



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCO EWERTON DE SOUSA LIMA

BIORREFINARIA DA MACROALGA MARINHA *Solieria filiformis*
(GIGARTINALES, RHODOPHYTA) PARA EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA,
IOTA-CARRAGENANA E VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS

FORTALEZA

2022

FRANCISCO EWERTON DE SOUSA LIMA

BIORREFINARIA DA MACROALGA MARINHA *Solieria filiformis* (GIGARTINALES,
RHODOPHYTA) PARA EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA, IOTA-CARRAGENANA E
VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

FORTALEZA

2022

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

L698b Lima, Francisco Ewerton de Sousa.
Biorrefinaria da macroalga marinha *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) para extração de R-ficoeritrina, iota-carragenana e valorização dos resíduos sólidos / Francisco Ewerton de Sousa Lima. – 2023.
43 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Ingredientes marinho. 2. Ficocolóide. 3. Pigmento vermelho. 4. Protease. 5. Bioinsumo. I. Título.

CDD 572

FRANCISCO EWERTON DE SOUSA LIMA

BIORREFINARIA DA MACROALGA MARINHA *Solieria filiformis* (GIGARTINALES,
RHODOPHYTA) PARA EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA, IOTA-CARRAGENANA E
VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29 / 04 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lucia Ponte Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Glauber Cruz Lima
Faculdade UNINTA

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e graças em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Luis Filho e Maria Lúcia, que são os maiores responsáveis pelas minhas conquistas, e por sempre me darem suporte para continuar seguindo em frente meio as dificuldades. À minha irmã Mary Karoline, que sempre esteve comigo me apoiando sempre que precisa.

À Janilly Késsia, Viviane Andrade, Larisse Cruz que sempre estiveram presentes na minha caminhada por quase toda a vida, e hoje, apesar do tempo, continuamos unidos.

À Professora Dra Ana Lucia, por ter aceitado ser minha orientadora, além de estar presente desde a minha graduação, nos projetos de extensão que tive o prazer de participar (PIQD biotec, AUG Biotec), contribuindo com minha formação pessoal e profissional. Apesar de todas as intercorrências devido a esses anos atípicos, que atrasaram o desenvolvimento do trabalho, sempre houve o apoio e motivação para continuar.

À Professora Dra Márjory Lima Holanda Araújo, que há mais de seis anos contribui diretamente para a minha formação, desde a graduação, por me aceitar e me acolher no seu laboratório e por toda disponibilidade, ajuda e excelente orientação durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos – BioAP e Laboratório de Algas Marinhas – LabALGAS pela parceria, amizade incondicional e valorosa contribuição nesta conquista, em especial aos amigos Lucas Lopes, Lais Leite, Diego Chagas, Poliana, Gabriel, Ana Paula, Jessica Roberta, Ingrid Queiroz, Ticiane Lima.

Um agradecimento especial a um grande amigo, companheiro de laboratório que auxiliou bastante no desenvolvimento desse trabalho e que nos deixou de forma inesperada Dr. Acrisio Bastos (*in memoriam*), esse trabalho não teria sido possível sem sua valiosa contribuição.

À toda a turma de mestrado do PPG Bioquímica, ingressante no ano de 2019.1, por termos iniciado essa caminhada juntos, nos apoiando nas disciplinas iniciais e também nas pesquisas laboratoriais.

A todos os professores que ministram aulas e contribuem com o PPG em Bioquímica (UFC), pelos seus ensinamentos durante minha permanência no curso.

À banca examinadora, composta pelos professores Profa. Dra. Ana Lúcia, Profa. Dra. Marjory e Prof. Dr. Glauber Cruz pela disponibilidade e compreensão na avaliação desse trabalho.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela ajuda e amizade durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

À UFC, por meio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que disponibilizou o espaço físico para execução do referido trabalho.

À coordenação Programa de Pós Graduação em Bioquímica da UFC, em nome do Prof. Dr. Cleverton Diniz (coordenador), que sempre incentivou o desenvolvimento dos alunos, buscando sempre a melhoria do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedido durante o curso.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

Solieria filiformis é uma alga vermelha abundante na costa brasileira. No Ceará tem sido cultivada no mar e suas biomoléculas foram extraídas e estudadas pelo nosso grupo de pesquisa. No presente estudo, foi proposto um esquema de biorrefinaria da biomassa de *S. filiformis* para extração de R-ficoeritrina e iota-carragenana, seguido do uso do resíduo sólido hidrolisado para produção de protease por *Bacillus subtilis*. Os rendimentos de R-ficoeritrina e iota-carragenana alcançados foram de 0,63 e 36,59 % de algas secas. O índice de pureza do R-FE foi de 0,63 e 0,73 a partir da extração aquosa e do processo de congelamento-descongelamento. A iota-carragenana extraída apresentou 44,07% de carboidratos, 3,41% de proteínas e 24,02% de sulfato. O resíduo sólido rico em celulose foi hidrolisado, via ácido-térmica, e apresentou 43,55 g/L de carboidratos totais, dos quais 29,64 % foram açúcares redutores. O cultivo de *Bacillus subtilis* em hidrolisado como fonte de carbono gerou 0,83 g/L de biomassa celular e um extrato proteolítico de 31,21, 30,89 e 29,94 U/mgP em pH 7, 9 e na presença do sabão, respectivamente. Uma protease de 21 kDa foi revelada por SDS-PAGE no sobrenadante. Assim, a biorrefinaria *S. filiformis* foi desenvolvida para produzir importantes ingredientes de origem marinha para cosmecêuticos, nutracêuticos e alimentos funcionais.

Palavras-chave: ingredientes marinho; ficocolóide; pigmento vermelho; protease; bioinsumo.

ABSTRACT

Solieria filiformis is a red seaweed abundant in the Brazilian coast. In the Ceara state it has been cultivated in the sea and its biomolecules have been extracted and studied by our research group. In the present study, a biorefinery scheme of *S. filiformis* biomass was proposed to extraction of R-phycoerythrin and iota-carrageenan, followed by use of the hydrolysed solid residue for protease production by *Bacillus subtilis*. The yields of the R-phycoerythrin and iota-carrageenan reached were 0.63 and 36.59 % dry seaweed. The purity index of the R-PE was 0.63 and 0.73 from aqueous extraction and freeze-thaw process. The iota-carrageenan extracted presented 44.07 % of carbohydrates, 3.41 % of proteins and 24.02 % sulfate. The cellulosic-rich solid waste was acid-thermal hydrolysed and presented 43.55 g/L of total carbohydrates, of which 12.91% were reducing sugars. The cultivation of *Bacillus subtilis* in acid hydrolysed generated 0.83 g/L of cell biomass and a proteolytic extract of 31.21, 30.89 and 29.94 U/mgP at pH 7, 9 and in presence of the soap, respectively. One protease of 21 kDa was revealed by SDS-PAGE in the supernatant. Thus, the *S. filiformis* biorefinery was developed to produce important marine-derived ingredients for cosmeceuticals, nutraceuticals, and functional foods.

Keywords: marine-derived ingredients; phycocolloid; red pigment; protease; bioinput.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1	Macroalgas marinhas e Economia azul	10
1.1.1	<i>Bioeconomia voltada aos oceanos</i>	10
1.1.2	<i>Macroalgas marinhas: Importância ecológica e comercial</i>	11
1.2	Macromoléculas de algas vermelhas (<i>Rhodophytas</i>) e suas aplicações	13
1.2.1	Polissacarídeos	13
1.2.1.1	<i>Agar</i>	13
1.2.1.1	<i>Carragenana</i>	15
1.2.2	<i>Ficobiliproteínas</i>	17
1.3	Algas vermelhas no conceito de biorrefinaria	18
2	INTRODUCTION	22
3	MATERIALS AND METHODS	24
3.1	<i>Solieria filiformis</i> seaweed and <i>Bacillus subtilis</i> bacteria	24
3.2	<i>Extraction and quantification of R-phycoerythrin from S. filiformis</i>	24
3.3	<i>Pretreatment of Sw-RPE from S. filiformis</i>	24
3.4	<i>Iota-Carrageenan extraction from Sw-RPEt</i>	25
3.5	<i>Acid-therm hydrolysis of Sw-CAR</i>	25
3.6	<i>Chemical analyses</i>	25
3.7	<i>Bioprocess for proteolytic extract production by Bacillus subtilis cultivation</i>	26
3.8	<i>Proteolytic activity of EnzE-HYD</i>	26
3.9	<i>Protein electrophoresis</i>	27
3.10	<i>Statistical analysis</i>	27
4	RESULTS	27
4.1	<i>R-Phycoerythrin extraction</i>	28
4.2	<i>Pretreatment of solid waste from R-PE extraction process</i>	29
4.3	<i>Iota-carrageenan extraction from Sw-RPEt</i>	29
4.4	<i>Acid-Therm hydrolysis of the Sw-CAR</i>	30
4.5	<i>Bacillus subtilis cultivation in Sw-CAR hydrolysate as carbon source</i>	30
4.6	<i>Proteolytic activity of EnzE-HYD</i>	30
4.7	<i>Biorefinary of Solieria filiformis</i>	31
5	DISCUSSION	33
6	CONCLUSÃO	37

REFERÊNCIAS	38
--------------------------	-----------

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Macroalgas marinhas e Economia azul

1.1.1 Bioeconomia voltada aos oceanos

Atualmente as reservas fósseis são muito demandadas por vários setores industriais, mostrando uma dependência da economia global por essa fonte finita de recursos, gerando assim uma pressão alarmante sobre o meio ambiente (OWUSU; ASUMADU-SARKODIE, 2016). O uso extensivo desses recursos além de reduzir suas reservas, também impactam consideravelmente o meio ambiente, como por exemplo altas emissões de gases de efeito estufa (GEE) que contribuem para as desordens das mudanças climáticas e aquecimento global (LEONG *et al.*, 2021). Essa problemática há muito tempo já estudada mundialmente, somado ao fato da crescente demanda de energia, combustíveis e produtos sintéticos provindos do petróleo, que acelera a poluição, preocupações com sustentabilidade aumentaram a uma taxa alarmante.

Uma solução emergente é a utilização em cascata de biomassa provinda de recursos biológicos em uma abordagem sistêmica para o desenvolvimento econômico, conhecida como bioeconomia circular. Essa economia oferece uma utilização eficiente da biomassa, incluindo a utilização de resíduos gerado durante processos produtivos, para a produção sustentável de produtos de alto valor agregado, refletindo uma economia de baixo carbono e potencial no desenvolvimento de um ambiente sustentável e mais verde. (LEONG *et al.*, 2021)

Então a transição da economia linear baseada em fontes fósseis para a bioeconomia circular está sendo considerada como um dos requisitos fundamentais para a sustentabilidade global (MOHAN *et al.*, 2020). As Nações Unidas declararam 2021-2030 como a ‘Década da Ciência do Oceano para o Desenvolvimento Sustentável’ para apoiar os esforços para reverter o ciclo de declínio na saúde dos oceanos e reunir as partes interessadas do oceano em todo o mundo por trás de uma estrutura comum.

Na última década, a Economia dos Oceanos/Marinha ou Economia Azul foi amplamente defendida por uma série de partes interessadas como um conceito ou uma estratégia para salvaguardar os oceanos e os recursos hídricos do mundo (LEE; NOH; KHIM, 2020). Em 2017 o Banco Mundial definiu esta economia como “o uso sustentável dos recursos oceânicos para o crescimento econômico, melhoria dos meios de subsistência e empregos, preservando a saúde do ecossistema oceânico.”, sendo um conceito que abrange vários aspectos

da sustentabilidade oceânica, desde a pesca sustentável até a saúde do ecossistema e prevenção da poluição (WBG, 2015).

No contexto da Economia Azul, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (FIGURA 1) das Nações Unidas destacam a necessidade do equilíbrio do desenvolvimento socioeconômico com a sustentabilidade ambiental em relação aos oceanos, visando apoiar os países na criação de melhores condições para o desenvolvimento sustentável do oceano (LEE; NOH; KHIM, 2020).

Figura 1 – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas



17 objetivos, 169 metas e 232 indicadores relacionados resultam de um acordo de múltiplas partes interessadas entre os países, projetado para reduzir a insustentabilidade e promover o desenvolvimento sustentável globalmente (Nações Unidas, 2022).

1.1.2 Macroalgas marinhas: Importância ecológica e comercial

No contexto dos desafios atuais na busca de novas matérias primas renováveis para o desenvolvimento de processos mais *eco-friendly*, as algas marinhas (incluindo macroalgas e

microalgas) são uma fonte renovável atraente para a produção de biocombustíveis, químicos e outros produtos de alto valor econômico, com muitas vantagens sobre a biomassa de alimentos ou materiais celulósicos. As algas incluem uma ampla variedade de organismos fotossintéticos que vivem em muitos ambientes diversos e presentes em todos os ecossistemas existentes na terra (NIGAM; SINGH, 2011).

O termo macroalgas é comumente usado como uma descrição abrangente de um grupo polifilético de organismos multicelulares semelhantes a plantas que estão divididos nos táxons Rhodophyta (macroalgas vermelhas), Chlorophyta (macroalgas verdes) e Phaeophyta (macroalgas pardas ou marrons) (GUIRY; GUIRY, 2020).

Em condições normais, as algas usam luz solar com alta eficiência na conversão de resultando em grande aumento de biomassa, juntamente com a assimilação de nutrientes inorgânicos, mostrando fixação melhor em comparação com a biomassa terrestre, sendo consideradas organismos em potencial para biorremediação de águas poluídas pela piscicultura e também como candidatas para a redução de CO₂, tendo uma assimilação de compostos na forma de carboidratos lipídios e outras biomoléculas com vantagens para aplicações na produção de energia renovável e biomateriais relacionados (GAO; MCKINLEY, 1994; JOHN *et al.*, 2011; SUBHADRA; EDWARDS, 2010; TANO, 2016). Além disso possuem baixíssimo teor de hemicelulose e lignina, portanto, sua biomassa pode ser despolimerizadas com relativa facilidade em comparação com a biomassa lignocelulósica (JOHN *et al.*, 2011; WARGACKI *et al.*, 2012).

Muitas espécies de macroalgas são utilizadas pelos seres humanos há muito tempo como alimento, fertilizante e para fins medicinais, principalmente no continente Asiático (HURTADO; NEISH; CRITCHLEY, 2019). Na última década, mais de 200 espécies de algas marinhas apresentaram valor comercial com uma produção global atingindo 30,4 milhões de toneladas em 2015, sendo que as algas cultivadas (29,4 milhões de toneladas) foi muito superior às extrações naturais (1,1 milhão de toneladas) (FAO, 2018). Cerca de dez espécies de macroalgas são cultivadas intensivamente: alga marrom (*Saccharina japonica*, *Undaria pinnatifida* e *Sargassum fusiforme*); vermelhas (*Porphyra* spp., *Eucheuma* spp., *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria* spp.); e verdes (*Enteromorpha clathrata*, *Monostroma nitidum* e *Caulerpa* spp.), com *Eucheuma* spp., *Saccharina japonica* e *Gracilaria* spp. representando 33,5%, 26,3% e 12,8% do volume total de produção em 2015 (FAO, 2018).

A capacidade das algas crescerem na água salgada ou a água residual é fundamental para a produção sustentável a fim de evitar a competição com culturas alimentares que requerem água doce e terras cultiváveis (JOHN *et al.*, 2011), além dos subprodutos dos processamentos

conterem bioativos valiosos, bioquímicos finos (corantes e pigmentos) e outras biomoléculas (proteínas, óleos) que podem ser destinados a diversos setores industriais (BUSCHMANN *et al.*, 2017).

1.2 Macromoléculas de algas vermelhas (*Rhodophytas*) e suas aplicações

As algas vermelhas (filo *Rhodophyta*) são uma linhagem eucariótica distinta cujos membros estão unidos em análises filogenéticas de genes nucleares, plastidiais e mitocondriais. As rodofíceas não contêm clorofila *b* e *c*, mas contêm proteínas acessórias ao fotossistema que são aloficocianinas, ficocianinas (coloração azul) e ficoeritrinas (coloração vermelha) organizadas nos ficobilisomos, presentes nos tilacóides (YOON *et al.*, 2006).

Os habitats típicos dessas espécies são ambientes protegidos, como baías, estuários ou foz de rios. Crescem em substratos rochosos, arenosos ou enlameados, entre marés ou submarinos, ou em afloramentos rochosos associados a praias arenosas. Podem estar até 20 m de profundidade, presas a pequenas pedras, parcialmente cobertas ou ancoradas na areia, frequentemente em áreas com boa circulação de água (SUMAYYA; SREELEKSHMI; MURUGAN, 2017).

Atualmente, as algas vermelhas estão chamando a atenção da comunidade científica devido às substâncias bioativas que produzem como os ácidos graxos, pigmentos, compostos fenólicos e polissacarídeos (COTAS *et al.*, 2020). Além das algas serem amplamente utilizadas na culinária, vários produtos possuem propriedades excepcionais com interesse nutracêutico, farmacológico e biomédico, aplicação em cosméticos, como xampus, sabonetes, cremes hidratantes e também como uso na aquicultura em rações biofiltro, dentre outros usos (COTAS *et al.*, 2020; TORRES *et al.*, 2019).

1.2.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos das algas vermelhas são as moléculas mais exploradas, já amplamente utilizadas em diversas indústrias por apresentarem propriedades de formação de geis e atualmente entrando em aplicações mais avançadas do ponto de vista terapêutico (COTAS *et al.*, 2020).

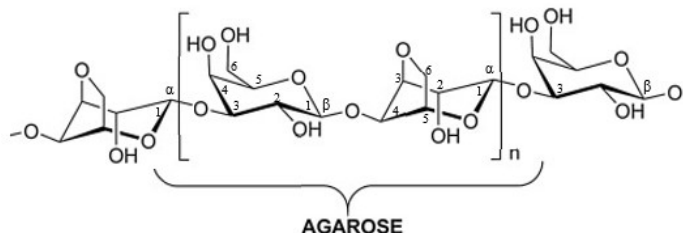
1.2.1.1 Agar

O ágar, foi o primeiro ficocolóide usado como aditivo alimentar em nossa civilização, preparado pela primeira vez a partir de algas marinhas involuntariamente no Extremo Oriente há mais de 300 anos e é formado por uma mistura de agarose e agaropectina (ARAKI, 1956; LEE *et al.*, 2016).

Devido às suas características físico-químicas e gelificantes, o ágar tem sido utilizado comercialmente como agente gelificante e espessante nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, além de meio sólido para o crescimento de bactérias em pesquisas biomédicas e biotecnológicas, sendo produzido exclusivamente na parede celular de espécies de algas vermelhas nas *Gracilariaceae*, *Gelidiaceae*, *Pterocladaceae* e *Gelidiellaceae* (LEE *et al.*, 2016).

A agarose, o constituinte principal do ágar, consiste da repetição alternada de dissacarídeos unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ β -D-galactopiranosose ligado a 3,6-anidro-L-galactopiranosose por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (FIGURA 2) (ARAKI, 1956).

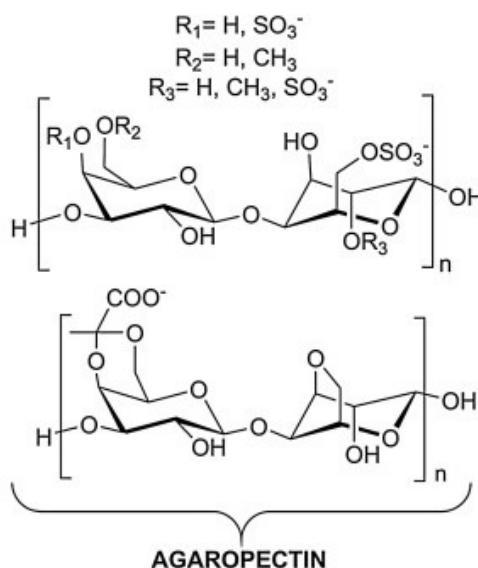
Figura 2 – Representação das unidades formadoras da agarose



Estrutura química dos dissacarídeos que formam a estrutura da agarose. Galactose (G) e 3,6 anidro-galactose (AHG) unidos por ligações β 1 $\rightarrow$ 4 e α 1 $\rightarrow$ 3. Fonte: (BERTASA *et al.*, 2017), adaptado.

Agaroses são as frações de ágar que essencialmente gelificam. Eles têm alto peso molecular acima de 100.000 Daltons e frequentemente ultrapassam 150.000 Daltons, como um baixo teor de sulfato, geralmente abaixo de 0,15% (ARMISEN; GALATAS, 1987). Por outro lado, a agaropectina são frações restantes do ágar que não gelificam, elas têm um peso molecular menor que a agarose, geralmente abaixo de 20.000 Daltons, tipicamente 14.000 Daltons (FIGURA 3). Os sulfatos estão em um conteúdo mais alto que na agarose, registrando de 5% a 8% (WANG *et al.*, 2001).

Figura 3 – Estrutura química da agarpectina



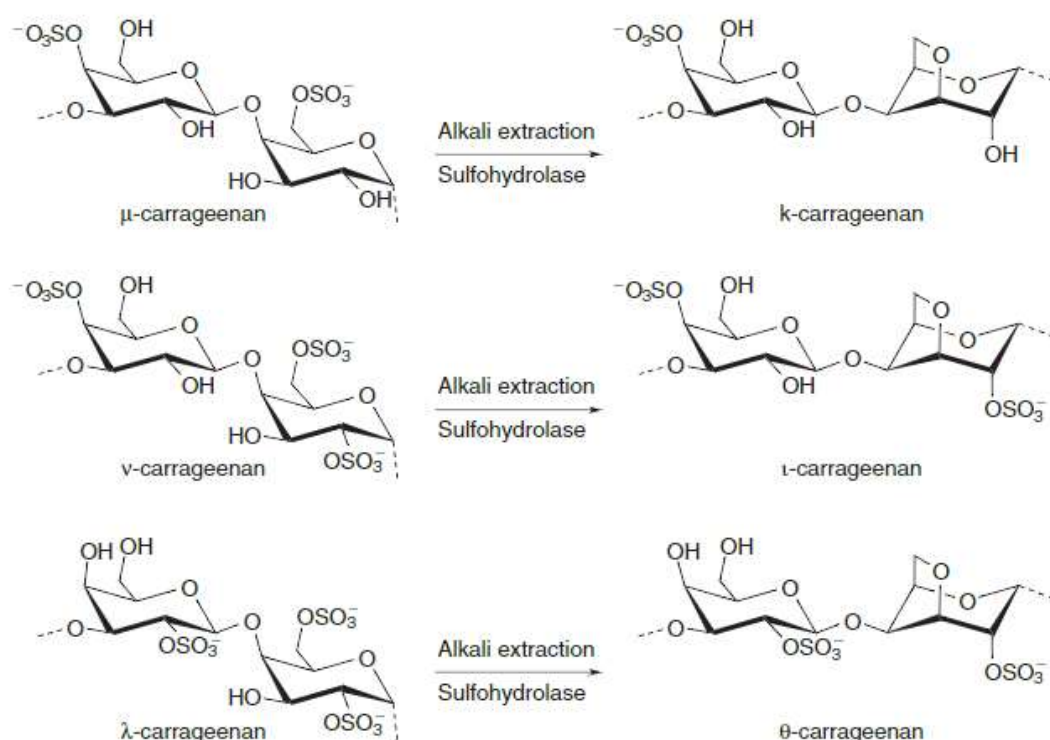
Possível unidades de repetição de dissacarídeos que compõem a agarpectina com diferentes substituintes (hidroxi, metoxi, sulfoxi, piruvato acetal). Fonte: (BERTASA *et al.*, 2017)

1.2.1.1 Carragenana

A carragenana é um carboidrato natural obtido a partir de algas vermelhas e tem sido usada na Irlanda desde 400 d.C. como gelatina e como remédio caseiro para curar tosses e resfriados e nos dias atuais ela é utilizada como um aditivo alimentar sem valor nutricional nas preparações de alimentos por suas propriedades gelificantes, espessantes e emulsificantes, em aplicações farmacêuticas e na medicina experimental é frequentemente usada para o teste de agentes anti-inflamatórios (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Esse carboidrato é constituído por um grupo de diversas poligalactanas sulfatadas, linear, parcialmente hidrofílicos com 15 a 40% de teor de éster-sulfato e uma massa molecular relativa média acima de 100.000 Da. É formado por unidades alternadas de α -D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose (3,6-AG) unidas por ligação α -1,3 e β -1,4-glicosídica (FIGURA 4), além da galactose e do sulfato, foram observados substituintes adicionais como os grupos piruvato e xilose (GOÑI; QUILLE; O'CONNELL, 2020).

Figura 4 – Estrutura química de unidades de repetições de tipos de carragenana comerciais



Fonte: GOÑI; QUILLE; O'CONNELL, 2020

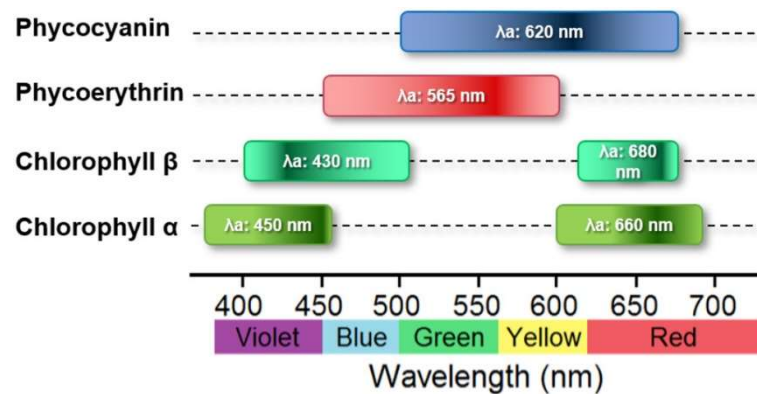
Carragenanas podem apresentar seis estruturas básicas: kappa (κ), iota (ι), theta (θ), mu (μ), nu (ν) e lambda (λ) dependendo da quantidade de sulfatação e 3,6-AG, sendo que as mais utilizadas são do tipo κ -carragenana é obtida predominantemente por extração química da alga tropical *Kappaphycus alvarezii* e ι -carragenana que geralmente é extraída de *Eucheuma denticulatum* (GOÑI; QUILLE; O'CONNELL, 2020).

Recursos naturais de fontes renováveis têm recebido muita atenção devido às suas propriedades multifuncionais, como degradabilidade e compatibilidade com sistemas orgânicos. Os biomateriais à base de carragenana têm sido utilizados em formulações farmacêuticas devido às suas propriedades multifuncionais, incluindo biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, bem como propriedades bioativas como propriedades antivirais, antibacterianas, anti-hiperlipidêmicas, anticoagulantes, antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras (PACHECO-QUITO; RUIZ-CARO; VEIGA, 2020). Sua atividade e propriedades físico-químicas os tornam biomateriais adequados para a administração de fármacos e, mais recentemente, para o desenvolvimento da engenharia de tecidos, *drug delivery* e cicatrização de feridas (MOKHTARI *et al.*, 2021; YEGAPPAN *et al.*, 2019).

1.2.2 Ficobiliproteínas

Como organismos fotossintéticos, as algas vermelhas utilizam a energia solar em comprimentos de onda de 400 a 700 nm (FIGURA 5) (radiação fotossinteticamente ativa) e converte em energia química que pode ser usada pelas células, para tanto, elas possuem um grande complexo multiproteico com várias subunidades chamado ficobilissoma (PBS) que é responsável pela captação de luz, também conhecido como complexo antena (LI *et al.*, 2019).

Figura 5 – Comprimento de absorção de onda relacionado aos pigmentos fotossintéticos

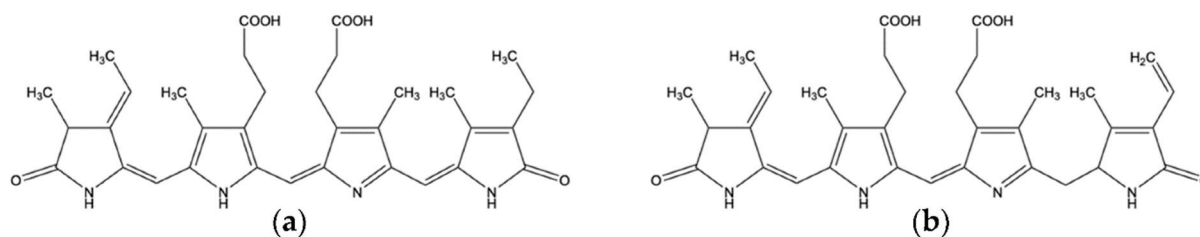


Macroalgas vermelhas não contêm clorofila *b* e *c*, mas apresentam proteínas acessórias ao fotossistema que auxiliam na fotossíntese.

Fonte: (HSIEH-LO *et al.*, 2019).

Os PBSs, são compostos de ficobiliproteínas solúveis em água (PBPs) e peptídeos ligantes hidrofóbicos, sendo que as ficobiliproteínas são um grupo de proteínas macromoleculares em forma de disco com tetrapirróis (FIGURA 6) de cadeia aberta ligados covalentemente e são as principais proteínas das algas vermelhas, correspondendo de 40-50% do conteúdo total de proteínas (KITADE *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019). As principais ficobiliproteínas podem ser divididas em quatro categorias principais de acordo com suas propriedades espectrais e incluem ficoeritrina (rosa), ficocianina (azul), aloficocianina (azul-esverdeado) e ficoeritrocianina (roxa) (OSÓRIO *et al.*, 2020).

Figura 6 – Estrutura química das ficobilinas presentes na ficocianina e ficoeritrina



(a) Ficocianobilina (b) Ficoeritrobilina. Fonte: (OSÓRIO *et al.*, 2020)

As ficocianinas e ficoeritrinas são pigmentos com grande potencial biotecnológico devido às suas cores intensas, propriedades fluorescentes e potenciais benefícios à saúde. Suas principais aplicações são como suplementos nutricionais, corantes naturais em alimentos e cosméticos e como reagente para ensaios imunológicos (HSIEH-LO *et al.*, 2019).

Além de aplicações alimentícias e em cosméticos, os PBPs demonstraram ter efeitos antioxidantes, antivirais, antitumorais, de aumento da imunidade e anti-inflamatórios (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; GARCÍA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2019).

1.3 Algas vermelhas no conceito de biorrefinaria

A sustentabilidade do processo, viabilidade econômica e gestão de efluentes são os parâmetros decisivos que determinam o sucesso comercial geral de qualquer tecnologia de bioprocessamento (BAGHEL *et al.*, 2020). Com base nessas características, a biomassa de algas pode ser uma matéria-prima promissora para uma tecnologia de conversão zero de resíduos que direcione para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado (MISHRA; ROY; MOHANTY, 2019).

A abordagem de processamento em biorrefinaria visa a exploração da biomassa em cada etapa do processo com geração mínima de resíduos onde o material que seria descartado após cada processo, fosse posteriormente utilizado de forma eficiente para a geração de subprodutos de valor agregado (BALINA; ROMAGNOLI; BLUMBERGA, 2017; RAJAK; JACOB; KIM, 2020).

Esta estratégia é composta por um processo sequencial que inclui desde o cultivo de macroalgas em instalações aquícolas, extração de compostos bioativos da biomassa de macroalgas colhidas, conversão de biomassa residual (hidrólise, pirólise, fermentação e liquefação) para geração de combustível ou químicos derivados seguido por resíduos

fermentados ou processados utilização para a geração de produtos de baixo valor e alto volume (RAJAK; JACOB; KIM, 2020).

Meinita e colaboradores (2019) investigou a possibilidade de produção de etanol utilizando resíduos sólidos de carragenana, que representou mais de 30% da matéria prima de extração, provenientes da extração de *Kappaphycus alvarezii* e concluiu que abordagem de hidrólise ácida seguida de enzimática aumentou a produção de galactose e glicose, além de produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (MEINITA *et al.*, 2019a).

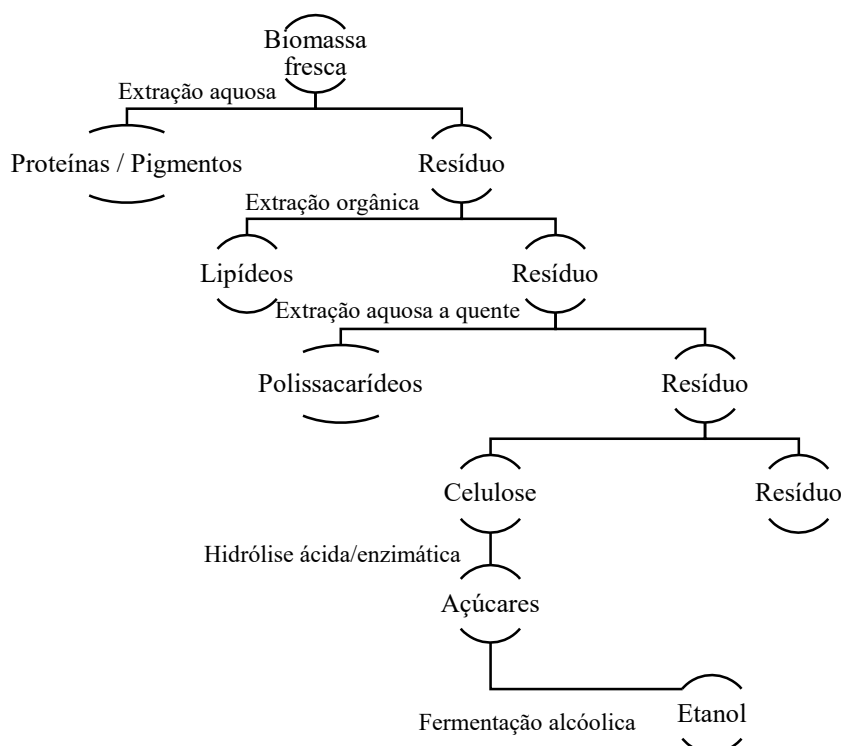
Masarin e colaboradores (2016) também analisaram a composição química e hidrólise enzimática do resíduo produzido a partir da extração de carragenana de *K. alvarezii* com tratamento alcalino KOH 6%, obtendo rendimento de carragenana e resíduo 60 e 27,8%, respectivamente e glicose como o maior constituinte produzido por hidrólise enzimática do resíduo, sugerindo a aplicação em processos fermentativos (MASARIN *et al.*, 2016).

Solieria filiformis cultivada em sistema integrado de aquicultura multitrófica (IMTA) foi estudada para a obtenção de produtos com abordagem de biorrefinaria, onde um extrato hidrossolúvel rico em proteínas e polissacarídeos sulfatados adequado como suplemento alimentar, uma fração lipídica rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) com potencial para uso na indústria nutracêutica e uma *ι*-carragenana pura com atividade antiviral contra *Herpes simplex virus* foram recuperados (PEÑUELA *et al.*, 2018).

Amostras de *Gracilaria verrucosa* colhidas em diferentes meses do ano resultaram na extração de ~27–33% de ágar, com um resíduo contendo cerca de 62-68% de holocelulose e rendimento de açúcares de 87% (por g de celulose) após hidrólise enzimática, seguindo para a produção de etanol por *S. cerevisiae* (KUMAR *et al.*, 2013).

Em geral, para algas vermelhas a abordagem de biorrefinaria segue uma sequência baseada nas biomoléculas de interesse como mostrado na FIGURA 7.

Figura 7 – Esquema geral da sequência de extração e obtenção de biomoléculas de algas marinhas vermelhas



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de BAGHEL *et al.*, 2015; MEINITA *et al.*, 2019; PEÑUELA *et al.*, 2018; SAMPATH-WILEY; NEEFUS, 2007; ZHAO *et al.*, 2020.

Nota-se que moléculas mais sensíveis são extraídas primeiramente seguindo uma ordem de obtenção de moléculas com valor econômico inversamente proporcional à quantidade obtida, em outras palavras, componentes extraídos nas etapas iniciais apresentam um valor de mercado maior e uma quantidade de obtenção menor em relação aos compostos extraídos posteriormente no processo.

O nosso grupo de pesquisa já desenvolve estudos com extração de biomoléculas de algas marinhas como R-ficoeritrina de *Solieria filiformis* (BASTOS FILHO, 2016; BASTOS FILHO, 2021), ficocianina da alga *Hypnea musciformis* (COSTA, 2016), iota-carragenana de *S. filiformis* (LIMA, 2012), hidrólise ácida de *S. filiformis* para a obtenção de bioetanol (CASTRO *et al.*, 2017) e de *Gracilaria birdiae* para obtenção de ácidos orgânicos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Tendo em vista o exposto anteriormente somado às tendências mundiais de produção sustentável e minimização da produção de resíduos industriais, o objetivo desse trabalho foi a extração sequencial de biomoléculas da macroalga vermelha *Solieria filiformis*

com a valorização dos resíduos sólidos em um conceito de biorrefinaria, utilizando tecnologias e estudos já desenvolvidos por nosso grupo de forma individual.

2 INTRODUCTION

The term seaweed is commonly used as a comprehensive description of plant-like multicellular organisms that are divided into the taxa Rhodophyta (red), Chlorophyta (green) and Phaeophyta (brown) (GUIRY; GUIRY, 2020). Worldwide, more than 200 seaweed species have been used for different purposes such as human food, hydrocolloids (alginates, agar and carrageenan), paper, biofertilizer, biofuels, animal feed and pharmaceutical biomolecules production (WHITE; WILSON, 2015). The seaweeds also have the potential for bioremediation of water polluted by fish farming and were candidates for CO₂ reduction, thanks to their high photosynthetic metabolism (TANO, 2016). In 2016, the global seaweed industry was worth more than US\$ 6 billion per year, with a rising market and growing annual product sales projections, which will reach US\$ 26 million by 2025 (FAO, 2018), farmed seaweeds represented 97.1 percent by volume of the total of 32.4 million tonnes in 2018 (FAO, 2020).

Red seaweed represents 61% of the total global production of seaweed with the main purpose of agar and carrageenan extraction. Agar is formed by alternating β -D-galactose and α -L-galactose units, while carrageenan is a linear polysaccharide formed by a sequence of α -D-galactopyranose and β -D-galactopyranose which presents physicochemical properties of industrial interest, forming gels and being used as thickeners and gelling agents in food and cosmetic industries (ÁLVAREZ-VIÑAS *et al.*, 2019; PEÑUELA *et al.*, 2018). Murano *et al.* (MURANO *et al.*, 1997) extracted and characterized the chemical structure of the sulfated polysaccharide from *Solieria filiformis* and suggested it be an iota-carrageenan.

Synthesis of photoprotective molecules against UV radiation and photosynthetic pigments (chlorophyll a, phycobiliproteins and carotenoids) by red seaweeds have already been shown to have potential applications as dyes, UV protectors and antioxidants biomolecules. The pigments that stand out are the phycobiliproteins because they have solubility in water and spectroscopic and fluorescence properties which can be applied in biomedical, food, biotechnology, cosmetic, and pharmaceutical products and processes (ÁLVAREZ-VIÑAS *et al.*, 2019).

Based on these data and sustainability, strategies have been increasingly sought for the maximum exploitation of seaweed biomass by applying the concept of biorefinery (BAGHEL *et al.*, 2015a; CHANDRA *et al.*, 2019; DEEPIKA; RAVISHANKAR; RAO, 2022; GOLBERG *et al.*, 2020; RAJAK; JACOB; KIM, 2020; UBANDO; FELIX; CHEN, 2020; WHITE; WILSON, 2015). Baghel *et al.* (BAGHEL *et al.*, 2015a) demonstrated an integrated sequential extraction process of the main components of the seaweeds *Gelidiella acerosa*,

Gracilaria dura and *Gelidium pusillum* and obtained the red pigment R-phycoerythrin (R-PE), R-phyococyanin (R-PC), lipids, agar, cellulose, and mineral solution. In addition, the cellulose residue was used to obtaining of ethanol by alcoholic fermentation. Pañuela *et al.* (PEÑUELA *et al.*, 2018) using the *Solieria filiformis* biomass grown in an integrated multitrophic aquaculture system (IMTA) obtained a water-soluble extract rich in proteins and sulfated polysaccharides, a lipid fraction rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and an iota-carrageenan with antiviral activity against Herpes simplex. Meinita *et al.* (MEINITA *et al.*, 2019a) studied the kappa-carrageenan extraction residue from *Kappaphycus alvarezii* via acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis to obtain glucose and galactose fermented by *Saccharomyces cerevisiae* producing ethanol. Masarin *et al.* (MASARIN *et al.*, 2016) also obtained the same monosaccharides in enzymatic hydrolysis.

Among the currently commercially exploited carrageenans, the most abundant genus belongs to the Solieriaceae (Gigartinales) family (PEÑUELA *et al.*, 2018). Application of biomolecules extracted from *Solieria filiformis* revealed that this species contains several compounds with biological activity (CAAMAL-FUENTES; ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, [s.d.]; DE ARAÚJO *et al.*, 2011; PEÑUELA *et al.*, 2018). Therefore, the objective of this study was to establish a biorefinery of *Solieria filiformis* seaweed to obtaining of R-phycoerythrin, iota-carrageenan, and proteolytic extract for industrial application.

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 *Solieria filiformis* seaweed and *Bacillus subtilis* bacteria

The seaweed *Solieria filiformis* specimens were harvested from farming structures located in Flecheiras Beach, Ceará, Brazil (03° 13' 06" S 39° 16' 47" W). The seaweed biomass was cleaned with water to remove sand and froze (- 20 °C) until utilization.

Bacillus subtilis ATCC 6633 was obtained in culture collection of microorganisms at Laboratory of plant toxins in Federal University of Ceará, Brazil. Stock cultures of *B. subtilis* ATCC 6633, were maintained at -20 °C on glycerol 20% and transferred to agar nutrient by streak plate method.

3.2 Extraction and quantification of R-phycoerythrin from *S. filiformis*

The first step of the R-phycoerythrin (R-PE) extraction was performed with 1.2 Kg of *S. filiformis* wet biomass. The seaweed was cut in an electric mill and mixed in 25 mM potassium phosphate buffer 25mM, pH 6.5, ratio 1:3 (w/v) and kept mixing with a mechanical stirrer (150 rpm) in the dark at 25°C for 6 h, followed by filtration in nylon tissue. The liquid phase was centrifuged at 15,000 *xg*, 4°C by 30 min and absorbance at 280, 564, 618 and 730 nm was recorded in spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences). The solid waste this step was used in second step of R-PE extraction, it was frozen for 24 h, thawed and the liquid phase was recuperated by filtration in nylon tissue. The solid waste of this second step was denominated Sw-RPE. The R-PE content of the liquid phases was quantified according to Equation 1 proposed by Sampath-Wiley & Neefus (SAMPATH-WILEY; NEEFUS, 2007)

$$\text{R-PE (mg/mL)} = 0.1247[(A_{564} - A_{730}) - 0.4583(A_{618} - A_{730})] \quad (1)$$

and the purity index (PI) of the R-PE was calculated according to Equation 2, proposed by Senthilkumar *et al.* (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013).

$$PI = A_{564}/A_{280} \quad (2)$$

3.3 Pretreatment of Sw-RPE from *S. filiformis*

Pretreatment of Sw-RPE was carried out to remove the residual red pigments. A cold alkali transformation (*CAT*) was performed, initially, where the Sw-RPE was soaked in 6 % KOH solution 1:2 (w/v) for 24 h at 25 °C. The Sw-RPE alkali was copiously washed with current water until pH 7,0 (MASARIN *et al.*, 2016), soaked twice with 5 % (v/v) of commercial bleach (Ype®, with 2.5 and 1.0% the maximum concentration of NaClO and NaOH, respectively) in ratio 1:2 (w/v) for 20 min, followed by wash and filtration on nylon tissue to obtaining of the clarified biomass (Sw-RPEt).

3.4 Iota-Carrageenan extraction from Sw-RPEt

The iota-carrageenan (CAR) extraction was performed using 900 g of Sw-RPEt, it was separated into tree backers and addicted distilled water ratio of 1:3 (w/v) and boiled at 94 °C in a water bath for 4 h, followed by hot filtration in a nylon tissue and dried in an oven at 50 °C until constant mass (DONG *et al.*, 2018). The solid waste of the iota-carrageenan extraction (Sw-CAR) was collected, dried in the same conditions, and used for acid-therm hydrolysis.

3.5 Acid-therm hydrolysis of Sw-CAR

Acid-therm hydrolysis of the Sw-CAR dry was performed in a 250 mL flask using 100 mL of 0.5 M H₂SO₄, 5.0 % of Sw-CAR (w/v), hydrolysis time 30 min and hydrolysis temperature 120 °C in autoclave (CASTRO *et al.*, 2017; MEINITA *et al.*, 2019b). Then, the hydrolysates (HYD) were filtered in a nylon tissue and the pH of the liquid phase was adjusted to 7.0 with calcium hydroxide, producing calcium sulfate, which was further separated by vacuum filtration in filter paper. The biological solid waste from acid-therm hydrolysis (Sw-HYD) was whashed in distilled water and pH neutralized, followed by vacuum filtration in a nylon layer and dried in an oven.

3.6 Chemical analyses

To quantify biomolecules in dried samples was used method described by Masarin *et al.* with some modifications. The milled samples (80 mesh) were hydrolyzed with 72 % (w/w) sulfuric acid at 30 °C for 1 h (2 mL of acid to 200 mg of the sample), the acid hydrolysate was diluted with 34 mL of distilled water (4 % (w/w) sulfuric acid), and the mixture was autoclaved at 121 °C for 1 h and residual material was cooled (MASARIN *et al.*, 2016). The pH was

neutralized (pH 7,0 - 7,5) with NaOH 6 M, complete to 50 mL and kept shaking for 20 min and filtered. Proteins and carbohydrates content was quantified in filtrate passed through 0.45 μ m membranes.

The total soluble carbohydrates and protein of the biorefinery products were measured by the sulfuric acid-UV method (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013), and Bradford method (BRADFORD, 1976), respectively. The bovine serum albumin was used as protein standard. Sulfate content of the i-CAR was determined by the barium chloride-gelatin turbidimetric assay (DODGSON; PRICE, 1962), and reducing sugar content of the hydrolysates was determined by 3,5-dinitrosalicylic acid method (MILLER, 2002).

3.7 Bioprocess for proteolytic extract production by *Bacillus subtilis* cultivation

Sw-CAR-HYD was used as culture medium for *Bacillus subtilis* bacteria. Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 100 mL of sterile medium composed 5.0 g/L peptone, 5.0 g/L tryptone, 5.0 g/L NaCl and 2.5 g/L yeast extract, 62.01 mL of Sw-CAR-HYD (final ART concentration 8.0 g/L), pH 7.0, were inoculated with 10 mL. The inoculum was prepared by transferring of same activated colonies of *B. subtilis* to ATGE medium and incubation for 24 h at 35°C under orbital agitation at 150 rpm. The optic density of the inoculum was 1.0. The bioprocess occurred for 72 h at 35°C and orbital agitation at 150 rpm. The control was performed with same culture medium composition replaced Sw-CAR-HYD by 8.0 g/L of glucose.

After time, the fermented culture medium was centrifuged at 12,000 xg, 4°C, 15 min and the pellet was resuspended in NaCl 0.9% and dried in oven (50 °C) for determination of the bacteria biomass. The supernatant containing proteins was concentrated by ultrafiltration (Vivaspin™, 10,000 Da MWCO, GE Healthcare) and a resultant concentrated liquid was named EnzE-HYD (Enzymatic extract).

3.8 Proteolytic activity of EnzE-HYD

The buffers potassium phosphate 50 mM pH 7.0 and Tris-HCl 50 mM pH 9.0 and commercial soap solution (TixanYpe® powder, 5 g/L according fabricant) were used to evaluate the proteolytic activity of the EnzE-HYD. The proteolytic activity was assayed by using azocasein with some modifications of the method described by Secades & Guijarro (SECADES; GUIJARRO, 1999). Briefly, 50 μ L of EnzE-HYD was added to 250 μ L of

azocasein 1% in 250 μ L reaction buffer, and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was terminated by adding 300 μ L of 12% (w/v) trichloroacetic acid, followed by centrifugation at 12,000 xg, at 4°C for 5 min. 250 μ L of the supernatant was neutralized by adding 750 μ L of 2 M NaOH, and the absorbance at 420 nm (A_{420}) was measured using a spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences. One unit of enzyme activity was defined as the amount which yielded an increase of 0.01 in the A_{420} after 30 min at 30 °C (SECADES; GUIJARRO, 1999).

3.9 Protein electrophoresis

Enzymatic extracts (EnzE-HYD and EnzE-HYD concentrated) were mixed (1:1) with SDS sample buffer (0.125 M Tris HCl, pH 6.8; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) glycerol; 0.04% (w/v) bromophenol blue) and SDS-PAGE was performed according to Laemmli (LAEMMLI, 1970) with 12.5% polyacrylamide-bisacrylamide gel. The silver nitrate method was used to proteins revelation in gel as described by Blum *et al.* (BLUM; BEIER; GROSS, 1987). The protein markers were α -Lactalbumin from bovine milk, carbonic anhydrase from bovine erythrocytes, albumin from chicken egg white, albumin from bovine serum.

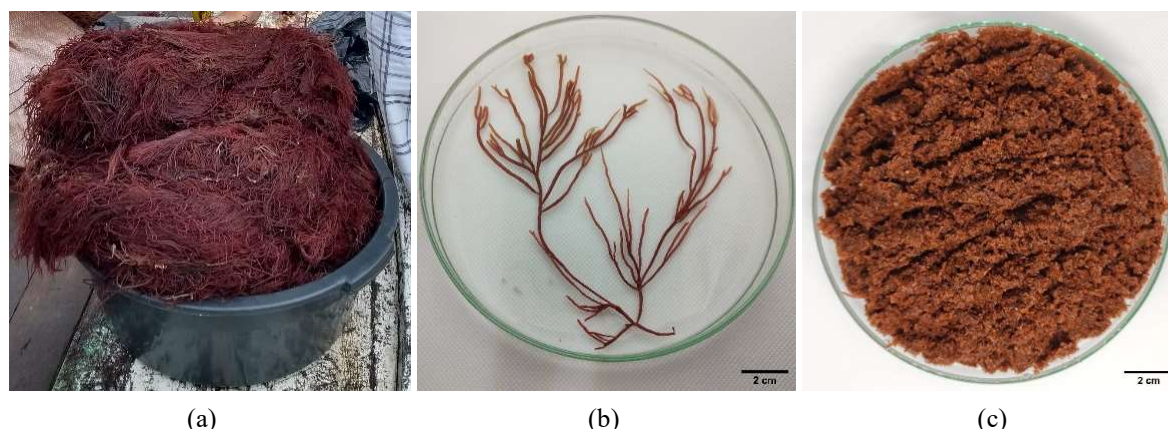
3.10 Statistical analysis

The extracted assays were carried out in triplicate and the results were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). The data were analyzed with student's "t" tests or one-way analysis of variance (ANOVA) to determine if there were significant differences between treatments ($p > 0.05$) (GraphPad Prism 9 Software, La Jolla, CA, USA).

4 RESULTS

Solieria filiformis harvested (FIGURE 1 (a, b)) after thawing showed a dry mass corresponding to 4.85 ± 0.26 % of wet mass (95.15 % moisture), 40.19 ± 8.93 % of total carbohydrates and $16.95\% \pm 0.27\%$ of total soluble proteins.

Figure 8 - *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson (GABRIELSON, 1985).



(a) seaweed cultivated on the sea and harvested by Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG), Flecheiras Beach, Ceará State, Brazil; (b) macroscopic view of the seaweed's morphology; (c) crushed biomass used for the R-Phycoerythrin extraction. Source: Prepared by the author

4.1 R-Phycoerythrin extraction

The extraction step of the R-PE from *S. filiformis* seaweed (FIGURE 8c) reached yields of 0.183 and 5.04 mg/g of fresh and dry seaweed, respectively, being the extract protein content of 407.88 mgP total (after centrifugation), whose 54% was R-PE with PI of 0.635 ± 0.091 (Table 1).

Table 1 - Extraction process, yield and purity index of R-phycoerythrin from *Solieria filiformis* seaweed.

Step	Extract Total Volume (L)	Concentration		R-PE Total content (mg)	Purity Index (PI)	Yield R-PE (mg/g seaweed)
		Proteins (mg/mL)	R-PE (mg/mL)			
Extraction	3.812 ± 0.059	0.107 ± 0.01	0.057 ± 0.008	220.33	0.635 ± 0.091	0.183 fw 5.04 dw
Freeze-thaw	0.235 ± 0.02	0.397 ± 0.002	0.234 ± 0.078	54.99	0.732 ± 0.103	0.0556 fw 1.12 dw
Total	4.047	-	-	275.32	-	0.299 fw 6.30 dw

Source: Prepared by the author

The later step of residue freeze-thaw increased the recuperation of the R-PE in 20% and the PI of the pigment was higher than extract.

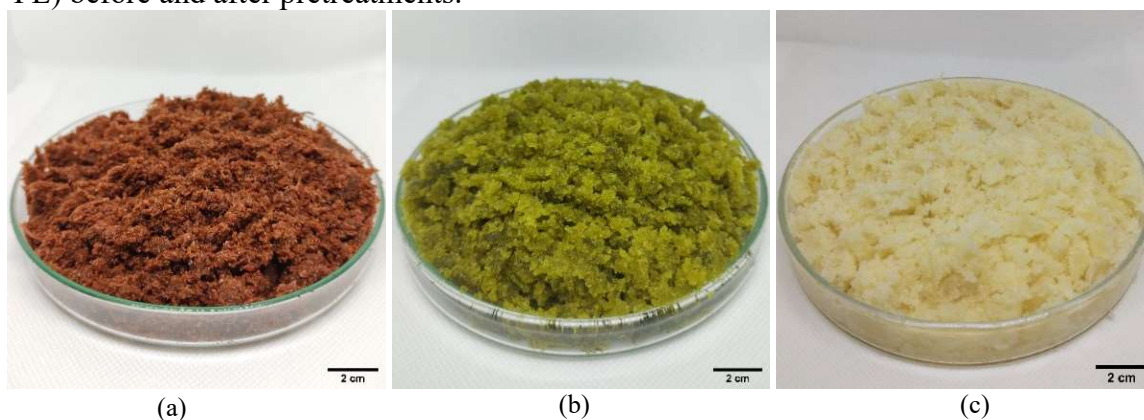
In the total, 4.047 L of extract were obtained for 1.20 kg of seaweed, being 11.04% from additional volume of applied buffer in the extraction step. The yields of the R-PE from *S. filiformis* reached with the extraction process proposed in this work were 0.3 and 6.3 mg R-PE/g seaweed wet and dry, respectively.

The final solid waste mass from the R-PE extraction process (Sw-RPE) presented red color of residual pigment and was 778.5 ± 8.83 g wet mass, corresponding 52.31 g dw and containing 48.47 ± 0.68 % of carbohydrates and 9.34 ± 0.08 % of proteins.

4.2 Pretreatment of solid waste from R-PE extraction process

The Sw-RPE obtained before and after pretreatments with cold alkaline and chemical clarification were shown in the FIGURE 9. The red Sw-RPE (FIGURE 9a) presented green color after CAT pretreatment (FIGURE 9b) and white color after clarification with commercial bleach solution (FIGURE 9c). The carbohydrate and protein contents of the Sw-RPE_t were $56.99 \pm 1.76\%$ and 3.30 ± 0.06 % respectively. Not was observed significant loss of biomass after pretreatments, where the wet biomass recuperated was 972.531 g corresponding 50.18 g dw.

Figure 9 - Color of the solid waste from R-PE extraction process of *S. filiformis* (Sw-R-PE) before and after pretreatments.



(a) Sw-RPE; (b) Sw-RPE after cold alkaline transformation (CAT) with 6% KOH for 24 h; (c) Sw-RPE_t resulting from the chemical clarification process with commercial bleach 5% (v/v) of the Sw-RPE_{CAT}. Source: Prepared by the author

4.3 Iota-carrageenan extraction from Sw-RPE_t

The yield of the i-CAR extracted from Sw-RPE_t was 45.83% and it presented 44.07 ± 0.16 % of total carbohydrates, 3.41 ± 0.27 % of proteins, and 24.02 ± 0.45 % of sulfate. The solid waste mass generated in the process (Sw-CAR) was 15.98 ± 0.91 g, representing 34.39% of Sw-RPE_t mass and carbohydrate and protein contents of 58.73 ± 0.37 and 2.72 ± 0.16 %.

4.4 *Acid-Therm hydrolysis of the Sw-CAR*

The acid therm hydrolysis of 15 g of Sw-CAR showed a recovered hydrolysate volume of 249 ± 7.93 mL, corresponding $82.67 \pm 2.65\%$ of the reaction total volume. The total carbohydrates content in the hydrolysate was 10.84 g, being 3.21 g of ART and 7.60 mg of total proteins. The hydrolysis efficiency of the Sw-CAR was 72.26% for total carbohydrates and 21.4% for ART. The solid waste of the acid therm hydrolysis (Sw-HYD) was 4.84 ± 0.60 g, corresponding 32.26% of the Sw-CAR and containing $53.23 \pm 0.10\%$ of total carbohydrates and $1.01 \pm 0.05\%$ proteins.

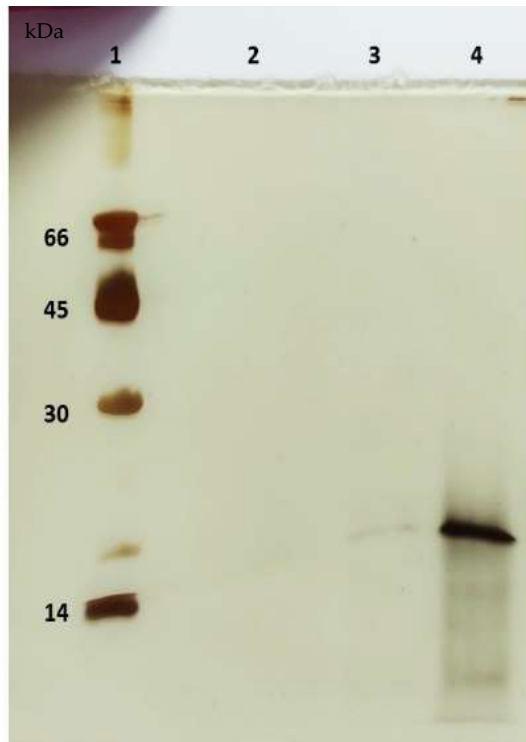
4.5 *Bacillus subtilis* cultivation in Sw-CAR hydrolysate as carbon source

The concentration of *Bacillus subtilis* biomass and protein in the Sw-CAR hydrolysate (Sw-CAR-HYD) after 72 h of bioprocess reached 0.89 ± 0.005 g/L and 0.067 ± 0.008 mg/mL (6.67 mg total protein in 100 mL), respectively. *B. subtilis* was 8.95 % higher than control ($p = 0.0058$). After cell removing and membrane filtration at 10,000 Da (Vivaspin) of the supernatant, the volume was reduced 8 times generating an enzymatic extract (EnzE-HYD) containing 0.282 ± 0.036 mg/mL of protein (2.46 mg total protein).

4.6 *Proteolytic activity of EnzE-HYD*

The protease activity of EnzE-HYD was 8.80 ± 0.93 at pH 7, 8.71 ± 0.33 at pH 9 and 8.44 ± 0.23 U/mL in soap presence with specific activities of 31.21, 30.89 and 29.94 U/mgP, respectively. The EnzE control showed enzymatic activity below the detection limit. The molecular weight of the predominant protein in the EnzE-HYD was of 21 kDA as observed in lane 4 and a band at the same height, with lower intensity, also be seen in Lane 3 (FIGURE 10).

Figure 10 - Protein profile of Enzymatic Extract (EnzE) obtained by bioprocess with *Bacillus subtilis* cultivation in 12.5 % SDS-PAGE.

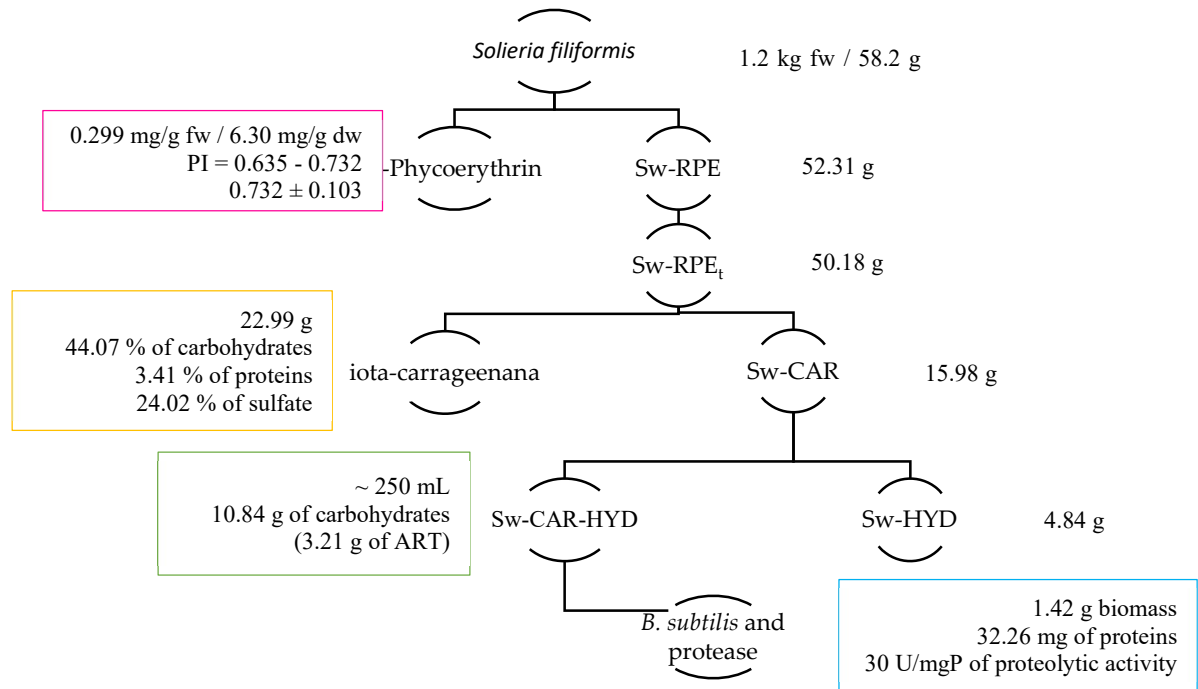


Lane 1: Molecular markers; 2: EnzE Control (medium containing glucose as the carbon source for *B. subtilis* cultivation); 3: EnzE from *B. subtilis* cultivation in Sw-CAR hydrolyzed (HYD); 4: EnzE-HYD concentrated. Source: Prepared by the author

4.7 Biorefinary of *Solieria filiformis*

The FIGURE 11 shows a summary of the products obtained in the present work. The values were calculated referring to the total use of the previous raw material.

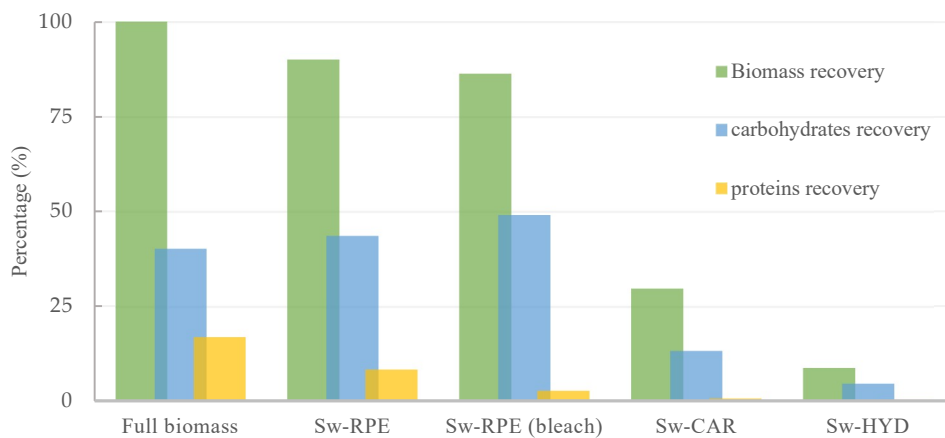
Figure 11 - General scheme of the sequential extraction of *Solieria filiformis* molecules in a biorefinery concept



Source: Prepared by the author

Observing the biochemical composition of the products obtained by *S. filiformis* biorefinery, was possible to see the decay of the components of the original seaweed biomass as shown in FIGURE 12.

Figure 12 - Biochemical composition recovery of the full biomass in the solid wastes produced after extracting of each *S. filiformis* biomolecules



Sw-solid waste; RPE: R-phycoerythrin; *i*-CAR: Iota-Carrageenan; HYD: Hydrolysate.
Source: Prepared by the author

5 DISCUSSION

Solieria filiformis is a red seaweed abundant on the Brazilian coast and some of its compounds are already studied individually by our research group. The cultivation contributes to the development of technologies with *S. filiformis*, as it enables large-scale production with a very low environmental impact.

In recent years, the valorization of seaweed biomass through the adoption of a biorefinery approach has gained attention since water-soluble biomolecules can be extracted (BAGHEL *et al.*, 2015c; GAJARIA *et al.*, 2017; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019). R-Phycoerythrin is the main phycobiliprotein found in red seaweed and plays an important role as accessory pigment in photosynthesis and is a water-soluble compound (MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019). This work launches a proposal of maximum use of the cultivated biomass of *S. filiformis*, where the R-phycoerythrin was the first product extracted. The yield of R-PE/Proteins shown in this work was similar to that found by Vicent *et al.* (VICENTE *et al.*, 2019), they performed an aqueous extraction of red pigment from *Gracilaria* sp. and the characterization by proteomic analysis showed 59.4 % of R-phycoerythrin. Zaoh *et al.* (ZHAO *et al.*, 2020) obtained 0.062 mgR-PE/mL with PI of 0.24 in the crude extract of *Gracilaria tenuistipitata* using freeze-thaw cycles as extraction method, similar concentration but PI of the R-PE lower than showed in this work. In addition, the freezing and thawing process carried out generated 0.234 mgR-PE/mL with PI highest (0.73), increasing the total yield R-PE extracted in 20%, but showing still a large amount of residual R-PE in the Sw-RPE. Sequential methodology of cell disruption can be used to increase the yield R-PE extracted and to avoid the pretreatments steps for iota-carrageenan extraction.

Iota-carrageenan is one of the hydrocolloids derived from red seaweed and it is widely used for its rheological properties that promote its use as gelling agents, thickeners and stabilizers, as well as applications in experimental medicine, pharmaceutical formulations, cosmetics, bioinks for bioprinting, films and others industrial applications (CAMPBELL; HOTCHKISS, 2017; KIM *et al.*, 2019; NECAS; BARTOSIKOVA, [s.d.]).

The iota-carrageenan extraction from Sw-RPE used in this work proposed the use of a solid waste obtained after the extraction of R-PE and the yields observed were similar to those obtained using crushed dry biomass seaweed as shown in TABLE 2.

Table 2 - Yield and composition of iota-carrageenan extracted from *Solieria filiformis* biomass and solid waste of the red pigment extraction (Sw-RPE) by different methodologies.

Source	Extraction method	Yield%	Carbohydrates%	Sulfate%	Proteins%	Reference
Sw-RPE	KOH-pretreated	45.83	44.07	24.02	3.41	Current work
Cultivated biomass	KOH-pretreated and Hot-water	44.20	47.00	24.10	-	(LIMA, 2012)
		33.54	56.43	35.05	1.44	(DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2011)
	MAE*	25.55	22.47	47.66	-	(PEÑUELA <i>et al.</i> , 2018)
	MAE biorefinery	29.67	28.79	34.91	-	(CAAMAL-FUENTES; ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, [s.d.])
Biomass from IMTA** system	Hot-water	17.89	55.13	21.40	3.18	
	KOH-treated and Hot-water	15.87	52.88	19.11	6.70	

*Micro-waves assisted extraction; ** Integrated Multi-Trophic Aquaculture.

The yield of the iota-carrageenan extracted from Sw-RPE was similar to those described from biomass of the same specie. Therefore, the prior R-PE extraction didn't affect the yield of iota-carrageenan. The yield shown in this work was closer to the work carried out by our research group (DE ARAÚJO *et al.*, 2011; LIMA, 2012) from biomass. However, given the residual pigment observed in the Sw-RPE still were necessary steps of pretreatment of the solid waste to obtaining iota-carrageenan depigmented. Different extraction methods can generate different yields for the same raw biomass, in addition, the seasonality factor and season of the year (rain-summer) influence the yield (LIMA, 2012).

The solid waste from the extraction of hydrocolloids from red seaweeds is mainly composed of cellulose (BAGHEL *et al.*, 2015a; GONTIÑAS *et al.*, 2019), and it is a water-insoluble polysaccharide that is not hot-extracted like carrageenan. The benefit of using sulfuric acid in addition to the high temperature in hydrolysis is its high reaction rates and efficiency with which it breaks down seaweed polysaccharides (CASTRO *et al.*, 2017; MEINITA *et al.*, 2019a). Hydrolysate from Sw-CAR in the present study, containing 12.91 g/L ART, is in agreement with the ~14 g/L of monosaccharides (glucose and galactose) obtained by hydrolysis of kappa-carrageenan residue from *K. alvarezzi* (0.2 M H₂SO₄, 120 °C for 15 min) (MEINITA *et al.*, 2019a), and highest than 7.3 g/L in the hydrolysis of carrageenan filter cake (solid waste from carrageenan industry) (GONTIÑAS *et al.*, 2019). Castro *et al.* [30] obtained 18.1 g/L of total monosaccharide at the condition 0.5 M, 20 min with hydrolysis of full *S. filiformis* biomass.

In general, research on hydrolysis of whole biomass of seaweeds or residues from some process aims at the formation of monomeric sugars for alcoholic fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (BAGHEL *et al.*, 2015a; CASTRO *et al.*, 2017; GONTIÑAS *et al.*, 2019; MEINITA *et al.*, 2019b), promoting seaweed biomass as a raw material for obtaining second-generation biofuels based (bioethanol) (MASARIN *et al.*, 2016). However, following the idea of maximum use of the *S. filiformis* biomass united at high world demand for biotechnological products and the sustainability, this work proposed the use of the Sw-CAR-HYD as a component in the culture medium in the growth of *Bacillus subtilis* aiming the enzyme production.

B. subtilis is a bacterium widely used in industry bioprocesses due to its easy genetic manipulation, favorable large-scale cultivation characteristics, high protein secretion capacity, and generally recognized as safe (GRAS) status (ZHANG *et al.*, 2020). Among the enzymatic arsenal produced by this bacterium, proteases are the most commercially used enzyme group, corresponding to almost 20% of the world enzyme market, and are used in various areas such as food, detergents, textiles, pharmaceuticals, diagnostic, and waste treatment (CHATTERJEE *et al.*, 2015).

The submerged culture of *B. subtilis* in Sw-CAR-HYD is the first report in the literature on the use of solid waste from phycocolloids for protease production. This bioprocess generated a low amount of protein in the medium after 72 h, but higher than the control medium (using glucose as a carbon source). Studies with the same bacterial strain obtained a proteolytic extract with 807.28 (pH 7) and 750.9 U/ml (pH 10) in the solid-state culture of wheat bran (CHATTERJEE *et al.*, 2015) and 839.8 U/mg of specific activity in 24h dropping dramatically in 72h of cultivation in casein and cheese whey presence (DIAS *et al.*, 2008). Previously it has been reported that most microbial proteases are of low molecular weight ranging from 15-45 kDa (CHATTERJEE *et al.*, 2015) The relative masses of proteolytic extract of 21 and 36 kDa were found by Chatterjee *et al.* (CHATTERJEE *et al.*, 2015), 40 kDa by Dias *et al.* (DIAS *et al.*, 2008) and 21 kDa in the present study.

An important result showed this study was the alkaline treatment (CAT) associated with chemical clarification of the biomass as it showed a decay of the protein content with effect on the pigmentation of the Sw-RPE, without changing the amount of carbohydrates. In addition, the commonly used step of sun drying and subsequent rehydration for carrageenan extraction was not necessary, greatly shortening the time and generating a iota-carrageenan clarified powder.

Finally, a biorefinery scheme of *S. filiformis* seaweed was developed to obtain R-PE and iota-carrageenan, two biomolecules which are marine-derived ingredients for cosmeceuticals, nutraceuticals and functional foods, besides the bioprocess for production of protease from cellulose-rich solid waste of iota-carrageenan extraction. The *S. filiformis* biorefinery promoted the use of 91.2% of full seaweed biomass. The results found in this work contribute still to maximize the *Solieria filiformis* biomass cultivation.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados do presente trabalho, pode-se concluir que *Solieria filiformis* é um organismo com grande potencial para extração sequencial de moléculas como R-ficoeritrina, iota-carragenana, hidrólise do resíduo e utilização de açúcares para cultivo microbiano, com aplicação de técnicas de biorrefinaria e aproveitamento máximo da biomassa algal.

Perspectivas a partir desse trabalho visam uma análise mais detalhada de cada parte do processo, composição das biomassas, variação nas condições empregadas, aumento de escala para uma quantidade maior de biomassa, cinética bacteriana para a produção de enzimas e biomassa microbiana.

REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 12 set. 2013.
- ALBUQUERQUE, J. C. S. *et al.* Acid hydrolysis conditions for the production of fine chemicals from *Gracilaria birdiae* alga biomass. **Algal Research**, v. 53, p. 102139, 1 mar. 2021.
- ÁLVAREZ-VIÑAS, M. *et al.* Successful approaches for a red seaweed biorefinery. **Marine Drugs**, v. 17, n. 11, 30 out. 2019.
- ARAKI, C. Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 29, p. 543–544, 1956.
- ARMISEN, R.; GALATAS, F. Production, properties and uses of agar. Em: MCHUGH, D. J. (Ed.). **Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds, FAO Fisheries Technical Paper**. 281. ed. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1987. p. 1–57.
- BAGHEL, R. S. *et al.* Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. **Green Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2436–2443, 1 abr. 2015a.
- BAGHEL, R. S. *et al.* Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. **Green Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2436–2443, 7 abr. 2015b.
- BAGHEL, R. S. *et al.* Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. **Green Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2436–2443, 7 abr. 2015c.
- BAGHEL, R. S. *et al.* Seaweed biorefinery: A sustainable process for valorising the biomass of brown seaweed. **Journal of Cleaner Production**, v. 263, p. 121359, 1 ago. 2020.
- BALINA, K.; ROMAGNOLI, F.; BLUMBERGA, D. Seaweed biorefinery concept for sustainable use of marine resources. **Energy Procedia**, v. 128, p. 504–511, 1 set. 2017.
- BASTOS FILHO, A. J. U. **Purificacao e caracterizacao do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga marinha Solieria filiformis (Kutzing) P.W. Gabrielson**. 2016. Dissertação (Mestre em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- BASTOS FILHO, A. J. U. **Determinação do efeito antioxidante e da estabilidade espectroscópica da R-Ficoeritrina isolada da macroalga marinha Solieria filiformis (Kützing) P. W. Gabrielson e sua aplicação como corante natural vermelho em iogurte**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- BERTASA, M. *et al.* Cleaning materials: A compositional multi-analytical characterization of commercial agar powders. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 125, p. 310–317, 2017.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **ELECTROPHORESIS**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1 jan. 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUSCHMANN, A. H. *et al.* Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. **European Journal of Phycology**, v. 52, n. 4, p. 391–406, 2 out. 2017.

CAAMAL-FUENTES, E.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Physicochemical Characterization and Biological activities of Sulfated Polysaccharides from Cultivated *Solieria filiformis* Rhodophyta. *[s.d.]*.

CAMPBELL, R.; HOTCHKISS, S. Carrageenan Industry Market Overview. **Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities**, p. 193–205, 2017.

CASTRO, G. M. C. *et al.* Optimized acid hydrolysis of the polysaccharides from the seaweed *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson for bioethanol production. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 39, n. 4, p. 423–430, 1 out. 2017.

CHANDRA, R. *et al.* **Algal biorefinery: A sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery**. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2019. . Acesso em: 30 abr. 2021

CHATTERJEE, J. *et al.* Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 709–718, 1 set. 2015.

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

COTAS, J. *et al.* A Comprehensive Review of the Nutraceutical and Therapeutic Applications of Red Seaweeds (Rhodophyta). **Life** **2020, Vol. 10, Page 19**, v. 10, n. 3, p. 19, 26 fev. 2020.

DE ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Iota-carrageenans from *Solieria filiformis* (Rhodophyta) and their effects in the inflammation and coagulation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 2, p. 127–135, 9 nov. 2011.

DEEPIKA, C.; RAVISHANKAR, G. A.; RAO, A. R. Potential Products from Macroalgae: An Overview. **Sustainable Global Resources Of Seaweeds Volume 1**, p. 17–44, 2022.

DIAS, D. R. *et al.* Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2027–2034, 3 out. 2008.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106, 1962.

DONG, M. *et al.* Preparation of carrageenan fibers with extraction of Chondrus via wet spinning process. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 217–224, 15 ago. 2018.

FAO. The Global Status of Seaweed Production, Trade and Utilization. **Globefish Research Programme**, v. 124, p. 2–6, 2018.

FAO. World Fisheries and Aquaculture 2020. p. 244 p., 2020.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 375–392, 1 nov. 2014.

GABRIELSON, P. W. AGARDHIELLA VERSUS NEOAGARDHIELLA (SOLIERIACEAE, RHODOPHYTA): ANOTHER LOOK AT THE LECTOTYPIFICATION OF GIGARTINA TENERA . **TAXON**, v. 34, n. 2, p. 275–280, maio 1985.

GAJARIA, T. K. *et al.* Integration of protein extraction with a stream of byproducts from marine macroalgae: A model forms the basis for marine bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 867–873, 1 nov. 2017.

GAO, K.; MCKINLEY, K. R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 45–60, 1994.

GARCÍA, A. B. *et al.* Using a B-Phycocerythrin Extract as a Natural Colorant: Application in Milk-Based Products. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **297**, v. 26, n. 2, p. 297, 8 jan. 2021.

GOLBERG, A. *et al.* **Macroalgal Biorefineries for the Blue Economy**. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2020.

GOÑI, O.; QUILLE, P.; O'CONNELL, S. Seaweed Carbohydrates. **The Chemical Biology of Plant Biostimulants**, p. 57–95, 2 mar. 2020.

GONTIÑAS, J. G. L. *et al.* Acid hydrolysis as a method to valorize cellulosic filter cake from industrial carrageenan processing. **Detritus**, v. 6, n. June, p. 47–58, 1 jun. 2019.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. Disponível em: <https://www.algaebase.org/>. Acesso em: 12 abr. 2022.

HSIEH-LO, M. *et al.* Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. **Algal Research**, v. 42, p. 101600, 1 set. 2019.

HURTADO, A. Q.; NEISH, I. C.; CRITCHLEY, A. T. Phyconomy: the extensive cultivation of seaweeds, their sustainability and economic value, with particular reference to important lessons to be learned and transferred from the practice of eucheumatoid farming. **Phycologia**, v. 58, n. 5, p. 472–483, 3 set. 2019.

JOHN, R. P. *et al.* Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.

KIM, M. H. *et al.* Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 98, p. 187–194, 1 out. 2019.

KITADE, Y. *et al.* Structural characteristics of phycobiliproteins from red alga *Mazzaella japonica*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 1, 1 fev. 2018.

KUMAR, S. *et al.* Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 150–156, 1 maio 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEE, K. H.; NOH, J.; KHIM, J. S. **The Blue Economy and the United Nations' sustainable development goals: Challenges and opportunities**. **Environment International** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2020. . Acesso em: 25 maio. 2021

LEE, W. K. *et al.* Factors affecting yield and gelling properties of agar. **Journal of Applied Phycology** **2016 29:3**, v. 29, n. 3, p. 1527–1540, 28 nov. 2016.

LEONG, H. Y. *et al.* **Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues**. **Biotechnology for Biofuels** BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01939-5>. Acesso em: 25 maio. 2021

LI, W. *et al.* Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 340–353, 1 mar. 2019.

LIMA, T. D. B. **Cultivo da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson: textura de géis aquosos e lácteos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MASARIN, F. *et al.* Chemical analysis and biorefinery of red algae *Kappaphycus alvarezii* for efficient production of glucose from residue of carrageenan extraction process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 122, 10 jun. 2016.

MEINITA, M. D. N. *et al.* Sequential acid and enzymatic hydrolysis of carrageenan solid waste for bioethanol production: a biorefinery approach. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2507–2515, 1 ago. 2019a.

MEINITA, M. D. N. *et al.* Sequential acid and enzymatic hydrolysis of carrageenan solid waste for bioethanol production: a biorefinery approach. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2507–2515, 1 ago. 2019b.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 2002.

MISHRA, S.; ROY, M.; MOHANTY, K. Microalgal bioenergy production under zero-waste biorefinery approach: Recent advances and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 122008, 1 nov. 2019.

MITTAL, R.; SHARMA, R.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction of R-Phycoerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 277–286, 1 maio 2019.

MOHAN, S. V. *et al.* **Algal biorefinery models with self-sustainable closed loop approach: Trends and prospective for blue-bioeconomy.** **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, 1 jan. 2020. Acesso em: 30 abr. 2021

MOKHTARI, H. *et al.* Recent Advances in Chemically-Modified and Hybrid Carrageenan-Based Platforms for Drug Delivery, Wound Healing, and Tissue Engineering. **Polymers** **2021, Vol. 13, Page 1744**, v. 13, n. 11, p. 1744, 26 maio 2021.

MURANO, E. *et al.* Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiellia subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Marine Chemistry**, v. 58, n. 3–4, p. 319–325, 1 nov. 1997.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, [s.d.].

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 1 fev. 2011.

OSÓRIO, C. *et al.* Pigments Content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of Different Commercial Dried Algae. **Separations** **2020, Vol. 7, Page 33**, v. 7, n. 2, p. 33, 11 jun. 2020.

OWUSU, P. A.; ASUMADU-SARKODIE, S. **A review of renewable energy sources, sustainability issues and climate change mitigation.** **Cogent Engineering** Cogent OA, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23311916.2016.1167990>. Acesso em: 25 maio. 2021

PACHECO-QUITO, E. M.; RUIZ-CARO, R.; VEIGA, M. D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. **Marine Drugs** **2020, Vol. 18, Page 583**, v. 18, n. 11, p. 583, 23 nov. 2020.

PEÑUELA, A. *et al.* Environmentally friendly valorization of *Solieria filiformis* (Gigartinales, rhodophyta) from IMTA using a biorefinery concept. **Marine Drugs**, v. 16, n. 12, p. 487, 6 dez. 2018.

RAJAK, R. C.; JACOB, S.; KIM, B. S. A holistic zero waste biorefinery approach for macroalgal biomass utilization: A review. **Science of the Total Environment**, v. 716, p. 137067, 10 maio 2020.

SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D. An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phyocyanin contents from crude aqueous extracts of Porphyra (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 2, p. 123–129, 2007.

SECADES, P.; GUIJARRO, J. A. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3969–3975, 1999.

SENTHILKUMAR, N. *et al.* Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 150–160, abr. 2013.

SUBHADRA, B.; EDWARDS, M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. **Energy Policy**, v. 38, n. 9, p. 4897–4902, 2010.

SUMAYYA, S. S.; SREELEKSHMI, S. G.; MURUGAN, K. Cultivation and economical perspectives of Gracilaria: Marine. **Kongunadu Research Journal**, v. 4, n. 2, p. 73–79, 30 dez. 2017.

TANO, S. **Seaweed in the tropical seascape importance, problems and potential**. [s.l.] Stockholm University, 2016.

TORRES, P. *et al.* A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta). **Algal Research**, v. 37, p. 288–306, 1 jan. 2019.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. **Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review**. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, 1 mar. 2020. Acesso em: 25 maio. 2021

VICENTE, F. A. *et al.* R-phycoerythrin extraction and purification from fresh Gracilaria sp. using thermo-responsive systems. **Green Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 3816–3826, 15 jul. 2019.

WANG, L. *et al.* Comparative research on the structures and physical-chemical properties of agars from several agarophyta. **Oceanologia et Limnologia Sinica**, v. 32, n. 6, p. 658–664, 2001.

WARGACKI, A. J. *et al.* An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. **Science**, v. 335, n. 6066, p. 308–313, 2012.

WHITE, W. L.; WILSON, P. World seaweed utilization. **Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications**, p. 7–25, 1 jan. 2015.

YEGAPPAN, R. *et al.* Injectable angiogenic and osteogenic carrageenan nanocomposite hydrogel for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 320–328, 1 fev. 2019.

YOON, H. S. *et al.* Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 2, p. 482–492, 1 abr. 2006.

ZHANG, X. *et al.* Applications of bacillus subtilis spores in biotechnology and advanced materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 17, 1 set. 2020.

ZHAO, P. *et al.* Agar extraction and purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria tenuistipitata*, and subsequent wastewater treatment by *Ulva prolifera*. **Algal Research**, v. 47, p. 101862, 1 maio 2020.