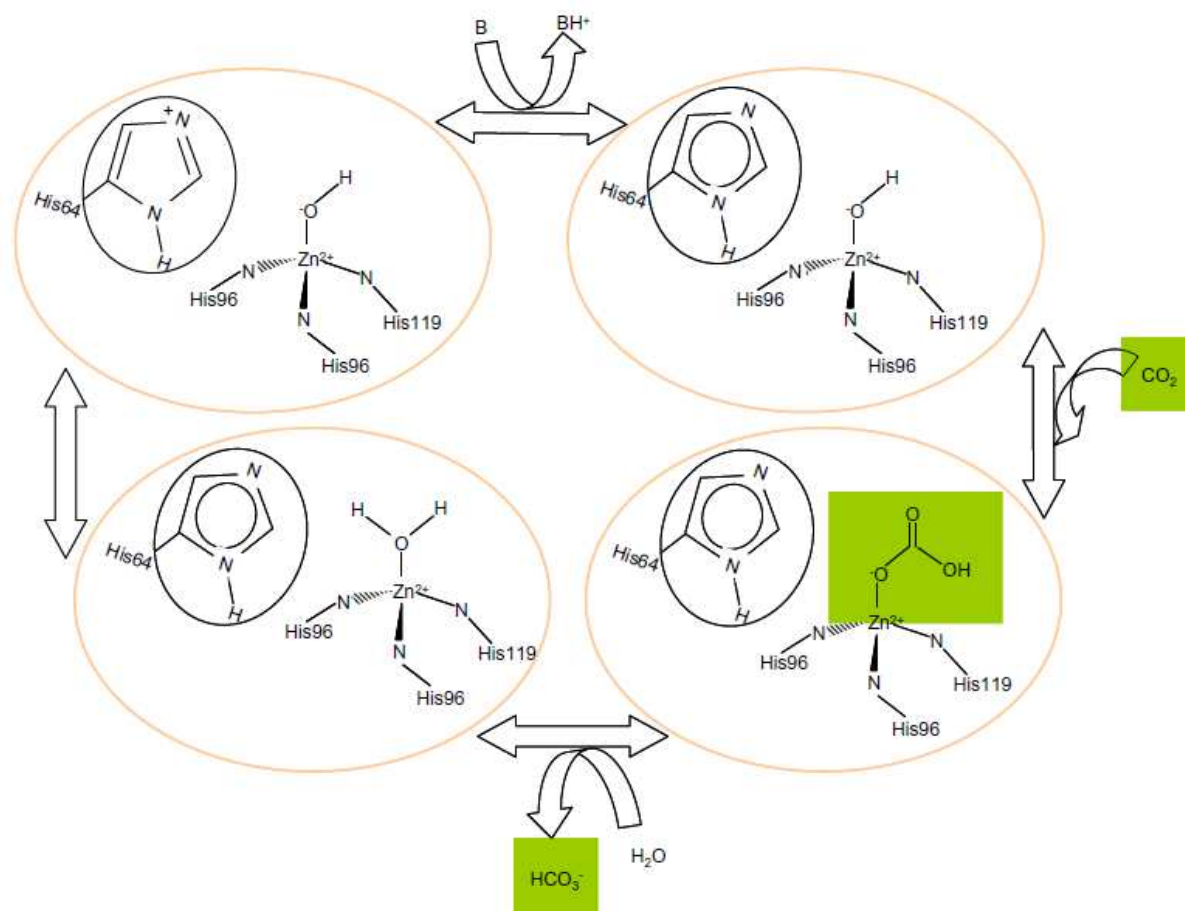
Família	Distribuição	Inibição	Coordenação com o Zn no sítio ativo
$\alpha$	Vertebrados, algas, eubactérias, plantas e vírus.	Altamente sensíveis às sulfonamidas.	Três resíduos de histidina*
$\beta$	Algas, plantas, eubactérias, fungos, invertebrados e arqueobactérias.	Menos suscetível às sulfonamidas.	Dois resíduos de cisteína e um resíduo de histidina.
$\gamma$	Arqueobactérias, as cianobactérias, algas e plantas.	Altamente sensíveis às sulfonamidas.	Três resíduos de histidina**

Fonte: adaptado de Hewett-Emmett e Tashian (1996)

\*resíduos de histidina são fornecidos pela mesma subunidade; \*\*resíduos de histidina são fornecidos por duas subunidades diferentes.

O grupo cataliticamente ativo é a água ligada ao íon Zn, que pode ser ionizada a um íon hidróxido. De acordo com o mecanismo proposto, a reação enzimática catalisada ocorre em duas etapas distintas. A primeira semi-reação é a interconversão entre  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  (Equações 1 e 2) (onde E=enzima e B=tampão). A segunda semi-reação é a regeneração da forma ativa da enzima (Equações 3 e 4) (SMITH; FERRY, 2000; LINDSKOG, 1997). A etapa limitante da velocidade é a transferência intramolecular de prótons da molécula de zinco ligada à água para a His-64, que serve como um transportador de prótons entre o centro metálico e as moléculas do tampão no meio de reação (LINDSKOG, 1997). A Figura 2 apresenta em esquema do mecanismo da anidrase carbônica durante a reação de hidratação do  $\text{CO}_2$ .



**Figura 2** – Esquema do mecanismo catalítico da anidrase carbônica

Fonte: RUSSO et al. (2013)

As reações de hidratação e desidratação não-catalisadas são lentas, enquanto as reações de dissociação são consideradas instantâneas. A AC acelera a hidratação do  $\text{CO}_2$  dissolvido na solução e aumenta a taxa na qual as diferentes formas de  $\text{C}_i$  (carbono inorgânico) em solução são interconvertidas. O equilíbrio entre as formas de  $\text{C}_i$  é dependente do pH. Em condições de força iônica fisiológica, se o pH é inferior à primeira constante de dissociação ( $\text{p}K_1 \approx 6,4$ ), o  $\text{CO}_2$  predomina; se o pH é entre 6,4 e aproximadamente 10,3 ( $\text{p}K_2$ ), o  $\text{HCO}_3^-$  predomina; enquanto que em pH acima de 10,3, o  $\text{CO}_3^{2-}$  predomina (MORONEY; BARTLETT; SAMUELSSON, 2001).

As ACs da família  $\alpha$  são as mais estudadas e encontram-se amplamente distribuídas. As  $\alpha$ -ACs têm sido encontradas em animais, plantas, algas, eubactérias e vírus, e foram identificadas pela primeira vez em células vermelhas do sangue. As  $\alpha$ -ACs de vertebrados podem ser classificadas em dois grupos, segundo Jiang e Gupta (1999). Um grupo inclui as isoformas solúveis como a CAI, CAII, CAIII, CAIV, CAIX, CAXII e CAXIV.

O segundo grupo inclui as encontradas associadas à membrana, como a CAIV, CAVI, CAIX, CAXII, CAXIV e CAXVI. Os humanos contem 11 isoenzimas, incluindo as citoplasmáticas (CAI, CAII, CAIII e CAVII), mitocondriais (CAV<sub>A</sub> e CAV<sub>B</sub>), secretadas (CAVI) e associadas à membrana (CAIV, CAIX, CAXII e CAXIV). A faixa de variação de atividades específicas destas isoenzimas é bastante grande, com a CAII apresentando o maior valor, 2000-3000 WAU/mg (Wilbur e Anderson unit/mg), e a CAIII o menor valor, 1-5 WAU/mg.

Em organismos fotossintéticos poucas  $\alpha$ -ACs foram identificadas até o momento. Uma foi identificada em cada uma das cianobactérias *Anabaena* e *Synechococcus* (SOLTES-RAK et al., 1997), e em ambos os casos a anidrase carbônica está localizada no espaço periplasmático. As algas verdes (KARLSSON et al., 1998) e a *Dunaliella salina* possuem três e duas  $\alpha$ -ACs, respectivamente. As ACs da *D. salina* estão localizadas no periplasma (FISHER et al., 1996). Na *Chlamydomonas reinhardtii*, duas das  $\alpha$ -ACs estão localizados no periplasma e uma no lúmen do tilacoide (FUKUZAWA et al., 1990).

$\beta$ -ACs foram as primeiras ACs a serem reconhecidas em organismos fotossintéticos (FAWCETT et al., 1990; BURNELL; GIBBS; MASON, 1990). Uma vez reconhecida,  $\beta$ -ACs foram encontradas em plantas superiores, algas, eubactérias (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996), arqueobactérias (SMITH; FERRY, 1999), em fungos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pombe* (GÖTZ; GNANN; ZIMMERMANN, 1999), *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, mas não em vertebrados. Pode estar localizada no estroma dos cloroplastos, onde é altamente ativa, no citoplasma e cloroplasto de plantas superiores e no citoplasma da alga simbiótica *Coccomyxa* (HILTONEN et al., 1998).

O terceiro tipo de AC, a  $\gamma$ -AC, foi descoberto na archaeobacteria *Methanosarcina thermophila* (ALBER; FERRY, 1994). Genes da  $\gamma$ -AC são encontrados em eubactérias e plantas (NEWMAN et al., 1994). Um homólogo foi descoberto, também, no *Synechococcus* PCC7942 (PRICE et al., 1993).

De uma forma geral, as isoenzimas da anidrase carbônica nas cianobactérias podem ser encontradas nos carboxissomos, enquanto que nas microalgas eucarióticas podem ser encontradas nos cloroplastos, citosol e espaço periplasmático (MORONEY; SOMANCHI, 1999).

## 2.4 Captura e sequestro de dióxido de carbono

O aquecimento global é resultante do aumento das concentrações atmosféricas de dióxido de carbono, nitrogênio e enxofre, óxidos, metano e outros gases de efeito estufa (GHG, do inglês *greenhouse gas*). O aumento das concentrações destes gases aumentará a

temperatura média da superfície do planeta em até 6 °C durante o século 21. Os prováveis efeitos do aumento da temperatura da superfície terrestre incluem: (a) mudança na distribuição e quantidade de precipitações, (b) impacto na produção de alimentos, (c) derretimento acelerado das calotas polares, (d) aumento do nível dos oceanos e (e) extinção acelerada de espécies (BILANOVIC et al., 2009).

O primeiro estudo detalhado e quantitativo sobre o efeito estufa do dióxido de carbono foi realizado há pouco mais de cem anos por Svante Arrhenius, Nobel de Química Arrhenius (1896). Desde então um grande número de trabalhos foram realizados sobre o aquecimento global, culminando recentemente no Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas, IPCC (do inglês *Intergovernmental Panel on Climate Change*).

As maiores fontes de poluição são a queima de combustível fóssil para geração de energia e transporte, a queima de combustível sólido para aquecimento e a queima de florestas e pastagens. O último subproduto de todas essas queimas é o gás incolor dióxido de carbono (IPCC, 2007). O mesmo tem sido reportado atualmente como o maior contribuinte para o efeito estufa (FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009). O aumento contínuo da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera tem sido extensivamente documentado (RAMANATHAN; FENG, 2009). Sua concentração aumentou de 280 ppm em 1850 (revolução industrial) (IPCC, 2007; WMO, 2010) para 398 ppm em fevereiro de 2014, e atualmente vem aumentando a uma taxa de 2,07 ppm/ano (NOAA, 2014).

Muitos países e regiões ao redor do mundo estabeleceram metas para redução de CO<sub>2</sub>, a fim de cumprir os objetivos de sustentabilidade previstos no Protocolo de Kyoto. Atualmente, várias opções estão sendo estudadas e implementadas, com diferentes graus de sucesso, e em diferentes fases de estudo e implementação. Alguns exemplos são energia solar, térmica ou fotovoltaica, hidrelétrica, eólica, geotérmica, biocombustíveis, sequestro de carbono, entre outros. Cada alternativa possui vantagens e problemas, e a escolha da melhor opção irá depender da área de aplicação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Com o objetivo de reduzir os gases de efeito estufa, várias estratégias de mitigação de CO<sub>2</sub> têm sido investigadas, que podem geralmente ser classificadas em duas categorias: (i) abordagens baseadas em reações químicas e (ii) mitigação biológica do CO<sub>2</sub> (WANG et al., 2008).

As tecnologias de mitigação biológica são baseadas em reações naturais do CO<sub>2</sub> nos organismos vivos (FIGUEROA et al., 2008). Nesse sentido, destacam-se a utilização de sistemas de captura enzimática utilizando a anidrase carbônica (AC) livre ou imobilizada (BOND et al., 2001; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007; DAVY, 2009;



DILMORE et al., 2009; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; ORES et al., 2012) e a fixação de CO<sub>2</sub> por microalgas (FULKE et al., 2013; KUMAR et al., 2011; RADMANN et al., 2011; WANG et al., 2008).

Nos processos enzimáticos de captura de CO<sub>2</sub>, ocorre primeiramente a hidratação do CO<sub>2</sub>, catalisada pela enzima, e posterior fixação na forma de minerais de carbonato. O sequestro baseado na fixação química de CO<sub>2</sub> na forma de minerais de carbonato, como a calcita, magnesita e dolomita, apresenta-se como um método seguro e permanente de eliminação de CO<sub>2</sub>. Os mesmos são abundantes na natureza e são ambientalmente seguros e estáveis (MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007). A utilização da anidrase carbônica para tal propósito se constitui em uma alternativa limpa e viável com o benefício adicional da formação de carbonatos que podem ser utilizados em plantas de tratamento de efluentes para correção de pH e tamponamento do meio.

A fixação biológica se baseia na utilização do CO<sub>2</sub> por plantas e micro-organismos fotossintéticos para produção de biomassa e energia através da fotossíntese (MORAIS; COSTA, 2007), sendo que as microalgas possuem a capacidade de fixar CO<sub>2</sub> com maior eficiência quando comparadas às plantas (LI et al., 2008). No entanto, os gases de combustão emitidos pelas indústrias, além de altas concentrações de CO<sub>2</sub>, apresentam concomitantemente óxidos de enxofre e nitrogênio, compostos orgânicos voláteis e materiais particulados que podem ser tóxicos ao crescimento das algas por inibição direta ou por induzir a redução do pH (BRILMAN; ALBA; VENEMAN, 2013). Além disso, são necessárias grandes áreas para o cultivo, o que não ocorre quando se trata de sistemas de captura enzimática. Neste caso, a enzima pode ainda ser utilizada na forma imobilizada, aumentando sua estabilidade e possibilitando, também, o reuso. Outras vantagens do emprego da anidrase carbônica que merecem destaque são seu alto número de *turnover*, alta meia vida (FIGUEROA et al., 2008) e manutenção da atividade ao longo de uma ampla faixa de temperatura e pH (DILMORE et al., 2009).

Nos sistemas de captura enzimática, até o momento, são empregadas preparações enzimáticas altamente purificadas e de fontes de difícil ampliação de escala, como o sangue humano (BOND et al., 2001; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007; DILMORE et al., 2009; DAVY, 2009; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; VINOBA et al., 2012), o que aumenta o custo do processo. No entanto, existem estudos que se aplicam a enzima obtida a partir de bactérias (SHARMA et al., 2008; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; SHARMA; BHATTACHARYA; SHRIVASTAVA, 2011) e,

mais recentemente, extraída de eritrócito bovino (ORES et al., 2012) e da microalga *Chlorella vulgaris* (LI et al., 2012).

## 2.5 Produção de anidrase carbônica em microalgas

A função primária de AC em algas, tal como em plantas superiores, é aumentar a concentração de dióxido de carbono em torno da enzima fotossintética ribulose-bisfosfato carboxilase (Rubisco). As microalgas e cianobactérias vivem num meio aquoso em que a concentração de dióxido de carbono em torno das células é significativamente menor do que em plantas aéreas. A fim de manter altas taxas de fotossíntese estes organismos desenvolveram um mecanismo de concentração de carbono (CCM – do inglês *carbon concentrating mechanism*), que funciona para aumentar a concentração de dióxido de carbono intracelular para um nível muito superior ao presente no meio ambiente circundante. O dióxido de carbono é usado pela Rubisco para iniciar a primeira reação no ciclo de Calvin, a carboxilação da ribulose-bifosfato. O sistema de transporte de carbono inorgânico ( $C_i$ ) e AC são fundamentais para o funcionamento do CCM (BADGER; PRICE, 1989; BADGER; PRICE, 1992; VAN HILLE et al., 2003).

As cianobactérias são estruturalmente diferentes das algas eucariotas, com a ausência de cloroplastos. Neste caso, os pigmentos fotossintéticos são concentrados em carboxissomos. Assim o mecanismo é um pouco diferente nestes organismos (BADGER; PRICE, 1989; VAN HILLE et al., 2003).

O mecanismo pelo qual ocorre o transporte de  $C_i$  em cianobactérias ainda não é bem compreendido. Vários métodos têm sido utilizados para tentar discriminar entre o transporte de  $CO_2$  e  $HCO_3^-$ , porém, de uma forma geral, existe uma ideia que indica que ambas as espécies de carbono podem ser usadas como substrato. O transporte de  $CO_2$  é, no entanto, considerado constitutivo, e a capacidade de acumular  $HCO_3^-$  parece ser induzida em resposta às baixas concentrações externas de  $CO_2$ . Independentemente da espécie, é o íon  $HCO_3^-$  que é entregue no interior do citosol. O  $HCO_3^-$  acumulado internamente penetra nos carboxissomos, que contêm a maior parte de Rubisco da célula. ACs localizadas especificamente nos carboxissomos geram o  $CO_2$  ao redor da Rubisco (BADGER; PRICE, 1992; AL-MOGHRABI et al., 1996; VAN HILLE et al., 2003).

Kupriyanova et al. (2011), relata ainda a existência da anidrase carbônica extracelular (ligada à membrana). O íon bicarbonato, que é a principal forma de  $C_i$  externo em lagos alcalinos, é capturado pelas células com participação da AC extracelular. Segundo o mesmo autor, a AC extracelular seria responsável, ainda, por evitar a fuga do  $CO_2$  das células

por sua rápida conversão para  $\text{HCO}_3^{-1}$  no espaço periplasmático e camada pericelular. O  $\text{HCO}_3^{-1}$  é, então, transportado através da membrana de volta para dentro da célula por transportadores de carbono.

De uma forma geral, a enzima é induzida por baixos níveis de  $\text{CO}_2$  dissolvido e luz (BADGER; PRICE, 1989; BADGER; PRICE, 1992; VAN HILLE et al., 2003). Segundo Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003), a alcalinização do meio também induz a produção da enzima, como um mecanismo para aumentar a concentração de  $\text{CO}_2$  ao redor da Rubisco, pois, em pH alcalino ocorre uma predominância de carbono na forma do íon bicarbonato.

Quando se almeja produtos biotecnológicos é essencial o conhecimento a respeito do perfil de produção dos mesmos. Esse tipo de informação permite obter o período de máxima produtividade da biomolécula de interesse. Com relação à produção da anidrase carbônica ao longo do cultivo de microalgas, ainda são escassos os estudos encontrados na literatura.

Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003) e Rigobello-Masini, Masini e Aidar (2006) avaliaram o perfil da anidrase carbônica e da nitrato redutase ao longo do cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis* para compreender melhor o mecanismo de fotossíntese desta alga em diferentes condições de aeração. Os autores verificaram que com a alcalinização do meio e o decréscimo da concentração de carbono inorgânico, houve um aumento da atividade da anidrase carbônica externa (enzima ligada à membrana – ensaios de atividade realizados com a célula inteira) e total (ensaios realizados com o extrato enzimático – célula rompida).

Li et al. (2012) acompanharam a produção da enzima durante 5 dias de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, sendo o objetivo maior do trabalho a caracterização da enzima. A microalga apresentou atividades específicas altas nos primeiros dias, decaindo no quarto e quinto dias de cultivo. Os autores verificaram, também, que a enzima extraída da microalga possui a capacidade de induzir a precipitação do  $\text{CO}_2$  na forma de  $\text{CaCO}_3$ .

## **2.6 Ficobiliproteínas**

Ficobiliproteínas são complexos pigmento-proteína, hidrossolúveis, envolvidos na captação de luz, covalentemente ligadas com grupos cromóforos e muito fluorescentes, encontradas em cianobactérias (algas verdes-azuis), em uma classe de algas eucarióticas (Criptomonados) e em rodófitas (algas vermelhas) (ABALDE et al., 1998). A maior parte da energia luminosa usada por alguns organismos fotossintéticos é obtida por pigmentos acessórios, como as ficobiliproteínas, porque a clorofila absorve energia luminosa somente

em uma região limitada do espectro solar (REIS et al., 1998). As ficobiliproteínas podem representar mais de 60% do conteúdo de proteínas solúveis (VISKARI; COLYER, 2003)

De acordo com a presença de diferentes grupos cromóforos, as ficobiliproteínas são classificadas em quatro grupos (DUCRET et al., 1998; SUN; WANG, 2003): ficoeritrinas (FE;  $\lambda_{\text{máx}} = 490 - 570 \text{ nm}$ ), ficocianinas (FC;  $\lambda_{\text{máx}} = 590 - 652 \text{ nm}$ ), ficoeritrocianinas (FEC;  $\lambda_{\text{máx}} = 560 - 600 \text{ nm}$ ) e aloficocianina (AFC;  $\lambda_{\text{máx}} = 650 - 665$ ). Quanto à coloração, as ficoeritrinas aparecem com coloração vermelho rosada, as ficocianinas são azul escuro e as aloficocianina possuem coloração azul esverdeada (VISKARI; COLYER, 2002)

Os prefixos das ficobiliproteínas foram inicialmente propostos para distinguir a sua origem taxonômica (R- algas vermelhas, C- cianobactérias). No entanto, após a descoberta de dois espectros de ficoeritrina ligeiramente diferentes em algas vermelhas da ordem Bangiales, B-ficoeritrina e b-ficoeritrina, a nomenclatura “R” para algas vermelhas não seria mais válido. Consequentemente, estes prefixos não mais se referem ao tipo de organismos de origem, mas as suas características espectrais específicas (MARSAC, 2003).

As principais ficobiliproteínas são ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina (VISKARI; COLYER, 2002). Em cianobactérias a ficocianina está presente em maior proporção, e nas algas vermelhas a ficoeritrina, enquanto o conteúdo da aloficocianina é muito menor em ambas as espécies (SU et al., 2010). Estão localizadas dentro de estruturas subcelulares de cianobactérias chamadas de ficobilissomos, onde se encontram organizadas de modo a maximizar a transferência ressonante de energia por fluorescência. Essa transferência ocorre da FE para a FC, desta para a AFC e finalmente da AFC para o centro de reação fotossintético (clorofila a) (VISKARI; COLYER, 2002).

O grande interesse nestas biomoléculas está na aplicação como corantes naturais. Quando purificadas, as ficobiliproteínas podem ser aplicadas como corante em alimentos (C-ficocianina) e cosméticos (C-ficocianina e R-ficoeritrina). A C-ficocianina oriunda de *Spirulina* é utilizada como corante natural em goma de mascar, produtos lácteos e geleias (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

Os corantes empregam um papel especial nos alimentos que irão ser consumidos. Sendo as crianças os principais consumidores de alimentos e guloseimas artificialmente coloridos, o crescimento da consciência da importância de corantes naturais, especialmente de alimentos e cosméticos, tem ocupado uma grande demanda de fontes naturais e biológicas de corantes (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Dentro deste contexto, espécies do gênero *Spirulina* são fontes não dispendiosas de ficobiliproteínas (MINKOVA et al., 2003),

além de possuir certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*), permitindo seu uso em alimentos.

Em sua forma purificada, a C-ficocianina (C-FC) possui, também, atividade antioxidante contra radicais hidroxil (ESTRADA; BESCOS; DEL FRESNO, 2001), radicais peróxidos (BHAT; MADYASTHA, 2000) e radicais DPPH (GANTAR et al., 2012), e tem sido utilizada como agente anti-tumoral e anti-inflamatório (REDDY et al., 2003), pela sua capacidade hepatoprotetora (NAGARAJ et al., 2012) e pelo potencial contra diabetes (OU et al., 2013) e hipertensão (ICHIMURA et al., 2013).

A aloficocianina é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas como marcador fluorescente (SHAPIRO et al., 1983; YEH et al., 1987). Além disso, vários estudos têm relatado que a aloficocianina possui propriedade hepatoprotetora, antioxidante, de eliminação de radicais, antiartrítica, propriedades anti-inflamatórias (REDDY et al., 2003; ROMAY et al., 1998) e atividade anti-enterovirus (SHIH et al., 2003). Apesar de sua ampla aplicação, a aloficocianina continua a ser a ficobiliproteína menos estudada devido ao seu baixo rendimento e à falta de métodos eficazes de purificação (FAN et al. 2012). Estudos de purificação de ficobiliproteínas geralmente focam na obtenção de ficoeritrina ou ficocianina, que estão presentes em maior quantidade em cianobactérias ou algas vermelhas (SU et al., 2010). Uma forma de melhorar o baixo rendimento de extração de aloficocianina é o aperfeiçoamento do processo de ruptura celular.

## **2.7 Produção de ficobiliproteínas em cianobactérias**

Na literatura são encontrados diversos trabalhos de extração e purificação de ficobiliproteínas, mas poucos estudos avaliam a produção destes pigmentos ao longo do cultivo de microalgas.

Saleh, Dharb e Singh (2011) realizaram um comparativo dos perfis de pigmentos de diferentes cepas de *Spirulina* ao longo de 25 dias de cultivo. Os autores avaliaram a produção das ficobiliproteínas, carotenoides e  $\beta$ -caroteno. Maiores produções de C-ficocianina e aloficocianina são obtidas entre o 15º e 20º dias de cultivo. As máximas concentrações obtidas pelos autores foram 82, 9  $\mu\text{g/mL}$  de C-ficocianina e 62, 3  $\mu\text{g/mL}$  de aloficocianina.

Chen et al. (2013) avaliaram a fixação de  $\text{CO}_2$  e a produção de C-ficocianina pela *Spirulina platensis* durante 10 dias de cultivo. Os autores verificaram que uma maior produtividade de C-ficocianina é alcançada entre o 3º e o 4º dias de cultivo.

## 2.8 Extração de biomoléculas intracelulares

O aumento na demanda por produtos intracelulares, como proteínas e enzimas, pelas indústrias alimentícia e farmacêutica, tem evidenciado a importância dos processos de rompimento celular. Os critérios utilizados para a seleção da técnica de ruptura celular devem considerar alguns fatores como: tamanho da célula, tolerância a tensões de cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, tempo de operação, rendimento do processo, gasto de energia, custo e capital de investimento (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Microalgas podem ser utilizadas para a produção de um grande número de bioativos de alto valor agregado. A produção comercial de metabólitos intracelulares de microalgas requer as seguintes etapas: (1) a produção em larga escala de biomassa da microalga apropriada; (2) recuperação da biomassa a partir de um cultivo relativamente diluído; (3) extração do metabólito a partir da biomassa; e (4) purificação do extrato bruto (GRIMA et al., 2003).

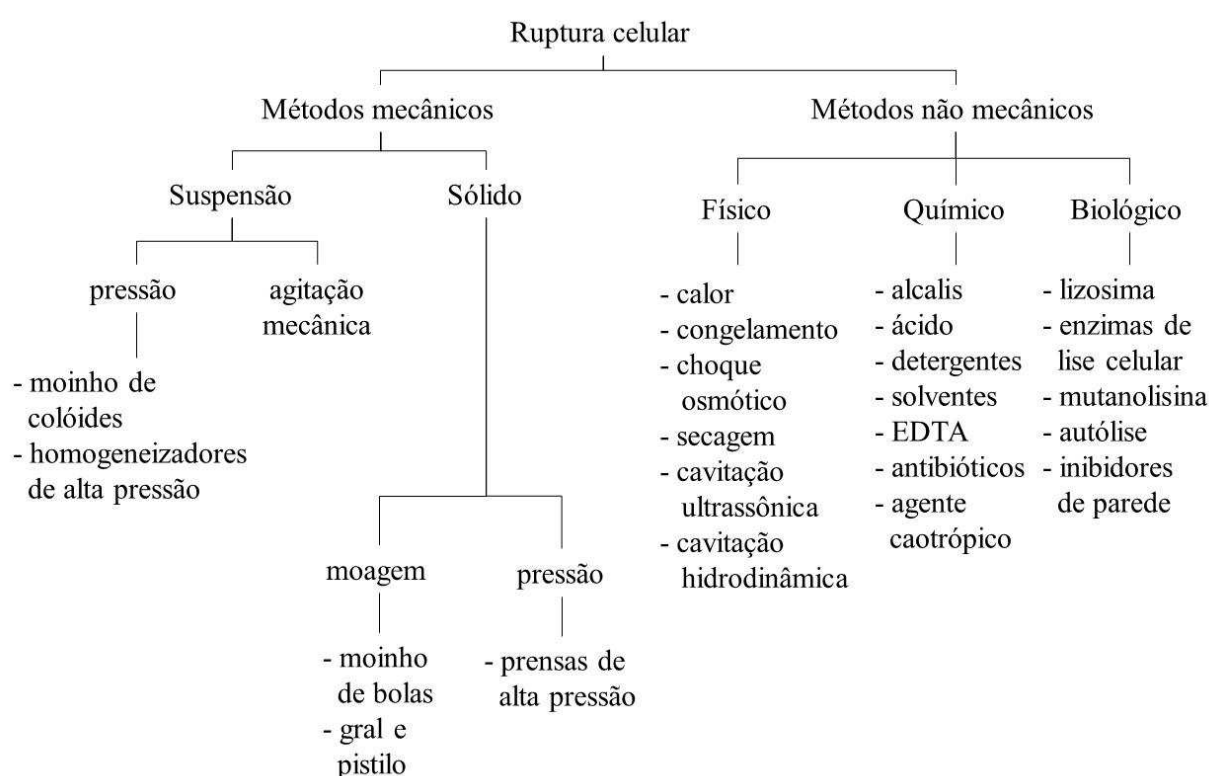
Diferentes métodos podem ser empregados para a extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos micro-organismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse (FARCADE, HARRISON, PANDIT, 2005).

Não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente, porém, para qualquer proteína, é possível escolher uma sequência de etapas de separação que, dependendo da pureza desejada, podem resultar em aumento do custo e redução da produção (LIMA et al., 2002). Técnicas baseadas no uso de pressão osmótica, condições abrasivas, tratamento químico, tratamento enzimático, secagem, congelamento-descongelamento e tratamento ultrassônico, podem ser utilizadas para ruptura celular (MORAES et al., 2011a).

O rompimento celular pode ser conseguido por uma variedade de técnicas, e os métodos disponíveis podem ser classificados de um modo geral em métodos mecânicos e não mecânicos (Figura 3). Os métodos mecânicos também podem ser combinados com os métodos não mecânicos para aumentar a eficiência global da ruptura celular. Os métodos mecânicos incluem moinhos de bola, homogeneizadores de alta pressão e a cavitação. A cavitação pode ser ainda gerada através de sonicação, homogeneizadores ultrassônicos e reatores de cavitação hidrodinâmica. Os métodos não-mecânicos incluem tratamentos químicos, enzimáticos, calor, soluções alcalinas, choque osmótico, ciclos de congelamento/descongelamento (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

Embora uma variedade de técnicas esteja disponível para a extração de produtos intracelulares, os métodos mecânicos têm encontrado maior aplicação comercial em comparação com os métodos não mecânicos, pois os últimos possuem limitações operacionais e econômicas quando aplicados em larga escala. Os moinhos de bolas e homogeneizadores de alta pressão tendem a ser utilizados em larga escala para ruptura de células microbianas, ao passo que outros métodos mecânicos e não mecânicos são predominantemente utilizados na escala laboratorial (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

**Figura 3** – Classificação das técnicas ruptura celular



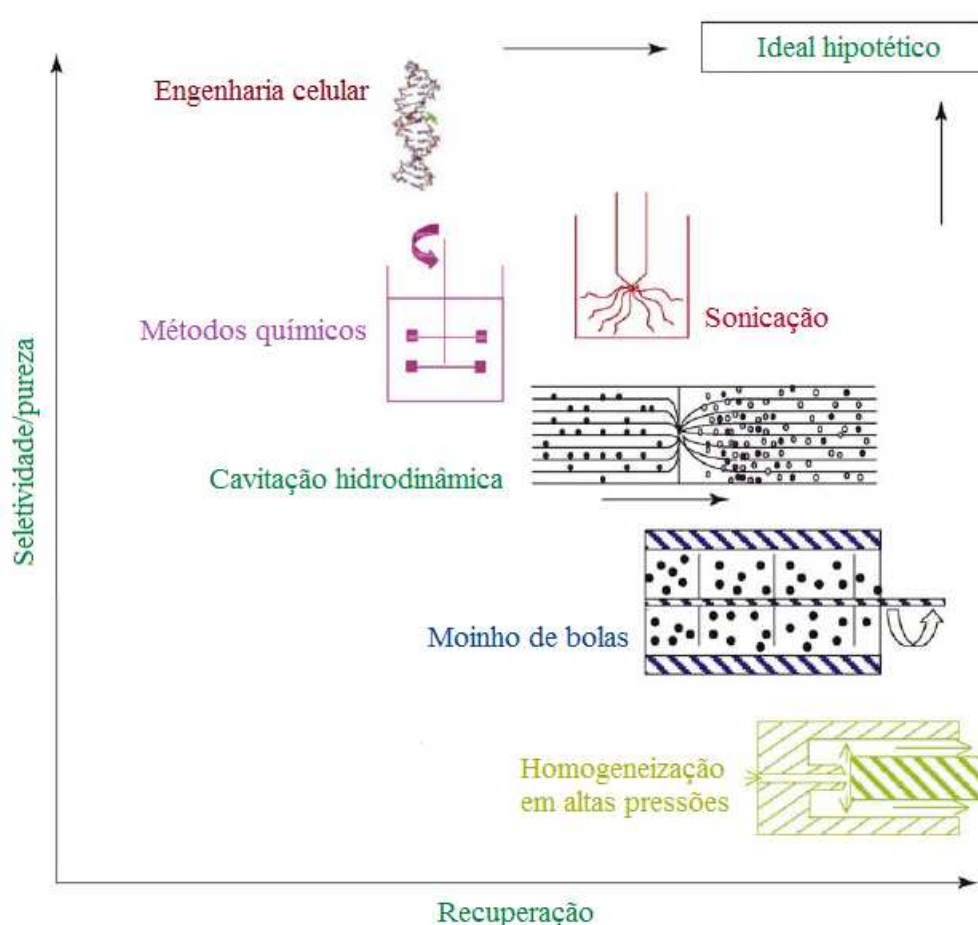
Fonte: adaptado de HARRISON (1991)

Os moinhos de bola e homogeneizadores de alta pressão possuem algumas desvantagens, como a liberação não seletiva do produto, isto é, a liberação de contaminantes juntamente com o biocomposto de interesse, e a micronização dos fragmentos celulares, que prejudicam as etapas que sucedem a extração (centrifugação e/ou filtração) (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

A economia do processo pode ser melhorada se a recuperação seletiva dos produtos durante os passos iniciais for levada em consideração. No caso de um produto intracelular, isto pode ser conseguido através da liberação do produto seletivamente durante a

primeira operação de recuperação, a ruptura celular, onde o tratamento ultrassônico tem demonstrado ser uma técnica promissora (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009). A seletividade relativa e recuperação que podem ser conseguidos com os métodos de ruptura celular acima mencionados são resumidos na Figura 4. Embora os métodos mecânicos industrialmente preferidos, como moinho de bolas e homogeneizador de alta pressão, são superiores em termos de recuperação do produto, a sua fraca seletividade é uma grande desvantagem.

**Figura 4** – Relação entre seletividade do produto liberado e facilidade de recuperação de diferentes técnicas de ruptura conhecidos



Fonte: adaptado de BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL (2009)

O rompimento celular é muitas vezes necessário para a recuperação de produtos intracelulares a partir de microalgas. A maioria dos métodos de ruptura celular que foram desenvolvidos para a utilização com micro-organismos não fotossintetizantes podem ser aplicados para as microalgas. Alguns dos métodos já utilizados para rompimento de biomassa microalgal são o homogeneizador de alta pressão, a agitação de biomassa em presença de



pérolas de vidro e de cerâmica, autoclavagem, ultrassom, tratamento com ácido, solventes, álcalis e enzimas. Os homogeneizadores de alta pressão são amplamente utilizados para romper as células de *Haematococcus* destinado à alimentação dos peixes. O rompimento aumenta grandemente a biodisponibilidade e a assimilação dos pigmentos (GRIMA et al., 2003).

## 2.9 Extração de anidrase carbônica e ficobiliproteínas

Na literatura não existem estudos a respeito da extração da anidrase carbônica a partir de algas e/ou de cianobactérias. Os autores visam apenas o isolamento da enzima para sua caracterização, não importando o rendimento do processo de extração. Algumas das metodologias utilizadas para a extração da enzima nestes estudos são: agitação com pérolas de vidro, prensa francesa, sonicação, maceração em gral com nitrogênio líquido, congelamento e descongelamento e homogeneização mecânica, tratamento enzimático com lisozima e homogeneizador ultrassônico (GHOSHAL; HUSIC; GOYAL, 2002; XIA; GAO, 2005; RIGOBELLO-MASINI; MASINI; AIDAR, 2006; SHARMA et al., 2008; CHINNASAMY et al., 2009; RAMANAN et al., 2009; KUPRIYANOVA et al., 2011; LI et al., 2012).

Com relação à biomassa de cianobactéria, são encontrados diversos trabalhos que avaliam a extração de C-ficocianina a partir de biomassa seca (SILVEIRA et al., 2007; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010) e de biomassa úmida (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999; MORAES et al., 2011a). Porém, não são encontrados trabalhos de extração conjunta de ficobiliproteínas e da enzima anidrase carbônica.

No estudo de Sarada, Pillai e Ravishankar (1999), dentre as técnicas estudadas para a extração de C-ficocianina de *Spirulina platensis*, o congelamento e descongelamento e a homogeneização em gral e pistilo foram as que proporcionaram os maiores rendimentos, 194,7 e 196,6 mg/g, respectivamente. Os autores ainda relatam que o congelamento/descongelamento foi o método que proporcionou maior qualidade de C-ficocianina e o extrato obtido não continha clorofila.

Silveira et al. (2007) estudaram os efeitos da temperatura e da razão de biomassa-solvente sobre a concentração e pureza da C-ficocianina extraída a partir de biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52. As condições ótimas para a extração do biocorante foram uma proporção de biomassa-solvente de 0,08 g/mL e temperatura de 25 °C. Nestas condições, foi possível obter um extrato de C-ficocianina com uma concentração de 3,68 mg/mL com um grau de pureza ( $A_{615}/A_{280}$ ) de 0,46.

No trabalho de Moraes, Burkert e Kalil (2010), primeiramente, a biomassa oriunda da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 foi submetida à diferentes tratamentos para a ruptura celular. Definida a metodologia de ruptura, o processo de extração foi otimizado, avaliando os efeitos da velocidade de rotação (agitação da suspensão foi realizada em agitador orbital) e razão biomassa-solvente usando a metodologia de planejamento experimental e superfície de resposta. A secagem seguida de congelamento e maceração até partículas com tamanho entre 0,106 e 0,125 mm, juntamente com uma razão de biomassa-solvente de 0,16:1 e extração sem agitação à 25 °C foram as melhores condições de extração obtidas pelos autores. Nestas condições foi alcançada uma concentração de C-ficocianina de 13,2 mg/mL com pureza de 0,603 e rendimento de 82,5 mg/g.

Moraes et al. (2011a) avaliaram a extração de C-ficocianina a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB 52. Dentre os tratamentos estudados pelos autores, a sonicção com pérola de vidro foi a técnica que resultou nos maiores rendimentos. Os autores obtiveram valores de C-ficocianina em torno de 43,7 mg/g.

Com relação a extração de aloficocianina, são encontrados poucos trabalhos. Apenas no estudo de El-Mohsnawy (2013) é avaliada a extração deste pigmento por duas técnicas, lisozima juntamente com alta pressão ou somada à agitação em vórtex com pérolas de vidro, com biomassa da cianobactéria *Thermosynechococcus elongatus*. Os ensaios realizados com o vórtex foram os que resultaram em uma maior extração de aloficocianina.

## **2.10 Considerações finais**

A utilização de biomassa microalgal para obtenção de compostos de alto valor agregado vem crescendo de maneira significativa nos últimos anos requerendo cada vez mais estudos a respeito da produção e recuperação dos mesmos. Dentro do exposto na revisão bibliográfica, observou-se que os processos envolvendo a produção e extração de biomoléculas intracelulares de microalgas vem sendo pouco estudados.

Esta tese vem a contribuir no avanço do desenvolvimento de um processo de obtenção e extração de bioprodutos de interesse comercial, anidrase carbônica e ficobiliproteínas, uma vez que inova quando apresenta um processo de obtenção conjunta destes compostos a partir de biomassa de cianobactérias.

Além disso, o estudo da produção da enzima ao longo do cultivo das algas, que permite avaliar o período de máxima produção da enzima, visando a obtenção de máxima produtividade, é interessante, visto que a maior parte dos artigos são apenas de isolamento e caracterização da enzima.

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

**ARTIGO 1: EXTRAÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA DA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*: POTENCIALIDADE PARA USO EM CAPTURA DE CO<sub>2</sub>**

## EXTRAÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA DA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*: POTENCIALIDADE PARA USO EM CAPTURA DE CO<sub>2</sub>

### RESUMO

Nos últimos tempos existe um forte interesse na estabilização atmosférica do CO<sub>2</sub> e outros gases de efeito estufa para mitigar os riscos do aquecimento global. Dentre as estratégias para redução das emissões está a captura e sequestro de CO<sub>2</sub> atmosférico, onde sistemas utilizando a anidrase carbônica têm sido muito estudados. Esta enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza, sendo as microalgas uma fonte potencialmente atrativa desta biomolécula. Este trabalho apresenta a obtenção da anidrase carbônica a partir da biomassa da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e sua aplicação na captura enzimática do CO<sub>2</sub>. Foram testados três métodos para a extração da enzima: agitação com abrasivo, maceração com gral e pistilo e tratamento ultrassônico. Foram estudadas, também, diferentes concentrações de biomassa úmida e tempos de extração. Por último, a enzima obtida a partir da microalga foi aplicada em um sistema enzimático de captura e sequestro de CO<sub>2</sub>. Obteve-se um extrato enzimático com uma atividade na ordem de 67 U/g de biomassa, sendo que os maiores rendimentos em extração foram obtidos com o tratamento ultrassônico, concentrações de biomassa entre 0,1 e 0,2 g/L e tempos de extração de 3 min. A enzima foi aplicada na captação enzimática do CO<sub>2</sub> eficazmente, demonstrando que a biomassa microalgal trata-se de uma fonte potencialmente atrativa para obtenção de anidrase carbônica.

**Palavras-chave:** captação enzimática; mitigação do CO<sub>2</sub>; tratamento ultrassônico; ruptura celular.

### 1 INTRODUÇÃO

O aquecimento global tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias eficazes para mitigação do CO<sub>2</sub>. O aumento contínuo da concentração deste gás na atmosfera tem sido extensivamente documentado (RAMANATHAN; FENG, 2009). Sua concentração aumentou de 280 ppm em 1850 (revolução industrial) (IPCC, 2007; WMO, 2010) para 398 ppm em fevereiro de 2014, e atualmente vem aumentando a uma taxa de 2,07 ppm/ano (NOAA, 2014).

Este poluente é oriundo principalmente da queima de combustíveis fósseis para geração de energia e transporte, que está associada com o aumento da população e industrialização (CHANG; YANG, 2003). Outras fontes seriam a queima de florestas e cerrado, e a queima de combustíveis de uso doméstico (RAMANATHAN; FENG, 2009).

Os gases de efeito estufa contribuem não somente para o aquecimento global, mas também para outros impactos no meio ambiente e na vida humana. Os oceanos absorvem aproximadamente um terço do CO<sub>2</sub> emitido a cada ano pelas atividades humanas, tornando a água gradualmente mais ácida, o que pode causar a perda rápida de barreiras de corais e da

biodiversidade do ecossistema marinho com enormes implicações na vida marinha e, conseqüentemente, na vida terrestre (ORMEROD et al., 2002).

Muitos países e regiões ao redor do mundo estabeleceram metas para redução de CO<sub>2</sub>, a fim de cumprir os objetivos de sustentabilidade previstos no Protocolo de Kyoto. Várias opções estão sendo estudadas e implementadas, com diferentes graus de sucesso, e em diferentes fases de estudo e implementação. Alguns exemplos são energia solar, térmica ou fotovoltaica, hidrelétrica, eólica, geotérmica, biocombustíveis, sequestro de carbono, entre outros. Cada alternativa possui vantagens e problemas, e a escolha da melhor opção irá depender da área de aplicação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Dentre as estratégias para redução de emissões de CO<sub>2</sub> está o sequestro deste gás a partir de fontes pontuais ou atmosféricas através de técnicas naturais e de engenharia (LAL, 2008). Dentro deste contexto, os sistemas biológicos, que utilizam a enzima anidrase carbônica, vêm ganhando cada vez mais atenção. Estes sistemas são baseados em reações que ocorrem naturalmente nos organismos vivos e são uma via potencial para a melhoria destas tecnologias (FIGUEROA, 2008). Porém, a viabilidade do processo de captura enzimática reside inicialmente na obtenção da enzima a partir de fontes viáveis.

A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa com alta eficiência a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato, uma reação fundamental para processos biológicos como a fotossíntese e respiração. Pode ser encontrada em diversos organismos, como animais, vegetais e algas (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996), sendo o último uma fonte potencialmente atrativa para obtenção da enzima.

O cultivo de microalgas possui algumas vantagens, como rápido crescimento, comparado às plantas superiores; possibilidade de cultivo em águas salobra e/ou salgada, liberando o uso de água doce para o consumo humano e agricultura; tolerância a fatores ambientais extremos, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços e em regiões impróprias para atividades agrícolas (KURANO et al., 1995).

*Dunaliella tertiolecta* (*D. tertiolecta*) foi usada neste estudo, porque é uma espécie relativamente fácil de cultivar e utiliza nutrientes inorgânicos presentes na água do mar, águas residuais ou água salobra, juntamente com a luz solar para produzir biomassa usando CO<sub>2</sub> como fonte de carbono. Além disso, possui elevada tolerância ao sal, temperatura e luz (TANG et al., 2011), possui, também, capacidade de crescer sobre uma ampla faixa de pH (YOUNG; BEARDALL; GIORDANO, 2001). Tem sido utilizada em estudos de biofixação devido sua resistência a altas concentrações de CO<sub>2</sub> (ONO; CUELLO, 2006; WANG et al., 2008). Segundo Young, Beardall e Giordano (2001) a microalga *Dunaliella*

*tertiolecta* expressa uma capacidade de acumulação de carbono inorgânico dissolvido extremamente eficiente, relacionada a capacidade da célula de utilizar o íon  $\text{HCO}_3^-$ .

Neste trabalho foi avaliada a potencialidade da enzima anidrase carbônica extraída da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* em um sistema enzimático para captura de  $\text{CO}_2$ . Para isso, foi estudada a extração da enzima anidrase carbônica da biomassa de *Dunaliella tertiolecta* por três métodos de ruptura celular. Foram estudados, também, diferentes concentrações celulares e tempos de extração. Por fim, foi aplicada esta enzima em sistemas de captura do  $\text{CO}_2$ .

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microalga e meio de cultivo

Foi utilizada a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Conway (WALNE, 1966) com água marinha natural com salinidade de 28 (OLIVEIRA et al., 2011).

### 2.2 Cultivo

Os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 1 L (volume útil de 800 mL), sendo adicionado 20% de inóculo. As algas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C, por 10 dias e a agitação realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminação foi promovida por lâmpadas fluorescentes do tipo *daylight* ( $40,5 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ), com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro.

Ao final do cultivo, a biomassa foi obtida por centrifugação ( $5200 \times g$  por 20 min) e ressuspendida em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 (RIGOBELLO-MASINI, AIDAR E MASINI, 2003) para realização dos testes de extração.

### 2.3 Extração da anidrase carbônica

A extração da enzima foi estudada em duas etapas. Na primeira, foi avaliado o desempenho de três métodos de ruptura, que foram: agitação com pérolas de vidro, homogeneização em gral e tratamento ultrassônico. Nesta primeira etapa foi utilizado uma suspensão de biomassa em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 na concentração de 5 g/L (MORAES et al., 2011).

Para a agitação foram adicionadas pérolas de vidro ( $r < 0,4$  mm) à biomassa na proporção de 1:1,1 (mL de suspensão: g pérolas de vidro), e a mistura agitada vigorosamente em vórtex durante 40 min, intercalando 2 min de agitação e 2 min de resfriamento em banho com gelo (MEDEIROS et al., 2008).

Na homogeneização em geral, a biomassa congelada ( $-18$  °C por 24 h) foi homogeneizada com auxílio de um pistilo, na presença de terra diatomácea, na proporção de 5:1 (g de biomassa: g terra diatomácea) (MORAES et al., 2011).

No tratamento ultrassônico, o rompimento celular foi realizado utilizando um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz (ponteira micro com potência de 60 W) por 10 min. O ensaio foi realizado em banho de gelo.

Na segunda etapa, foi fixado o método de extração e foram testadas suspensões de biomassa com concentração entre 0,1 e 9 g/L. Estabelecida a melhor concentração, esta foi utilizada para avaliar o rendimento de extração em função do tempo, onde foram testados tempos de 1 a 10 min. O ensaio foi realizado sempre em banho de gelo.

Após a ruptura celular, a suspensão resultante de cada teste foi centrifugada a  $5200 \times g$  por 20 min a uma temperatura de 4 °C, e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática, clorofila a, clorofila b e carotenoides totais. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.4 Captura enzimática do CO<sub>2</sub>**

A anidrase carbônica extraída da biomassa microalgal foi utilizada como catalisador para a hidratação do CO<sub>2</sub> e o mesmo foi precipitado na forma de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Em erlenmeyers contendo o extrato enzimático, adicionou-se tampão Tris 1,2 M contendo 4,5% de cloreto de cálcio diidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) na proporção 1:1. A reação foi iniciada com a adição de uma solução de água deionizada saturada com CO<sub>2</sub>. Após determinados intervalos de tempo, a mistura foi filtrada e seca para ser mensurada a quantidade de CaCO<sub>3</sub> precipitado (ensaio enzimático). Também foram realizados ensaios substituindo o extrato enzimático por água deionizada (ensaio não-enzimático) (ORES et al., 2012).

## **2.5 Métodos analíticos**

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o teste de atividade de esterase (POCKER; STONE, 1967), adaptado. Nessa metodologia a mistura reacional



consistiu em 1,8 mL de tampão Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,4, 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato. Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância à 400 nm ( $\epsilon_{p\text{-nitrofenol}} = 11,9 \text{ mL/cm}\cdot\mu\text{mol}$ ). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. Os resultados foram expressos, também, em termos de rendimento de extração, calculado dividindo-se a atividade enzimática (U/L) pela concentração de biomassa (g/L)

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm e conversão para biomassa seca através de uma curva padrão previamente preparada (MASSART; AUBRY; HANTSON, 2010).

A extração da clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ) e carotenoides totais ( $C_{x+c}$ ) foi realizada com éter dietílico segundo metodologia de Dere, Günes e Sivaci (1998) e as concentrações destes pigmentos foram calculadas conforme Equações 1, 2 e 3 (LICHTENTALER; WELLBURN, 1985).

$$C_a = 10,05 \cdot A_{662} - 0,766 \cdot A_{644} \quad (1)$$

$$C_b = 16,37 \cdot A_{644} - 3,140 \cdot A_{662} \quad (2)$$

$$C_{x+c} = 1000 \cdot A_{470} - 1,280 \cdot C_a - 56,7 \cdot C_b / 230 \quad (3)$$

## 2.6 Análise estatística

Os resultados foram tratados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey, considerando um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Extração da anidrase carbônica

Foram realizados testes de extração da anidrase carbônica e as concentrações de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais, também foram determinadas nestes primeiros ensaios como uma forma de verificar a eficácia das metodologias de extração escolhidas, já que não são encontrados na literatura trabalhos que avaliem a extração da anidrase carbônica.

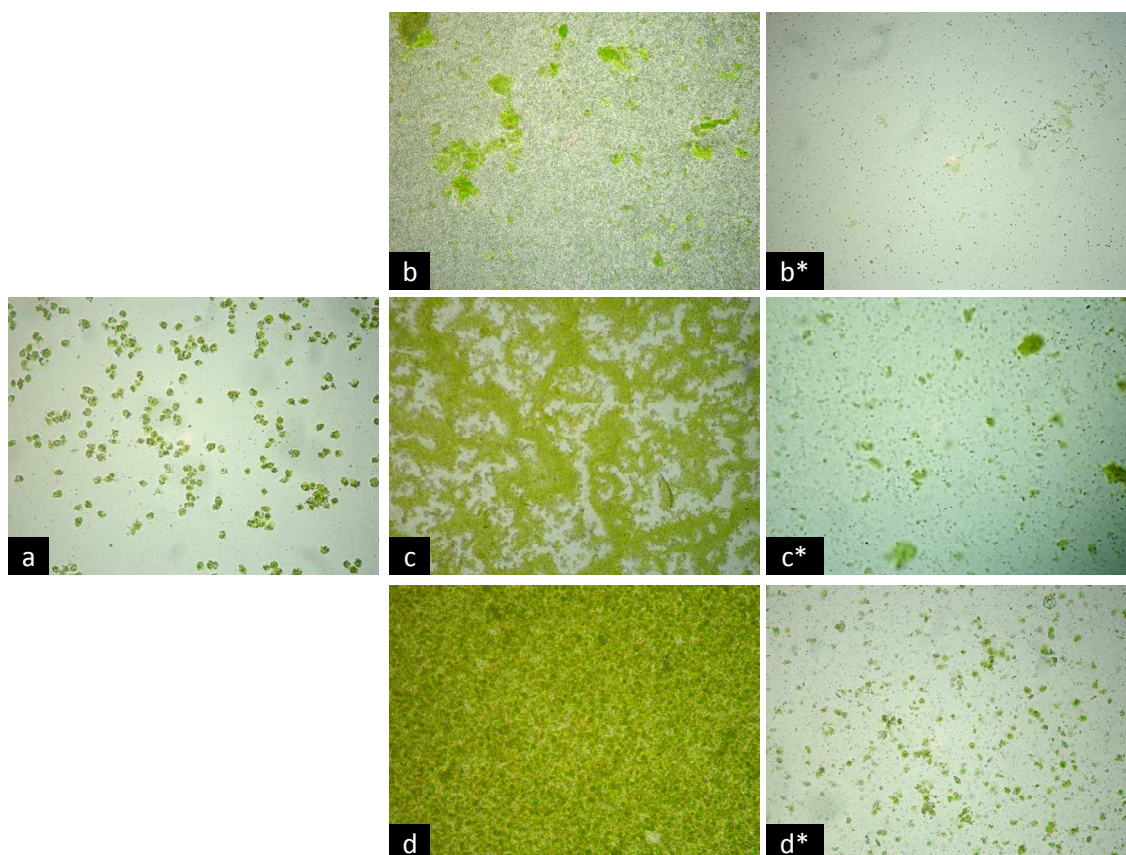
Observa-se na Tabela 1 que o tratamento ultrassônico foi o que proporcionou maior extração da enzima, com atividade enzimática de 14,4 U/g de biomassa, e maiores concentrações de clorofila a (17,2  $\mu\text{g/g}$ ), clorofila b (5,6  $\mu\text{g/g}$ ) e carotenoides totais (10,2  $\mu\text{g/g}$ ).

**Tabela 1** – Valores experimentais (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos nos ensaios de extração da enzima por diferentes tratamentos

Método	Atividade (U/g)	Clorofila a ( $\mu\text{g/g}$ )	Clorofila b ( $\mu\text{g/g}$ )	Carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ )
Agitação com abrasivo	$7,0 \pm 0,2^b$	$4,1 \pm 0,3^b$	$0,8 \pm 0,1^b$	$2,3 \pm 0,1^b$
Ultrassônico	$14,4 \pm 0,7^a$	$17,2 \pm 0,2^a$	$5,6 \pm 0,2^a$	$10,2 \pm 0,1^a$
Gral e pistilo	$2,3 \pm 0,3^c$	$0,5 \pm 0,2^c$	$0,1 \pm 0,03^c$	$0,4 \pm 0,1^c$

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

Através da Figura 1, que mostra a biomassa da microalga *Dunaliella tertiolecta* antes e após os processos de ruptura celular, pode-se confirmar que o tratamento ultrassônico foi mais eficiente na extração dos pigmentos, como clorofila e carotenoides. Sendo assim, como a enzima é intracelular, o ultrassom foi, conseqüentemente, mais eficiente na extração da enzima.

**Figura 1** – Microalga *Dunaliella tertiolecta* (a) antes da extração da enzima; e biomassa após extração por (b) tratamento ultrassônico, (c) agitação com abrasivo e (d) homogeneização com gral e pistilo; todas com aumento de 400 vezes (\*amostra diluída)

O tratamento ultrassônico tem sido reconhecido cada vez mais como um eficiente método de extração e tem sido comumente utilizado para lise celular. O ultrassom tem demonstrado ser um tratamento eficaz para romper a parede celular de microalgas (BERMEJO et al., 2001; FURUKI et al., 2003; PATEL et al., 2005, BERMEJO et al., 2006; MORAES et al., 2011). No ultrassom, as ondas sonoras são convertidas em vibrações causando o fenômeno de cavitação. Essas vibrações geram focos de baixa pressão no líquido suficientes para a formação de bolhas muito pequenas. À medida que se prolonga o tempo das vibrações, essas bolhas entram em colapso, que gera uma onda de choques que circulam pelo meio líquido e resultam em um impacto e aumento da tensão de cisalhamento, com consequentemente rompimento celular (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005) e liberação da enzima para o meio.

O uso de reatores de cavitação hidrodinâmica para rompimento celular tem sido aprovado, inclusive, para aplicações em larga escala, pois tem demonstrado maior eficiência em comparação com técnicas convencionais baseadas na utilização da energia mecânica (GOGATE; KABADI, 2009). No geral, a cavitação é uma tecnologia bem estabelecida em escala de laboratório e piloto (GOGATE et al., 2001; BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009), mas são necessários os esforços combinados de químicos, engenheiros e físicos para aproveitar eficazmente o potencial desta tecnologia em escala industrial.

Furuki et al. (2003) ainda ressaltam que o ultrassom trata-se de um método rápido, em comparação com as técnicas tradicionais, e mais seletivo para larga escala. Ao estudar a extração de C-ficocianina de *Spirulina platensis*, os autores verificaram que a pureza do biocorante pode ser controlada pela frequência da onda do ultrassom irradiada. O efeito seletivo do ultrassom é relatado, também, na extração de enzimas (BALASUNDARAM; PANDIT, 2001; BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009; GOGATE; KABADI, 2009).

O ultrassom também apresenta resultados satisfatórios na extração de clorofila, carotenoides e lipídios a partir de biomassa de microalgas. Simon e Helliwell (1998) avaliaram a extração de clorofila da alga *Selenastrum obliquus* utilizando solvente juntamente com as técnicas de banho ultrassônico, sonda ultrassônica, gral e pistilo, triturador mecânico de tecidos e a imersão em solvente (método tradicional). Os autores verificaram que a sonda ultrassônica proporcionou uma extração de clorofila 3,8 vezes superior ao método tradicional. Henriques, Silva e Rocha (2007) também verificaram um aumento no rendimento da extração de clorofila da alga *Nannochloropsis gaditana* utilizando o tratamento ultrassônico em conjunto com o solvente orgânico.

Macías-Sández et al. (2009) avaliaram a extração de clorofila e de carotenoides da alga *Dunaliella salina*. Para isso, os autores testaram duas metodologias: ultrassom e a utilização de fluidos supercríticos, ambos em conjunto com solventes orgânicos. A técnica de ultrassom foi a que proporcionou as maiores extrações, tanto de carotenoides como de clorofila.

Serive et al. (2012) observaram em seu estudo que a sonicação apresenta-se como um método eficaz, de fácil operação e reproduzível para a extração de pigmentos e metabólitos da alga *Phaeodactylum tricornutum*. A agitação com pérolas de vidro também demonstrou ser um método eficaz para a *Phaeodactylum tricornutum* e para a *Porphyridium purpureum*. Dentre os pigmentos avaliados pelos autores estão a clorofila a e o betacaroteno.

Adam et al. (2012), Gerde et al. (2012) e Araujo et al. (2013) avaliaram o uso do tratamento ultrassônico para a extração de lipídios de biomassa microalgal. Nos três trabalhos o tratamento ultrassônico aumentou a extração de materiais intracelulares, demonstrando ser uma técnica promissora.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 1 escolheu-se o tratamento ultrassônico para a próxima etapa, onde foram realizados testes de extração variando a concentração de biomassa e, posteriormente o tempo de processo. Primeiramente, foram realizados ensaios com concentração de biomassa entre 1,5 e 9 g/L e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Valores experimentais de atividade (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos nos ensaios de extração com diferentes concentrações de biomassa

Biomassa (g/L)	Atividade (U/L)	Atividade (U/g)
1,5	4,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	9,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
3	3,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	9,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
6	3,4 $\pm$ 0,4 <sup>a,b</sup>	7,9 $\pm$ 1,0 <sup>a,b</sup>
9	3,2 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	7,4 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

Não houve diferença significativa entre as atividades (U/L e U/g) obtidas nos ensaios com 1,5, 3 e 6 g/L, sendo alcançado um máximo de 9,3 U/g e 4,0 U/L com 1,5 g/L. Porém, nota-se pelos resultados da Tabela 2 que diminuindo a concentração de biomassa de 9 para 1,5 g/L houve um aumento na atividade enzimática. A partir disso, foram realizados novos ensaios para avaliar o rendimento em extração (U/g) com concentrações de biomassa

entre 0,5 e 1,5 g/L (Tabela 3), pois para realizar um acompanhamento da atividade ao longo do cultivo, concentrações baixas de biomassa são mais interessantes do ponto de vista prático.

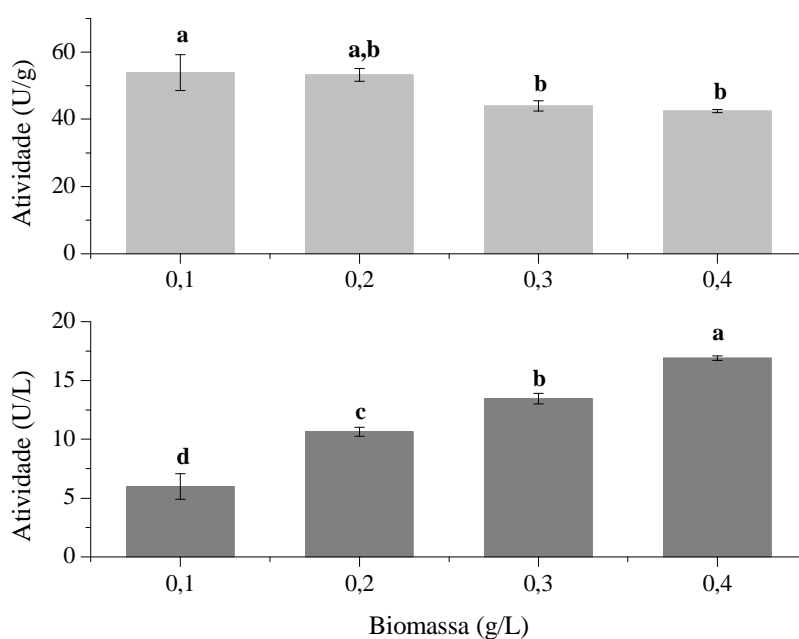
**Tabela 3** – Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos nos ensaios de extração com baixas concentrações de biomassa

Resposta	Concentração celular (g/L)		
	0,5	1,0	1,5
Atividade (U/L)	10,8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	10,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	10,5 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
Atividade (U/g)	66,7 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	67,2 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	65,3 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>

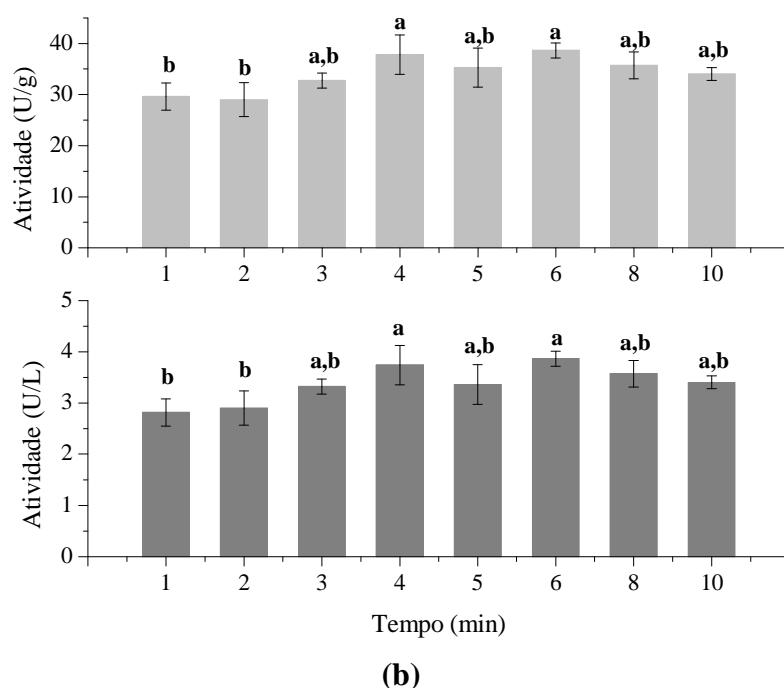
Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 3 que os valores de atividade enzimática obtidos com as três concentrações foram estatisticamente iguais. As três concentrações celulares resultaram em um bom rendimento em termos de extração da enzima. Mesmo diminuindo a concentração de biomassa para 0,5 g/L, não houve uma diminuição significativa da atividade enzimática. Assim, foi verificada a necessidade de estudar a extração da enzima com concentrações inferiores a 0,5 g/L (Figura 2a) para verificar até que ponto pode-se diminuir a concentração de biomassa sem acarretar em perdas de rendimento de extração.

**Figura 2** – Extração da enzima anidrase carbônica em função (a) da concentração de biomassa e (b) do tempo (letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias,  $p > 0,05$ ,  $n=3$ )



(a)



Observa-se na Figura 2 (a) que quanto maior a concentração de biomassa utilizada, maior foi o valor de atividade enzimática (U/L) dos ensaios, conforme esperado para essa faixa de concentrações de biomassa. O maior valor de atividade (16,9 U/L) foi obtido com 0,4 g/L, valor este estatisticamente diferente dos demais, e o menor valor (6 U/L) foi obtido com 0,1 g/L. Porém, o maior rendimento de extração (U/g) foi obtido com a suspensão de 0,1 g/L (53,9 U/g), valor este estatisticamente igual ao obtido no ensaio com 0,2 g/L (53,2 U/g).

Nota-se, também, que as concentrações de 0,2, 0,3 e 0,4 g/L apresentaram rendimentos estatisticamente iguais, ou seja, concentrações de biomassa acima de 0,2 g/L proporcionam o mesmo rendimento de extração da enzima (U/g), quando utilizado o tratamento ultrassônico.

Por último, foram realizados ensaios fixando a concentração de biomassa (0,1 g/L) e variando o tempo de extração de 1 a 10 min, sendo os resultados apresentados na Figura 2b. Um aumento do tempo de extração até 3 min proporcionou um aumento na atividade e rendimento da extração da enzima. Porém, a partir de 3 min, não houve um incremento nas respostas. Os valores obtidos com 3 min foram estatisticamente iguais aos tempos de 4 a 10 min, sendo assim, poderia se optar por trabalhar com um tempo de extração de 3 min, onde se obteve alta atividade e rendimento.

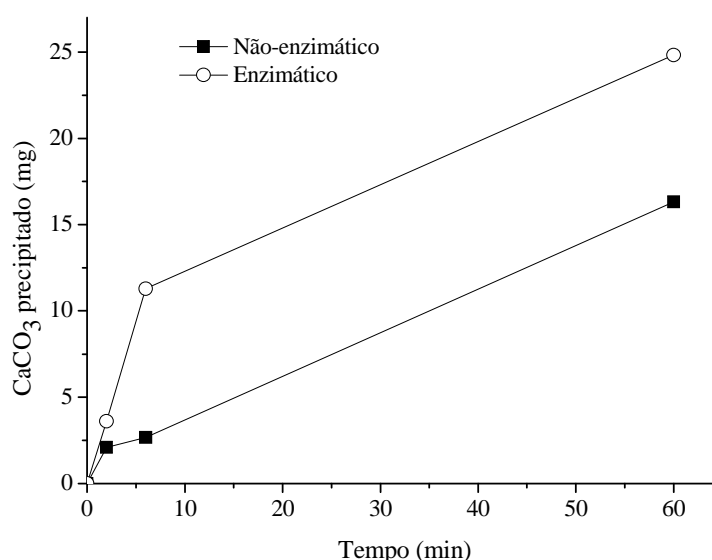
Uma das desvantagens geralmente apontada com relação ao uso do ultrassom é a geração de calor, principalmente nas proximidades da sonda, que pode causar a desnaturação de enzimas. Em virtude disso, a técnica necessita de um controle eficiente de temperatura (CHISTI; MOO-YOUNG, 1986; GECIOVA; BURY; JELEN, 2002). Porém, os resultados obtidos neste trabalho para a biomassa de *D. tertiolecta*, demonstram que o ultrassom alcançou seu rendimento máximo em extração em apenas 3 min, o que torna o controle da temperatura mais fácil.

### 3.2 Captura enzimática do CO<sub>2</sub>

Para verificar a potencialidade do uso da anidrase carbônica extraída da biomassa microalgal de *D. tertiolecta*, foi realizado um ensaio de captação enzimática do CO<sub>2</sub>. A cinética de precipitação do CO<sub>2</sub> na forma de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) está apresentada na Figura 3.

Como pode ser observado na Figura 3, a anidrase carbônica obtida da biomassa microalgal da *Dunaliella tertiolecta* catalisou a hidratação do CO<sub>2</sub>, que precipitou mais rapidamente na forma de CaCO<sub>3</sub> na presença da enzima.

**Figura 3** – Cinética de precipitação do carbonato de cálcio



Estudos anteriores (MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; ORES et al., 2012) demonstraram que a massa total de CaCO<sub>3(s)</sub> precipitada não depende da concentração da enzima, a anidrase carbônica apenas altera a

cinética para atingir o equilíbrio, pois se trata de um catalisador. Este comportamento pode ser observado na Figura 3, a reação na presença da anidrase carbônica (ensaio enzimático) apresentou uma taxa inicial de precipitação do  $\text{CaCO}_3$  superior ao ensaio não-enzimático.

A maioria dos estudos que usam a anidrase carbônica para a captura de  $\text{CO}_2$  utilizam preparações enzimáticas altamente purificadas ou de fontes de difícil ampliação de escala, como sangue humano (BOND et al., 2001; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY; 2007; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; DILMORE et al., 2009; DAVY, 2009), o que aumenta o custo do processo, limitando a aplicabilidade deste tipo de tecnologia. No entanto, já existem estudos que aplicam a enzima obtida a partir de bactérias (SHARMA et al., 2008; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; SHARMA; BHATTACHARYA; SHRIVASTAVA, 2011) e, mais recentemente, extraída de eritrócito bovino (ORES et al., 2012) e da microalga *Chlorella vulgaris* (LI et al., 2012). No presente trabalho, além de a enzima ter sido obtida de uma fonte potencialmente viável, a biomassa resultante do processo de extração pode ainda ser destinada para outros fins, como, por exemplo, incorporação em ração animal, dependendo do seu conteúdo proteico, ou conversão em biogás para a produção de energia.

#### 4 CONCLUSÕES

A biomassa microalgal mostrou ser uma fonte potencialmente atrativa para obtenção da enzima anidrase carbônica. Maiores rendimentos de extração da enzima a partir da microalga *Dunaliella tertiolecta* foram obtidos utilizando tratamento ultrassônico, juntamente com baixas concentrações de biomassa úmida, entre 0,1 e 0,2 g/L. O ultrassom também mostrou ser um método de ruptura rápido e eficaz, sendo necessários tempos mínimos de extração de 3 min.

O estudo demonstrou que a anidrase carbônica extraída da biomassa da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* apresenta potencial para aplicação em processos de captação enzimática do  $\text{CO}_2$ , contribuindo, assim, para os estudos de mitigação de  $\text{CO}_2$ .

#### Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA pelo fornecimento das algas e auxílio técnico.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, F.; ABERT-VIAN, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457-465, 2012.
- ARAÚJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. R. L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 95-98, 2013.
- BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009.
- BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation, **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 251-256, 2001.
- BERMEJO, R., FELIPE, M. A., TALAVERA, E. M. AND ALVAREZ-PEZ, J. M., Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1-2, p. 59-66, 2006.
- BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. **Journal of Chromatography A**, v. 917, p. 135-145, 2001.
- BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M. G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. **Energy & Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.
- CHANG, E. H.; YANG, S. S. Microalgae for biofixation of carbon dioxide – Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 44, p. 43-52, 2003.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p. 194-204, 1986.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO<sub>2</sub> into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DERE, S.; GÜNES, T.; SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. **Turkish Journal of Botany**, Turkey, v. 22, p. 13-17, 1998.
- DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S. W.; KOEPEL, R.; ATAAL, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 3, p. 401-410, 2009.

FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 16-170, 2009.

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

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

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60-72, 2009.

GOGATE, P. R.; SHIRGAONKAR, I. Z.; SIVAKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, P.; VICHARE, N. P.; PANDIT, A. B. Cavitation reactors: Efficiency assessment using a model reaction. **AIChE Journal**, v. 47, n. 11, p. 2526-2538, 2001.

HENRIQUES, M.; SILVA, A.; ROCHA, J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 586-593, 2007.

HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

IPCC – INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2007: the scientific basis**. In: Solomon, S. (Ed.), Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge Univ. Press, New York, 2007.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 689-692, 1995.

LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 363, p. 815-830, 2008.

LI, L.; FU, M. L.; ZHAO, Y. H.; ZHU, Y. T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO<sub>2</sub> capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4227-4232, 2012.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 11, p. 591-592, April, 1985.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, p. 948-952, 2009.

MASSART, A.; AUBRY, E.; HANTSON, A. L. Étude de stratégies de culture de *Dunaliella tertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 14, n. 2, p. 567-572, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 921-926, 2007.

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011.

NOAA – NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. United States Department of Commerce, 2014. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 31 de mar. de 2014.

OLIVEIRA, L. S.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, I. A.; MENDES, C. Q.; CRUZ, A. C. S.; LEITE, M. B. N.; ARAUJO, V. Q.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I.; VICH, D.; TOSTO, M. Biocombustíveis de microalgas: seleção das melhores espécies com base na produção de lipídios. In.: VII SEMBIO - SEMANA DE BIOLOGIA DA UFBA: PROTEGENDO NOSSAS FLORESTAS, 2011, Salvador. **Anais...** Salvador: Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, 2011. p. 35-37.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. **Biosystems Engineering**, v. 95, n. 4, p. 597-606, 2006.

ORES, J. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, p. 255-259, 2012.

ORMEROD, W. G.; FREUND, P.; SMITH, A.; DAVISON, J. **Ocean storage of CO<sub>2</sub>**. IEA greenhouse gas R&D programme. UK: International Energy Agency, 2002.

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.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, São Paulo, SP: Editora Manole, 2005. ISBN 852042032X.

POCKER, Y.; STONE, J. T. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, p. 668-678, 1967.

RAMANATHAN, V.; FENG, Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 37-50, 2009.

RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* (chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267-272, 2003.

SERIVE, B.; KAAS, R.; BÉRARD, J. B.; PASQUET, V.; PICOT, L.; CADORET, J. P. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 311-320, 2012.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> into CaCO<sub>3</sub> using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 122-128, 2010.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; PUJARI, R.; SHRIVASTAVA, A. Characterization of carbonic anhydrase from diversified genus for biomimetic carbon-dioxide sequestration. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 365-371, 2008.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; SHRIVASTAVA, A. Biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains immobilized on biopolymeric materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 416-426, 2011.

SIMON, D.; HELLIWELL, S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2220-2223, 1998.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v. 25, n. 4, p.1-53, 1966.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707-718, 2008.

WMO – WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Greenhouse gas bulletin: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2009**. N° 6: 24, [S.I.:s.n.], November, 2010.

**ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA POR MICROALGAS  
MARINHAS E DULCÍCOLAS**

## PRODUÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA POR MICROALGAS MARINHAS E DULCÍCOLAS

### RESUMO

A biomassa microalgal é uma fonte potencialmente atrativa para obtenção de diversos bioprodutos, dentre eles a anidrase carbônica, enzima responsável por catalisar a hidratação reversível do CO<sub>2</sub>. Esta biomolécula tem sido estudada para aplicação em sistemas enzimáticos de captura e sequestro de CO<sub>2</sub>. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção da enzima anidrase carbônica ao longo do cultivo de microalgas marinhas e dulcícolas, acompanhando, também, o crescimento em termos de biomassa e pH. As microalgas marinhas *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*, e as microalgas dulcícolas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* foram cultivadas em erlenmeyer de 1 L (ensaio em triplicata), adicionado de 20% de inóculo, incubados a 25±1 °C, com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro e agitação por injeção de ar estéril (0,5 vvm). A microalga dulcícola maior produtora da enzima foi a *C. vulgaris*, que apresentou uma atividade máxima 44,0 U/L. Dentre as marinhas, a microalga *P. tricornutum* se destacou como maior produtora, com uma atividade máxima de 19,9 U/L. Em termos de atividade específica, os maiores valores foram obtidos com as microalgas *D. tertiolecta* (44,6 U/g) e a *P. tricornutum* (24,5 U/g). Através dos resultados obtidos, pode-se verificar a potencialidade das microalgas para produção da enzima anidrase carbônica. A biomassa microalgal caracteriza-se, portanto, como uma fonte atrativa para a obtenção desta biomolécula.

**Palavras-chave:** anidrase carbônica, biomassa, cultivo, microalgas.

### 1 INTRODUÇÃO

A anidrase carbônica (AC) catalisa com alta eficiência a hidratação reversível do dióxido de carbono, uma reação fundamental para muitos processos biológicos, como fotossíntese, respiração e reabsorção óssea (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996). É composta de um único polipeptídeo sem pontes dissulfeto e contém um íon Zn<sup>+2</sup> necessário para a atividade catalítica (LINDSKOG, 1997).

Esta biomolécula tem recebido mais atenção devido sua aplicação em sistemas de captura enzimática de CO<sub>2</sub> atmosférico (BOND et al., 2001; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007; SHARMA et al., 2008; DAVY, 2009; DILMORE et al., 2009; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; SHARMA; BHATTACHARYA; SHRIVASTAVA, 2011; ORES et al., 2012; LI et al., 2012, VINOBA et al., 2012). Estes sistemas são baseados em reações que ocorrem naturalmente nos organismos vivos (FIGUEROA et al., 2008), porém, a viabilidade do processo de captura enzimática reside inicialmente na obtenção da enzima de fontes viáveis, como por exemplo, a biomassa microalgal, o que minimiza os custos de processo e possibilita o seu emprego.

O cultivo de microalgas é usado para a produção de compostos químicos valiosos, incluindo pigmentos naturais, biocombustíveis e suplementos dietéticos (ANDRADE; COSTA, 2007). Devido a este potencial, cultivos têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (DERNER et al., 2006). Um bioproduto, de alto valor agregado, que também pode ser obtido a partir de biomassa microalgal, é a enzima anidrase carbônica.

O uso da biomassa microalgal para obtenção da enzima, além de se caracterizar como uma fonte viável, possui vantagens operacionais como rápido crescimento e tolerância a fatores ambientais extremos (KURANO et al., 1995). Além disso, a biomassa resultante do processo de extração da enzima pode ser utilizada para outros fins, como incorporação em ração animal, ou até mesmo para a extração de outros biocompostos de alto valor agregado que são produzidos por estes organismos (CHISTI, 2008), como lipídeos e ácidos graxos (RADMANN; COSTA, 2008), que podem ter permanecido remanescentes na biomassa.

São poucos os trabalhos que avaliam a produção da enzima durante o cultivo de microalgas. Nos trabalhos de Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003) e Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2006) foi avaliada a produção da enzima, juntamente com a nitrato redutase, ao longo de 10 dias com o intuito de compreender melhor o mecanismo da fotossíntese da microalga marinha *Tetraselmis gracilis* em diferentes condições de aeração.

Li et al. (2012), também observaram a produção da anidrase carbônica, porém para a microalga *Chlorella vulgaris* e por um período de apenas 5 dias. O objetivo dos autores foi de caracterizar a enzima, apresentando-a como uma alternativa às preparações comerciais altamente purificadas aplicadas para em sistemas de captura de CO<sub>2</sub>. Porém, quando se almeja a obtenção de enzimas intracelulares, é necessário avaliar o perfil completo de produção da mesma, para obter o maior rendimento possível do bioproduto.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção da anidrase carbônica ao longo do cultivo de diferentes espécies de microalgas marinhas e dulcícolas, realizando também o acompanhamento em termos de biomassa e pH, bem como verificar a potencialidade das microalgas como produtoras da enzima.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microalgas e meios de cultivo

Para este estudo foram utilizadas cinco microalgas marinhas (*Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, e duas microalgas dulcícolas, a *Chlorella vulgaris*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, e a *Scenedesmus obliquus*, gentilmente cedida pelo LABIOMAR.

No preparo dos cultivos e manutenção das algas marinhas foi utilizado o meio Conway (WALNE, 1966), empregando-se água marinha natural com salinidade de 28 (OLIVEIRA et al., 2011). Para as microalgas dulcícolas foi utilizado o meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979).

### 2.2 Cultivo

Os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 1 L (volume útil de 800 mL), sendo adicionado 20% de inóculo. As algas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e a agitação realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescentes do tipo *daylight* ( $40,5 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ), com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro.

A separação da biomassa foi realizada por centrifugação ( $5200 \times g$  por 20 min) e a mesma destinada para leitura em espectrofotômetro (determinação de célula seca) e para a extração da enzima. O sobrenadante foi utilizado para medida do pH.

Foi realizado um acompanhamento da concentração de biomassa, da variação do pH e da atividade enzimática durante o período de cultivo das diferentes microalgas estudadas, sendo retiradas amostras assepticamente a cada 24 ou 48 horas. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

### 2.3 Extração da anidrase carbônica

Como a anidrase carbônica é intracelular, é necessário uma etapa de extração. O rompimento celular foi realizado através de tratamento ultrassônico utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz (ponteira micro com potência de 60 W) por um período de 4 min. Foram utilizadas suspensões de biomassa em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 com concentração de 0,2 g/L. Durante o tratamento ultrassônico as amostras foram sempre mantidas em banho de gelo.



Após a etapa de rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas a 5200 x g por 20 min, e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática.

#### 2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento

Para cada curva de crescimento, a partir dos valores de concentração de biomassa, foram determinados os parâmetros cinéticos: concentração de biomassa máxima ( $X_{\text{máx}}$ , g/L), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , 1/dia) e produtividade de biomassa ( $P$ , g/L/d) de cada alga. As velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas pela regressão exponencial da porção logarítmica da curva de crescimento (BAILEY; OLLIS, 1986). A produtividade de biomassa foi calculada através da Equação 1, segundo Schmidell et al. (2001).

$$P = (X_{\text{máx}} - X_0) / t_f \quad (1)$$

Onde  $X_0$  é a concentração de biomassa inicial (g/L),  $X_{\text{máx}}$  é a concentração de biomassa máxima (g/L) e  $t$  é o tempo necessário para atingir  $X_{\text{máx}}$  (d). Para cada microalga, foi calculada, também, a produtividade em termos de produção da anidrase carbônica ( $P_{\text{AC}}$ , U/L/d).

#### 2.5 Métodos analíticos

Para a determinação da medida da atividade enzimática foi utilizado o teste de atividade de esterase (POCKER; STONE, 1967), adaptado. Nessa metodologia a mistura reacional consistiu em 1,8 mL de tampão Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,4, 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato. Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância a 400 nm ( $\epsilon_{p\text{-nitrofenol}} = 11,9 \text{ mL/cm} \cdot \mu\text{mol}$ ). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. Os resultados foram expressos, também, em termos de atividade específica (U/g), calculada dividindo-se a atividade enzimática (U/L) pela concentração de biomassa (g/L).

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm e conversão para biomassa seca através de uma curva padrão previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e ressuspensas com água para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até peso constante.

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH (Hanna Instruments pH 21) segundo AOAC (2000).

## 2.6 Análise estatística

Os resultados foram tratados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey, considerando um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

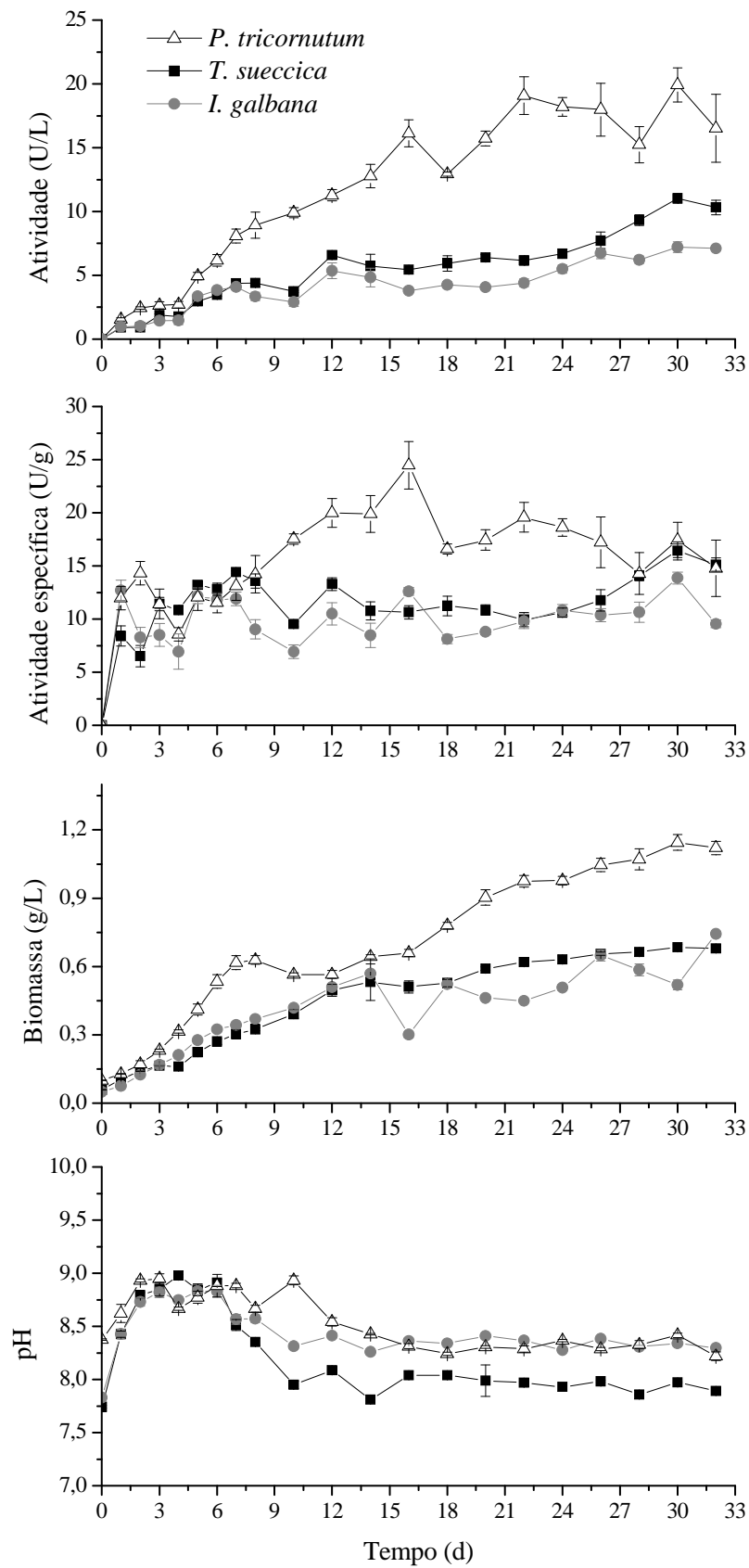
A produção da enzima anidrase carbônica foi avaliada ao longo do cultivo de 7 microalgas, sendo acompanhados também o crescimento celular e a variação do pH do meio. Os resultados obtidos ao longo dos cultivos estão apresentados nas Figuras 1 a 3.

As microalgas *T. suecica* e *I. galbana* apresentaram comportamento semelhante ao longo do cultivo (Figura 1). A atividade (U/L) aumentou gradativamente, sendo o pico de máximo na fase estacionária, ao final do cultivo. Já a atividade específica de ambas as microalgas permaneceu praticamente constante, apresentando algumas oscilações, e o pico de máximo também ocorreu no final do cultivo. A microalga *C. vulgaris* (Figura 3), também apresentou máximas atividade e atividade específica no final do cultivo, sendo que a atividade específica apresentou uma oscilação maior nos primeiros dias de cultivo.

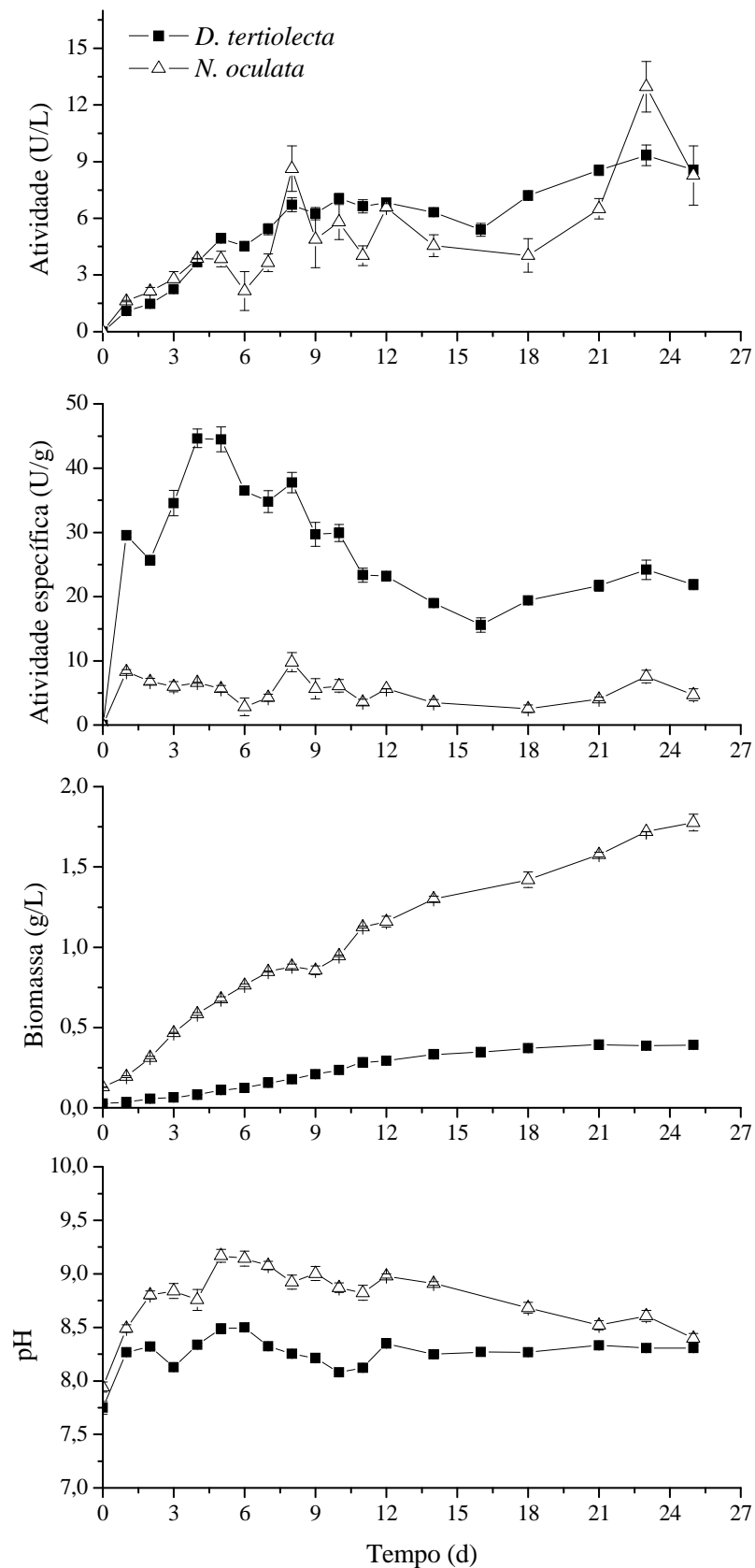
A microalga *S. obliquus* (Figura 3) apresentou um pico de atividade (U/L) máxima no 38° dia de cultivo, já a atividade específica (U/g) manteve-se praticamente constante apresentando um pico não muito pronunciado no 22° dia. A *P. tricornutum* (Figura 1) apresentou comportamento semelhante a *S. obliquus*. O pico de máxima atividade (U/L) ocorreu ao final do cultivo (30° dia), ao contrário da atividade específica (16° dia). A microalga *N. oculata* (Figura 2) apresentou dois picos pronunciados de atividade, o primeiro no 8° dia e o segundo (máximo) no 23° dia. Em termos de atividade específica, a mesma permaneceu praticamente constante, sendo a máxima no 8° dia.

A microalga *D. tertiolecta* (Figura 2) apresentou um comportamento bem diferente das demais microalgas. Apresentou altos valores de atividade específica nos primeiros dias de cultivo (fase log de crescimento), sendo o pico de máxima no 4° dia. Após o 8° dia, os valores de atividade específica caíram bastante, permanecendo constante após o 12° dia. Apesar dos altos valores de atividade específica, a microalga apresentou baixos valores de atividade em U/L, devido à baixa produção de biomassa. O pico de atividade em U/L ocorreu ao final do cultivo, no 23° dia.

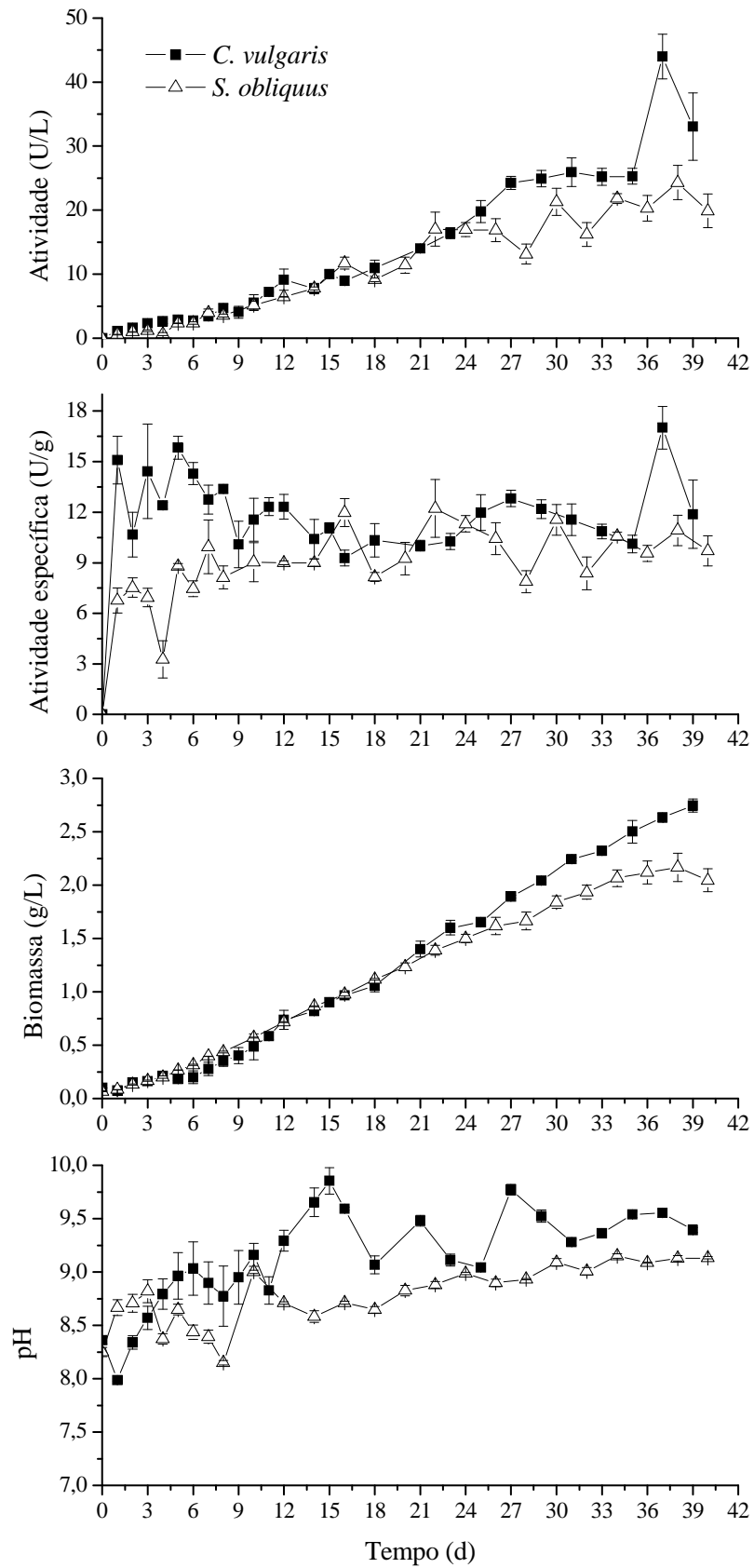
**Figura 1** – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo das microalgas *P. tricornutum*, *T. suecica* e *I. galbana* (n=3)



**Figura 2** – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo das microalgas *D. tertiolecta* e *N. oculata* (n=3)



**Figura 3** – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo das microalgas *C. vulgaris* e *S. obliquus* (n=3)



Durante muitos anos, a anidrase carbônica (AC) tem sido conhecida por existir em muitos organismos fotossintéticos, onde desempenham um papel importante no processo da fotossíntese. Nestes processos, a enzima é responsável por catalisar a interconversão entre o  $\text{CO}_2$  e o íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). No entanto, o papel que a AC desempenha pode variar para cada organismo (BADGER; PRICE, 1994).

Algumas algas podem ter vários tipos de ACs em vários locais celulares e cada AC pode desempenhar um papel diferente no processo fotossintético. Por exemplo, a AC pode estar envolvida no processo de transporte do carbono para o interior da célula, quando o mesmo encontra-se na forma do íon bicarbonato e pode, também, realizar essa conversão no interior da célula, fornecendo o  $\text{CO}_2$  para a Rubisco durante o processo da fotossíntese (BADGER; PRICE, 1994).

A regulação da atividade da AC está correlacionada com vários fatores e esta regulação não segue o mesmo padrão para todas as microalgas (BADGER; PRICE, 1994). No entanto, a concentração de  $\text{CO}_2$  e de carbono total inorgânico são considerados os fatores mais importantes que induzem a atividade da AC (KAPLAN; REINHOLD, 1999), sendo que a alcalinização do meio também exerce um importante papel. Uma das consequências dessa alcalinização, causada pelo processo fotossintético e pela absorção de nitrato, é o deslocamento do equilíbrio das espécies de carbono inorgânico em direção ao íon  $\text{HCO}_3^-$ , assim diminuindo a concentração de  $\text{CO}_2$  (RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003; RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2006).

Durante o cultivo de todas as sete microalgas estudadas neste trabalho, o pH do meio manteve-se sempre alcalino, o que justifica a manutenção da produção da enzima pela microalga, inclusive na fase estacionária. Com o pH alcalino ocorre uma predominância de carbono na forma do íon bicarbonato, que não atravessa a membrana com a mesma facilidade do que o  $\text{CO}_2$ , necessitando da atuação da AC para fazer o transporte. Além disso, os cultivos foram realizados com a injeção de ar atmosférico estéril, que contém baixos níveis de  $\text{CO}_2$ , induzindo a produção da enzima no interior da célula. Porém, para um melhor entendimento do metabolismo das microalgas testadas, seria necessária uma análise das concentrações de carbono inorgânico e  $\text{CO}_2$  dissolvido.

Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003), verificaram durante o cultivo da *Tetraselmis gracilis*, que com a alcalinização do meio e o decréscimo da concentração de carbono inorgânico, houve um aumento da atividade da anidrase carbônica externa (enzima ligada a membrana – ensaios de atividade realizados com a célula inteira) e total (ensaios realizados com o extrato enzimático – célula rompida), como meio de absorver o íon

bicarbonato, fonte de carbono majoritária devido à alcalinização do meio. A partir do 4º dia a concentração de CO<sub>2</sub> caiu a valores muito baixos (menores que o K<sub>m</sub> da Rubisco), assim, a atividade da anidrase interna aumenta como um mecanismo para aumentar a concentração de CO<sub>2</sub> ao redor da Rubisco.

A presença de anidrase carbônica externa (ligada a membrana), o aumento da atividade em baixos níveis de CO<sub>2</sub> e em pH alcalino, também foi observado para outras microalgas, como a *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum* e *Micromonas pusilla* (WILLIAMS; COLMAN, 1993; IGLESIAS-RODRÍGUEZ; NIMER; MERRETT, 1998; NIMER; WARREN; MERRETT, 1998; YOUNG; BEARDALL; GIORDANO, 2001; BHATTI; HUERTAS; COLMAN, 2002; GHOSHAL; HUSIC; GOYAL, 2002; XIA; GAO, 2005; RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2006; YINGYING; CHANGHAI, 2009).

Satoh et al. (2001) verificaram a ausência de atividade da AC externa para a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, pois os autores detectaram atividade apenas no extrato rompido (anidrase intracelular). Verificaram, também, uma redução da atividade em cultivos com injeção de CO<sub>2</sub>.

Poucos autores avaliam a produção da enzima ao longo do cultivo de microalgas. Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003) e Rigobello-Masini; Masini e Aidar (2006) avaliaram o perfil da anidrase carbônica e da nitrato redutase ao longo do cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis*. Da mesma forma que os perfis obtidos neste trabalho, a atividade específica da enzima (U/g) não decaiu ao final do cultivo, permanecendo constante mesmo durante a fase estacionária.

Li et al. (2012) acompanharam a produção da AC durante 5 dias de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*. A microalga apresentou atividades específicas altas nos primeiros dias, decaindo no quarto e quinto dias de cultivo. Os autores citam, também, que em estudos anteriores foi verificada a existência de atividade de uma AC externa.

Os trabalhos da literatura geralmente utilizam a metodologia de atividade de hidratase para determinar a atividade da anidrase carbônica, onde o substrato da análise é o CO<sub>2</sub> (WILBUR; ANDERSON, 1948), o que torna difícil realizar uma comparação dos dados obtidos neste trabalho com outros autores.

No início do estudo foram realizados ensaios prévios utilizando o CO<sub>2</sub> como substrato, porém, como a enzima está presente em pequenas quantidades em microalgas e possui uma atividade enzimática baixa comparada com a anidrase de eritrócitos bovinos, foram encontradas dificuldades na determinação da atividade e a mesma apresentou desvios

muito elevados. Kupriyanova et al. (2003) e Soltes-Rak, Mulligan e Coleman (1997), também relataram dificuldades para determinação da atividade da anidrase carbônica em microalgas utilizando a metodologia eletrométrica (atividade de hidratase com CO<sub>2</sub>) de Wilbur e Anderson (1948).

Assim, optou-se por trabalhar com a metodologia de atividade de esterase (POCKER; STONE, 1967), onde o substrato é o *p*-nitrofenil acetato, por ser uma análise colorimétrica, rápida, fácil, precisa e sensível quando a enzima está presente em pequenas quantidades. Além disso, a atividade de esterase é muito utilizada em estudos de captação e imobilização da enzima de diferentes fontes (BOND et al., 2001; HOSSEINKHANI; NEMAT-GORGANI, 2003; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; VINOBA et al., 2012).

Zhang et al. (2011) utilizaram o método colorimétrico (atividade de esterase) para acompanhar a atividade da anidrase carbônica durante o cultivo de *Bacillus mucilaginosus*. Os autores estudaram a otimização dos constituintes nutricionais do meio para produção da enzima, alcançando uma atividade máxima de 33,4 µU/L. A enzima extraída a partir das microalgas estudadas no presente trabalho apresenta uma atividade muito superior à obtida a partir da bactéria *B. mucilaginosus*.

As máximas atividades enzimáticas, biomassa e demais parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para cada microalga estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Atividade volumétrica máxima (U/L) e valores de atividade específica (U/g) biomassa (*X*) e produtividade (*P*) obtidos no ponto de máxima U/L

	Microalga	U/L	Dia	U/g	<i>X</i> (g/L)	<i>P</i> <sub>AC</sub> (U/L/d)
	<i>T. suecica</i> *	11,0 ± 0,4 <sup>c,d</sup>	30	16,4 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	0,685 ± 0,012 <sup>e</sup>	0,368 ± 0,013 <sup>c,d</sup>
	<i>I. galbana</i> *	7,2 ± 0,4 <sup>d</sup>	30	13,9 ± 0,6 <sup>c,d</sup>	0,520 ± 0,022 <sup>e,f</sup>	0,240 ± 0,014 <sup>d</sup>
Marinhas	<i>D. tertiolecta</i>	9,3 ± 0,6 <sup>c,d</sup>	23	24,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	0,386 ± 0,007 <sup>f</sup>	0,406 ± 0,024 <sup>c</sup>
	<i>N. oculata</i>	13,0 ± 1,4 <sup>c</sup>	23	7,6 ± 1,0 <sup>e</sup>	1,777 ± 0,052 <sup>c</sup>	0,564 ± 0,059 <sup>b</sup>
	<i>P. tricornutum</i>	19,9 ± 1,3 <sup>b</sup>	30	17,4 ± 1,7 <sup>b</sup>	1,145 ± 0,034 <sup>d</sup>	0,664 ± 0,044 <sup>b</sup>
Dulcícolas	<i>C. vulgaris</i> *	44,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	37	17,0 ± 1,3 <sup>b,c</sup>	2,634 ± 0,044 <sup>a</sup>	1,189 ± 0,094 <sup>a</sup>
	<i>S. obliquus</i>	24,3 ± 2,7 <sup>b</sup>	38	10,9 ± 0,9 <sup>d</sup>	2,167 ± 0,133 <sup>b</sup>	0,640 ± 0,070 <sup>b</sup>

U/L: atividade volumétrica, U/g: atividade específica, *P*<sub>AC</sub>: produtividade de anidrase carbônica, \*U/L e U/g máximos no mesmo dia de cultivo. Letras iguais indicam não há diferença significativa entre as médias (p>0,05).



**Tabela 2** – Atividade específica máxima (U/g) e parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para as sete microalgas estudadas

	Microalga	U/g	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$P_{X_{m\acute{a}x}}$ (g/L/d)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (1/d)
	<i>T. suecica</i> *	16,4 ± 0,9 <sup>c</sup>	0,685 ± 0,012 <sup>e</sup>	0,020 <0,001 <sup>d</sup>	0,128 ± 0,004 <sup>g</sup>
	<i>I. galbana</i> *	13,9 ± 0,6 <sup>c,d</sup>	0,743 ± 0,011 <sup>e</sup>	0,022 <0,001 <sup>d</sup>	0,339 ± 0,004 <sup>b</sup>
Marinhas	<i>D. tertiolecta</i>	44,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	0,393 ± 0,003 <sup>f</sup>	0,017 <0,001 <sup>d</sup>	0,231 ± 0,006 <sup>e</sup>
	<i>N. oculata</i>	9,8 ± 1,5 <sup>d</sup>	1,777 ± 0,052 <sup>c</sup>	0,069 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,389 ± 0,001 <sup>a</sup>
	<i>P. tricornutum</i>	24,5 ± 2,2 <sup>b</sup>	1,145 ± 0,034 <sup>d</sup>	0,035 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,275 ± 0,003 <sup>c</sup>
Dulcícolas	<i>C. vulgaris</i> *	17,0 ± 1,3 <sup>c</sup>	2,746 ± 0,061 <sup>a</sup>	0,069 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,166 ± 0,003 <sup>f</sup>
	<i>S. obliquus</i>	12,2 ± 1,7 <sup>d</sup>	2,167 ± 0,133 <sup>b</sup>	0,055 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,256 ± 0,001 <sup>d</sup>

U/g: atividade específica,  $P_{X_{m\acute{a}x}}$ : produtividade em biomassa no  $X_{m\acute{a}x}$ , \*U/L e U/g máximos no mesmo dia de cultivo. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

As máximas atividades enzimáticas (Tabela 1) ficaram compreendidas entre 7,2 e 44,0 U/L e as máximas atividades específicas (Tabela 2) entre 9,8 e 44,6 U/g. Avaliando os resultados para atividade enzimática, pode ser observado nas Figuras 1, 2, 3 e na Tabela 1 que a microalga *C. vulgaris* se destacou, dentre as dulcícolas, como maior produtora da enzima atingindo uma atividade enzimática volumétrica de 44,0 U/L, atividade específica de 17,0 U/g e produtividade de anidrase carbônica de 1,189 U/L/d no 37° dia de cultivo.

Analisando as microalgas marinhas, a que apresentou maior atividade volumétrica (19,9 U/L) e produtividade de enzima (0,664 U/L/d) foi a *P. tricornutum*. Já em termos de atividade específica, a *D. tertiolecta* se destacou, apresentando uma atividade máxima de 44,6 U/g, porém, a mesma apresenta uma produção de biomassa muito inferior às demais. Os resultados deste trabalho demonstram que a biomassa microalgal caracteriza-se como uma fonte altamente potencial para a obtenção da enzima anidrase carbônica. A biomassa resultante do processo de extração pode ainda ser aproveitada para outros fins, como incorporação em ração animal e extração de outros biocompostos que podem estar presentes nas células remanescentes.

Observando a Tabela 2, nota-se que as algas com maiores  $X_{m\acute{a}x}$  apresentam as maiores produtividades, devido à maior produção de biomassa. Houve uma maior variação entre as velocidades específicas máximas de crescimento entre as sete algas estudadas. Lavín e Lourenço (2005) e Campos, Barbarino e Lourenço (2010) observaram em seus estudos que espécies dotadas de menores volumes celulares apresentam maiores velocidades de

crescimento. De acordo com os volumes encontrados na literatura para as microalgas *D. tertiolecta*, *T. suecica*, *P. tricornutum*, *I. galbana*, *N. oculata*, *C. vulgaris* e *S. obliquus* (OLENINA et al., 2006; FONSECA et al., 2014), o mesmo comportamento foi observado.

Segundo Lavín e Lourenço (2005) e Campos, Barbarino e Lourenço (2010), tais resultados devem estar associados à maior eficiência na absorção de nutrientes por células menores, devido à maior razão superfície-volume destas, bem como a diferença no metabolismo celular.

#### 4 CONCLUSÃO

A microalga *Chlorella vulgaris* se destacou como maior produtora da enzima anidrase carbônica dentre as sete avaliadas, atingindo no 37º dia de cultivo valores de atividade enzimática de 44,0 U/L, atividade específica de 17,0 U/g, concentração celular de 2,6 g/L e produtividade de enzima de 1,2 U/L/d. Os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento e produtividade máxima alcançados para a *C. vulgaris* foram 0,166 1/dia e 0,069 g/L/dia, respectivamente.

Dentre as algas marinhas, a *Phaeodactylum tricornutum* se destacou como maior produtora da enzima, apresentando no pico máximo de atividade volumétrica (19,9 U/L, 30º dia do cultivo) uma atividade específica de 17,4 U/g, concentração celular de 1,14 g/L e produtividade de enzima de 0,7 U/L/d.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar a potencialidade das microalgas para produção e obtenção da enzima anidrase carbônica, biomolécula de alto valor industrial.

#### Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA e ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG pelo fornecimento das algas e auxílio técnico.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p. 130-134, 2007.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., Virginia:[s.n], 2000.

- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p. 369-392, 1994
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2nd ed. Singapore, McGraw-Hill, 1986. 928 p.
- BHATTI, S.; HUERTAS, I. E.; COLMAN, B. Acquisition of inorganic carbon by the marine haptophyte *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 914-921, 2002.
- BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M. G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. **Energy & Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 339-347, fev, 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO<sub>2</sub> into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S. W.; KOEPEL, R.; ATAAI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 3, p. 401-410, 2009.
- FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 163–170, 2009.
- FIGUEROA, J. D.; FOUT, T.; PLASYNSKI, S.; MCILVRIED, H.; SRIVASTAVA, R. D. Advances in CO<sub>2</sub> capture technology – The U.S. Department of Energy’s Carbon Sequestration Program. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 2, p. 9-20, 2008.
- FONSECA, B. M.; FERRAGUT, C.; TUCCI, A.; CROSSETTI, L. O.; FERRARI, F.; BICUDO, D. C.; SANT’ANNA, C. L.; BICUDO, C. E. M. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 9-30, 2014.
- GHOSHAL, D.; HUSIC, H. D.; GOYAL, A. Dissolved inorganic carbon concentration mechanism in *Chlamydomonas moewusii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 299-305, 2002.

HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

HOSSEINKHANI, S.; NEMAT-GORGANI, M. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 179-184, 2003.

IGLESIAS-RODRÍGUEZ, M. D.; NIMER, N. A.; MERRETT, M. J. Carbon dioxide-concentrating mechanism and the development of extracellular carbonic anhydrase in the marine picoeukaryote *Micromonas pusilla*. **New Phytologist**, v. 140, p. 685-690, 1998.

KAPLAN, A.; REINHOLD, L. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 539-570, 1999.

KUPRIYANOVA, E. V.; LEBEDEVA, N. V.; DUDOLADOVA, M. V.; GERASIMENKO, L. M.; ALEKSEEVA, S. G.; PRONINA, N. A.; ZAVARZIN, G. A. Carbonic anhydrase activity of alkalophilic cyanobacteria from soda lakes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 4, p. 532-539, 2003.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 689-692, 1995.

LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n. 1/2, p. 55-68, 2005.

LI, L.; FU, M. L.; ZHAO, Y. H.; ZHU, Y. T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO<sub>2</sub> capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4227-4232, 2012.

LINDSKOG, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 74, n. 1, p. 1-20, 1997.

MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 921-926, 2007.

NIMER, N. A.; WARREN, M.; MERRETT, M. J. The regulation of photosynthetic rate and activation of extracellular carbonic anhydrase under CO<sub>2</sub>-limiting conditions in the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 805-812, 1998.

OLENINA, I.; HAJDU, S.; EDLER, L.; ANDERSSON, A.; WASMUND, N.; BUSCH, S., GÖBEL, J.; GROMISZ, S.; HUSEBY, S.; HUTTUNEN, M.; JAANUS, A.; KOKKONEN, P.; LEDAINE, I.; NIEMKIEWICZ, E. **Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea**. [S.I.]: HELCOM Balt.Sea Environ. Proc. No. 106, ISSN 0357-2994, 2006, 144 p.

OLIVEIRA, L. S.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, I. A.; MENDES, C. Q.; CRUZ, A. C. S.; LEITE, M. B. N.; ARAUJO, V. Q.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I.; VICH, D.; TOSTO, M. Biocombustíveis de microalgas: seleção das melhores espécies com base na produção de lipídios. In.: VII SEMBIO - SEMANA DE BIOLOGIA DA UFBA: PROTEGENDO NOSSAS FLORESTAS, 2011, Salvador. **Anais...** Salvador: Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, 2011. p. 35-37.

ORES, J. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, p. 255-259, 2012.

POCKER, Y.; STONE, J.T. "The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, p. 668-678, March 1967.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMANATHAN, V.; FENG, Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 37-50, 2009.

RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* (chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267-272, 2003.

RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 18-25, 2006.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

SATOH, D.; HIRAOKA, Y.; COLMAN, B. MATSUDA, Y. Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1459-1470, 2001.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> into CaCO<sub>3</sub> using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 122-128, 2010.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; PUJARI, R.; SHRIVASTAVA, A. Characterization of carbonic anhydrase from diversified genus for biomimetic carbon-dioxide sequestration. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 365-371, 2008.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; SHRIVASTAVA, A. Biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains immobilized on biopolymeric materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 416-426, 2011.

SOLTES-RAK, E.; MULLIGAN, M. E.; COLEMAN, J. R. Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 769-774, 1997.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOONA, Y. I.; NAMA, S. C. Carbonic anhydrase conjugated to nanosilver immobilized onto mesoporous SBA-15 for sequestration of CO<sub>2</sub>. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 60-67, 2012.

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v. 25, n. 4, p.1-53, 1966.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v.176, p. 147-154, 1948.

WILLIAMS, T. C.; COLMAN, B. Identification of distinct internal and external isozymes of carbonic anhydrase in *Chlorella saccharophila*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 943-948, 1993.

XIA, J. R.; GAO, K. S. Impacts of elevated CO<sub>2</sub> concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae. **Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)**, v. 47, n. 6, p. 668-675, 2005.

YINGYING, S.; CHANGHAI, W. The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus, Zn<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub>, and light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 225-231, 2009

YOUNG, E.; BEARDALL, J.; GIORDANO, M. Inorganic carbon acquisition by *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) involves external carbonic anhydrase and direct HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> utilization insensitive to the anion exchange inhibitor DIDS. **European Journal of Phycology**, v. 36, p. 81-88, 2001.

ZHANG, Z.; LIAN, B.; HOU, W.; CHEN, M.; LI, X.; SHEN, W.; LI, Y. Optimization of nutritional constituents for carbonic anhydrase production by *Bacillus mucilaginosus* K02. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 42, p. 8403-8413, 2011.

**ARTIGO 3: CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA E  
FICOBILIPROTEÍNAS POR CIANOBACTÉRIAS**

## CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA E FICOBILIPROTEÍNAS POR CIANOBACTÉRIAS

### RESUMO

A anidrase carbônica é uma metaloenzima conhecida por catalisar a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato e pode ser encontrada em diferentes organismos, inclusive nas algas. Atualmente existe uma busca por fontes alternativas de obtenção desta enzima, uma vez que possui potencial aplicação em sistemas de captação e sequestro de CO<sub>2</sub> atmosférico. O cultivo de microalgas é usado para a produção de compostos químicos valiosos, como a C-ficocianina e a aloficocianina, pigmentos naturais extraídos de algumas cianobactérias que podem ser aplicados como corantes para alimentos e cosméticos, além disso, possuem propriedades terapêuticas e farmacológicas. Considerando a importância industrial destes três biocompostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas ao longo do cultivo de cianobactérias, acompanhando, também, o crescimento em termos de biomassa e pH. As cianobactérias *Spirulina* sp. LEB 18, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Synechococcus nidulans* foram cultivadas em erlenmeyer de 1 L, adicionado de 20% de inóculo, incubados a 25±1 °C, iluminância de 40,5 µE/m<sup>2</sup>.s, com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro e agitação por injeção de ar estéril (0,5 vvm). As cianobactérias apresentaram valores de atividade volumétrica de anidrase carbônica entre 41,6 e 45,9 U/L. As maiores concentrações de ficobiliproteínas obtidas no ponto de máxima atividade volumétrica foram alcançadas com a *Spirulina* sp. LEB 18, que foram 65,9 µg/mL de C-ficocianina e 82,2 µg/mL de aloficocianina. Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar a potencialidade das cianobactérias para produção da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas.

**Palavras-chave:** anidrase carbônica, co-produção, C-ficocianina, aloficocianina.

### 1 INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma grande procura por soluções alternativas para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, um dos gases causadores do efeito estufa. Dentre as estratégias que podem ser utilizadas encontra-se o sequestro ou a captura de CO<sub>2</sub> utilizando sistemas biológicos, que tem como princípio reações que já ocorrem normalmente em organismos vivos (LAL, 2008).

A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que tem sido amplamente estudada para aplicação nestes sistemas (BOND et al., 2001; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY; 2007; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; DILMORE et al., 2009; DAVY, 2009, LI et al., 2012; ORES et al., 2012; VINOBA et al., 2012), pois catalisa a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato com alta eficiência (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996). Porém, a viabilidade do processo de captura enzimática reside inicialmente na obtenção da enzima de fontes viáveis.



Esta enzima pode ser produzida por diversos organismos, pois desempenha papel fundamental em processos biológicos como fotossíntese e respiração (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996). Uma fonte potencialmente viável de obtenção desta enzima são as algas que por sua vez possuem grande importância industrial no momento. Cianobactérias e algas possuem, também, uma ampla variedade de compostos como carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Espécies do gênero *Spirulina* são fontes não dispendiosas de ficobiliproteínas (MINKOVA et al., 2003), além de possuir certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) concedido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), permitindo seu uso em alimentos.

O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens, como seu rápido crescimento comparado às plantas terrestres, alta produção de biomassa, resistência a fatores ambientais extremos, assim como a possibilidade de cultivo em espaços pequenos (KURANO et al., 1995), não oferecendo grandes competições por terras agrícolas (BRILMAN; ALBA; VENEMAN, 2013). Além disso, a biomassa resultante do processo de extração da enzima pode ser utilizada para outros fins, como incorporação em ração animal (CHISTI, 2008), ou até mesmo para a extração de outros biocompostos que são produzidos por estes organismos, como lipídeos e ácidos graxos (RADMANN; COSTA, 2008), que podem ter permanecido remanescentes na biomassa.

A biomassa de cianobactérias, além de ser fonte de anidrase carbônica, caracteriza-se como uma fonte potencial de ficobiliproteínas. As principais ficobiliproteínas em cianobactérias e algas vermelhas são a ficocianina ou ficoeritrina, enquanto o conteúdo da aloficocianina é muito menor (SU et al., 2010). A aloficocianina é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas como uma sonda fluorescente de proteínas, particularmente em citometria de fluxo (SHAPIRO et al., 1983; YEH et al., 1987). Apresenta, também, propriedades antioxidantes (GE et al., 2006) e atividade anti-enterovirus (SHIH et al., 2003), entre outras. Apesar de suas propriedades, a aplicação da aloficocianina é um pouco limitada pela dificuldade na purificação de grandes quantidades da proteína. Estudos de purificação de ficobiliproteínas geralmente focam na obtenção de ficoeritrina ou ficocianina, que estão presentes em maior quantidade em cianobactérias ou algas vermelhas (SU et al., 2010).

A C-ficocianina (C-FC), principal componente da família das ficobiliproteínas (PATIL; RAGHAVARAO, 2007), é um pigmento fotossintético acessório azul, que apresenta várias aplicações, como corante natural para alimentos e cosméticos (ARAD; VARON, 1992). Sua forma purificada possui atividade antioxidante (ESTRADA; BESCOS; DEL FRESNO, 2001; GANTAR et al., 2012) e tem sido utilizada como agente anti-tumoral e anti-

inflamatório (REDDY et al., 2003), possui capacidade hepatoprotetora (NAGARAJ et al., 2012) e potencial contra diabetes (OU et al., 2013) e hipertensão (ICHIMURA et al., 2013).

Quando se almeja a obtenção de enzimas biotecnologicamente, torna-se essencial avaliar a produção da biomolécula de interesse pelo micro-organismo que se pretende utilizar. Não são encontrados estudos sobre a produção da AC ao longo do cultivo de cianobactérias. São encontrados trabalhos que avaliam a produção desta enzima durante o cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis* (RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003; RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2006) para entender melhor o mecanismo da fotossíntese nessa microalga em diferentes condições de aeração. Li et al. (2012), também observaram a produção da anidrase, porém para a microalga *Chlorella vulgaris* e durante 5 dias. O objetivo dos autores foi apenas de caracterizar a enzima. Para entender melhor a produção da enzima, é necessário obter o perfil completo de produção da mesma.

São encontrados poucos trabalhos que avaliam a produção de C-ficocianina e aloficocianina durante o cultivo de cianobactérias. Saleh, Dharb e Singh (2011) avaliaram a produção de pigmentos (C-ficocianina, aloficocianina, C-ficoeritrina, carotenoides e  $\beta$ -caroteno) de diferentes cepas de *Spirulina* ao longo de 25 dias de cultivo. Tanto para a C-ficocianina, como para a aloficocianina, houve um pico mais pronunciado no meio do cultivo, e o mesmo decaiu até o final do cultivo. O mesmo comportamento foi observado nos estudos de Chen et al. (2013), que analisou a produção de C-ficocianina durante a biofixação de CO<sub>2</sub> pela cianobactéria *Spirulina platensis*.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção da anidrase carbônica e das ficobiliproteínas C-ficocianina e aloficocianina, todos bioprodutos de interesse industrial, durante o cultivo das cianobactérias *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*. Foi verificada, também, a potencialidade de uso da enzima extraída da *S. platensis* LEB 52 em um sistema de captura do CO<sub>2</sub>.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microalgas e meio de cultivo

Para este estudo foram utilizadas três cianobactérias, *Spirulina* sp. LEB 18, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Synechococcus nidulans*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. No preparo dos cultivos e manutenção das algas marinhas foi utilizado o meio Zarrouk 20% (ZARROUK, 1966; REINEHR; COSTA, 2006).

## 2.2 Cultivo

Os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 1 L (volume útil de 800 mL), sendo adicionado 20% de inóculo. As algas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e a agitação realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescentes do tipo *daylight* ( $40,5 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ), com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro. A separação da biomassa foi realizada por centrifugação ( $5200 \times g$  por 20 min) e a mesma destinada para leitura em espectrofotômetro (determinação de célula seca) e para a extração da enzima e ficobiliproteínas. O sobrenadante foi utilizado para medida do pH.

Foi realizado um acompanhamento da concentração de biomassa, da variação do pH, da atividade enzimática e da concentração de ficobiliproteínas (C-ficocianina e aloficocianina) durante o período de cultivo das diferentes microalgas estudadas, sendo retiradas amostras assepticamente a cada 24 ou 48 horas. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

## 2.3 Extração da anidrase carbônica e ficobiliproteínas

Tanto a anidrase carbônica, como as ficobiliproteínas são intracelulares, sendo necessária uma etapa de extração. O rompimento celular foi realizado através de tratamento ultrassônico utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz (ponteira micro com potência de 60 W) por um período de 4 min. Foram utilizadas suspensões de biomassa em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 com concentração de 0,2 g/L. Durante o tratamento ultrassônico as amostras foram sempre mantidas em banho de gelo. Após a etapa de rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas a  $5200 \times g$  por 20 min, e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática e concentrações dos biocorantes.

## 2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento

Para cada curva de crescimento, a partir dos valores de concentração de biomassa, foram determinados os parâmetros cinéticos: concentração de biomassa máxima ( $X_{\text{máx}}$ , g/L), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , 1/dia) e produtividade de biomassa ( $P$ , g/L/dia) de cada alga.

As velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas pela regressão exponencial da porção logarítmica da curva de crescimento (BAILEY; OLLIS, 1986). A produtividade de biomassa foi calculada através da Equação 1, segundo Schmidell et al. (2001).

$$P = (X_{\text{máx}} - X_0) / t_f \quad (1)$$

Onde  $X_0$  é a concentração de biomassa inicial (g/L),  $X_{\text{máx}}$  é a concentração de biomassa máxima (g/L) e  $t$  é o tempo necessário para atingir  $X_{\text{máx}}$  (d). As produtividades em termos de produção da enzima ( $P_{\text{AC}}$ , U/L/d), de C-ficocianina ( $P_{\text{FC}}$ , µg/mL/d) e de aloficocianina ( $P_{\text{AFC}}$ , µg/mL/d), também foram calculadas.

## 2.5 Captura enzimática do CO<sub>2</sub>

Para verificar a potencialidade do uso da enzima obtida a partir de cianobactérias foram realizados ensaios de captura enzimática do CO<sub>2</sub>.

A anidrase carbônica extraída da biomassa microalgal (*Spirulina platensis* LEB 52) foi utilizada como catalisador para a hidratação do CO<sub>2</sub> e o mesmo foi precipitado na forma de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Em erlenmeyers contendo o extrato enzimático, adicionou-se tampão Tris 1,2 M contendo 4,5% de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) na proporção 1:1. A reação foi iniciada com a adição de uma solução de água deionizada saturada com CO<sub>2</sub>. Após determinados intervalos de tempo, a mistura foi filtrada e seca para ser mensurada a quantidade de CaCO<sub>3</sub> precipitado (ensaio enzimático). Também foram realizados ensaios substituindo o extrato enzimático por água deionizada (ensaio não-enzimático) (ORES et al., 2012).

## 2.6 Métodos analíticos

Para a determinação da medida da atividade enzimática foi utilizado o teste de atividade de esterase (POCKER; STONE, 1967), adaptado. Nessa metodologia a mistura reacional consistiu em 1,8 mL de tampão Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,4, 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato. Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância à 400 nm ( $\epsilon_{p\text{-nitrofenol}} = 11,9 \text{ mL/cm}\cdot\mu\text{mol}$ ). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. Os resultados foram expressos, também, em termos de atividade específica (U/g), calculada dividindo-se a atividade enzimática (U/L) pela concentração de biomassa (g/L).

As concentrações de C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC) foram determinadas por leitura da densidade óptica (DO) a 620 e 652 nm, sendo calculadas conforme as Equações 2 e 3 (BENNETT; BOGORAD, 1973).

$$C - FC = \frac{DO_{620} - 0,474(DO_{652})}{5,34} \quad (2)$$

$$AFC = \frac{DO_{652} - 0,208(DO_{620})}{5,09} \quad (3)$$

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm (GRIFFITHS et al., 2011) e conversão para biomassa seca através de uma curva padrão previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e ressuspendidas com água para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até peso constante.

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH (Hanna Instruments pH 21) segundo AOAC (2000).

## 2.7 Análise estatística

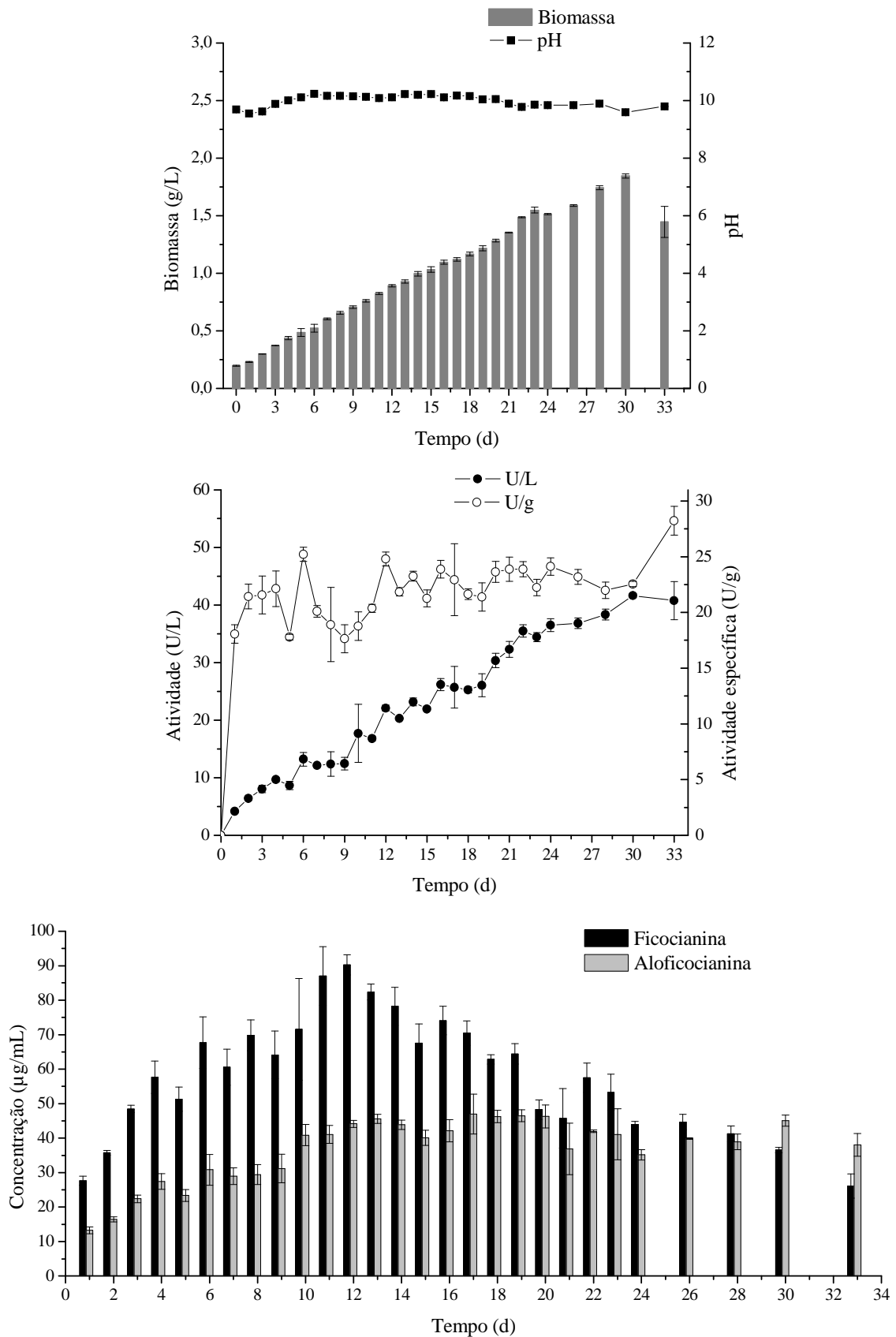
Os resultados foram tratados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey, considerando um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

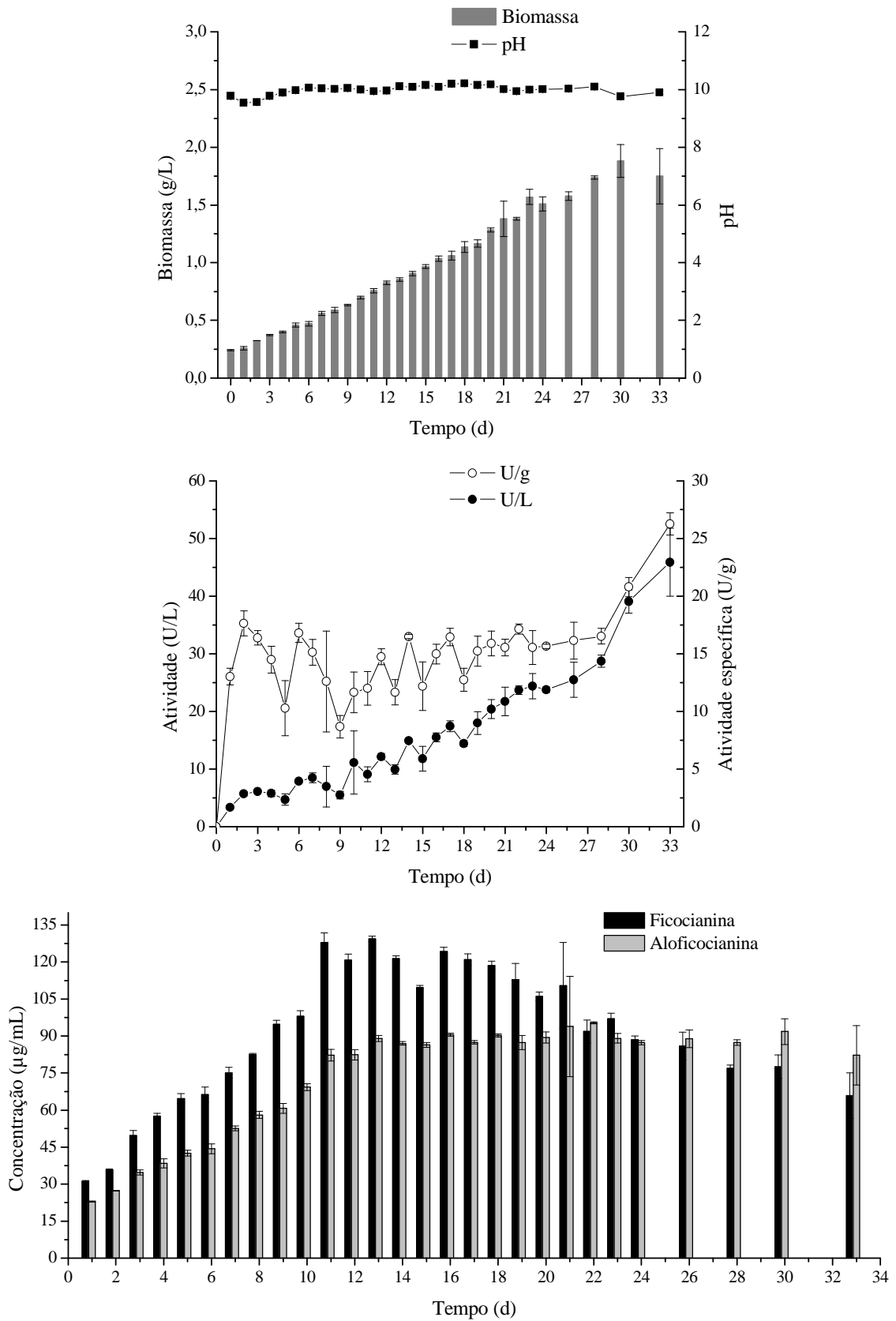
A produção da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas foi avaliada ao longo do cultivo das cianobactérias *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*, sendo acompanhados também o crescimento celular e a variação do pH do meio. Os resultados obtidos ao longo dos cultivos e os parâmetros cinéticos de crescimento estão apresentados nas Figuras 1 a 3.

As três cianobactérias apresentaram um perfil de atividade volumétrica (U/L) semelhante. A atividade aumentou gradativamente, sendo que o pico máximo ocorreu no final do cultivo durante a fase estacionária e/ou de declínio. A atividade específica (U/g) das microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 (Figura 1) e *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 2) permaneceu constante, com oscilações ao longo do crescimento, apresentando um pico de máximo mais pronunciado ao final do cultivo.

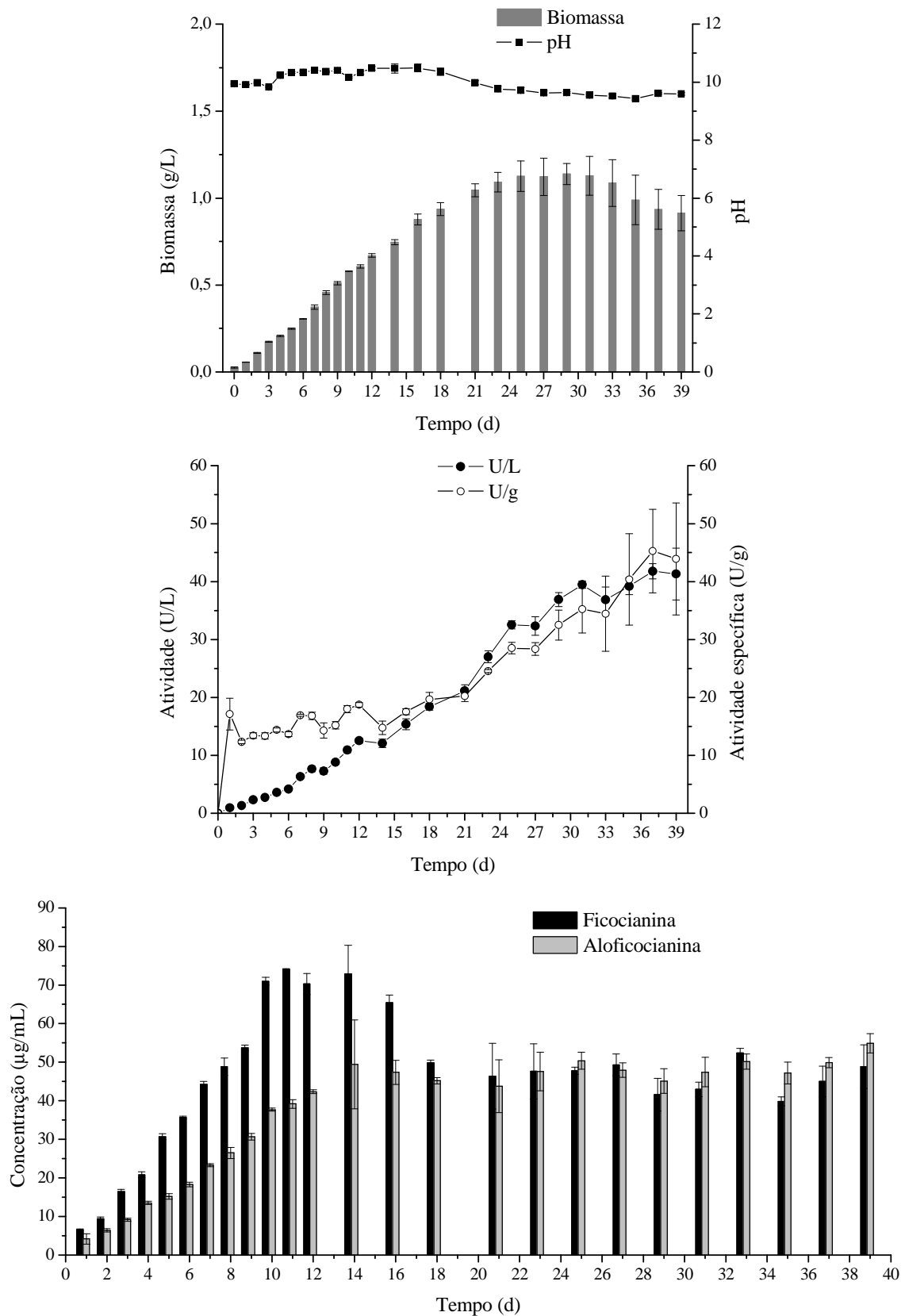
**Figura 1** – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 (n=3)



**Figura 2** – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (n=3)



**Figura 3** – Acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação do pH durante o cultivo da microalga *Synechococcus nidulans* (n=3)





Já para a microalga *Synechococcus nidulans* (Figura 3) a atividade específica permaneceu praticamente constante apenas até o 16º dia de cultivo, aumentando gradativamente a partir deste ponto até o pico máximo no 37º dia. Este aumento iniciou ainda na fase logarítmica de crescimento, ao contrário das duas cepas de *Spirulina*, onde o aumento ocorreu apenas na fase estacionária.

A função primária da anidrase carbônica (AC) em algas é aumentar a concentração de dióxido de carbono em torno da enzima fotossintética ribulose-bisfosfato carboxilase (Rubisco). O sistema de transporte de carbono inorgânico ( $C_i$ ) e AC são fundamentais para o funcionamento do mecanismo de concentração de carbono (CCM – do inglês *Carbon Concentrating Mechanism*) (BADGER; PRICE, 1989; BADGER; PRICE, 1992; VAN HILLE et al., 2003).

O mecanismo pelo qual ocorre o transporte de  $C_i$  em cianobactérias ainda não é bem compreendido. Segundo Kupriyanova et al. (2011) o íon bicarbonato, que é a principal forma de  $C_i$  externo em lagos alcalinos, é capturado pelas células com participação da AC extracelular. A AC presente nos carboxissomos converte o  $HCO_3^{-1}$  acumulado em  $CO_2$ , fornecendo o substrato para a Rubisco. De forma geral, sabe-se que a enzima é induzida por baixas concentrações de  $CO_2$  dissolvido e luz (BADGER; PRICE, 1989; BADGER; PRICE, 1992; AL-MOGHRABI et al., 1996; VAN HILLE et al., 2003), sendo induzida, também, pela alcalinização do meio (RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003) devido ao deslocamento do equilíbrio das espécies de carbono inorgânico em direção ao íon  $HCO_3^-$ .

Durante o cultivo das três cianobactérias estudadas neste trabalho, o pH do meio manteve-se sempre alcalino, o que justifica a manutenção da produção da enzima pela microalga, inclusive na fase estacionária. Além disso, os cultivos foram realizados com a injeção de ar atmosférico estéril, que contém baixas concentrações de  $CO_2$ , o que também induz a produção da enzima no interior da célula.

Kupriyanova et al. (2003) verificaram a presença de atividade da anidrase carbônica nas células inteiras (enzima extracelular) e nos extratos enzimáticos das cianobactérias alcalofílicas *Rhabdoderma* sp., *Rhabdoderma lineare* e *Microcoleus chthonoplastes*. Os autores também verificaram o efeito do pH do meio na atividade extracelular da enzima da microalga *Microcoleus chthonoplastes*. Foi observado uma alta atividade sob condições alcalinas extremas (pH 10), comprovando, mais uma vez, que a produção da enzima é induzida em valores de pH alcalinos.

Kupriyanova et al. (2007) identificaram uma anidrase carbônica extracelular na cianobactéria *Microcoleus chthonoplastes*. Kupriyanova et al. (2011), mais recentemente,

identificaram e caracterizaram, em relação a sequenciamento de DNA e RNA, a enzima anidrase carbônica obtida da cianobactéria alcalifílica *Microcoleus chthonoplastes*. Os autores relatam que alta capacidade de crescer em meios altamente alcalinos pH (9-10) está relacionada com a atuação da anidrase carbônica.

Badger e Price (1989) investigaram o envolvimento da anidrase carbônica no processo de acumulação de C<sub>i</sub> na cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942. Tanto as células inteiras da microalga, como o extrato enzimático apresentaram atividade de anidrase carbônica. Nos cultivos com injeção de 1% de CO<sub>2</sub> houve uma diminuição da produção da enzima.

Não é possível traçar um comparativo em termos de grandeza de atividade da anidrase carbônica, porque os trabalhos geralmente utilizam a metodologia de atividade de hidratase, onde o substrato da análise é o CO<sub>2</sub> (WILBUR; ANDERSON, 1948). Porém, como a enzima está presente em pequenas quantidades em microalgas, e possui uma atividade enzimática baixa, foram encontradas dificuldades na determinação da atividade. Assim, optou-se por utilizar a metodologia de atividade de esterase (POCKER; STONE, 1967), onde o substrato é o *p*-nitrofenil acetato, por se tratar de uma análise colorimétrica, rápida, fácil, precisa e sensível quando a enzima está presente em pequenas quantidades.

Kupriyanova et al. (2003) e Soltes-Rak, Mulligan e Coleman (1997), também relataram dificuldades para determinação da atividade da anidrase carbônica em microalgas utilizando a metodologia eletrométrica (atividade de hidratase com CO<sub>2</sub>) de Wilbur e Anderson (1948). Além disso, a atividade de esterase é muito utilizada em estudos de captação e imobilização da enzima de diferentes fontes (BOND et al., 2001; HOSSEINKHANI; NEMAT-GORGANI, 2003; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; VINOBA et al., 2012).

Zhang et al. (2011) utilizaram o método colorimétrico (atividade de esterase) para acompanhar a atividade da anidrase carbônica durante o cultivo de *Bacillus mucilaginosus*. Os autores estudaram a otimização dos constituintes nutricionais do meio para produção da enzima, alcançando uma atividade máxima de 33,4 μU/L. Ou seja, a enzima extraída de cianobactéria apresenta uma atividade muito superior à obtida a partir da bactéria *B. mucilaginosus*.

Não são encontrados trabalhos que acompanham a produção da enzima ao longo do cultivo de cianobactérias. São encontrados alguns estudos com as algas *Tetraselmis gracilis* e *Chlorella vulgaris* que também acompanham a produção da enzima ao longo do cultivo. Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003) e Rigobello-Masini; Masini e Aidar (2006)

avaliaram o perfil da anidrase carbônica e da nitrato redutase ao longo do cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis*. Da mesma forma que os perfis obtidos neste trabalho, a atividade específica da enzima (U/g) não decaiu ao final do cultivo, permanecendo alta mesmo durante a fase estacionária.

Li et al. (2012) acompanharam a produção da enzima durante 5 dias de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*. A microalga apresentou atividades específicas altas nos primeiros dias, decaindo um pouco no quarto e quinto dias de cultivo. Porém, os autores deveriam ter acompanhado a produção da enzima por mais tempo para verificar se realmente se trata de uma diminuição de atividade. Os autores verificaram, também, que a enzima extraída da microalga possui a capacidade de induzir a precipitação do CO<sub>2</sub> na forma de CaCO<sub>3</sub>.

Com relação à produção das ficobiliproteínas, pode-se observar nas Figuras 1 a 3 que os perfis de produção de C-ficocianina e aloficocianina são diferentes. A *S. platensis* LEB 52 e *S. sp.* LEB 18 apresentaram comportamento semelhante na produção de C-ficocianina. A concentração de C-ficocianina máxima foi obtida no início do cultivo, no 12º dia para *S. platensis* LEB 52 e 13º dia para *S. sp.* LEB 18, decaindo gradativamente após o pico de máximo. Já no caso da *S. nidulans*, após o pico de máxima (14º dia) a concentração de C-ficocianina decaiu até o 18º dia, permanecendo constante a partir deste dia.

Já no caso da aloficocianina, após o pico de máximo a concentração, seu valor permaneceu praticamente constante até o final do cultivo. Este comportamento foi observado nas três cianobactérias estudadas. As máximas concentrações de aloficocianina foram alcançadas no 13º dia (*S. platensis* LEB 52 e *S. sp.* LEB 18) e 14º dia (*S. nidulans*).

Saleh, Dharb e Singh (2011) realizaram um comparativo dos perfis de pigmentos de diferentes cepas de *Spirulina* ao longo de 25 dias de cultivo. Os perfis de produção de C-ficocianina e aloficocianina foram semelhantes aos obtidos neste trabalho. As máximas concentrações obtidas pelos autores foram 82,9 µg/mL de C-ficocianina e 62,3 µg/mL de aloficocianina, valores inferiores aos obtidos neste trabalho. No cultivo da *S. LEB 18* foram obtidos valores de C-ficocianina acima de 120 µg/mL e valores de aloficocianina ao redor de 90 µg/mL nos picos de máxima produção. No estudo de Chen et al. (2013), com *Spirulina platensis*, também ocorreu um caimento da produção de C-ficocianina após o pico de máximo.

As máximas atividades enzimáticas e concentrações de ficobiliproteínas, biomassa e produtividades obtidas no pico de máxima U/L estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Atividade volumétrica máxima (U/L) e valores de atividade específica (U/g), biomassa (X) e produtividade (P) obtidos no ponto de máxima U/L

Microalga	U/L	Dia	U/g	X (g/L)	P <sub>AC</sub> (g/L/d)
<i>S. platensis</i> LEB 52	41,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	30	22,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,846 ± 0,018 <sup>a</sup>	1,387 ± 0,013 <sup>a</sup>
<i>S. sp.</i> LEB 18*	45,9 ± 5,9 <sup>a</sup>	33	26,3 ± 1,0 <sup>b</sup>	1,749 ± 0,240 <sup>a</sup>	1,390 ± 0,179 <sup>a</sup>
<i>S. nidulans</i> *	41,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	37	45,3 ± 7,2 <sup>a</sup>	0,935 ± 0,114 <sup>b</sup>	1,129 ± 0,036 <sup>a</sup>

U/L: atividade volumétrica, U/g: atividade específica, P<sub>AC</sub>: produtividade de anidrase carbônica, \*U/L e U/g máximos no mesmo dia de cultivo. Letras iguais indicam não há diferença significativa entre as médias (p>0,05).

**Tabela 2** – Concentrações de ficobiliproteínas obtidas no ponto de atividade máxima (U/L)

Microalga	C-Ficocianina (µg/mL)	Aloficocianina (µg/mL)	P <sub>FC</sub> (µg/mL/d)	P <sub>AFC</sub> (µg/mL/d)
<i>S. platensis</i> LEB 52	36,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	45,1 ± 1,6 <sup>b</sup>	1,218 ± 0,027 <sup>b</sup>	1,502 ± 0,054 <sup>b</sup>
<i>S. sp.</i> LEB 18	65,9 ± 9,3 <sup>a</sup>	82,2 ± 12,0 <sup>a</sup>	1,996 ± 0,281 <sup>a</sup>	2,492 ± 0,364 <sup>a</sup>
<i>S. nidulans</i>	45,0 ± 4,0 <sup>b</sup>	49,9 ± 1,3 <sup>b</sup>	1,216 ± 0,107 <sup>b</sup>	1,348 ± 0,036 <sup>b</sup>

P<sub>FC</sub>: produtividade de C-ficocianina, P<sub>AFC</sub>: produtividade de aloficocianina. Letras iguais indicam não há diferença significativa entre as médias (p>0,05).

As máximas atividades enzimáticas (Tabela 1) ficaram compreendidas entre 41,6 e 45,9 U/L, sendo que não há diferença significativa entre os valores obtidos para as três microalgas estudadas. Os valores de produtividade de enzima (P<sub>AC</sub>), também foram estatisticamente iguais para as cianobactérias avaliadas. Em termos de atividade específica, o valor máximo foi obtido pela *S. nidulans* (45,3 U/g), sendo este diferente estatisticamente dos demais. A *S. nidulans* foi inferior às duas cepas de *Spirulina* apenas em termos de produção de biomassa.

Porém, a produção de ficobiliproteínas da *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina sp.* LEB 18 foi superior à produção da *Synechococcus*, além disso, a *Spirulina* possui o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*). Como pode ser observado na Tabela 2, a *Spirulina sp.* LEB 18 foi a microalga que apresentou as maiores concentrações e produtividades de C-ficocianina e aloficocianina no pico de máxima atividade, demonstrando que a mesma apresenta potencial tanto para a obtenção destas duas ficobiliproteínas, como para a obtenção da enzima anidrase carbônica.

Com relação aos parâmetros cinéticos de crescimento (Tabela 3), como esperado, as algas com maiores  $X_{m\acute{a}x}$  apresentaram as maiores produtividades, devido à maior produção de biomassa. Os valores de  $X_{m\acute{a}x}$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $P_{X_{m\acute{a}x}}$  (produtividade em biomassa) obtidos para as duas cepas de *Spirulina* foram próximos, provavelmente, por pertencerem ao mesmo gênero, sendo que o  $X_{m\acute{a}x}$  e a produtividade foram estatisticamente iguais. Já comparando com a *Synechococcus*, houve uma variação grande entre as algas. Com relação à velocidade específica, houve uma maior variação entre os valores obtidos para cada alga.

**Tabela 3** – Atividade específica máxima (U/g) e parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para cianobactérias estudadas

Microalga	U/g	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$P_{X_{m\acute{a}x}}$ (g/L/d)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (1/d)
<i>S. platensis</i> LEB 52	28,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	1,846 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,055 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,207 ± 0,003 <sup>b</sup>
<i>S. sp.</i> LEB 18*	26,3 ± 1,0 <sup>b</sup>	1,882 ± 0,142 <sup>a</sup>	0,055 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,118 ± 0,005 <sup>c</sup>
<i>S. nidulans</i> *	45,3 ± 7,2 <sup>a</sup>	1,139 ± 0,061 <sup>b</sup>	0,038 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,641 ± 0,033 <sup>a</sup>

\*U/L e U/g máximos no mesmo dia de cultivo, U/g: atividade específica,  $P_{X_{m\acute{a}x}}$ : produtividade em biomassa no  $X_{m\acute{a}x}$ . Letras iguais indicam não há diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

Os valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  obtidos para as cianobactérias estão de acordo com os obtidos na literatura. Radmann et al. (2011), em seu estudo de isolamento de microalgas resistentes a  $SO_x$  e  $NO_x$  a partir de usinas termelétricas e aplicação em biofixação de  $CO_2$ , cultivou a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 em reatores tubulares, alcançando velocidades específicas entre 0,22 e 0,23 1/d. Rosa et al. (2011) obteve um  $\mu_{m\acute{a}x}$  de 0,26 1/d no cultivo da mesma microalga, para a fixação de  $CO_2$ , em reatores abertos (tipo *raceway*) sob condições controladas.

Andrade e Costa (2008) avaliaram o crescimento de *Spirulina platensis* LEB 52 em meio de cultivo complementado com melão líquido (MEL) e melão em pó (MEP). No cultivo autotrófico (sem MEL ou MEP), os autores obtiveram um  $\mu_{m\acute{a}x}$  de 0,117 1/d. Fu et al. (2007) estudaram os efeitos da temperatura e da concentração de  $CO_2$  na fotossíntese, crescimento e concentração de pigmentos para a cianobactéria *Synechococcus* sp. Os autores obtiveram valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  em torno de 0,6 1/d nos cultivos a 24 °C e nível baixo de  $CO_2$  (380 ppm), valor próximo ao obtido no presente trabalho (0,641 1/d).

Lavín e Lourenço (2005) e Campos, Barbarino e Lourenço (2010) observaram em seus estudos que espécies dotadas de menores volumes celulares apresentam maiores

velocidades de crescimento. Este comportamento se deve à maior eficiência na absorção de nutrientes por células menores, devido à maior razão superfície-volume destas, bem como a diferença no metabolismo celular. De acordo com os volumes encontrados na literatura para as cianobactérias estudadas (OLENINA et al., 2006; FONSECA et al., 2014), o mesmo comportamento foi observado.

Em termos de produtividade em biomassa ( $P_{X_{máx}}$ ), os valores também estão próximos aos obtidos para estas microalgas na literatura. Para a *Spirulina* são encontrados valores em torno de 0,045-0,08 g/L/d e para a *Synechococcus* em torno de 0,03-0,07 g/L/d (ANDRADE; COSTA, 2008; RADMANN et al., 2011). São encontrados valores de  $X_{máx}$  entre 1,4 e 1,6 g/L para a *Spirulina* e *Synechococcus* (ANDRADE; COSTA, 2008; RADMANN et al., 2011)

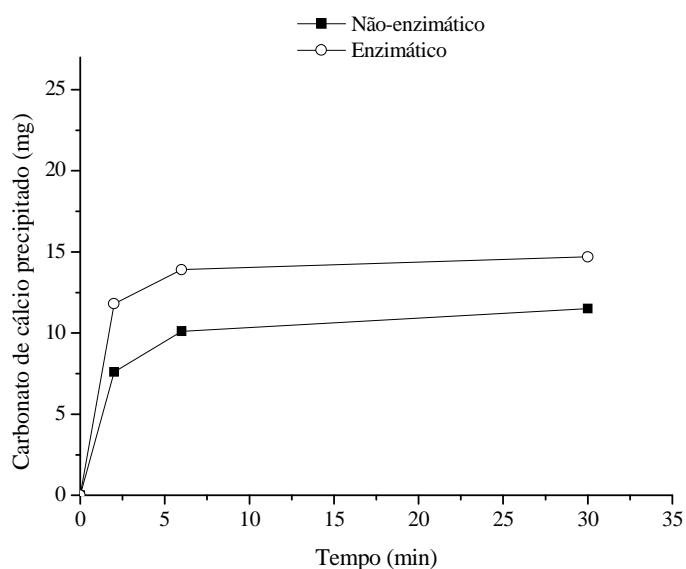
Para verificar a potencialidade do uso da anidrase carbônica extraída da biomassa de cianobactérias, foi realizado um ensaio de captação enzimática do CO<sub>2</sub>. O teste foi realizado com a enzima extraída da *Spirulina platensis* LEB 52 por apresentar alta atividade volumétrica ao longo de todo o cultivo e, além disso, já existem diversos estudos na literatura sobre a purificação da C-ficocianina produzida por esta cepa (SILVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2009; ANTELO et al., 2010; MORAES et al., 2011; MORAES et al., 2013). A cinética de precipitação do CO<sub>2</sub> na forma de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) está apresentada na Figura 4.

Como pode ser observado, a anidrase carbônica obtida da biomassa cianobactéria catalisou a hidratação do CO<sub>2</sub>, que precipitou mais rapidamente na forma de CaCO<sub>3</sub> na presença da enzima. Sabe-se, através de estudos anteriores (MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; ORES et al., 2012), que a massa total de CaCO<sub>3(s)</sub> precipitada não depende da concentração da enzima, a anidrase carbônica apenas altera a cinética para atingir o equilíbrio, pois se trata de um catalisador. Este comportamento pode ser observado na Figura 4, onde a reação na presença da anidrase carbônica (ensaio enzimático) apresentou uma taxa inicial de precipitação do CaCO<sub>3</sub> superior ao ensaio não-enzimático.

A maioria dos estudos que usam a anidrase carbônica para a captura de CO<sub>2</sub> utilizam preparações enzimáticas altamente purificadas ou de fontes de difícil ampliação de escala, como sangue humano (BOND et al., 2001; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY; 2007; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; DILMORE et al., 2009; DAVY, 2009; VINOBA et al., 2012), o que aumenta o custo do processo, limitando a aplicabilidade deste tipo de tecnologia. No entanto, já existem estudos que aplicam a enzima obtida a partir de bactérias

(SHARMA et al., 2008; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; SHARMA; BHATTACHARYA; SHRIVASTAVA, 2011) e, mais recentemente, extraída de eritrócito bovino (ORES et al., 2012) e da microalga *Chlorella vulgaris* (LI et al., 2012).

**Figura 4** – Cinética de precipitação do carbonato de cálcio



No presente trabalho, além de a enzima ter sido obtida de uma fonte potencialmente viável, biomassa microalgal, este trabalho propõem, também, a obtenção conjunta de ficobiliproteínas, com destaque para a C-ficocianina, biocorante azul de alto valor para a indústria alimentícia e farmacêutica. Além disso, a biomassa resultante do processo de extração pode ainda ser destinada para outros fins, como incorporação em ração animal, dependendo do seu conteúdo proteico. A biomassa de *Spirulina* pode inclusive ser incorporada em alimentos para consumo humano, pois possui certificado GRAS.

#### 4 CONCLUSÃO

As cianobactérias apresentaram valores de atividade volumétrica da anidrase carbônica de 41,6 U/L para a *Spirulina platensis* LEB 52 no 30º dia de cultivo, 45,9 U/L para a *Spirulina* sp. LEB 18 no 33º dia e 41,8 U/L para a *Synechococcus nidulans* no 37º dia. A partir das cinéticas, constatou-se que um maior aumento da atividade específica da enzima da *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 ocorreu durante a fase estacionária de crescimento. Ao contrário do observado para a *Synechococcus nidulans*, onde ocorreu um aumento da atividade específica da anidrase carbônica ainda na fase log, continuando na fase estacionária e de morte.

A microalga *Synechococcus nidulans* apresentou atividade específica superior, que foi de 45,3 U/g, porém, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram maiores produções de C-ficocianina e aloficocianina. As maiores concentrações obtidas no ponto de máxima atividade volumétrica foram alcançadas com a *Spirulina* sp. LEB 18, que foram 65,9 µg/mL de C-ficocianina e 82,2 µg/mL de aloficocianina.

A anidrase carbônica extraída da biomassa de *S. platensis* LEB 52 catalisou com eficiência a hidratação do CO<sub>2</sub> que precipitou na forma de CaCO<sub>3</sub>, demonstrando que a enzima obtida de cianobactérias pode ser aplicada em processos de captação enzimática do CO<sub>2</sub>.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar a potencialidade das cianobactérias para produção conjunta da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas, biomoléculas de alto valor industrial.

### Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG pelo auxílio técnico e fornecimento das algas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MOGHRABI, S.; GOIRAN, C.; ALLEMAND, D.; SPEZIALE, N.; JAUBERT, J. Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral-dinoflagellate association II. Mechanisms for bicarbonate uptake. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 199, p. 227-248, 1996.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- ANTELO, F. S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J. A.; KALIL, S. J. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 921-926, 2010.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., Virginia:[s.n], 2000.
- ARAD, S. M.; VARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, p. 92-97, 1992.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. Carbonic anhydrase activity associated with the cyanobacterium *Synechococcus* PCC79421. **Plant Physiology**, v. 89, p. 51-60, 1989.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 606-615, 1992.



- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2nd ed. Singapore, McGraw-Hill, 1986. 928 p.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M. G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. **Energy & Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.
- BRILMAN, W.; ALBA, L. G.; VENEMAN, R. Capturing atmospheric CO<sub>2</sub> using supported amine sorbents for microalgae cultivation. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 39-47, 2013.
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 339-347, fev, 2010.
- CHEN, C. Y.; KAO, P. C.; TSAI, C. J.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoyanin production and CO<sub>2</sub> fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307-312, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO<sub>2</sub> into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S. W.; KOEPEL, R.; ATAANI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 3, p. 401-410, 2009.
- ESTRADA, J. E. P.; BESCOS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 497-500, 2001.
- FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 163–170, 2009.
- FONSECA, B. M.; FERRAGUT, C.; TUCCI, A.; CROSSETTI, L. O.; FERRARI, F.; BICUDO, D. C.; SANT'ANNA, C. L.; BICUDO, C. E. M. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 9-30, 2014.
- FU, F. X.; WARNER, M. E.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; HUTCHINS, D. A. Effects of increased temperature and co2 on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 43, p. 485-496, 2007.

GANTAR, M.; SIMOVIĆ, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnospira* sp. strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 21-26, 2012.

GE, B.; QIN, S.; HAN, L.; LIN, F.; REN, Y. Antioxidant properties of recombinant allophycoerythrin expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 175-180, 2006.

GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 119-123, 2011.

HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

HOSSEINKHANI, S.; NEMAT-GORGANI, M. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 179-184, 2003.

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI, K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

KUPRIYANOVA, E. V.; LEBEDEVA, N. V.; DUDOLADOVA, M. V.; GERASIMENKO, L. M.; ALEKSEEVA, S. G.; PRONINA, N. A.; ZAVARZIN, G. A. Carbonic anhydrase activity of alkaliphilic cyanobacteria from soda lakes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 4, p. 532-539, 2003.

KUPRIYANOVA, E. V.; SINETOVA, M. S.; MARKELOVA, A. G.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; LOS, D. A.; PRONINA, N. A. Extracellular  $\beta$ -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, p. 78-86, 2011.

KUPRIYANOVA, E.; VILLAREJO, A.; MARKELOVA, A.; GERASIMENKO, L.; ZAVARZIN, G.; SAMUELSSON, G.; LOS, D. A.; PRONINA, N. Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Microbiology**, v. 153, p. 1149-1156, 2007.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 689-692, 1995.

LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 815-830, August 2008.

- LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n. 1/2, p. 55-68, 2005.
- LI, L.; FU, M. L.; ZHAO, Y. H.; ZHU, Y. T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO<sub>2</sub> capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4227-4232, 2012.
- MINKOVA, K.M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M.I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R.E. E BUSHEVA, M. Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 55-59, 2003.
- MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 921-926, 2007.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Modeling of ion exchange expanded-bed chromatography for the purification of C-phycoyanin. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 73-78, 2013.
- MORAES, C. C.; ORES, J. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Recovery of C-phycoyanin in the presence of cells using expanded bed IEC. **Chromatographia**, v. 74, n. 3, p. 307-312, 2011.
- NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-Phycoyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.
- OLENINA, I.; HAJDU, S.; EDLER, L.; ANDERSSON, A.; WASMUND, N.; BUSCH, S., GÖBEL, J.; GROMISZ, S.; HUSEBY, S.; HUTTUNEN, M.; JAANUS, A.; KOKKONEN, P.; LEDAINE, I.; NIEMKIEWICZ, E. **Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea**. [S.I.]: HELCOM Balt.Sea Environ. Proc. No. 106, ISSN 0357-2994, 2006, 144 p.
- ORES, J. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, p. 255-259, 2012.
- OU, Y.; LIN, L.; YANG, X.; PAN, Q.; CHENG, X. Antidiabetic potential of phycoyanin: effects on KKAY mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 539-544, 2013.
- PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 156-164, 2007.
- POCKER, Y.; STONE, J.T. "The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, p. 668-678, March 1967.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; SIVANESAN, S. D.; MUDLIAR, S.; KAUR, S.; TRIPATHI, A. K.; CHAKRABARTI, T. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 981-987, 2009.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 937-943, 2006.

RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* (chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267-272, 2003.

RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 18-25, 2006.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

SALEH, A. M.; DHAR, D. W.; SINGH, P. K. Comparative pigment profiles of different *Spirulina* strains. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 67-74, 2011.

SARADA, R.; PILLAI, M. G. E RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795-801, 1999.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.

SHAPIRO, H. M.; GLAZER, A. N.; CHRISTENSON, L.; WILLIAMS, J. M.; STROM, T. B. Immunofluorescence measurement in a flow cytometer using low-power helium-neon laser excitation. **Cytometry**, v. 4, p. 276-279, 1983.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> into CaCO<sub>3</sub> using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 122-128, 2010.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; PUJARI, R.; SHRIVASTAVA, A. Characterization of carbonic anhydrase from diversified genus for biomimetic carbon-dioxide sequestration. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 365-371, 2008.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; SHRIVASTAVA, A. Biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains immobilized on biopolymeric materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 416-426, 2011.

SHIH, S. R.; TSAI, K. N.; LI, Y. S.; CHUEH, C. C.; CHAN, E. C. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Medical Virology**, v. 70, p. 119-125, 2003.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of c-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 5-12, 2009.

SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. M.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 477-482, 2008.

SOLTES-RAK, E.; MULLIGAN, M. E.; COLEMAN, J. R. Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 769-774, 1997.

SU, H. N.; XIE, B. B.; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 65-70, 2010.

VAN HILLE, R. P.; ANTUNES, A. P. M.; SANYAHUMBI, D.; NIGHTINGALE, L.; DUNCAN, J. R. **Development of integrated biosorption systems for the removal and/or recovery of heavy metals from mining and other industrial wastewaters, and determination of the toxicity of metals to the bioremediation processes.** [S.I.]: Water Research Commission, WRC Report No. 1243/1/03, 2003. 126 p.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOONA, Y. I.; NAMA, S. C. Carbonic anhydrase conjugated to nanosilver immobilized onto mesoporous SBA-15 for sequestration of CO<sub>2</sub>. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 60-67, 2012.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v.176, p. 147-154, 1948.

YEH, S. W.; ONG, L. J., CLARK, J. H.; GLAZER, A. N. Fluorescence properties of allophycocyanin and a crosslinked allophycocyanin trimer. **Cytometry**, v. 8, p. 91-95, 1987.

ZARROUK, C. **Contribution a letude dune Cyanophyce, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZHANG, Z.; LIAN, B.; HOU, W.; CHEN, M.; LI, X.; SHEN, W.; LI, Y. Optimization of nutritional constituents for carbonic anhydrase production by *Bacillus mucilaginosus* K02. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 42, p. 8403-8413, 2011.

**ARTIGO 4: EXTRAÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA E FICOBILIPROTEÍNAS  
DE MICROALGAS POR DIFERENTES MÉTODOS**

## EXTRAÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA E FICOBILIPROTEÍNAS DE MICROALGAS POR DIFERENTES MÉTODOS

### RESUMO

O cultivo de microalgas em condições controladas, além de promover a biofixação de dióxido de carbono da atmosfera, pode gerar produtos de interesse comercial, como a enzima anidrase carbônica e as ficobiliproteínas, C-ficocianina e aloficocianina. Atualmente a anidrase carbônica tem recebido destaque por catalisar a hidratação reversível do CO<sub>2</sub>, sendo aplicada, então, em sistemas enzimáticos de captura de CO<sub>2</sub>. Dentre as ficobiliproteínas produzidas pelas cianobactérias do gênero *Spirulina* destaca-se a C-ficocianina, corante natural azul e, quando purificada, apresenta propriedades terapêuticas e farmacológicas. Por se tratarem de biomoléculas intracelulares, um fator importante do processo é a etapa de extração. Assim, no presente trabalho foi avaliado o uso de diferentes técnicas de ruptura celular para a extração da anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de biomassa microalgal, visando obter um máximo rendimento em extração. A partir da microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum* e da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 foram obtidos altos rendimentos de extração da enzima utilizando homogeneizador ultrassônico, 31,3 U/g e 25,5 U/g, respectivamente. Os tratamentos com secagem, congelamento e maceração, bem como a agitação com abrasivo, também demonstraram serem técnicas eficazes. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 também apresentou potencial para a extração de ficobiliproteínas em conjunto com a enzima anidrase carbônica, obtendo-se extratos com alta concentração de C-ficocianina (100,5 mg/g) e aloficocianina (69,9 mg/g). Neste trabalho, a partir da mesma biomassa, foi possível obter três biomoléculas de alto valor industrial.

**Palavras-chave:** anidrase carbônica, ficobiliproteínas, microalga, ruptura celular.

### 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas é usado para a produção de compostos químicos valiosos, incluindo pigmentos naturais, biocombustíveis e suplementos dietéticos (ANDRADE; COSTA, 2007). Devido a este potencial, cultivos têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Um bioproduto, de alto valor agregado, que também pode ser obtido a partir de biomassa microalgal, é a enzima anidrase carbônica.

A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco em seu centro ativo, amplamente encontrada na natureza, que catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no íon bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Devido sua propriedade catalítica, esta enzima tem sido estudada em sistemas de captura enzimática do CO<sub>2</sub> tanto na forma livre como imobilizada (SHEKH et al., 2012).

São encontrados na literatura trabalhos de captação que usam a enzima altamente purificada e/ou oriunda muitas vezes de sangue humano (BOND et al., 2001; MIRJAFARI;



ASGHARI; MAHINPEY; 2007; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; DILMORE et al., 2009; DAVY, 2009), obtida a partir de bactérias (SHARMA et al., 2008; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; SHARMA; BHATTACHARYA; SHRIVASTAVA, 2011) e, mais recentemente, extraída de eritrócito bovino (ORES et al., 2012) e da microalga *Chlorella vulgaris* (LI et al., 2012).

Outros bioprodutos que podem ser obtidos de biomassa microalgal são as ficobiliproteínas, pigmentos fotossintéticos acessórios que participam de uma cadeia de transferência de energia extremamente eficiente na fotossíntese (RÓMAN et al., 2002). São responsáveis por cerca de 50% de captação de luz de cianobactérias e algas vermelhas (WILLIAMS; GINGRICH; GLAZER, 1980). Os três grupos principais das ficobiliproteínas são as ficocianinas, aloficocianinas e ficoeritrinas (BENNETT; BOGORAD, 1973). As principais ficobiliproteínas encontradas em *Spirulina platensis* são a C-ficocianina e a aloficocianina (KUDDUS et al., 2013).

A cianobactéria denominada *Spirulina* (renomeada como *Arthrospira*), tem sido comercializada em diversos países por seu uso como alimento saudável e suas propriedades terapêuticas devido aos seus componentes valiosos, particularmente proteínas e vitaminas. Além disso, também é uma fonte rica e econômica de pigmentos, como a C-ficocianina (KUDDUS et al., 2013).

Aloficocianina é um complexo pigmento-proteína encontrado no núcleo dos ficobilissomas de *Spirulina*. Esta proteína solúvel em água é amplamente utilizada como uma sonda fluorescente, particularmente para a análise de citometria de fluxo (SHAPIRO et al., 1983; YEH et al., 1987). Além disso, vários estudos têm relatado que a aloficocianina possui propriedade hepatoprotetora, antioxidante, de eliminação de radicais, antiartrítico e propriedades anti-inflamatórias (REDDY et al, 2003;. ROMAY et al., 1998). Apesar de sua ampla aplicação, a aloficocianina continua a ser a ficobiliproteína menos estudada devido ao seu baixo rendimento e a falta de métodos eficazes de purificação (FAN et al. 2012).

Como a anidrase carbônica e as ficobiliproteínas estão localizadas intracelularmente, um fator importante a ser considerado é a etapa de extração. O processo de ruptura celular constitui o fator chave na produção e purificação de compostos intracelulares, o qual tem um importante efeito na recuperação e qualidade do extrato proteico obtido (BECERRA et al., 2001).

Cada micro-organismo possui características particulares referentes à localização de proteínas produzidas intracelularmente, sendo assim, a molécula de interesse pode estar localizada no citoplasma, periplasma ou até mesmo estar armazenada no interior de organelas,

como a mitocôndria. Dessa forma, o protocolo de extração pode variar de acordo com a proteína desejada (MORAES et al., 2011).

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos micro-organismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse (FARKADE et al., 2005). Assim, pode se fazer uso de pressão osmótica, condições abrasivas, tratamento químico, tratamento enzimático, secagem, congelamento-descongelamento e tratamento ultrassônico, dentre outros métodos (MORAES et al., 2011).

O processo de extração da enzima anidrase carbônica a partir de biomassa microalgal ainda é pouco explorado, na literatura é encontrado apenas o trabalho de Ores et al. (2013). Os autores estudaram a extração da enzima da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* a partir de diferentes proporções de biomassa:solvente, avaliando, também, a potencialidade da enzima em sistemas de captura enzimática de CO<sub>2</sub>.

Com relação à extração de ficobiliproteínas, são encontrados diversos trabalhos com relação à extração de C-ficocianina (SILVEIRA et al., 2007; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; MORAES et al., 2011), porém não existem estudos de extração conjunta de anidrase carbônica e ficobiliproteínas a partir de cianobactérias.

A literatura apresenta, ainda, uma lacuna com relação à de aloficocianina. Apenas no estudo de El-Mohsnawy (2013) é avaliada a extração deste pigmento por duas técnicas, lisozima juntamente com alta pressão ou somada à agitação em vórtex com pérolas de vidro, com biomassa da cianobactéria *Thermosynechococcus elongatus*. Os ensaios realizados com o vórtex foram os que resultaram em uma maior extração de aloficocianina.

Com base na importância industrial da anidrase carbônica e das ficobiliproteínas, desenvolveu-se este trabalho. Diferentes tratamentos foram avaliados para a extração da enzima a partir de duas fontes, a microalga marinha *Phaeodactylum tricorutum* e a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18. Para a *Spirulina*, este trabalho propôs, também, a extração conjunta da enzima e dos biocorantes C-ficocianina e aloficocianina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microalga e meio de cultivo

Para este estudo foi utilizada a microalga marinha *Phaeodactylum tricorutum*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, e a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da

Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção das microalgas foram utilizados o meio Conway (WALNE, 1966) com água marinha natural com salinidade de 28 (OLIVEIRA et al., 2011) para a *P. tricornutum* e o meio Zarrouk 20% (ZARROUK, 1966; REINEHR; COSTA, 2006) para a *S. sp.* LEB 18.

## 2.2 Obtenção da biomassa

Os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 1 L (volume útil de 800 mL), sendo adicionado 20% de inóculo. As algas foram incubadas a  $25\pm 1$  °C, por 28 dias (*P. tricornutum*) e 33 dias (*S. sp.* LEB 18), e a agitação realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescentes do tipo *daylight* ( $40,5 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ ), com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro. Ao final do cultivo, a biomassa foi obtida por centrifugação ( $5200 \times g$  por 20 min) e ressuspensa em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 em uma concentração de 5 g/L para realização dos testes de extração.

## 2.3 Extração da anidrase carbônica e ficobiliproteínas

Para a extração da enzima e dos biocorantes foi avaliado o desempenho de nove metodologias de ruptura:

1. Tratamento ultrassônico: o rompimento celular foi realizado utilizando um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz (ponteira micro com potência de 60 W) por 10 min, em banho de gelo e com intervalos de 2 min de descanso (ORES et al., 2013).

2. Sonicação com abrasivo: foram adicionadas pérolas de vidro ( $r < 0,4$  mm) à suspensão de biomassa na proporção de 1:1,1 (mL de suspensão: g pérolas de vidro), e a mesma foi colocada em um banho ultrassônico (50 kHz), durante 40 min, intercalando 2 min no sonicador e 2 min em banho com gelo (MEDEIROS et al., 2008).

3. Agitação com abrasivo: foram adicionadas pérolas de vidro ( $r < 0,4$  mm) à suspensão de biomassa na proporção de 1:1,1 (mL de suspensão: g pérolas de vidro), e a mistura agitada vigorosamente em vórtex durante 40 min, intercalando 2 min de agitação e 2 min em banho com gelo (MEDEIROS et al., 2008);

4. Homogeneização em gral e pistilo: a biomassa congelada ( $-18$  °C por 24 h) foi homogeneizada com auxílio de um pistilo, na presença de terra diatomácea na proporção de 5:1 (g de biomassa: g terra diatomácea) (MORAES et al., 2011).

5. Congelamento e descongelamento: a suspensão de biomassa em tampão foi submetida a dois e a quatro ciclos de congelamento (-18 °C) e descongelamento (temperatura ambiente), sendo que cada ciclo corresponde a intervalos de 24 h.

6. Secagem e maceração: a suspensão de biomassa em tampão foi seca por 24 h em estufa a 50 °C em placas de petri, raspada e macerada utilizando gral e pistilo. Após, a biomassa foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 e a suspensão foi mantida em agitação por 30 min.

7. Secagem, congelamento e maceração: a suspensão de biomassa em tampão foi seca por 24 h em estufa a 50 °C em placas de petri, raspada e congelada a -18 °C por 24 h. Após, a biomassa foi macerada utilizando gral e pistilo, ressuspensa em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 e a suspensão resultante mantida sob agitação por 30 min.

8. Extração com etanol: a biomassa foi tratada com etanol p.a. na proporção de 1:1 (g de biomassa: mL de solvente), sendo deixados em contato por 24 h a uma temperatura de 10 °C.

9. Extração com acetona: a biomassa foi tratada com acetona p.a. na proporção de 1:1 (g de biomassa: mL de solvente), sendo deixados em contato por 24 h a uma temperatura de 10 °C.

Após a ruptura celular, a suspensão resultante de cada teste foi centrifugada a 5200  $\times$  g por 20 min a uma temperatura de 4 °C, e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática e leitura de C-ficocianina e aloficocianina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.4 Métodos analíticos

Para a determinação da medida da atividade enzimática foi utilizado o teste de atividade de esterase (POCKER; STONE, 1967), adaptado. Nessa metodologia a mistura reacional consistiu em 1,8 mL de tampão Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,4, 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato. Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância à 400 nm ( $\epsilon_{p\text{-nitrofenol}} = 11,9 \text{ mL/cm}\cdot\mu\text{mol}$ ). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. Os resultados foram expressos em termos de rendimento de extração da enzima, calculado dividindo-se a atividade enzimática (U/L) pela concentração de biomassa (g/L).

As concentrações de C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC) foram determinadas por leitura da densidade óptica (DO) a 620 e 652 nm e calculadas conforme as

Equações 1 e 2 (BENNETT; BOGORAD, 1973). Da mesma forma que a atividade os resultados foram expressos em termos de rendimento de extração (mg/g), calculado dividindo-se a concentração de cada ficobiliproteína (mg/L) pela concentração de biomassa (g/L).

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

$$AFC = \frac{DO_{652} - 0,208(DO_{620})}{5,09} \quad (2)$$

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm e conversão para biomassa seca através de uma curva padrão previamente preparada (GRIFFITHS et al., 2011; HUANG et al., 2011). Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e ressuspensas com água para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105°C até peso constante.

## 2.5 Análise estatística

Os resultados foram tratados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey, considerando um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando a biomolécula de interesse é intracelular, a extração passa a ser uma das etapas mais importantes do processo. Assim, neste trabalho foi realizada uma comparação de diferentes procedimentos para a extração de anidrase carbônica de duas microalgas: *Phaeodactylum tricornutum* e *Spirulina* sp. LEB 18, e no caso da cianobactéria (*Spirulina*) foi realizada a extração conjunta da enzima e das ficobiliproteínas C-ficocianina e aloficocianina. Os resultados de extração da enzima estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

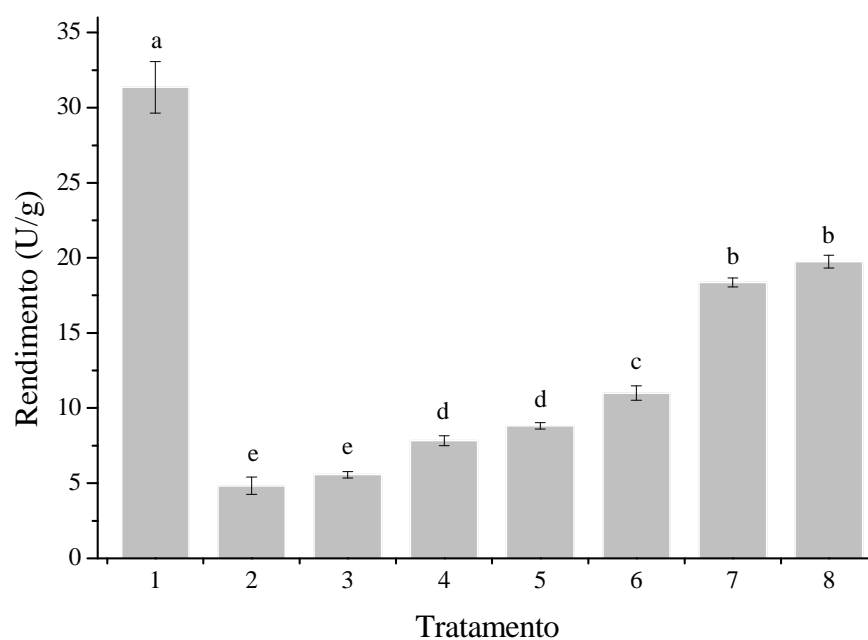
Não foi possível determinar a atividade enzimática dos extratos obtidos nos tratamentos com etanol e acetona. Como se trata de uma metodologia colorimétrica, os solventes interferiram na absorvidade do produto medido na reação, o *p*-nitrofenol. Por estes motivos os dados de extração com os solventes não são mostrados.

Com a biomassa da microalga *P. tricornutum* foram obtidos rendimentos em extração de anidrase carbônica entre 31,3 U/g (homogeneizador ultrassônico) e 4,8 U/g (sonicador com pérolas de vidro). Com a *S. sp.* LEB 18 foram obtidos rendimentos entre

25,5 U/g (homogeneizador ultrassônico) e 2,5 U/g (maceração em gral e pistilo). Para ambas as algas, o tratamento ultrassônico foi o que proporcionou maior extração da enzima e o mesmo se diferenciou estatisticamente dos demais (nível de significância de 5%).

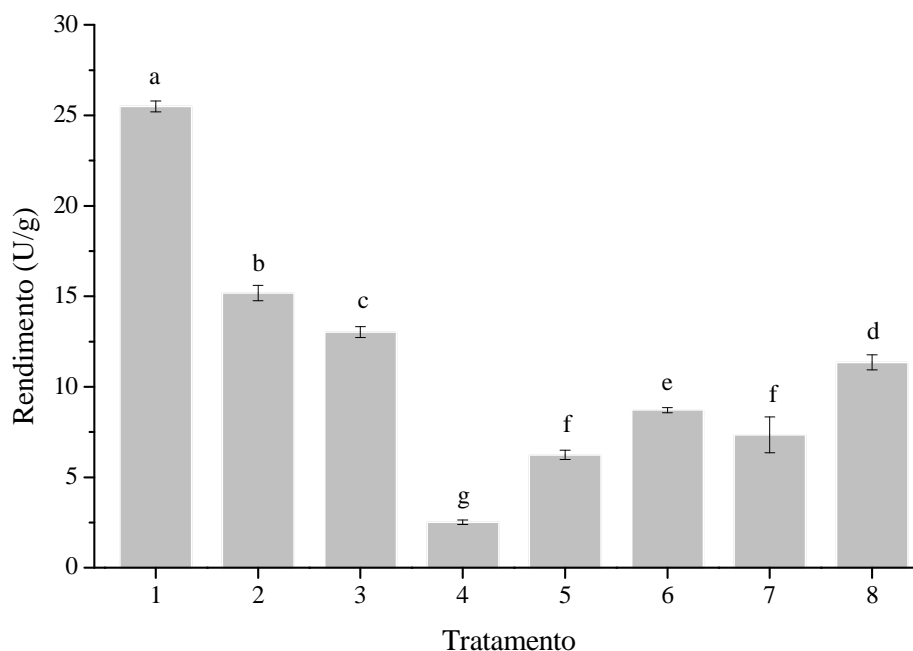
A Tabela 1 apresenta os rendimentos em extração das ficobiliproteínas obtidos com a biomassa da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18. O tratamento que proporcionou maior extração de C-ficocianina foi o congelamento/descongelamento de 4 ciclos (100 mg/g), sendo este estatisticamente igual ao valor obtido com o homogeneizador ultrassônico (90,4 mg/g). O tratamento com o homogeneizador ultrassônico, também proporcionou a maior extração de aloficocianina (69,9 mg/g).

**Figura 1** – Rendimento em extração de anidrase carbônica a partir da biomassa de *P. tricornutum* utilizando diferentes tratamentos: 1 – homogeneizador ultrassônico; 2 – sonicador com pérolas de vidro; 3 – vórtex com pérola de vidro; 4 – maceração com gral e pistilo; 5 – congelamento/descongelamento 2 ciclos; 6 – congelamento/descongelamento 4 ciclos; 7 – Secagem e maceração; 8 – secagem, congelamento e maceração



Letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ,  $n=3$ )

**Figura 2** – Rendimento em extração de anidrase carbônica a partir da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando diferentes tratamentos: 1 – homogeneizador ultrassônico; 2 – sonificador com pérolas de vidro; 3 – vórtex com pérola de vidro; 4 – maceração com gral e pistilo; 5 – congelamento/descongelamento 2 ciclos; 6 – congelamento/descongelamento 4 ciclos; 7 – Secagem e maceração; 8 – secagem, congelamento e maceração



Letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ,  $n=3$ )

**Tabela 1** – Concentrações de ficobiliproteínas (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas a partir da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando diferentes tratamentos

Tratamento	C-Ficocianina (mg/g)	Aloficocianina (mg/g)
Homogeneizador ultrassônico	90,4 $\pm$ 0,4 <sup>a,b</sup>	69,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Sonificador com pérolas de vidro	46,8 $\pm$ 9,4 <sup>e</sup>	35,1 $\pm$ 7,3 <sup>c</sup>
Vórtex com pérolas de vidro	83,4 $\pm$ 1,1 <sup>b,c</sup>	52,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
Maceração em gral e pistilo	59,1 $\pm$ 5,0 <sup>d</sup>	26,9 $\pm$ 2,7 <sup>c,d</sup>
Congelamento/Descongelamento 2 ciclos	57,7 $\pm$ 5,1 <sup>d,e</sup>	22,1 $\pm$ 2,6 <sup>d</sup>
Congelamento/Descongelamento 4 ciclos	100,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	26,4 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>
Secagem e maceração	74,4 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>	19,8 $\pm$ 2,2 <sup>d</sup>
Secagem, congelamento e maceração	76,2 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	21,1 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>

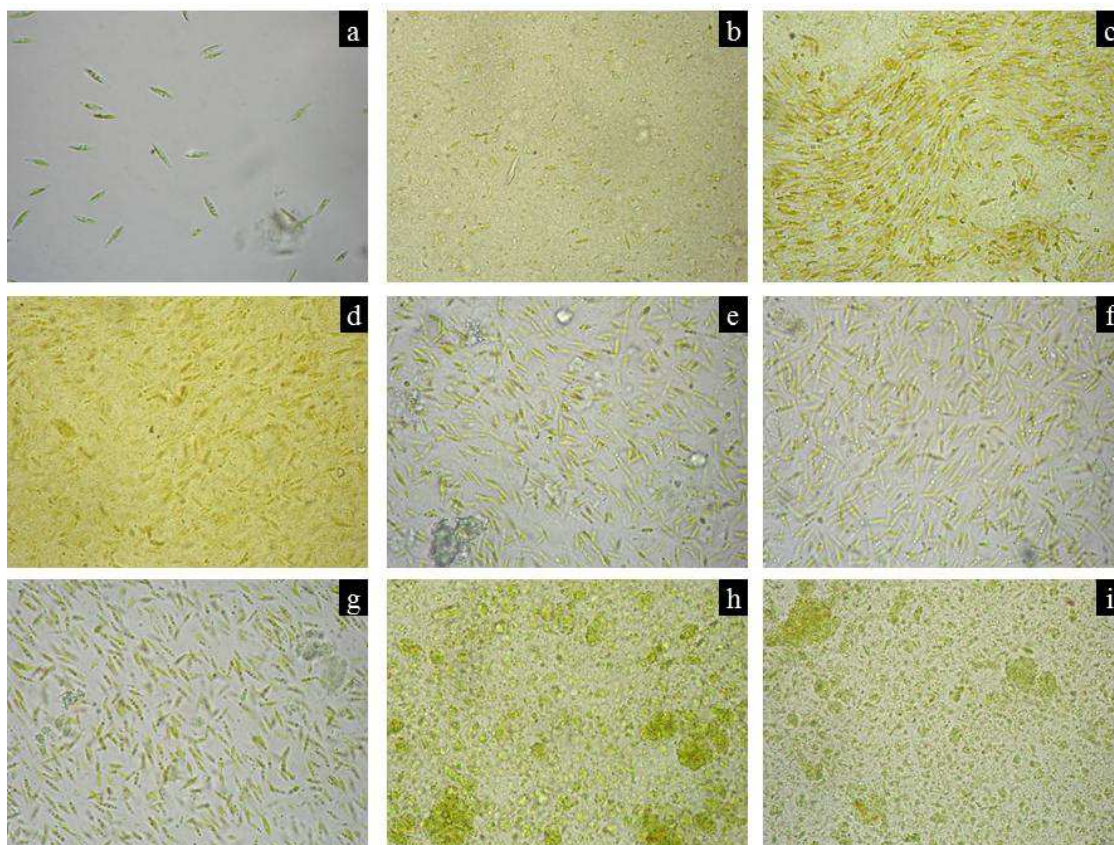
Letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ )

As Figuras 3 e 4 apresentam imagens de microscópio da biomassa das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Spirulina* sp. LEB18 antes e após os tratamentos estudados para a extração da anidrase carbônica e, também, para a extração das ficobiliproteínas no caso da cianobactéria (*Spirulina*). Pode-se verificar através das imagens que realmente o tratamento

com o homogeneizador ultrassônico foi o que provocou uma maior desintegração das células das microalgas.

Para a alga marinha *P. tricornutum* nota-se que a secagem seguida de maceração, ou de congelamento e maceração (imagens h e i da Figura 3), também proporcionou uma alta desintegração das células, comparada com a biomassa resultante dos tratamentos com sonicador, vórtex, gral e pistilo e congelamento/descongelamento. Essas observações vão ao encontro com os resultados de extração da enzima apresentados na Figura 1, onde estes dois tratamentos, após o homogeneizador ultrassônico, foram os que proporcionaram maior rendimento de extração da enzima, que foram 18,4 e 19,8 U/g.

**Figura 3** – Microalga *Phaeodactylum tricornutum* (a) antes da extração e biomassa após (b) homogeneizador ultrassônico, (c) sonicação com pérola de vidro, (d) agitação em vórtex com pérola de vidro, (e) maceração com gral e pistilo, (f) congelamento/descongelamento 2 ciclos, (g) congelamento/descongelamento 4 ciclos, (h) secagem e maceração e (i) secagem, congelamento e maceração (todas com aumento de 400 vezes)

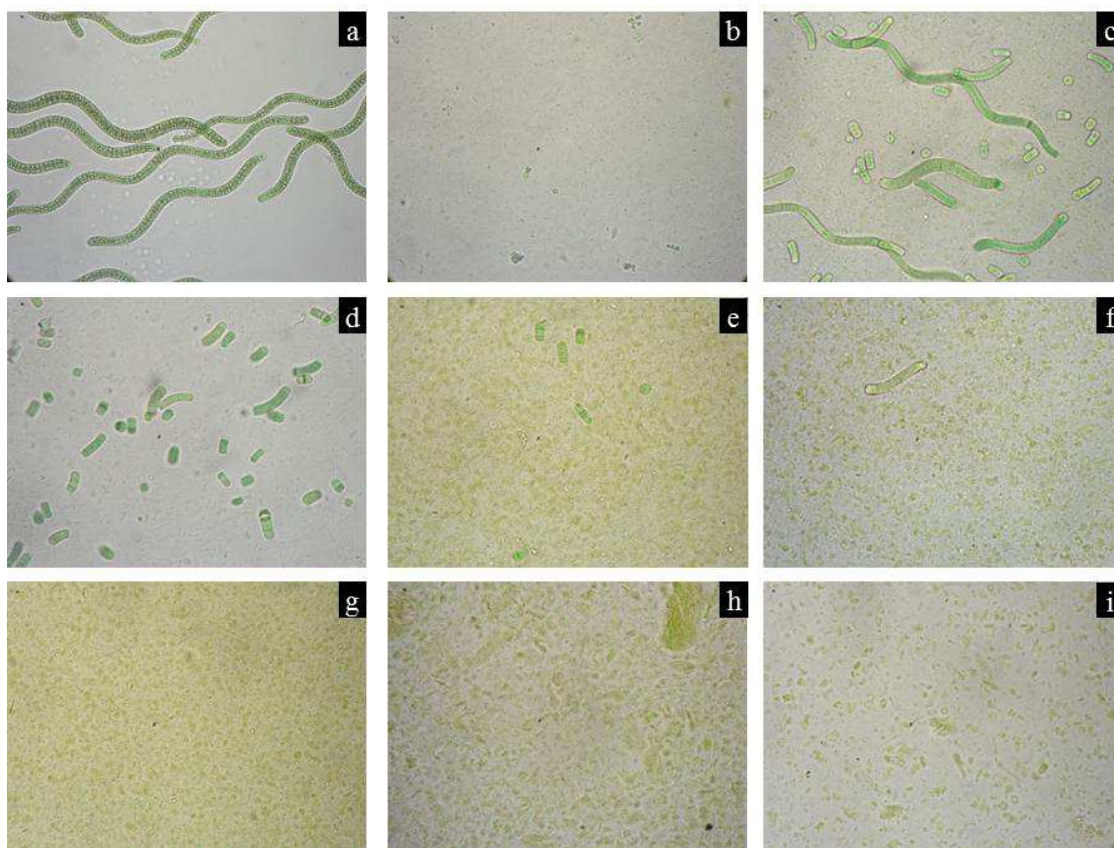


No caso da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 nota-se que a biomassa dos tratamentos com sonicador e agitação em vórtex (imagens c e d Figura 4) ainda apresentam pedaços de células inteiras. Porém, observa-se na Figura 2 que, juntamente com o tratamento



ultrassônico, foram os que proporcionaram maiores rendimentos de extração da enzima. Apesar de a desintegração celular aparentemente ser eficiente nos tratamentos que envolveram secagem, maceração e congelamento/descongelamento, a atividade obtida nos extratos foram menores comparadas aos valores obtidos com a sonicação e agitação em vórtex. Possivelmente, pode ter ocorrido desnaturação da enzima nestes tratamentos.

**Figura 4** – Microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (a) antes da extração e biomassa após (b) homogeneizador ultrassônico, (c) sonicação com pérola de vidro, (d) agitação em vórtex com pérola de vidro, (e) maceração com gral e pistilo, (f) congelamento/descongelamento 2 ciclos, (g) congelamento/descongelamento 4 ciclos, (h) secagem e maceração e (i) secagem, congelamento e maceração (todas com aumento de 400 vezes)



Em estudos de isolamento e caracterização da anidrase carbônica, algumas das metodologias utilizadas para a extração da enzima são: agitação com pérolas de vidro, prensa francesa, sonicação, maceração em gral com nitrogênio líquido, congelamento e descongelamento e homogeneização mecânica, tratamento enzimático com lisozima e homogeneizador ultrassônico (GHOSHAL; HUSIC; GOYAL, 2002; XIA; GAO, 2005; RIGOBELLO-MASINI; MASINI; AIDAR, 2006; SHARMA et al., 2008; CHINNASAMY et

al., 2009; RAMANAN et al., 2009; KUPRIYANOVA et al., 2011; LI et al., 2012). Porém, o processo de extração da enzima não é avaliado nestes trabalhos.

Na literatura é encontrado apenas um trabalho que avalia a extração da enzima anidrase carbônica a partir de microalgas. Ores et al. (2013) estudaram a extração da enzima da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* a partir de diferentes proporções de biomassa:solvente utilizando um homogeneizador ultrassônico. Foram alcançados altos rendimentos com esta biomassa (67,2 U/g) utilizando uma suspensão de 1 g/L. A desvantagem desta microalga é que o cultivo apresenta baixas produções de biomassa. O cultivo de *D. tertiolecta* alcança valores de biomassa em torno de 0,4 g/L, enquanto os cultivos com *P. tricornutum* e *S. sp.* LEB 18 resultam em valores de biomassa em torno de 1,1 e 1,8 g/L, respectivamente.

Com relação à biomassa de cianobactéria, são encontrados trabalhos que avaliam a extração de C-ficocianina a partir de biomassa seca (SILVEIRA et al., 2007; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010) e de biomassa úmida (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999; MORAES et al., 2011). No estudo de Sarada, Pillai e Ravishankar (1999), dentre as técnicas estudadas para a extração de C-ficocianina de *Spirulina platensis*, o congelamento e descongelamento e a homogeneização em gral e pistilo foram as que proporcionaram os maiores rendimentos, 194,7 e 196,6 mg/g, respectivamente. Os autores ainda relatam que o congelamento/descongelamento foi o método que proporcionou maior qualidade de C-ficocianina; o extrato obtido não continha clorofila. Neste estudo, o maior rendimento em extração de C-ficocianina, também, foi alcançado com a técnica de congelamento e descongelamento (4 ciclos).

Nos trabalhos de Silveira et al. (2007) e Moraes, Burkert e Kalil (2010) são alcançados valores de rendimento de extração em torno de 82 mg/g quando utilizado secagem seguida de congelamento e maceração para a extração de C-ficocianina a partir da biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52. Com o tratamento de secagem, congelamento e maceração utilizado neste trabalho, utilizando biomassa de *Spirulina sp.* LEB 18, foi alcançado um valor de C-ficocianina (76,2 mg/g) próximo ao dos autores citados acima.

Já no estudo de Moraes et al. (2011) com biomassa úmida *Spirulina platensis* LEB 52, a sonicação com pérola de vidro foi o tratamento que resultou nos maiores rendimentos. Os autores obtiveram valores de C-ficocianina em torno de 43,7 mg/g, valor próximo ao obtido neste trabalho utilizando o mesmo tratamento, que foi de 46,8 mg/g.

Poucos trabalhos são encontrados com relação à extração de aloficocianina (EL-MOHSNAWY, 2013). São encontrados mais estudos com relação à purificação deste

pigmento (PARMAR; SINGH; MADANWAR, 2010; YAN et al., 2011; FAN et al., 2012; HASHIMOTO et al., 2012; EL-MOHSNAWY, 2013), onde são utilizadas técnicas como agitação com pérolas de vidro, sonicação, tratamento enzimático, alta pressão, congelamento e descongelamento, liofilização e a combinação destes tratamentos.

No estudo de El-Mohsnawy (2013) é avaliada a extração de aloficocianina a partir da biomassa de *Thermosynechococcus elongatus* por duas técnicas, lisozima juntamente com alta pressão ou somada à agitação em vórtex com pérolas de vidro. Os autores avaliam ainda a purificação da aloficocianina por diferentes técnicas. Em todos os ensaios é verificado, também, o conteúdo de C-ficocianina. Os ensaios realizados com o vórtex foram os que resultaram em uma maior extração de aloficocianina e nos experimentos de alta pressão ocorreu uma maior extração de C-ficocianina. Os autores relatam que as pérolas de vidro possuem um efeito mais forte de destruição, levando à liberação de mais conteúdo de aloficocianina. No presente trabalho, o vórtex também proporcionou altos rendimentos de extração da aloficocianina de *Spirulina* sp. LEB 18, que foi de 52, 6 mg/g, ficando atrás apenas do tratamento ultrassônico.

Em operações de ruptura celular de micro-organismos em larga escala comumente são utilizados métodos mecânicos de desintegração celular como moinho de bolas e homogeneizadores de alta pressão, porém a eficiência energética destes métodos é geralmente em torno de 5-10%. O restante é dissipado na forma de calor, que precisa ser removido de forma eficiente para manter a integridade de bioprodutos sensíveis (GOGATE; KABADI, 2009). Embora os métodos mecânicos sejam industrialmente preferidos, devido sua alta recuperação do produto, a sua fraca seletividade é uma grande desvantagem, juntamente com a micronização dos fragmentos celulares (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

O tratamento com ultrassom é um dos métodos de ruptura mais usados em escala laboratorial (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002) e tem sido reconhecido cada vez mais como um eficiente método de extração, sendo utilizado para lise celular de leveduras (MEDEIROS et al., 2008; LEMES; ÁLVARES; KALIL, 2013) e de microalgas (BERMEJO et al., 2001; FURUKI et al., 2003; PATEL et al., 2005, BERMEJO et al., 2006; MORAES et al., 2011).

O uso de reatores de cavitação hidrodinâmica para rompimento celular tem sido aprovado, inclusive, para aplicações em larga escala, pois tem demonstrado maior eficiência em comparação com técnicas convencionais baseadas na utilização da energia mecânica (GOGATE; KABADI, 2009). No geral, a cavitação é uma tecnologia bem estabelecida em escala de laboratório e piloto (GOGATE et al., 2001; BALASUNDARAM; HARRISON;

BRACEWELL, 2009), mas são necessários os esforços combinados de químicos, engenheiros e físicos para aproveitar eficazmente o potencial desta tecnologia em escala industrial.

Altos valores de rendimento em extração da enzima e das ficobiliproteínas foram obtidos neste trabalho com técnicas possíveis de serem utilizadas tanto em escala laboratorial como industrial. A escolha da metodologia mais apropriada, bem como da biomassa microalgal, vai depender do uso destas biomoléculas e, também, do suporte disponível.

#### 4 CONCLUSÃO

Maiores rendimentos de extração da enzima a partir da microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum* e da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 foram obtidos utilizando homogeneizador ultrassônico, que foram 31,3 U/g e 25,5 U/g, respectivamente. Os tratamentos com secagem, congelamento e maceração, bem como a agitação com abrasivo, também demonstraram ser técnicas eficazes para a extração da enzima.

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, também apresentou potencial para a extração de ficobiliproteínas em conjunto com a enzima anidrase carbônica. Com o homogeneizador ultrassônico foi possível obter uma alta concentração de C-ficocianina de 90,4 mg/g, bem como 69,9 mg/g de aloficocianina. Ou seja, a partir da mesma biomassa, foi possível obter três biomoléculas de alto valor industrial.

O trabalho apresenta diferentes processos eficientes para a extração de anidrase carbônica e de ficobiliproteínas tanto para escala laboratorial como industrial.

#### Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA e ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG pelo fornecimento das algas e auxílio técnico.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p. 130-134, 2007.

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009.

- BECERRA, M.; BELMONTE, E. R.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G. Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135-139, 2001.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- BERMEJO, R., FELIPE, M. A., TALAVERA, E. M. AND ALVAREZ-PEZ, J. M., Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1-2, p. 59-66, 2006.
- BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. **Journal of Chromatography A**, v. 917, p. 135-145, 2001.
- BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M. G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. **Energy & Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.
- CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 518-532, 2009.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO<sub>2</sub> into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S. W.; KOEPEL, R.; ATAAI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 3, p. 401-410, 2009.
- EL-MOHSNAWY, E. Purification, characterization, and activity evaluation of allophycocyanin from *Thermosynechococcus elongates*. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, 2013.
- FAN, C.; JIANG, J.; YIN, X.; WONG, K. H.; ZHENG, W.; CHEN, T. Purification of selenium-containing allophycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* and its hepatoprotective effect against t-BOOH-induced apoptosis. **Food Chemistry**, v. 134, p. 253-261, 2012.
- FARKADE, V. D.; HARRISON, S.; PANDIT, A. B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 247-257, 2005.

FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 163–170, 2009.

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

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GHOSHAL, D.; HUSIC, H. D.; GOYAL, A. Dissolved inorganic carbon concentration mechanism in *Chlamydomonas moewusii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 299-305, 2002.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60-72, 2009.

GOGATE, P. R.; SHIRGAONKAR, I. Z.; SIVAKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, P.; VICHARE, N. P.; PANDIT, A. B. Cavitation reactors: Efficiency assessment using a model reaction. **AIChE Journal**, v. 47, n. 11, p. 2526-2538, 2001.

GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 119-123, 2011.

HUANG, W. W.; DONG, B. Z.; CAI, Z. P.; DUAN, S. S. Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 61, p. 13164-13174, October, 2011

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycocyanin. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2013.

KUPRIYANOVA, E. V.; SINETOVA, M. S.; MARKELOVA, A. G.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; LOS, D. A.; PRONINA, N. A. Extracellular  $\beta$ -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, p. 78-86, 2011.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 9-15, 2013

LI, L.; FU, M. L.; ZHAO, Y. H.; ZHU, Y. T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO<sub>2</sub> capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4227-4232, 2012.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 921-926, 2007.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133-148, 2010.

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011.

OLIVEIRA, L. S.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, I. A.; MENDES, C. Q.; CRUZ, A. C. S.; LEITE, M. B. N.; ARAUJO, V. Q.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I.; VICH, D.; TOSTO, M. Biocombustíveis de microalgas: seleção das melhores espécies com base na produção de lipídios. **In.: VII SEMBIO - Semana de Biologia da UFBA: Protegendo nossas Florestas**. Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, p. 35-37, 2011.

ORES, J. C.; FERNANDES, S. S.; AMARANTE, M. C. A.; SILVA, B. P.; KALIL, S. J. Tecnologia enzimática para captura de CO<sub>2</sub>: Cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica. **Vetor**, v. 23, n. 2, p. 82-92, 2013.

ORES, J. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, p. 255-259, 2012.

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

POCKER, Y.; STONE, J.T. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, p. 668-678, 1967.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; SIVANESAN, S. D.; MUDLIAR, S.; KAUR, S.; TRIPATHI, A. K.; CHAKRABARTI, T. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 981-987, 2009.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.937-943, 2006.

- RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 18-25, 2006.
- ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; GARCIA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from bluegreen algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36-41, 1998.
- SARADA, R.; PILLAI, M. G. E RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795-801, 1999.
- SHAPIRO, H. M.; GLAZER, A. N.; CHRISTENSON, L.; WILLIAMS, J. M.; STROM, T. B. Immunofluorescence measurement in a flow cytometer using low-power helium-neon laser excitation. **Cytometry**, v. 4, p. 276-279, 1983.
- SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> into CaCO<sub>3</sub> using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 122-128, 2010.
- SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; PUJARI, R.; SHRIVASTAVA, A. Characterization of carbonic anhydrase from diversified genus for biomimetic carbon-dioxide sequestration. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 365-371, 2008.
- SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; SHRIVASTAVA, A. Biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains immobilized on biopolymeric materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 416-426, 2011.
- SHEKH, A. Y.; KRISHNAMURTHI, K.; MUDLIAR, S. N.; YADAV, R. R.; FULKE, A. B.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Recent advancements in carbonic anhydrase – Driven processes for CO<sub>2</sub> sequestration: Minireview. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 1419-1440, 2012.
- 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. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2007.
- WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v. 25, n. 4, p.1-53, 1966.
- WILLIAMS, R.; GINGRICH, J.; GLAZER, A. Cyanobacterial phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and two pigment mutants. *The Journal of cell Biology*, 85, No. 3, 558, 1980.
- XIA, J. R.; GAO, K. S. Impacts of elevated CO<sub>2</sub> concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae. **Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)**, v. 47, n. 6, p. 668-675, 2005.



YEH, S. W.; ONG, L. J., CLARK, J. H.; GLAZER, A. N. Fluorescence properties of allophycocyanin and a crosslinked allophycocyanin trimer. **Cytometry**, v. 8, p. 91-95, 1987.

ZARROUK, C. **Contribution a letude dune Cyanophycee, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

## CONCLUSÃO GERAL

O estudo demonstrou que a biomassa de microalgas apresenta-se como uma fonte potencialmente atrativa para obtenção da anidrase carbônica, aplicada em processos de captação enzimática do CO<sub>2</sub>, e, no caso das cianobactérias, produção conjunta da enzima e ficobiliproteínas, que são biocorantes de alto valor comercial.

Altos rendimentos de extração da enzima a partir da microalga *Dunaliella tertiolecta* foram obtidos utilizando tratamento ultrassônico com baixas concentrações de biomassa úmida, entre 0,1 e 0,2 g/L. O ultrassom mostrou ser um método de ruptura rápido e eficaz, sendo necessários tempos de extração mínimos de 3 min.

Dentre as microalgas marinhas (*Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*) e dulcícolas (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*) estudadas, a *Phaeodactylum tricornutum* e a *Chlorella vulgaris* se destacaram como produtoras da enzima anidrase carbônica. A *Chlorella vulgaris* apresentou valores de atividade enzimática de 44,0 U/L e atividade específica de 17,0 U/g no 37° dia de cultivo, e a *Phaeodactylum tricornutum* apresentou atividades enzimáticas de anidrase carbônica de 19,9 U/L e 17,4 U/g no 30° dia de cultivo.

No estudo da produção da anidrase carbônica e de ficobiliproteínas pelas cianobactérias *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*, foram obtidos valores de atividade volumétrica entre 41,6 e 45,9 U/L, sendo que a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 se destacou como maior produtora de C-ficocianina e aloficocianina, as concentrações obtidas no ponto de máxima atividade volumétrica (45,9 U/L, 33° dia do cultivo) foram 65,9 µg/mL de C-ficocianina e 82,2 µg/mL de aloficocianina.

Foram testados diferentes processos para a extração da enzima a partir da alga marinha *Phaeodactylum tricornutum* e para a extração conjunta de anidrase carbônica e ficobiliproteínas a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18. Maiores rendimentos de extração da enzima foram obtidos utilizando o tratamento ultrassônico para o rompimento celular. Foram obtidos rendimentos de 31,3 U/g para a microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum* e 25,5 U/g para a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18.

Nos ensaios de ruptura celular da *Spirulina* sp. LEB 18, a máxima extração de C-ficocianina (100,5 mg/g) foi alcançada com 4 ciclos de congelamento e descongelamento. Já para a aloficocianina, a máxima concentração de 69,9 mg/g foi obtida utilizando o homogeneizador ultrassônico.

A enzima extraída da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 catalisaram a hidratação do CO<sub>2</sub>, que precipitou mais rapidamente

na forma de carbonato de cálcio na presença da enzima, demonstrando que a anidrase carbônica obtida de microalgas pode ser aplicada em processos de captação enzimática do CO<sub>2</sub>.

**SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Estudo da captação enzimática do CO<sub>2</sub> utilizando a enzima obtida pelas microalgas estudadas;
- Otimização das condições da extração conjunta da anidrase carbônica e das ficobiliproteínas com os métodos mais promissores;
- Caracterização da biomassa antes e após a extração dos biocompostos;
- Purificação da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas simultaneamente;
- Caracterização da enzima e das ficobiliproteínas;
- Imobilização da enzima.

**CAPÍTULO V**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.
- ADAM, F.; ABERT-VIAN, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457-465, 2012.
- ALBER, B. E.; FERRY, J. G. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 6909-6913, 1994.
- AL-MOGHRABI, S.; GOIRAN, C.; ALLEMAND, D.; SPEZIALE, N.; JAUBERT, J. Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral-dinoflagellate association II. Mechanisms for bicarbonate uptake. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 199, p. 227-248, 1996.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p. 130-134, 2007.
- ANTELO, F. S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J. A.; KALIL, S. J. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 921-926, 2010.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., Virginia:[s.n], 2000.
- ARAD, S. M.; VARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, p. 92-97, 1992.
- ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. R. L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 95-98, 2013.
- ARRHENIUS, S. On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature of the ground. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 41, p. 237-276, 1896.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. Carbonic anhydrase activity associated with the cyanobacterium *Synechococcus* PCC79421. **Plant Physiology**, v. 89, p. 51-60, 1989.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 606-615, 1992.

- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p. 369-392, 1994
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2nd ed. Singapore, McGraw-Hill, 1986. 928 p.
- BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009.
- BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A.B. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation, **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 251-256, 2001.
- BAYRAM, E.; SENTURK, M.; KUFREVIOGLU, O. I.; SUPURAN, C. T. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9101-9105, 2008.
- BECERRA, M.; BELMONTE, E. R.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G. Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135-139, 2001.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- BERMEJO, R., FELIPE, M. A., TALAVERA, E. M. AND ALVAREZ-PEZ, J. M., Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1-2, p. 59-66, 2006.
- BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. **Journal of Chromatography A**, v. 917, p. 135-145, 2001.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, 2000.
- BHATTI, S.; HUERTAS, I. E.; COLMAN, B. Acquisition of inorganic carbon by the marine haptophyte *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 914-921, 2002.
- BILANOVIC, D.; ANDARGATCHEW, A.; KROEGER, T.; SHELEF, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. **Energy Conversation and Management**, v. 50, p. 262-267, 2009.
- BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M. G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. **Energy & Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.



- BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: Primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”. **Atlântica**, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermenters. **Journal of biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.
- BRILMAN, W.; ALBA, L. G.; VENEMAN, R. Capturing atmospheric CO<sub>2</sub> using supported amine sorbents for microalgae cultivation. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 39-47, 2013.
- BURNELL, J. N.; GIBBS, M. J.; MASON, J. G. Spinach chloroplastic carbonic anhydrase. **Plant Physiology**, v. 92, p. 37-40, 1990
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 339-347, fev, 2010.
- CENTOFANTI, M.; MANNI, G. L.; NAPOLI, D.; BUCCI, M. G. Comparative effects on intraocular pressure between systemic and topical carbonic anhydrase inhibitors: a clinical masked, cross-over study. **Pharmacological Research**, v. 35, p. 481-485, 1997.
- CERÓN GARCÍA, M. C.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E.; GARCÍA CAMACHO, F. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p 239-248, 2000.
- CERÓN GARCÍA, M. C.; SÁNCHEZ MIRÓN, A.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E.; GARCÍA CAMACHO, F. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297-305, 2005.
- CHANG, E. H.; YANG, S. S. Microalgae for biofixation of carbon dioxide – Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 44, p. 43-52, 2003.
- CHEN, C. Y.; KAO, P. C.; TSAI, C. J.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoyanin production and CO<sub>2</sub> fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307-312, 2013.
- CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 71-81, 2011.
- CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 518-532, 2009.

- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p. 194-204, 1986.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO<sub>2</sub> into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DERE, S.; GÜNES, T.; SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. **Turkish Journal of Botany**, Turkey, v. 22, p. 13-17, 1998.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S. W.; KOEPEL, R.; ATAAI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 3, p. 401-410, 2009.
- DUCRET, A.; MÜLLER, S. A.; GOLDIE, K. N.; HEFTI, A.; SIDLER, W. A.; ZUBER, H.; ENGEL, A. Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacyclic allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, p. 369-388, 1998.
- EL-MOHSNAWY, E. Purification, characterization, and activity evaluation of allophycocyanin from *Thermosynechococcus elongates*. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, 2013.
- ESTRADA, J. E. P.; BESCOS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 497-500, 2001.
- FAN, C.; JIANG, J.; YIN, X.; WONG, K. H.; ZHENG, W.; CHEN, T. Purification of selenium-containing allophycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* and its hepatoprotective effect against t-BOOH-induced apoptosis. **Food Chemistry**, v. 134, p. 253-261, 2012.
- FARKADE, V. D.; HARRISON, S.; PANDIT, A. B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 247-257, 2005.
- FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 163-170, 2009.

- FAWCETT, T. W.; BROWSE, J. A.; VOLOKITA, M.; BARTLETT, S. G. Spinach carbonic anhydrase primary structure deduced from the sequence of a cDNA clone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 10, April, p. 5414-5417, 1990.
- FIGUEROA, J. D.; FOUT, T.; PLASYNSKI, S.; MCILVRIED, H.; SRIVASTAVA, R. D. Advances in CO<sub>2</sub> capture technology – The U.S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 2, p. 9-20, 2008.
- FISHER, M.; GOKHMAN, I.; PICK, U.; ZAMIR, A. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 17718-17723, 1996.
- FONSECA, B. M.; FERRAGUT, C.; TUCCI, A.; CROSSETTI, L. O.; FERRARI, F.; BICUDO, D. C.; SANT'ANNA, C. L.; BICUDO, C. E. M. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 9-30, 2014.
- FU, F. X.; WARNER, M. E.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; HUTCHINS, D. A. Effects of increased temperature and CO<sub>2</sub> on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 43, p. 485-496, 2007.
- FUKUZAWA, H.; FUJIWARA, S.; YAMAMOTO, Y.; DIONISIO-SESE, M. L.; MIYACHI, S. cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*-regulation by environmental CO<sub>2</sub> concentration. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 87, p. 4383-4387, 1990.
- FULKE, A. B.; CHAMBHARE, K. Y.; SANGOLKAR, L. N.; GIRIPUNJE, M. D.; KRISHNAMURTHI, K.; JUWARKAR, A. A.; CHAKRABARTI, T. Potential of wastewater grown algae for biodiesel production and CO<sub>2</sub> sequestration. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 2939-2948, 2013.
- FURUKI, T.; MAEDA, S.; IMAJO, S.; HIROI, T.; AMAYA, T.; HIROKAWA, T.; ITO, K.; NOZAWA, H. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 319-324, 2003.
- GANTAR, M.; SIMOVIĆ, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 21-26, 2012.
- GE, B.; QIN, S.; HAN, L.; LIN, F.; REN, Y. Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 175-180, 2006.
- GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

- GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.
- GHOSHAL, D.; HUSIC, H. D.; GOYAL, A. Dissolved inorganic carbon concentration mechanism in *Chlamydomonas moewusii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 299-305, 2002.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60-72, 2009.
- GOGATE, P. R.; SHIRGAONKAR, I. Z.; SIVAKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, P.; VICHARE, N. P.; PANDIT, A. B. Cavitation reactors: Efficiency assessment using a model reaction. **AIChE Journal**, v. 47, n. 11, p. 2526-2538, 2001.
- GOO, B. G.; BAEK, G.; CHOI, D. J.; PARK, Y. I.; SYNYTSYA, A.; BLEHA, R.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; PARK, J. K. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 343-350, 2013.
- GÖTZ, R.; GNANN, A.; ZIMMERMANN, F. K. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. **Yeast**, v. 15, p. 855-864, 1999.
- GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N. M. **Microalgae in novel food products**. In: Food Chemistry Research Developments. [S.I.]: Nova Science Publishers, 2008. p. 75-112
- GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 119-123, 2011.
- GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.
- GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.
- HARRISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 217-240, 1991.
- HENRIQUES, M.; SILVA, A.; ROCHA, J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 586-593, 2007.
- HENRY, R. P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. **Annual Review Physiology**, v. 58, p. 523-538, 1996.

HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

HILTONEN, T.; BJÖRKBACKA, H.; FORSMAN, C.; CLARKE, A. K.; SAMUELSSON, G. Intracellular beta-carbonic anhydrase of the unicellular green alga *Coccomyxa*. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1341-1349, 1998.

HOSSEINKHANI, S.; NEMAT-GORGANI, M. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 179-184, 2003.

HUANG, W. W.; DONG, B. Z.; CAI, Z. P.; DUAN, S. S. Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 61, p. 13164-13174, October, 2011

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

IGLESIAS-RODRÍGUEZ, M. D.; NIMER, N. A.; MERRETT, M. J. Carbon dioxide-concentrating mechanism and the development of extracellular carbonic anhydrase in the marine picoeukaryote *Micromonas pusilla*. **New Phytologist**, v. 140, p. 685-690, 1998.

IPCC – INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2001: the scientific basis**. In: Houghton, J.T. (Ed.), Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge Univ. Press, New York, p. 881, 2001.

IPCC – INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2007: the scientific basis**. In: Solomon, S. (Ed.), Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge Univ. Press, New York, 2007.

JÄPELT, R. B.; JAKOBSEN, J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 136, May, p. 1-20, 2013.

JIANG, W. P.; GUPTA, D. Structure of the carbonic anhydrase VI (CA6) gene: evidence for two distinct groups within the alpha-CA gene family. **Biochemical Journal**, v. 344, p. 385-390, 1999.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, p. 4607-4638, 2013.

KANTH, B. K.; PACK, S. P. Carbonic anhydrase as CO<sub>2</sub> capturing agent: its classes and catalytic mechanisms. In: PROCEEDINGS OF THE 2013 INTERNATIONAL

CONFERENCE ON BIOLOGY, MEDICAL PHYSICS, MEDICAL CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY AND BIOMEDICAL ENGINEERING (BIOMED 2013), 2013, Venice, Italy. **Anais Recent advances in biology, medical physics, medical chemistry, biochemistry and biomedical engineering**. Venice, 2013, p. 57-61.

KAPLAN, A.; REINHOLD, L. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 539-570, 1999.

KARLSSON, J.; CLARKE, A. K.; CHEN, Z. Y.; HUGGHINS, S. Y.; PARK, Y. I.; HUSIC, H. D.; MORONEY, J. V.; SAMUELSSON, G. A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO<sub>2</sub>. **EMBO Journal**, v. 17, p. 1208-1216, 1998.

KAUL, T.; REDDY, P. S.; MAHANTY, S.; THIRULOGACHANDAR, V.; REDDY, R. A.; KUMAR, B.; SOPORY, S. K.; REDDY, M. K. Biochemical and molecular characterization of stress-induced  $\beta$ -carbonic anhydrase from a C<sub>4</sub> plant, *Pennisetum glaucum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 601-610, 2011.

KHALIFAH, R. G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase, Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 2561-2573, 1971.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycoyanin. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2013.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; NAYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 4945-4953, 2011.

KUPRIYANOVA, E. V.; LEBEDEVA, N. V.; DUDOLADOVA, M. V.; GERASIMENKO, L. M.; ALEKSEEVA, S. G.; PRONINA, N. A.; ZAVARZIN, G. A. Carbonic anhydrase activity of alkaliphilic cyanobacteria from soda lakes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 4, p. 532-539, 2003.

KUPRIYANOVA, E. V.; SINETOVA, M. S.; MARKELOVA, A. G.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; LOS, D. A.; PRONINA, N. A. Extracellular  $\beta$ -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, p. 78-86, 2011.

KUPRIYANOVA, E.; VILLAREJO, A.; MARKELOVA, A.; GERASIMENKO, L.; ZAVARZIN, G.; SAMUELSSON, G.; LOS, D. A.; PRONINA, N. Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Microbiology**, v. 153, p. 1149-1156, 2007.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 689-692, 1995.

LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 815-830, August 2008.

LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n. 1/2, p. 55-68, 2005.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 9-15, 2013

LI, L.; FU, M. L.; ZHAO, Y. H.; ZHU, Y. T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO<sub>2</sub> capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4227-4232, 2012.

LI, Y.; HOSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 815-820, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 11, p. 591-592, April, 1985.

LIMA, A. L.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 63-68, 2002.

LINDSKOG, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 74, n. 1, p. 1-20, 1997.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, p. 948-952, 2009.

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

MASSART, A.; AUBRY, E.; HANTSON, A. L. Étude de stratégies de culture de *Dunaliella tertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 14, n. 2, p. 567-572, 2010.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

- MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.
- MELDRUM, N. U.; ROUGHTON, F. J. W. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. **Journal de Physiologie**, v. 80, p. 113-142, 1933.
- METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 477-489, 1996.
- MINKOVA, K.M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M.I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R.E. E BUSHEVA, M. Purification of C-phycoyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 55-59, 2003.
- MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 921-926, 2007.
- MORAES, C. C.; BURKERT, J. F.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133-148, 2010.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Modeling of ion exchange expanded-bed chromatography for the purification of C-phycoyanin. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 73-78, 2013.
- MORAES, C. C.; ORES, J. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Recovery of C-phycoyanin in the presence of cells using expanded bed IEC. **Chromatographia**, v. 74, n. 3, p. 307-312, 2011a.
- MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-Phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011b.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 439-445, 2007.
- MORONEY, J. V.; BARTLETT, S. G.; SAMUELSSON, G. Carbonic anhydrases in plants and algae. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 141-153, 2001.
- MORONEY, J. V.; SOMANCHI, A. How do algae concentrate CO<sub>2</sub> to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? **Plant Physiology**, v. 119, n. 1, p. 9-16, 1999.
- NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-Phycoyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.



NEWMAN, T.; DEBRUIJN, F. J.; GREEN, P.; KEEGSTRA, K.; KENDE, H.; MCINTOSH, L.; OHLROGGE, J.; RAIKHEL, N.; SOMERVILLE, S.; THOMASHOW, M.; RETZEL, E.; SOMERVILLE, C. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1241-1255, 1994.

NIMER, N. A.; WARREN, M.; MERRETT, M. J. The regulation of photosynthetic rate and activation of extracellular carbonic anhydrase under CO<sub>2</sub>-limiting conditions in the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 805-812, 1998.

NOAA – NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. United States Department of Commerce, 2014. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 31 de mar. de 2014.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, 2008.

OLENINA, I.; HAJDU, S.; EDLER, L.; ANDERSSON, A.; WASMUND, N.; BUSCH, S., GÖBEL, J.; GROMISZ, S.; HUSEBY, S.; HUTTUNEN, M.; JAANUS, A.; KOKKONEN, P.; LEDAINE, I.; NIEMKIEWICZ, E. **Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea**. [S.I.]: HELCOM Balt.Sea Environ. Proc. No. 106, ISSN 0357-2994, 2006, 144 p.

OLIVEIRA, L. S.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, I. A.; MENDES, C. Q.; CRUZ, A. C. S.; LEITE, M. B. N.; ARAUJO, V. Q.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I.; VICH, D.; TOSTO, M. Biocombustíveis de microalgas: seleção das melhores espécies com base na produção de lipídios. **In.: VII SEMBIO - Semana de Biologia da UFBA: Protegendo nossas Florestas**. Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, p. 35-37, 2011.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. **Biosystems Engineering**, v. 95, n. 4, p. 597-606, 2006.

ORES, J. C.; FERNANDES, S. S.; AMARANTE, M. C. A.; SILVA, B. P.; KALIL, S. J. Tecnologia enzimática para captura de CO<sub>2</sub>: Cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica. **Vetor**, v. 23, n. 2, p. 82-92, 2013.

ORES, J. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, p. 255-259, 2012.

ORMEROD, W. G.; FREUND, P.; SMITH, A.; DAVISON, J. **Ocean storage of CO<sub>2</sub>**. IEA greenhouse gas R&D programme. UK: International Energy Agency, 2002.

OU, Y.; LIN, L.; YANG, X.; PAN, Q.; CHENG, X. Antidiabetic potential of phycocyanin: effects on KKAY mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 539-544, 2013.

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.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoerythrin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 156-164, 2007.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, São Paulo, SP: Editora Manole, 2005. ISBN 852042032X.

POCKER, Y.; STONE, J.T. "The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, p. 668-678, March 1967.

PRICE, G. D.; HOWITT, S. M.; HARRISON, K.; BADGER, M. R. Analysis of a genomic DNA region from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942 involved in carboxysome assembly and function. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2871-2879, 1993.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; SIVANESAN, S. D.; MUDLIAR, S.; KAUR, S.; TRIPATHI, A. K.; CHAKRABARTI, T. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 981-987, 2009.

RAMANATHAN, V.; FENG, Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 37-50, 2009.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.937-943, 2006.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; NOVAIS, J. M. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 181-187, 1998.

RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* (chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267-272, 2003.

RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 18-25, 2006.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; GARCIA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from bluegreen algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36-41, 1998.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

RUSSO, M. E.; OLIVIERI, G.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P.; CARAMUSCIO, P.; CAVALEIRO, C. Post-combustion carbon capture mediated by carbonic anhydrase. **Separation and Purification Technology**, v. 107, p. 331-339, 2013.

SALEH, A. M.; DHAR, D. W.; SINGH, P. K. Comparative pigment profiles of different *Spirulina* strains. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 67-74, 2011.

SARADA, R.; PILLAI, M. G. E RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795-801, 1999.

SARRAF, N. S.; SABOURY, A. A.; RANJBAR, B.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Structural and functional changes of bovine carbonic anhydrase as a consequence of temperature. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p. 665-671, 2004.

SATOH, D.; HIRAOKA, Y.; COLMAN, B. MATSUDA, Y. Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1459-1470, 2001.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

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

SERIVE, B.; KAAS, R.; BÉRARD, J. B.; PASQUET, V.; PICOT, L.; CADORET, J. P. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 311-320, 2012.

SHAPIRO, H. M.; GLAZER, A. N.; CHRISTENSON, L.; WILLIAMS, J. M.; STROM, T. B. Immunofluorescence measurement in a flow cytometer using low-power helium-neon laser excitation. **Cytometry**, v. 4, p. 276-279, 1983.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> into CaCO<sub>3</sub> using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 122-128, 2010.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; PUJARI, R.; SHRIVASTAVA, A. Characterization of carbonic anhydrase from diversified genus for biomimetic carbon-dioxide sequestration. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 365-371, 2008.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; SHRIVASTAVA, A. Biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains immobilized on biopolymeric materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 416-426, 2011.

SHEKH, A. Y.; KRISHNAMURTHI, K.; MUDLIAR, S. N.; YADAV, R. R.; FULKE, A. B.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Recent advancements in carbonic anhydrase – Driven processes for CO<sub>2</sub> sequestration: Minireview. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 1419-1440, 2012.

SHIH, S. R.; TSAI, K. N.; LI, Y. S.; CHUEH, C. C.; CHAN, E. C. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Medical Virology**, v. 70, p. 119-125, 2003.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of c-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 5-12, 2009.

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. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, 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. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 477-482, 2008.

SIMON, D.; HELLIWELL, S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2220-2223, 1998.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 29-38, 2013.

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

SMITH, K. S.; FERRY, J. G. Prokaryotic carbonic anhydrases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 335-366, 2000.

SOLTES-RAK, E.; MULLIGAN, M. E.; COLEMAN, J. R. Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 769-774, 1997.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STADIE, W. C.; O'BRIEN, H. The catalysis of the hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid by an enzyme isolated from red blood cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 103, p. 521-529, 1933.

SU, H. N.; XIE, B. B.; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 65-70, 2010.

SUN, L.; WANG, S. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 72, p. 45-53, 2003.

TANG, H.; ABUNASSER, N.; GARCIA, M. E. D.; CHEN, M.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3324-3330, 2011.

VAN HILLE, R. P.; ANTUNES, A. P. M.; SANYAHUMBI, D.; NIGHTINGALE, L.; DUNCAN, J. R. **Development of integrated biosorption systems for the removal and/or recovery of heavy metals from mining and other industrial wastewaters, and determination of the toxicity of metals to the bioremediation processes.** [S.I.]: Water Research Commission, WRC Report No. 1243/1/03, 2003. 126 p.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOONA, Y. I.; NAMA, S. C. Carbonic anhydrase conjugated to nanosilver immobilized onto mesoporous SBA-15 for sequestration of CO<sub>2</sub>. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 60-67, 2012.

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

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection **Journal of Chromatography A**, v. 972, p. 269-276, 2002.

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v. 25, n. 4, p.1-53, 1966.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v.176, p. 147-154, 1948.

WILLIAMS, R.; GINGRICH, J.; GLAZER, A. Cyanobacterial phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and two pigment mutants. *The Journal of cell Biology*, 85, No. 3, 558, 1980.

WILLIAMS, T. C.; COLMAN, B. Identification of distinct internal and external isozymes of carbonic anhydrase in *Chlorella saccharophila*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 943-948, 1993.

WMO – WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Greenhouse gas bulletin: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2009**. N° 6: 24, [S.I.:s.n.], November, 2010.

XIA, J. R.; GAO, K. S. Impacts of elevated CO<sub>2</sub> concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae. **Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)**, v. 47, n. 6, p. 668-675, 2005.

YAN, M.; LIU, Z.; LU, D.; LIU, Z. Fabrication of single carbonic anhydrase nanogel against denaturation and aggregation at high temperature. **Biomacromolecules**, v.8, p. 560-565, 2007.

YEH, S. W.; ONG, L. J., CLARK, J. H.; GLAZER, A. N. Fluorescence properties of allophycocyanin and a crosslinked allophycocyanin trimer. **Cytometry**, v. 8, p. 91-95, 1987.

YINGYING, S.; CHANGHAI, W. The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus, Zn<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub>, and light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 225-231, 2009

YOUNG, E.; BEARDALL, J.; GIORDANO, M. Inorganic carbon acquisition by *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) involves external carbonic anhydrase and direct HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> utilization insensitive to the anion exchange inhibitor DIDS. **European Journal of Phycology**, v. 36, p. 81-88, 2001.

ZARROUK, C. **Contribution a letude dune Cyanophycee, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZHANG, Z.; LIAN, B.; HOU, W.; CHEN, M.; LI, X.; SHEN, W.; LI, Y. Optimization of nutritional constituents for carbonic anhydrase production by *Bacillus mucilaginosus* K02. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 42, p. 8403-8413, 2011.

**APÊNDICE 1**

Formulações dos meios de cultivo

**Tabela 1** – Formulação do meio Conway**A. SOLUÇÃO PRINCIPAL (P):**

$C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ (Na EDTA sal dissódico)	45,0 g
$H_3BO_3$ (Ácido Bórico)	33.6 g
$NaNO_3$ (Nitrato de Sódio)	100 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Cloreto de Manganês)	0.36 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Cloreto de Ferro)	1.30 g
$NaH_2PO_4$ (Fosfato de sódio anidro)	15.38 g

Diluir tudo em 1000 mL de água destilada e esterilizar em autoclave.

**B. TRAÇOS DE METAIS:**

$ZnCl_2$ (Cloreto de Zinco)	0.21 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Cloreto de Cobalto)	0.20 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (Molibdato de Amônia)	0.09 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Sulfato de Cobre)	0.20 g

Diluir tudo em 10 mL de água destilada; tomar 1mL desta solução (estéril) e adicionar à solução principal que deverá estar esterilizada.

**C. SOLUÇÃO DE VITAMINAS:**

Vitamina B12 – Cianocobalamina	5 mg
Vitamina B1 – Tiamina	100 mg

Diluir em 100 mL de água destilada esterilizar por filtração.

**D. SOLUÇÃO DE SILICATO DE SÓDIO (S):**

$Na_2OSiO_2 \cdot nH_2O$ (Silicato de sódio)	4.0 g
--	-------

Diluir em 100 mL de água destilada e esterilizar.

Fonte: WALNE (1966)

Quantidades das soluções do meio Conway a serem usadas nas culturas de algas:

Clorofíceas: 1.0 mL da solução P / litro de água marinha  
0.1 mL de Vitaminas / litro de água marinha

Diatomáceas: 2.0 mL da solução P / litro de água marinha  
2.0 mL da solução S / litro de água marinha  
0.1 mL de Vitaminas / litro de água marinha



**Tabela 2** – Composição do meio BG-11

Componente	Concentração (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub>	0,027
Citrato férrico amoniacal	0,006
EDTA dissódico	0,001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02
Ácido cítrico	0,006
Solução A <sub>5</sub> +Co*	1 mL

Fonte: RIPPKA (1979)

\*Solução A<sub>5</sub>+Co (g/L): ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,222); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,81); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,390); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2,86); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,079); Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

**Tabela 3** – Composição do meio Zarrouk

Componente	1L
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA	0,08
Solução A <sub>5</sub> *	1 mL
Solução B <sub>6</sub> **	1 mL

Fonte: ZARROUK (1966)

\*Solução A<sub>5</sub> (g/L): 2,86 g/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (191R); 1,81 g/L de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (180R); 0,222g/L de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (120R); 0,079g/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (49R); 0,018g/L de NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (201R).

\*\*Solução B<sub>6</sub>: 22,96 mg/L de \*NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> (202R); 192,0 mg/L de KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O (205R); 44,78 mg/L de NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O (203R); 17,94 mg/L de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (101R); 40 mg/L de \*\*TiO<sub>2</sub> (211R); 43,98 mg/L de Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (109R).

**APÊNDICE 2**

Tecnologia enzimática para captura de CO<sub>2</sub>: cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica – Artigo publicado na Vetor, v. 23, n. 2, p. 82-92, 2013

## TECNOLOGIA ENZIMÁTICA PARA CAPTURA DE CO<sub>2</sub>: CULTIVO DE MICROALGA PARA OBTENÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA

JOANA DA COSTA ORES<sup>1</sup>, SIBELE SANTOS FERNANDES<sup>2</sup>, MARINA CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE<sup>3</sup>, BIBIANA PORTO DA SILVA<sup>2</sup>, SUSANA JULIANO KALIL<sup>4\*</sup>

### RESUMO

Nos últimos tempos existe um forte interesse na estabilização da abundância atmosférica de CO<sub>2</sub> e outros gases de efeito estufa para mitigar os riscos do aquecimento global. As estratégias de redução de emissões de CO<sub>2</sub> incluem a redução do uso global de energia e o desenvolvimento de combustíveis livres ou com baixo teor de carbono. Outra estratégia que pode ser utilizada é a captura e sequestro de CO<sub>2</sub> atmosférico, onde sistemas utilizando a anidrase carbônica tem sido amplamente estudados. Esta enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza, sendo as microalgas uma fonte potencialmente atrativa desta biomolécula. Este trabalho apresenta a obtenção da anidrase carbônica a partir da biomassa da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e sua aplicação na captura enzimática do CO<sub>2</sub>. Foi realizado o cultivo da microalga em meio Conway a temperatura de 25 °C e fotoperíodo 12 h claro/escuro. Foi realizado um acompanhamento em termos de biomassa e pH, sendo feita a extração da enzima e determinada a atividade enzimática ao final do cultivo. Obteve-se um extrato enzimático com uma atividade na ordem de 67 U/mg de biomassa e a enzima foi aplicada na captação enzimática do CO<sub>2</sub> eficazmente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Captação enzimática. Cultivo microalgal. *Dunaliella tertiolecta*. Mitigação do CO<sub>2</sub>.

## ENZYME TECHNOLOGY FOR CO<sub>2</sub> CAPTURE: GROWING MICROALGAE TO OBTAIN CARBONIC ANHYDRASE

### ABSTRACT

There has recently been growing interest in stabilizing the abundance of atmospheric CO<sub>2</sub> and other greenhouse gases to mitigate risks of global warming. Strategies to reduce CO<sub>2</sub> emissions comprise the reduction of

---

Universidade Federal do Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Rua Eng. Alfredo Huch, nº475, Caixa Postal 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>1</sup> Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos.

<sup>2</sup> Graduandos do Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

<sup>3</sup> Graduanda do Curso de Engenharia Bioquímica.

<sup>4</sup> Professora no Curso de Engenharia de Alimentos. \*Autor correspondente (e-mail: dqmsjk@furg.br).

overall energy use and the development of free or low-carbon fuel. Since another feasible strategy is the capture and sequestration of atmospheric CO<sub>2</sub>, systems which use carbonic anhydrase have been extensively studied. This enzyme is widely distributed in nature and microalgae are one of its potentially attractive source. This study deals with the extraction of carbonic anhydrase from biomass of marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and its application to the enzymatic capture of CO<sub>2</sub>. Cultivation of microalgae was carried out in Conway medium at 25 °C and 12 h light-dark photoperiod. Biomass and pH were constantly monitored whereas the extraction of the enzyme and the determination of the enzymatic activity were carried out at the end of the cultivation. An enzyme extract, whose activity was 67.2 U/mg of biomass, was obtained and the enzyme was effectively applied to enzymatic CO<sub>2</sub> capture.

**KEY WORDS:** CO<sub>2</sub> mitigation. *Dunaliella tertiolecta*. Enzymatic capture. Microalgal cultivation.

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento do aquecimento global tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias eficazes para mitigação do CO<sub>2</sub>. O aumento contínuo da concentração deste gás na atmosfera tem sido extensivamente documentado [25]. Sua concentração aumentou de 280 ppm em 1850 (revolução industrial) para 390 ppm em 2010, e atualmente vem aumentando a uma taxa de 2,4 ppm/ano [16,28].

Este poluente é oriundo principalmente da queima de combustíveis fósseis para geração de energia e transporte, que está associada com aumento da população e industrialização [5]. Outras fontes seriam a queima de florestas e cerrado, e a queima de combustíveis de uso doméstico [25].

Os gases de efeito estufa contribuem não somente para o aquecimento global, mas também para outros impactos no meio ambiente e na vida humana. Os oceanos absorvem aproximadamente um terço do CO<sub>2</sub> emitido a cada ano pelas atividades humanas, tomando a água gradualmente mais ácida, o que pode causar a perda rápida de barreiras de corais e da biodiversidade do ecossistema marinho com enormes implicações na vida marinha e, conseqüentemente, na vida terrestre [23].

As emissões de gases de efeito estufa do transporte marítimo internacional são uma preocupação crescente. Embora os acordos internacionais sobre o clima, como o Protocolo de Quioto, exigirem que as nações considerem propostas políticas de mitigação de CO<sub>2</sub> para fontes terrestres de emissões, houve pouco progresso em relação à aviação e transporte naval internacionais [7].

Muitos países e regiões ao redor do mundo estabeleceram metas para redução de CO<sub>2</sub>, a fim de cumprir os objetivos de sustentabilidade previstos no Protocolo de Kyoto. Várias opções estão sendo estudadas e implementadas, com diferentes graus de sucesso, e em diferentes fases de estudo e implementação. Alguns exemplos são energia solar, térmica ou fotovoltaica, hidrelétrica, eólica, geotérmica, biocombustíveis, sequestro de carbono, entre outros. Cada alternativa possui vantagens e problemas, e a escolha da melhor opção irá depender da área de aplicação [19].

Dentre as estratégias para redução de emissões de CO<sub>2</sub> está o sequestro deste gás a partir de fontes pontuais ou atmosféricas através de técnicas naturais e de engenharia [17]. Dentro deste contexto, os sistemas biológicos, que utilizam a enzima anidrase carbônica, vêm ganhando cada vez mais atenção. Estes sistemas são baseados em reações que ocorrem naturalmente nos organismos vivos e são uma via potencial para a melhoria destas tecnologias [14]. Porém, a viabilidade do processo de captura enzimático reside inicialmente na obtenção da enzima a partir de fontes viáveis.

A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa com alta eficiência a hidratação reversível do CO<sub>2</sub> em bicarbonato, uma reação fundamental para processos biológicos como a fotossíntese e respiração. Pode ser encontrada em diversos organismos, como animais, vegetais e algas [15], sendo o último uma fonte potencialmente viável para obtenção da enzima.

O cultivo de microalgas possui algumas vantagens, como rápido crescimento; possibilidade de cultivo em águas salobra e/ou salgada, liberando o uso de água doce para o consumo humano e agricultura; tolerância a fatores ambientais extremos, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços e em regiões impróprias para atividades agrícolas [4].

De acordo com o exposto, considerando a importância da obtenção da enzima anidrase carbônica para utilização em tecnologias de mitigação do CO<sub>2</sub>, este trabalho teve como objetivo investigar a produção da enzima pela microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e seu uso na captura enzimática do CO<sub>2</sub>.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Microalga e meio de cultivo**

A microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

No preparo do cultivo e manutenção da alga marinha foi utilizado o meio Conway [27], empregando-se água marinha natural com salinidade de 28 [21].

## 2.2. Cultivo em fotobiorreator

O cultivo foi realizado em triplicata em erlenmeyer de 1 L contendo 800 mL do meio de cultivo adicionado de 10% de inóculo e incubados a  $25 \pm 1$  °C [21]. A aeração foi realizada por injeção constante de ar estéril (385 mL/min) e a iluminação foi promovida por lâmpadas fluorescentes de 20 W do tipo *daylight*, fornecendo 3000 lx, com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro.

Foi realizado um acompanhamento da concentração de biomassa e da variação do pH, sendo retiradas amostras assepticamente a cada 24 h.

## 2.3. Investigação da produção da enzima anidrase carbônica

Ao final do cultivo foi realizada a determinação da atividade enzimática para verificar a produção da enzima pela microalga, como a anidrase carbônica é intracelular foi necessário uma etapa de ruptura celular. O rompimento celular foi realizado através de tratamento ultrassônico utilizando um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz por 10 min em banho de gelo. Foram utilizadas suspensões com concentração de 0,5, 1 e 1,5 g de biomassa/L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a etapa de rompimento celular, as suspensões resultantes foram centrifugadas à  $5200 \times g$  por 10 min a uma temperatura de 4 °C utilizando uma centrífuga refrigerada (Cientec CT-5000R, Brasil), e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática. O extrato enzimático foi caracterizado, também, em termos de concentração de clorofila a e b.

## 2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

A partir dos valores de concentração de biomassa, foram determinados os parâmetros cinéticos: concentração de biomassa máxima ( $X_{max}$ , g/L), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ , 1/dia) e produtividade máxima de biomassa ( $P_{max}$ , g/L/dia).

A produtividade máxima de biomassa foi calculada através da Equação 1 [26].

$$P_{max} = (X_t - X_0)/(t - t_0) \quad (1)$$

onde:

$X_0$ : concentração de biomassa inicial (g/L) no tempo  $t_0$ ;

$X_t$ : concentração de biomassa (g/L) em qualquer momento  $t$  subsequente ao  $t_0$ .

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada pela regressão exponencial da porção logarítmica da curva de crescimento [2].

## 2.5. Captura enzimática do CO<sub>2</sub>

Para verificar a viabilidade do uso da enzima obtida a partir da microalga marinha foram realizados ensaios de captura enzimática do CO<sub>2</sub>.

A anidrase carbônica extraída da biomassa microalgal foi utilizada como catalisador para a hidratação do CO<sub>2</sub> e o mesmo foi precipitado na forma de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Em erlenmeyers contendo o extrato enzimático, adicionou-se tampão tris 1,2 M contendo 4,5% de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) na proporção 1:1. A reação foi iniciada com a adição de uma solução de água deionizada saturada com CO<sub>2</sub>. Após determinados intervalos de tempo, a mistura foi filtrada e seca para ser mensurada a quantidade de CaCO<sub>3</sub> precipitado (ensaio enzimático). Também foram realizados ensaios substituindo o extrato enzimático por água deionizada (ensaio não-enzimático) [22].

## 2.6. Determinações analíticas

A atividade enzimática foi determinada utilizando como substrato o *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), segundo Pocker e Stone [24]. A mistura reacional consistiu em tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,4, solução enzimática e solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato, sendo registrado o aumento da absorvância a 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm e conversão para biomassa seca através de curva padrão [8]. Uma alíquota do cultivo foi centrifugada a 5200 ×*g* por 10 min e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas com água destilada, e novamente centrifugadas. A biomassa foi ressuspensa com água destilada e feita leitura da absorvância em espectrofotômetro a 680 nm. A concentração celular foi convertida para peso seco conforme curva de calibração.

A extração da clorofila a e b foram realizadas com éter dietílico segundo metodologia de Dere, Günes e Sivaci [10] e a concentração destes pigmentos foram calculadas conforme equações de Lichtenthaler e Wellburn [18].

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH (Hanna Instruments®, modelo pH 21) segundo AOAC [1].

### 2.7. Análise estatística

Os resultados de extração da enzima foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na FIGURA 1 estão apresentados, respectivamente, o acompanhamento do crescimento celular da microalga *Dunaliella tertiolecta* e a variação do pH do meio ao longo do cultivo em fotobiorreator.

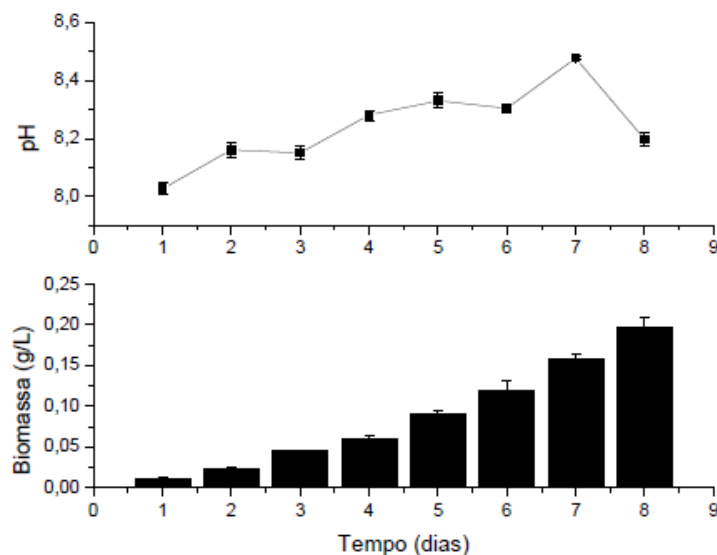


Figura 1. Acompanhamento do crescimento celular e variação do pH durante o cultivo da *Dunaliella tertiolecta*.

A concentração celular máxima de  $0,20 \pm 0,01$  g/L foi alcançada em 8 dias de cultivo. Os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento e produtividade máxima alcançados para a *D. tertiolecta* foram  $0,327 \pm 0,01$  1/dia e  $0,03 \pm 0,002$  g/L/dia, respectivamente. O pH do meio aumentou ao longo do cultivo, em relação ao pH inicial de 7,9, mantendo-se acima de 8,0, valor este favorável para a atuação da enzima.

A TABELA 1 apresenta os resultados de atividade, clorofila a e clorofila b obtidos após a ruptura celular das amostras com diferentes concentrações celulares.



Tabela 1. Resultados do ensaio de extração da anidrase carbônica utilizando diferentes concentrações celulares.

Resposta	Concentração celular (g/L)		
	0,5	1,0	1,5
Atividade específica (U/g)	66,7 ± 2,6 <sup>a</sup>	67,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	65,3 ± 3,6 <sup>a</sup>
Atividade (U/mg clorofila a)	2,2 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,03 <sup>c</sup>
Clorofila a (µg/mg)	32,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	29,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	30,1 ± 1,5 <sup>a,b</sup>
Clorofila b (µg/mg)	16,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	15,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	13,3 ± 0,6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (p<0,05)

Obtiveram-se extratos enzimáticos com atividade máxima de 67,2 U/g, sendo que os valores alcançados com as três concentrações estudadas foram estatisticamente iguais. O maior teor de clorofila a foi obtido no ensaio com 0,5 g/L de biomassa, que foi estatisticamente igual ao ensaio com 1,5 g/L. Os maiores valores de clorofila b, foram obtidos com 0,5 e 1,0 g/L.

Chinnasamy et al. [6] estudaram o efeito de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> e de diferentes temperaturas no crescimento da alga *Chlorella vulgaris* ARC 1, avaliando também a influência na atividade da enzima anidrase carbônica. Em condições ambientais (0,036% de CO<sub>2</sub>), foram obtidas atividades de 12,2 e 14,8 U/mg de clorofila, sendo que os autores determinaram a atividade de hidratase, que utiliza como substrato o CO<sub>2</sub>.

As três concentrações celulares resultaram em um bom rendimento em termos de extração da enzima. Porém, a concentração de biomassa mais favorável para realizar um acompanhamento da atividade enzimática e concentração de clorofila ao longo do cultivo seria a de 0,5 g/L.

A FIGURA 2 apresenta os resultados do ensaio de captação enzimática do CO<sub>2</sub>. Foi realizada uma cinética de precipitação do CO<sub>2</sub> na forma de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>).

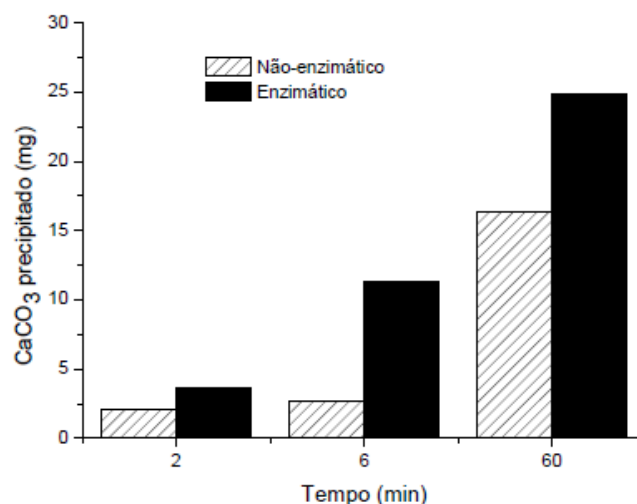


Figura 2. Cinética de precipitação do carbonato de cálcio.

Como pode ser observado na FIGURA 2, a anidrase carbônica obtida da biomassa microalgal da *Dunaliella tertiolecta* catalisou a hidratação do  $\text{CO}_2$ , que precipitou mais rapidamente na forma de  $\text{CaCO}_3$  na presença da enzima.

Estudos anteriores [12,20] demonstraram que a massa total de  $\text{CaCO}_{3(s)}$  precipitada não depende da concentração da enzima, a anidrase carbônica apenas altera a cinética para atingir o equilíbrio. Este comportamento pode ser observado na FIGURA 2. A reação na presença da anidrase carbônica (ensaio enzimático) apresentou uma taxa inicial de precipitação do  $\text{CaCO}_3$  superior ao ensaio não-enzimático.

Os poucos estudos que usam a anidrase carbônica para a captura de  $\text{CO}_2$  utilizam preparações enzimáticas altamente purificadas ou de fontes de difícil ampliação de escala, como sangue humano [3,9,11,12,20], o que aumenta o custo do processo, limitando a aplicabilidade deste tipo de tecnologia. No presente trabalho, além de a enzima ter sido obtida de uma fonte potencialmente viável, a biomassa resultante do processo de extração pode ainda ser destinada para outros fins, como incorporação em ração animal.

#### 4. CONCLUSÃO

Ao final do cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* obteve-se um extrato enzimático com uma atividade na ordem de 67 U/mg de biomassa. A enzima apresentou potencial para aplicação em processos de captação enzimática do  $\text{CO}_2$ .

Sendo assim, a biomassa microalgal mostrou ser uma fonte viável para obtenção da anidrase carbônica.

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] AOAC – Association Of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th. v. II., Virginia, 2000.
- [2] BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed. Singapore, McGraw-Hill, 1986.
- [3] BOND, G.M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D.K.; SIMSEK, F.A.; MEDINA, M.G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. *Energy & Fuels*, v. 15, p. 309-316, 2001.
- [4] BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: Primeiros passos para o desenvolvimento de um mecanismo de desenvolvimento limpo. *Atlântica*, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.
- [5] CHANG, E.H.; YANG, S.S. Microalgae for biofixation of carbon dioxide – Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Botanical Bulletin of Academia Sinica, Taipei*, v. 44, p. 43-52, 2003.
- [6] CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K.C. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p. 518-532, 2009.
- [7] CORBETT, J.J.; WANGB, H.; WINEBRAKE, J.J. The effectiveness and costs of speed reductions on emissions from international shipping. *Transportation Research Part D*, v. 14, p. 593-598, 2009.
- [8] COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; FILHO, P.D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 18, p. 603-607, 2002.
- [9] DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO<sub>2</sub> into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. *Energy Procedia*, v. 1, p. 885-892, 2009.
- [10] DERE, S.; GÜNES, T.; SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany, Turkey*, v. 22, p. 13-17, 1998.
- [11] DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S.W.; KOEPEL, R.; ATAAI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, v. 3, p. 401-410, 2009.
- [12] FAVRE, N.; CHRIST, M.L.; PIERRE, A.C. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, p. 163-170, 2009.
- [14] FIGUEROA, J.D.; FOUT, T.; PLASYNSKI, S.; MCILVRIED, H.; SRIVASTAVA, R.D. Advances in CO<sub>2</sub> capture technology – The U.S. Department of Energy's Carbon

- Sequestration Program. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, v. 2, p. 9-20, 2008.
- [15] HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R.E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.
- [16] IPCC – Intergovernmental Panel On Climate Change. *Climate change 2007: the scientific basis*. In: Solomon, S. (Ed.), *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge Univ. Press, New York, 2007.
- [17] LAL, R. Carbon sequestration. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, v. 363, p. 815-830, 2008.
- [18] LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, London, v. 11, p. 591-592, April 1985.
- [19] MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 217-232, 2010.
- [20] MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 46, p. 921-926, 2007.
- [21] OLIVEIRA, L.S.; PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, I.A.; MENDES, C.Q.; CRUZ, A.C.S.; LEITE, M.B.N.; ARAUJO, V.Q.; MARQUES, S.S.I.; CABANELAS, I.; VICH, D.; TOSTO, M. Biocombustíveis de microalgas: seleção das melhores espécies com base na produção de lipídios. In: VII SEMBIO - Semana de Biologia da UFBA: Protegendo nossas Florestas. Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, p. 35-37, 2011.
- [22] ORES, J.C.; SALA, L.; CERVEIRA, G.P.; KALIL, S.J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. *Chemosphere*, v. 88, p. 255-259, 2012.
- [23] ORMEROD, W.G.; FREUND, P.; SMITH, A.; DAVISON, J. *Ocean storage of CO<sub>2</sub>. IEA greenhouse gas R&D programme*. UK: International Energy Agency, 2002.
- [24] POKER, Y.; STONE, J.T. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *Biochem.*, v. 6, p. 668-678, 1976.
- [25] RAMANATHAN, V.; FENG, Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. *Atmospheric Environment*, v. 43, p. 37-50, 2009.
- [26] SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.
- [27] WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Fishery Investigations*, v. 25, n. 4, p.1-53, 1966.

[28] WMO – World Meteorological Organization. Greenhouse gas bulletin: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2009. N° 6: 24, November 2010.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.