



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

FRANCISCO LUCAS DE SOUZA LOPES

R-FICOERITRINA DA MACROALGA *Solieria filiformis*: FLUORESCÊNCIA IN VIVO E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

FORTALEZA

2022

FRANCISCO LUCAS DE SOUZA LOPES

R-FICOERITRINA DA MACROALGA *Solieria filiformis*: FLUORESCÊNCIA IN VIVO E
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

FORTALEZA

2022

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

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

- S238r Souza Lopes, Francisco Lucas de.
R-Ficoeritrina da macroalga *Solieria filiformis* : fluorescência in vivo e otimização da extração /
Francisco Lucas de Souza Lopes. – 2023.
75 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. Ficobiliproteína. 2. R-FE. 3. Microscopia confocal a laser. 4. Extração enzimática. I. Título.
CDD 572
-

FRANCISCO LUCAS DE SOUZA LOPES

R-FICOERITRINA DA MACROALGA *Solieria filiformis*: FLUORESCÊNCIA IN VIVO E
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Glauber Cruz Lima
Centro Universitário INTA (UNINTA)

Ao meu grande amigo e colega de bancada,

Acrísio Bastos, *in memoriam*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Laura Lopes e Weber Lopes, por todo o apoio e suporte para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu irmão, Ramon Lopes, pelo companheirismo e atenção.

À minha orientadora, Professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas, por todo o auxílio, atenção e confiança para a execução dessa dissertação.

À Professora Dra. Márjory Lima Holanda Araújo, por todo o suporte técnico para a execução dessa dissertação, além da paciência e disposição.

Ao meu amigo Acrísio Bastos, *in memoriam*, a quem sou inteiramente grato por todo aprendizado nesses anos de laboratório e por nossa amizade, e quem jamais sairá de minhas lembranças.

Aos membros da banca examinadora, os professores Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas, Dra. Márjory Lima Holanda Araújo e Dr. Glauber Cruz Lima, pela disponibilidade e pelas sugestões para o enriquecimento desse trabalho.

Às estudantes de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos, Vanessa Rodrigues e Mariana de Freitas que voluntariamente ajudaram na realização de várias etapas desse trabalho.

Ao meu amigo Éwerton Lima, pela parceria durante a execução de nossos projetos de pesquisa ao longo desses anos.

À Professora Dra. Norma Maria Barros Benevides que permitiu o uso de equipamentos de seu laboratório, contribuindo para a realização deste trabalho.

À Ma. Antônia Carlota de Souza Lima, por toda a ajuda com as análises estatísticas desse trabalho e por ter se mostrando gentilmente disponível.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e todo o seu corpo docente pela minha formação como Mestre em Bioquímica.

À Central Analítica da UFC pelas análises microscópicas realizadas para esse trabalho.

Aos meus amigos que sempre dão apoio e suporte necessários para continuar a caminhada: Joaquim Júnior, Vanessa Rodrigues, Amanda Moura, Milena Maciel, Rhaynan Andrade, Larissa Belizário, Matheus Alexandre, Lennon Camilo, Mateus Monteiro, Bruna de Araújo, Cristiane Maria, Carol Vieira, Carol Dantas, Ingrid Queiroz, Ticiano Lima, Renata Line, Neto Silva, Mariana Vieira, Matheus Finger, Florian Baumgartinger.

À Associação de Pós-Graduandos e Pós-Graduandas da UFC (APG-UFC) e aos colegas de gestão, em especial Gabrielle Feitosa e Henrique Freitas, pelo aprendizado, companheirismo e pela justa luta que travamos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Assim fica registrado o agradecimento a este importante órgão de fomento.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular, a quem sou muito grato.

RESUMO

A R-ficoeritrina (R-PE) é um pigmento fotossintético (ficobiliproteína) presente nas macroalgas vermelhas, que possui amplas aplicações industriais. A presença de polissacáridos na parede celular das macroalgas dificulta a extração do pigmento. Assim, ferramentas biotecnológicas podem ser utilizadas para otimizar este processo. Desse modo, a localização da R-PE no talo, a extração e o efeito da celulase na extração de R-PE de macroalga *Solieria filiformis*, uma espécie cultivada no litoral do Ceará, Brasil, foram avaliados. A microscopia confocal a laser foi utilizada para identificar as células pigmentadas no talo e os efeitos da concentração, temperatura e tempo da celulase sobre o rendimento e índice de pureza do pigmento extraído foram avaliados. Apenas as células corticais do talo apresentaram a fluorescência da R-PE. Foi observado que o congelamento como método de conservação causou modificações morfológicas do talo, contudo, a pigmentação foi preservada. O maior rendimento de extração de R-PE observado ($0,1921 \pm 0,0086$ mg g⁻¹ de macroalga húmida) ocorreu na presença da celulase de *Aspergillus niger* a 200 U g⁻¹ de macroalga úmida. A concentração de enzima, temperatura e tempo influenciaram positivamente o rendimento da extração de R-PE, mas influenciaram negativamente o índice de pureza do pigmento. A melhor condição para extrair o R-PE foi 160 U g⁻¹ de macroalga úmida, sob a temperatura de 35 °C por 6 h, atingindo 0,21 mg g⁻¹ de macroalga úmida, com um índice de pureza de 0,04.

Palavras-chave: Ficobiliproteína; R-PE; microscopia confocal a laser; extração enzimática.

ABSTRACT

R-phycoerythrin (R-PE) is a photosynthetic pigment (phycobiliprotein) present in red macroalgae, which has wide industrial applications. The presence of polysaccharides in the cell wall of macroalgae hampers pigment extraction. Thus, biotechnological tools can be used to optimize this process. Therefore, the R-PE localization in the thallus, the extraction and the effect of the cellulase on the R-PE extraction from *Solieria filiformis* macroalga, a species cultivated on the coast of Ceará, Brazil, were evaluated. Laser confocal microscopy was used to identify the pigmented cells in the thallus. It was observed that freezing as a preservation method caused morphological modifications of the thallus, however, the pigmentation was preserved. The effect of the cellulase concentration, temperature and time were evaluated on the yield and purity index of the pigment extracted. Only thallus cortical cells presented R-PE fluorescence and the highest R-PE yield extraction observed ($0.1921 \pm 0.0086 \text{ mg g}^{-1}$ wet macroalga) was in the presence of the cellulase from *Aspergillus niger* at 200 U g^{-1} wet macroalga. The concentration enzyme, temperature and time positively influenced the R-PE extraction yield, but negatively influenced the pigment purity index. The best condition to extract the R-PE was 160 U g^{-1} wet macroalga, temperature $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ by 6 h, reaching 0.21 mg g^{-1} wet macroalga, with a purity index of 0.04.

Keywords: Phycobiliproteins; R-PE; laser confocal microscopy; enzymatic extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Aspecto da coloração dos pigmentos azul e vermelho purificados da macroalga marinha <i>Hypnea musciformis</i>	17
Figura 2	- Espectro de Absorção dos Pigmentos Fotossintetizantes Ficoeritrina, Ficociana e Clorofila <i>a</i> presentes em Macroalgas Vermelhas	20
Figura 3	- Radiação Eletromagnética	20
Figura 4	- Representação da Membrana do Tilacóide e dos Ficobilissomos	22
Figura 5	- Representação da Estrutura do Ficobilissomo	22
Figura 6	- Formação dos Discos Hexaméricos das Ficobiliproteínas	23
Figura 7	- Estruturas Químicas das Ficobilinas	24
Figura 8	- Estruturas das Ficoeritrinas	26
Figura 9	- Estrutura Tridimensional das Subunidades α e β , do Trímero e do Hexámero da R-Ficoeritrina da Macroalga Vermelha <i>Gracilaria chilensis</i>	27
Figura 10	- Coloração e Fluorescência da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i>	29
Figura 11	- Micrografias do encapsulamento de R-PE	30
Figura 12	- Esquema da estrutura da parede celular das macroalgas vermelhas	33
Figura 13	- Aspecto visual do resíduo de extração de R-FE de <i>Solieria filiformis</i> por homogeneização	37
Figura 14	- Ligação glicosídica, ligações de hidrogênio e estrutura das fibrilas de celulose	37
Figura 15	- Efeito sinérgico das enzimas celulases para a hidrólise de celulose	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pigmentos, Componentes da Parede Celular e Função Ecológica de Macroalgas Verdes, Marrons e Vermelhas.....	15
Tabela 2 – Aplicações das macroalgas marinhas e de seu bioprodutos	16
Tabela 3 – Valor comercial de ficobiliproteínas	18
Tabela 4 – Histórico do Rendimento e Recuperação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	29
Tabela 5 – Patentes encontradas para R-ficoeritrina em três banco de dados	31
Tabela 6 – Métodos de extração e rendimentos de R-ficoeritrina de macroalgas vermelhas	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Algas Marinhas	13
1.2	Importância econômica macroalgas marinhas	14
1.3	Ficobiliproteínas	19
1.3.1	<i>Ficoeritrinas</i>	25
1.4	A macroalga marinha <i>Solieria filiformis</i> e sua importância	27
1.4.1	<i>R-ficoeritrina obtida da macroalga <i>Solieria filiformis</i></i>	28
1.5	Métodos de extração de R-ficoeritrina	31
2	PERMISSÃO LEGAL	40
3	ARTIGO REFERENTE À DISSERTAÇÃO	41
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas Marinhas

O termo “alga” é desprovido de valor taxonômico, uma vez que designa organismos distintos entre si, quanto a sua organização, origem, morfologia e composição, e que possuem representantes em dois dos três domínios da vida, Eubacteria e Eukarya, estando as mais de 10.000 espécies distribuídas nos reinos Bacteria, Plantae, Chromista e Protozoa (GUIRY, 2012, 2014; LOURENÇO, 2006; REVIERS, 2002; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

As algas são definidas, de modo geral, como organismos fotossintéticos, unicelulares ou pluricelulares, que possuem funções biológicas e ecológicas semelhantes às plantas, mas diferem dessas na sua bioquímica e por não possuírem estruturas especializadas como raízes, folhas, flores e tecidos sofisticados para transporte de água, açúcares e nutrientes (KAISER *et al.*, 2011; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Como um grupo, as algas são organismos ubíquos, usualmente presentes em sistemas aquáticos de água doce ou salgada, enquanto que individualmente as diferentes espécies ocupam habitats específicos. As algas podem estar fixadas ao substrato, como as plantas, ou podem ser móveis como animais, algumas espécies estão simplesmente suspensas na água, e outras mais estão simbioticamente associadas a outros organismos, como aos fungos, formando os líquens. Fatores físicos (substrato, temperatura, qualidade e quantidade de luz, atividade dinâmica das marés, ventos e tempestades), químicos (salinidade, pH, nutrientes, gases e nível de poluição) e biológicos (herbívoros, micróbios, epífitas, endófitos, simbioses, parasitas e doenças) determinam a sua distribuição (BAWEJA *et al.*, 2016). Assim, podem ser encontradas em ambientes de extremas temperaturas, como as que vivem em neve, desertos e fontes termais (ANDERSEN, 2013; EL GAMAL, 2010; EVERT; EICHHORN, 2013; GUIRY, 2014; LEE, 2008; LOURENÇO, 2006).

As algas demonstram grande importância ecológica, não somente pela produção de oxigênio para os outros organismos aquáticos, mas também atuam como produtores primários na cadeia alimentar, produzindo matéria orgânica a partir de luz solar, dióxido de carbono e água, e contribuindo para o balanço global da fotossíntese, além de serem capazes de remover poluentes de efluentes agrícolas e de esgoto (BOLD; WYNNE, 1985; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; LEE, 2008; LOURENÇO, 2006; SAMARAKOON; JEON, 2012; TAYLOR;

TAYLOR; KRINGS, 2009). Além disso, podem ser utilizadas como abrigo e área reprodutiva para peixes, invertebrados, aves e mamíferos (BAWEJA *et al.*, 2016).

A classificação desses organismos é complexa, fazendo-se uma divisão didática em microalgas e macroalgas, baseada na variedade de tamanho dos organismos, que podem medir desde 0,2-2 μm de diâmetro, os fitoplanctons, até 30-80 m, os gigantes *kelps*, os quais dão origem a grandes florestas de algas do tipo *Laminaria* (BARSANTI; GUALTIERI, 2014; EVERT; EICHHORN, 2013; MAKKAR *et al.*, 2016)

As macroalgas podem ser classificadas, ainda, de acordo com a sua pigmentação, componentes da parede celular e função ecológica, resumidamente apresentados na Tabela 1. Nesse sentido, por apresentarem origem polifilética, são atualmente distribuídas em dois reinos: as macroalgas verdes e vermelhas pertencem ao reino Plantae, enquanto que as macroalgas marrons pertencem ao Reino Chromista (LIN; QIN, 2014; MAKKAR *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Pigmentos, Componentes da Parede Celular e Função Ecológicas de Macroalgas Marinhas Verdes, Marrons e Vermelhas

Grupo	Pigmentos fotossintéticos	Principais componentes da parede celular	Função ecológica	Principais gêneros
Chlorophyta (Algas verdes)	Clorofila <i>a, b</i> , carotenoides	Celulose, carbonato de cálcio em algas calcárias	Produtores primários; as algas calcárias são fontes importantes de calcário nos recifes de corais	<i>Ulva, Codium, Enteromorpha, Chaetomorpha e Cladophora</i>
Ochrophyta (Algas marrons)	Clorofila <i>a, c</i> , xantofilas	Celulose, alginatos	Produtores primários; são os principais componentes das florestas de <i>kelps</i>	<i>Ascophyllum, Laminaria, Saccharina, Macrocystis, Nereocystis e Sargassum</i>
Rhodophyta (Algas vermelhas)	Clorofila <i>a</i> , ficobilinas (ficocianina, ficoeritrina), carotenoides	Ágar, carragenana, carbonato de cálcio em algas coralinas	Produtores primários; as algas coralinas são fontes importantes de calcário nos recifes de corais	<i>Pyropia, Porphyra, Chondrus, Palmaria e Gracilaria</i>

Fonte: Modificado de Castro & Huber (2012).

1.2 Importância econômica macroalgas marinhas

A diversidade de espécies de macroalgas e sua composição bioquímica representam extensa fonte de compostos bioativos para aplicações na indústria agroalimentar, cosmética, farmacológica e no campo da alimentação e química funcionais (HOLDT; KRAAN, 2011; IOANNOU; ROUSSIS, 2009; MAYER *et al.*, 2008).

As macroalgas são fontes de matéria mineral (11–55% de peso seco, na forma de cinzas), polissacarídeos (15–76% de peso seco), proteínas (1–50% de peso seco), lipídios (0,3–5% de peso seco), fito-hormônios e pigmentos, bem como uma ampla variedade de metabólitos secundários (compostos fenólicos, terpenóides e compostos halogenados, derivados de enxofre e derivados de nitrogênio), dentre outros (BEDOUX *et al.*, 2014; KADAM *et al.*, 2015).

Diante disso, o cultivo de macroalgas marinhas tem crescido nas últimas décadas, atingindo 32,4 milhões de toneladas em 2018, o que representa 13,3 bilhões de dólares, com significativa representação de macroalgas vermelhas (FAO, 2020). Nos últimos anos, o Brasil importou o equivalente a 79,45 milhões de dólares (20,3 mil toneladas), atingindo, em 2017, 14,64 milhões de dólares (1,7 mil toneladas). Por outro lado, na mesma década, o país exportou 2 mil toneladas a um valor total de 2,4 milhões de dólares, sendo verificado em 2015 o seu maior valor de exportação, 413.631 dólares referente a 142.604 Kg de biomassa algácea (DANTAS, 2018). A Tabela 2, a seguir, apresenta as aplicações potenciais de algumas espécies de macroalgas e seus bioprodutos.

Tabela 2 – Aplicações das macroalgas marinhas e de seu bioprodutos

Aplicação	Gênero ou Espécie	Referência
Alimentação humana	Porphyra <i>Undaria pinnatifida</i> <i>Saccharina japônica</i> Ulva	(EVERT; EICHHORN, 2013)
Biofertilização	<i>Enteromorpha intentalis</i> <i>Gracilaria birdiae</i>	(MATHUR <i>et al.</i> , 2015; OLIVEIRA, 2017)
Biorremediação	Ulva Gracilaria	(TROELL <i>et al.</i> , 2009)
Produção de carregenana	<i>Kappaphycus alvarezii</i> <i>Solieria filiformis</i> <i>Euचेuma isiforme</i> , <i>Halymenia floresii</i>	(ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 2011)

Formulação cosmética	<i>Ulva lactuca</i>	(GRILLO <i>et al.</i> , 2021)
Produtos farmacêuticos	<i>Laminaria digitata</i> <i>Macrocystis pyrifera</i>	(PURCELL-MEYERINK <i>et al.</i> , 2021)
Etanol	<i>Saccharina japonica</i>	(JANG <i>et al.</i> , 2012)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Merecem destaque os ficocolóides (alginatos, ágar e carragenanas), polissacarídeos localizados na parede celular de macroalgas vermelhas e marrons, que, quando isolados, podem formar géis e estabilizar emulsões em soluções aquosas. Devido a essa propriedade, os ficocolóides são de grande interesse, principalmente para a indústria alimentícia, mas também para as indústrias farmacêutica, biotecnológica, cosmética, têxtil e de papel (HOLANDA, 2016).

Há também grande atenção sobre os pigmentos das macroalgas, principalmente das vermelhas, como as ficocianinas e as ficoeritrinas. Tais pigmentos são denominados ficobiliproteínas, os quais possuem alta fluorescência e podem apresentar coloração azul e vermelha (Figura 1), tornando-se moléculas de potencial aplicação biotecnológica, sobretudo porque há uma busca de corantes naturais na indústria (GLAZER, 1984; REIS *et al.*, 1998; SCHIOZER; BARATA, 2007). Tais se destacam em relação aos corantes sintéticos principalmente porque são compostos atóxicos e não carcinogênicos (HEMLATA; FATMA, 2009). A ficoeritrina extraída de macroalgas Rhodophytas (R-Ficoeritrina), por exemplo, é usada como corante natural vermelho e representa uma alternativa para a redução do uso de pigmentos sintéticos na formulação de cremes e produtos de maquiagem (BEDOUX *et al.*, 2014). No que se refere a aplicação na indústria farmacêutica, diversas atividades biológicas das ficobiliproteínas já foram relatadas na literatura, tais como antioxidante (PALIWAL *et al.*, 2015; SONANI *et al.*, 2017), imunomodulatória (CHEN *et al.*, 2014), anticâncer (PAN *et al.*, 2013), anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2017), demonstrando o seu amplo campo de utilização.

Apesar da ampla aplicação dessas proteínas e do grande volume de produção de macroalgas no mundo, sobretudo as vermelhas para produção de ágar e carragenana, verifica-se que as ficobiliproteínas desses organismos ainda são subaproveitadas. O baixo rendimento dos processos de extração dessas biomoléculas pode ser um fator relevante. O fato é que elas apresentam alto valor comercial atualmente, como pode ser observado na Tabela 3, sendo que o mercado das ficobiliproteínas foi estimado em 112,3 milhões de dólares em 2018, com projeção de dobrar esse valor em 2028 (TAN *et al.*, 2021). Além disso, o mercado de corantes destinados a alimentos projetou 3,75 bilhões de dólares para 2022, com grande tendência e

participação dos pigmentos naturais (ARYEE; AGYEI; AKANBI, 2018). Vale ressaltar que o valor comercial de ficobiliproteínas está correlacionado ainda com o grau de pureza e aplicação desses pigmentos.

Figura 1 – Aspecto da coloração dos pigmentos azul e vermelho purificados da macroalga marinha *Hypnea musciformis*



Fonte: Costa (2016).

Portanto, para o aproveitamento máximo da biomassa macroalgácea o conceito de biorrefinaria pode ser aplicado, sendo identificado como o caminho mais promissor para indústria baseada na biomassa, por adotar uma abordagem de produção em cascata que visa a recuperação de vários compostos de algas, valorizando a biomassa completa e melhorando a economia da cadeia de valores (BASTIAENS *et al.*, 2017; TRIVEDI *et al.*, 2015).

Tabela 3 - Valor comercial de ficobiliproteínas

Molécula	Prefixo	Marca	Valor (em US\$.mg ⁻¹)	Referência
Ficoeritrina (FE)	B	Columbia Biosciences	21,60	(BIOSCIENCES, 2022a)
	R	Columbia Biosciences	10,80	(BIOSCIENCES, 2022b)
	R	Sigma-Aldrich	197,00	(ALDRICH, 2022a)
	R	Santa Cruz Biotechnology	52,00	(SANTA-CRUZ-BIOTECHNOLOGY, 2022)
	R	ThermoFisher	347,82 ^a	(THERMOFISHER, 2022)
Ficocianina (FC)	R	Columbia Biosciences	21,60	(BIOSCIENCES, 2022c)
	C	Sigma-Aldrich	203,00	(ALDRICH, 2022b)
Aloficocianina (AFC)	-	Columbia Biosciences	23,00	(BIOSCIENCES, 2022d)
	-	Sigma-Aldrich	474,00 ^a	(ALDRICH, 2022c)

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: a – produto vendido em volume de 0,5 mL.

Biorrefinar, segundo Agência Internacional de Energia (AIE) (do inglês, International Energy Agency – IEA), é “o processamento sustentável de utilização de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis (alimentos, rações, materiais e produtos químicos) e energia (combustíveis, energia, calor)” (SONNENBERG; BAARS; HENDRICKX, 2007). A biorrefinaria, portanto, surge como um modo de diminuir os impactos negativos sobre o meio ambiente, criando-se produtos de maior valor agregado para se obter benefícios econômicos e ambientais. Essa abordagem é dita sustentável porque reduz os desperdícios dos processos, diminuindo a pressão sobre os ecossistemas. Assim, biorrefinarias de macroalgas possuem um importante papel para a inserção da bioeconomia (BALINA; ROMAGNOLI; BLUMBERGA, 2017a; KOSTAS *et al.*, 2021).

Na literatura é possível verificar esquemas de biorrefinaria descritos para macroalgas vermelhas. Por exemplo, Baghel *et al.* (2015) utilizaram as macroalgas *Gelidiella acerosa* e *Gracilaria dura* para extração de ficobiliproteínas, fertilizante líquido, lipídio, ágar e celulose, que após hidrólise enzimática seguida de fermentação, é produzido bioetanol. Trivedi *et al.* (2016) utilizaram *Ulva fasciata* para a obtenção de extrato líquido rico em minerais, lipídios, ulvan e celulose, que também após hidrólise enzimática foi utilizada para a produção de bioetanol. Peñuela *et al.* (2018) implantaram um sistema multitrófico para a valorização da biomassa de *Solieria filiformis*, obtendo um extrato rico em proteínas e polissacarídeos sulfatados, ácidos graxos poli-insaturados e ι-carragenana pura.

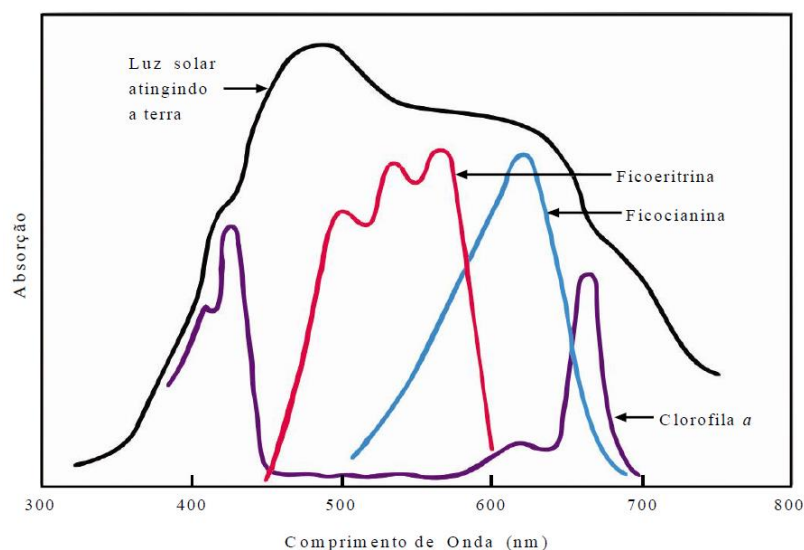
Nessa perspectiva e visando mostrar a importância ambiental e econômica da biomassa algácea e dos seus derivados é que o nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo métodos de cultivo, prospectando, estabelecendo e otimizando processos de extração de moléculas bioativas e desenvolvendo bioprocessos para obtenção de químicos e biocombustíveis utilizando macroalgas presentes na flora marinha cearense. Lima (2012) estabeleceu o cultivo de *Solieria filiformis* por esporulação natural no mar, enquanto que Alves (2016) estabeleceu o cultivo de *Gracilaria birdiae* também no mar. Por sua vez, Holanda (2016) e Maia (2016) desenvolveram cultivos de *G. birdiae* e *Gracilaria cornea*, respectivamente, sob condições de laboratório.

1.3 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são pigmentos proteicos hidrossolúveis envolvidos na absorção de luz, presentes em cianobactérias, glaucófitas e rodófitas (GLAZER, 1984; CHEN *et al.*, 2017; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008). A sua cor e as suas características espectrais são decorrentes da presença de grupos prostéticos lineares tetrapirrólicos (chamadas bilinas ou ficobilinas) que estão ligados covalentemente, via ligações tioéter, aos resíduos de cisteína da porção proteica (JIANG; ZHANG; LIANG, 1999; MANIRAFASHA *et al.*, 2016). A ficobilina é o pigmento fotossintético de fato, mas ele não apresenta função biológica se não estiver associado a uma proteína (LOURENÇO, 2006).

Essas proteínas, de acordo com a sua coloração, podem ser divididas em dois tipos: a ficoeritrina, de cor vermelha, e a ficocianina, de cor azul (O’CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980). Elas também podem ser classificadas em quatro classes distintas, de acordo com os seus comprimentos de onda máximos (λ_{max}) na região do espectro de absorção da luz visível (Figura 2): ficoeritrina (FE) ($\lambda_{\text{max}} = 495\text{-}570\text{ nm}$), ficoeritrocianina (FEC) ($\lambda_{\text{max}} = 575\text{ nm}$), ficocianina (FC) ($\lambda_{\text{max}} = 610\text{-}620\text{ nm}$) e aloficocianina (AFC) ($\lambda_{\text{max}} = 650\text{-}655\text{ nm}$) (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; BRYANT; GLAZER; EISERLING, 1976; GLAZER, 1984b).

Figura 2 – Espectro de Absorção dos Pigmentos Fotossintetizantes Ficoeritrina, Ficociana e Clorofila *a* presentes em Macroalgas Vermelhas

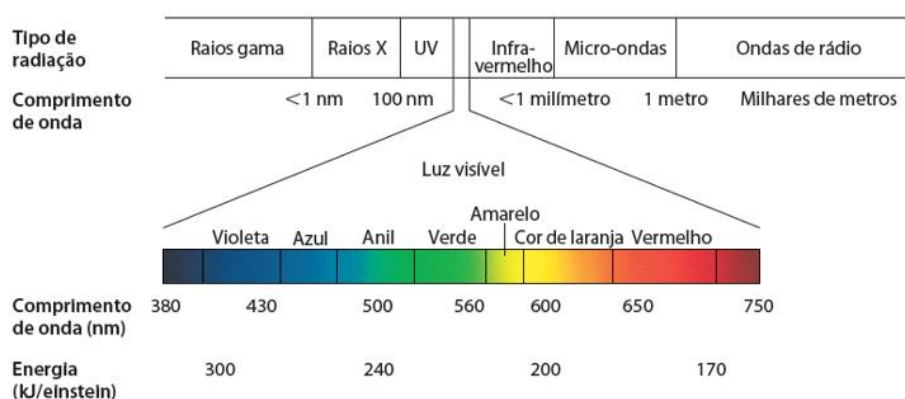


Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

As ficobiliproteínas fazem parte de uma eficiente cadeia de transferência de radiação eletromagnética do espectro da luz visível (Figura 3), sendo capazes de canalizá-la

para o centro de reação do fotossistema II, onde está presente a clorofila *a* (GLAZER, 1989; NELSON; COX, 2014a; SFRISO; GALLO; BALDI, 2018). O espectro de luz visível compreende a luz com comprimentos de onda na faixa de 400 a 700 nm, variando do violeta ao vermelho, e é chamado de radiação fotossintética ativa. Os organismos fotossintetizantes ajustam sua estrutura de captação de luz para absorver os vários comprimentos de onda de luz desse espectro, que varia com a profundidade da água (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; KAISER *et al.*, 2011).

Figura 3 – Radiação Eletromagnética



Fonte: Nelson e Cox (2014).

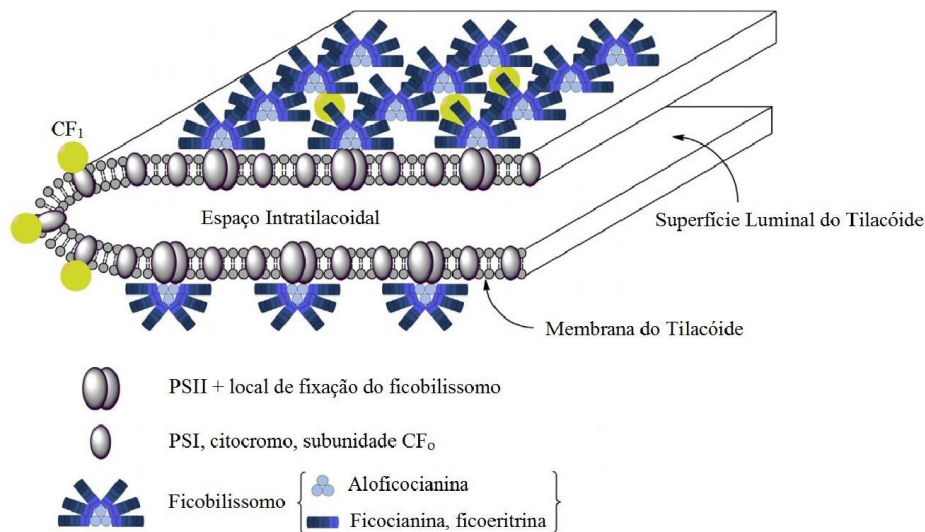
As ficobiliproteínas absorvem luz numa região do espectro em que a clorofila é ineficiente (450-670 nm), o que permite que as algas, como as rodófitas, ocupem ambientes aquáticos, como lagos e oceanos, nos quais, preferencialmente, a radiação de altos comprimentos de onda é filtrada pela água – predominantemente a vermelha, tendo-se que as algas que estão na superfície possuem maior contato com a luz vermelha que aquelas que estão em maiores profundidades. A água, portanto, funciona como um filtro, gerando o processo conhecido por aclimatação cromática complementar. Tal processo produz dois tipos principais de organismos fotossintetizantes aquáticos: aqueles que crescem em águas rasas que tendem a conter ficobiliproteínas especializadas em absorver a luz amarela/vermelha (FC), e aqueles que estão em águas mais profundas, os quais tendem a conter ficobiliproteínas especializadas em absorver a luz verde/azul (FE), que é, relativamente, a luz mais abundante em altas profundidades (GLAZER; STRYER, 1984; KEHOE, 2010; KEHOE; GUTU, 2006; NELSON; COX, 2014a; RAMUS *et al.*, 1976; SAGERT; SCHUBERT, 1995). A característica que faz as algas vermelhas serem capazes de se desenvolver e crescer abundantemente em águas profundas está diretamente ligada ao alto teor de ficoeritrina presente em seus tilacóides, pois

essa ficobiliproteína tem uma absorção eficiente da luz na faixa espectral de 450 a 570 nm (WANG *et al.*, 2015).

As ficobiliproteínas constituem um aglomerado proteico chamado ficobilissomo, o qual, *in vivo*, apresenta-se na superfície da membrana do tilacóide – exatamente sobre o centro de reação – das macroalgas vermelhas – e são constituídas pelas ficobiliproteínas e pelos peptídeos de ligação (Figura 4) (GLAZER, 1985; HURD *et al.*, 2014; LOURENÇO, 2006).

A estrutura dos ficobilissomos (Figura 5) funciona como uma antena capaz de absorver energia a qual é diretamente transferida para o centro de reação fotossintético II, com eficiência de captação e transferência de energia próximos a 100%, *in vivo* (GLAZER, 1989; MURAMATSU; HIHARA, 2012). O fluxo de transferência de energia se dá na disposição espectral em que os pigmentos são encontrados, isto é, a energia absorvida pela ficoeritrina é transmitida para a ficocianina, em seguida para a aloficocianina, e, enfim, para a clorofila *a* do centro de reação, por transferência de éxcitons (GLAZER; HIXSON, 1975; HURD *et al.*, 2014; NELSON; COX, 2014a; PARMAR *et al.*, 2011).

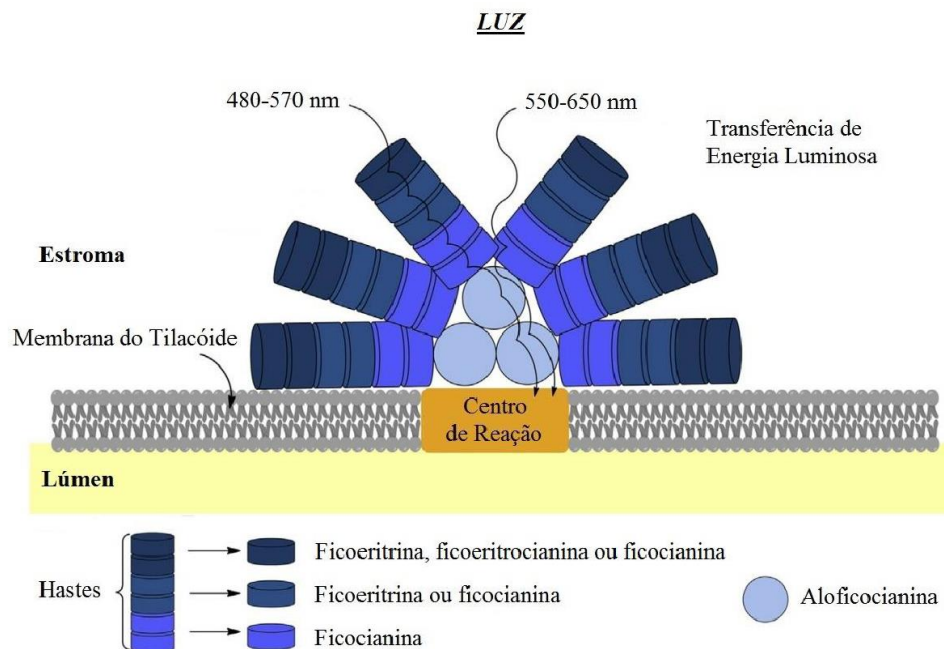
Figura 4 – Representação da Membrana do Tilacóide e dos Ficobilissomos



Fonte: Adaptado de Dumay *et al.* (2014). Legenda: CF – Fator de acoplamento; PS – Fotossistema.

As ficobiliproteínas têm como segunda função atuarem como reserva de nitrogênio, em que, em situações de estresse, as proteínas que as compõem são degradadas, liberando nitrogênio para os processos metabólicos essenciais. Tal processo, que é reversível, ocasiona uma mudança da coloração da alga, a qual assume um aspecto esverdeado (LOURENÇO, 2006).

Figura 5 – Representação da Estrutura do Ficobilissomo



Fonte: Adaptado de Dumay *et al.* (2014).

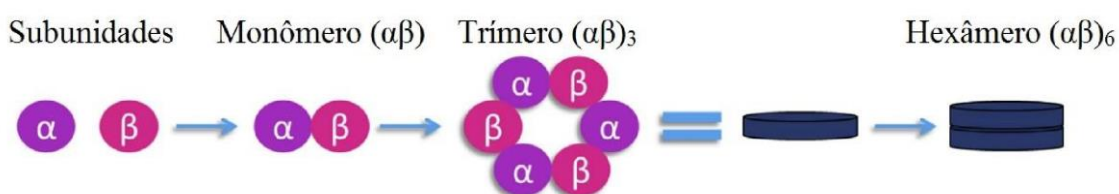
A morfologia dos ficobilissomos varia de acordo com organismo, sendo que, em macroalgas vermelhas assume uma estrutura hemi-elipsoidal, compondo-se de duas subestruturas bem definidas: as hastes e o núcleo. As hastes são constituídas pelos pigmentos ficoeritrina e ficocianina, de tal modo que a ficoeritrina, de maior energia, encontra-se nas extremidades das hastes, e a ficocianina, de menor energia, localiza-se na base das hastes. O núcleo, por sua vez, é composto pela aloficocianina (DUMAY *et al.*, 2014; GLAZER *et al.*, 1983; GLAZER, 1984).

As conexões entre as hastes, o núcleo e a membrana do tilacóide se dão pelos peptídeos de ligação, sendo que, dependendo da espécie, representam cerca de 15% do total de proteínas do ficobilissomo (DE MARSAC, 1977). Sua principal função, devido ao seu caráter hidrofóbico, é fixar o ficobilissomo na membrana do tilacoide. Além disso, esses peptídeos estabilizam a estrutura dos ficobilissomos e asseguram a coesão das ficobiliproteínas na estrutura (DUMAY *et al.*, 2014). Os polipeptídios de ligação são classificados em três tipos de acordo com sua massa molecular: o peptídeo de ligação do núcleo a membrana (L_{CM}) com massa molecular que varia de 70 a 120 kDa e tem por função ligar o núcleo do ficobilissomo a membrana do tilacóide, e, também, atuar como receptor final de éxcitons contribuindo para a transferência dessa energia para o centro de reação; o peptídeo de ligação L_C (9-12 kDa) que

tem por finalidade montar e fixar o núcleo do ficobilissomo; e, por fim, o peptídeo de ligação L_{RC} (25-35 kDa) que tem por função estabilizar a estrutura da ficobiliproteína e fazer a conexão da haste do ficobilissomo ao seu núcleo (DUCRET *et al.*, 1998; GLAZER, 1984).

As ficobiliproteínas são constituídas de duas subunidades diferentes (α e β) e uma terceira subunidade (γ), encontrada nas ficoeritrinas, atuando como peptídeo de ligação (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000a; GLAZER; HIXSON, 1975). As subunidades formam discos hexaméricos, como mostra a Figura 6.

Figura 6 – Formação dos Discos Hexaméricos das Ficobiliproteínas



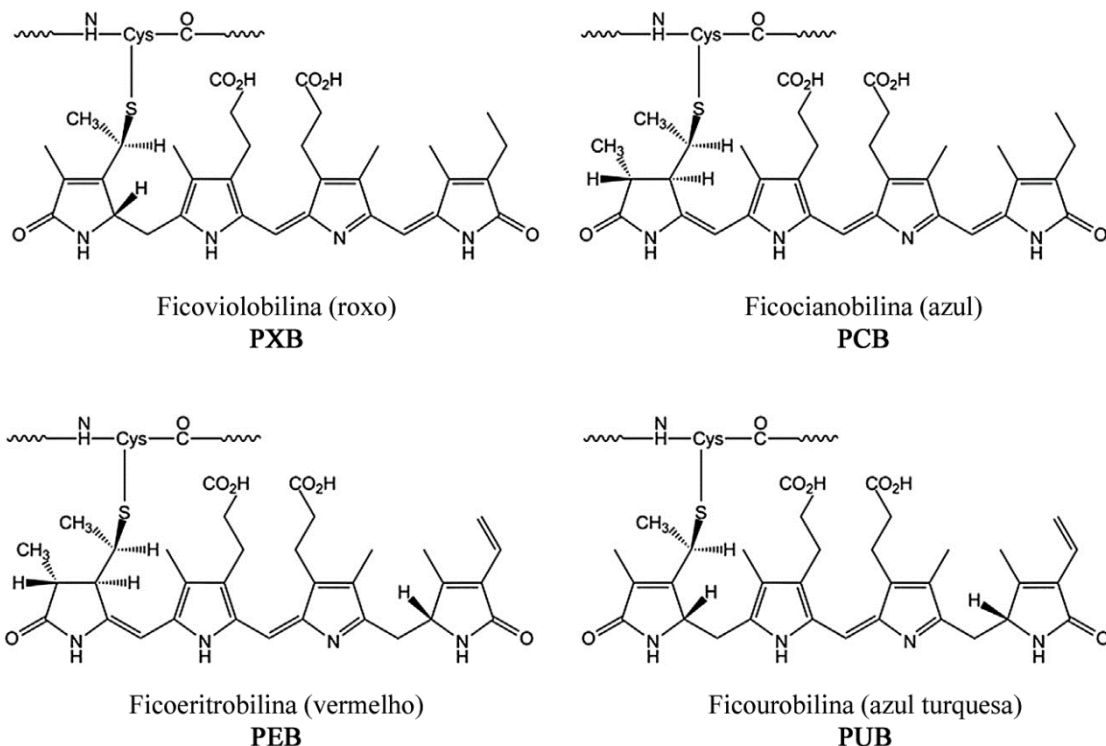
Fonte: Adaptado de Dumay *et al.* (2014).

A ficoeritrina é encontrada tanto na forma hexamérica com as subunidades α e β e γ [$(\alpha\beta)_6\gamma$], assim como sem a subunidade gama γ [$(\alpha\beta)_6$], variando de acordo com o tipo de ficoeritrina isolada; a ficoeritrocianina pode ser encontrada tanto na forma trimérica [$(\alpha\beta)_3$], como na forma hexamérica [$(\alpha\beta)_6$]; a ficocianina é encontrada, no pH 5-6, na forma hexamérica [$(\alpha\beta)_6$] e, no pH 7, na forma trimérica [$(\alpha\beta)_3$] e a aloficocianina é comumente encontrada na forma trimérica [$(\alpha\beta)_3$] (DUMAY *et al.*, 2014; GLAZER, 1984; WANG *et al.*, 2015).

Há uma ou mais ficobilinas ligadas, pelos resíduos de cisteína, a cada subunidade, dividindo-se em quatro diferentes tipos: ficoeritrobilina (PEB, $\lambda_{\max} = 560$ nm), ficourobilina (PUB, $\lambda_{\max} = 450$ nm), ficocianobilina (PCB, $\lambda_{\max} = 620-650$ nm) e ficoviolobilina (PXB, $\lambda_{\max} = 575$ nm) (DUMAY *et al.*, 2014; GLAZER, 1985, 1984; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; ZHAO *et al.*, 2015). Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 7.

PEB é encontrada nas C-Ficoeritrinas, R-Ficoeritrinas, B-Ficoeritrinas e ficocianinas, PUB é encontrada nas R-Ficoeritrinas e B-ficoeritrinas, PCB é encontrada nas ficocianinas, aloficocianinas e ficoeritrocianinas, e PXB é encontrada nas ficoeritrocianinas, fazendo com que os tipos de ficobilinas presentes nos organismos variem de espécie para espécie, conservando os locais de ligação das ficobilinas (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; NIU; WANG; TSENG, 2006).

Figura 7 – Estruturas Químicas das Ficobilinas



Fonte: Dumay *et al.* (2014), tradução nossa.

1.3.1. Ficoeritrinas

As ficoeritrinas são os pigmentos majoritários encontrados nas macroalgas vermelhas, constituindo um grupo variado de ficobiliproteínas devido às suas características espectroscópicas (DUMAY *et al.*, 2014; GLAZER, 1994). Elas também são conhecidas por representarem a classe das ficobiliproteínas mais dinâmicas, devido aos seus picos de absorção e a sua emissão de fluorescência (em torno de 575 nm) (SUN *et al.*, 2003), permitindo a sobrevivência a adaptação das macroalgas vermelhas em ambientes adversos e frente às alterações ambientais (KAWSAR *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ *et al.*, 1991).

De acordo com as suas propriedades de absorção de luz e com a espécie da alga, as ficoeritrinas podem ocorrer em diferentes formas, quais sejam: B-Ficoeritrina (B-FE) ($\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$, 545 nm , e um ombro a 499 nm), presente em Bangiales; b-Ficoeritrina (b-FE) ($\lambda_{\max} = 545 \text{ nm}$, e um ombro a 565 nm) e C-Ficoeritrina (C-FE) ($\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$), presentes em cianobactérias; e R-Ficoeritrina (R-FE) ($\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$, 498 nm e um ombro/pico a 545 nm), presente em Rhodophyta (BRYANT, 1982; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; SUN *et al.*, 2009). A CU-Ficoeritrina (CU-FE) ($\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$, 540 nm e/ou 565 nm) por possuir cromóforos e

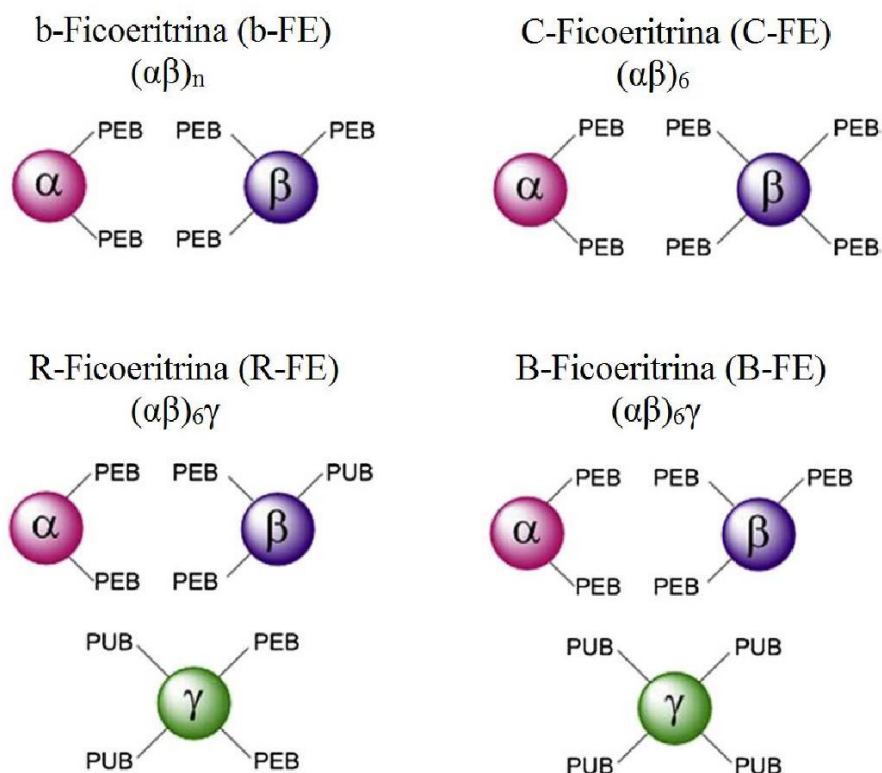
características de absorção semelhantes à R-Ficoeritrina, é geralmente classificada como R-FE (STADNICHUK, 1995).

As diferenças espectrais de absorbância entre os tipos de ficoeritrina se devem à quantidade de ficobilinas presentes na sua composição. B-FE e R-FE são compostas por subunidades α , β e γ , sendo descritas como complexos hexaméricos $(\alpha\beta)_6\gamma$, enquanto b-FE e C-FE são formados por $(\alpha\beta)$ sem a subunidade γ (Figura 8) (GLAZER *et al.*, 1983; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; SUN *et al.*, 2009).

As subunidades α , β e γ que compõem a R-FE possuem em torno de 18, 20 e 35 kDa, respectivamente, e formam complexos hexaméricos $(\alpha\beta)_6\gamma$, de 240 kDa. A subunidade γ se encontra no centro da molécula e é responsável pela ligação de dois trímeros $(\alpha\beta)_3$, conferindo maior estabilidade para a estrutura do pigmento (CHANG *et al.*, 1996; DUMAY *et al.*, 2014; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; WANG *et al.*, 2015).

Apenas duas ficobilinas estão presentes na estrutura das ficoeritrinas: ficoeritrobilinas (PEB) e ficourobilinas (PUB), que juntas realizam a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) [PUB para PEB], resultando no pico de emissão máximo de fluorescência a 575 nm (JIANG; ZHANG; LIANG, 1999).

Figura 8 – Estruturas das Ficoeritrinas



Fonte: Dumay *et al.* (2014), tradução nossa.

Nas R-Ficoeritrinas, cada subunidade α contém duas ficobilinas do tipo PEB ligadas por resíduos de cisteína específicos (C82 e C139); nas subunidades β estão ligados três ficobilinas, duas do tipo PEB, ligadas por resíduos de cisteínas específicos (C82 e C158), por ligação do tipo tioéter e uma do tipo PUB ligado a cisteína C50/61; por fim, nas subunidades γ estão ligadas duas ficobilinas do tipo PEB e duas ficobilinas do tipo PUB (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; CHANG *et al.*, 1996; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999; KLOTZ; GLAZER, 1985; ZHAO *et al.*, 2015).

Contreras-Martel *et al.* (2001) determinaram a estrutura tridimensional cristalográfica da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *Gracilaria chilensis*, em que evidenciou os cromóforos ligados às subunidades α (Figura 9a) e β (Figura 9b), além de determinar as estruturas trimérica (Figura 9c) e hexamérica (Figura 9d) formadas por essas subunidades. Há relatos de cristais de R-Ficoeritrina de outras macroalgas. Por exemplo, Chang *et al.* (1996) determinaram a estrutura cristalográfica R-FE da macroalga vermelha *Polysiphonia urceolata* e Miyabe *et al.* (2017) evidenciaram a estrutura cristalográfica da ficoeritrina da macroalga vermelha *Palmaria palmata*.

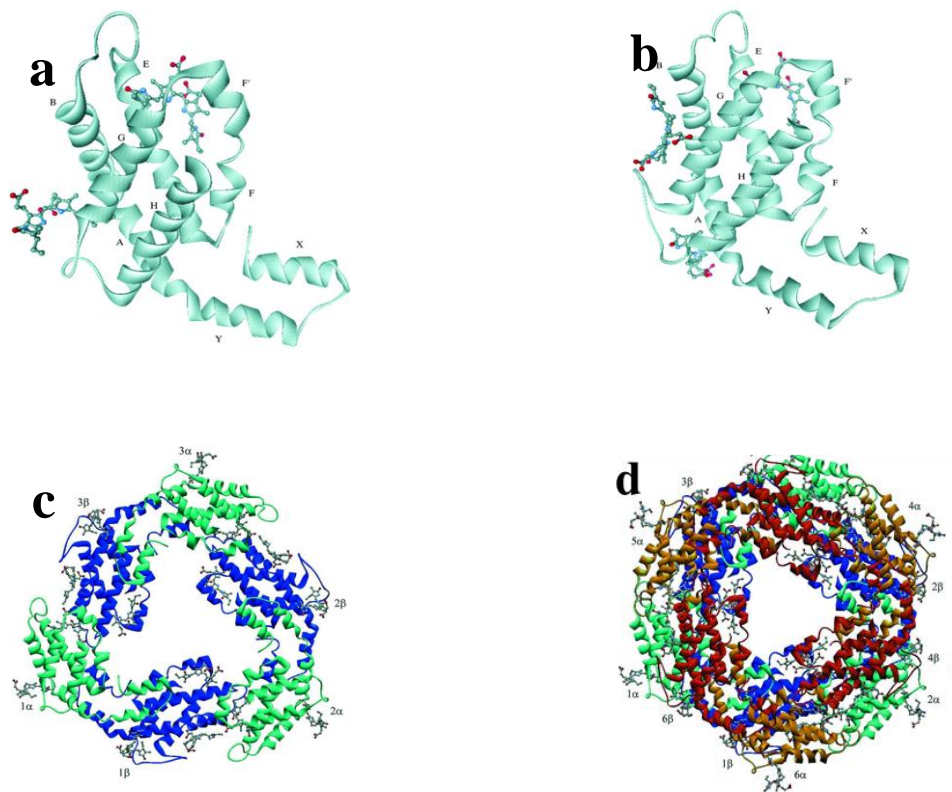
1.4 A macroalga marinha *Solieria filiformis* e sua importância

A macroalga marinha *Solieria filiformis* (Kützting) Gabrielson é uma espécie pertencente ao filo Rhodophyta, classe Florideophyceae, ordem Gigartinales e família Solieriaceae. Na sua fase vegetativa, a *S. filiformis*, de talo filamentosos cilíndrico ramificado, apresenta zonas cortical e medular claramente distintas entre si. Seu córtex apresenta quatro camadas de células altamente pigmentadas, enquanto que sua medula apresenta grandes células despigmentadas (PERRONE; CECERE, 1994). É uma espécie vastamente distribuída, sendo encontrada em várias regiões do planeta: Ilhas Canárias, Europa (França, Espanha, Itália, Reino Unido), América do Norte (Flórida, Geórgia, México), Caribe, América do Sul (Brasil, Colômbia, Venezuela), África (Gabão, Gana, Senegal), dentre outras (GUIRY; GUIRY, 2020). Com destaque para o Brasil, é uma espécie encontrada especialmente na costa da região Nordeste (SILVA *et al.*, 1987), tendo seu cultivo por esporulação natural estabelecido por Lima (2012), no litoral do Ceará.

A biomassa dessa macroalga tem sido utilizada para diversos fins. Peñuela *et al.*, (2018) realizaram um estudo multitrófico para a produção de biomassa de *S. filiformis* com o objetivo de estabelecer uma biorrefinaria, obtendo-se, como citado anteriormente, um extrato

rico em proteínas e polissacarídeos sulfatados, ácidos graxos poli-insaturados e ι-carragenana pura. Além disso, Abreu *et al.* (2018) determinaram o efeito antidepressivo de uma lectina de ligação à manana, extraída e purificada da macroalga *S. filiformis*, em modelos animais. Também foram estabelecidos métodos de extração e purificação para a R-ficoeritrina dessa macroalga, bem como determinada sua atividade antioxidante e sua estabilidade frente a variações de temperatura e pH (BASTOS FILHO, 2016; BRITO MONTEIRO, 2017; LOPES, 2018).

Figura 9 – Estrutura Tridimensional das Subunidades α e β , do Trímero e do Hexâmero da R-Ficoeritrina da Macroalga Vermelha *Gracilaria chilensis*



Fonte: Adaptado de Contreras-Martel *et al.* (2001). Legenda: (a) estrutura da subunidade α ligada a duas ficobilinas; (b) estrutura da subunidade β ligada a três ficobilinas; (c) estrutura trimérica da R-Ficoeritrina ($\alpha\beta$)₃; (d) estrutura hexamérica da R-Ficoeritrina ($\alpha\beta$)₆.

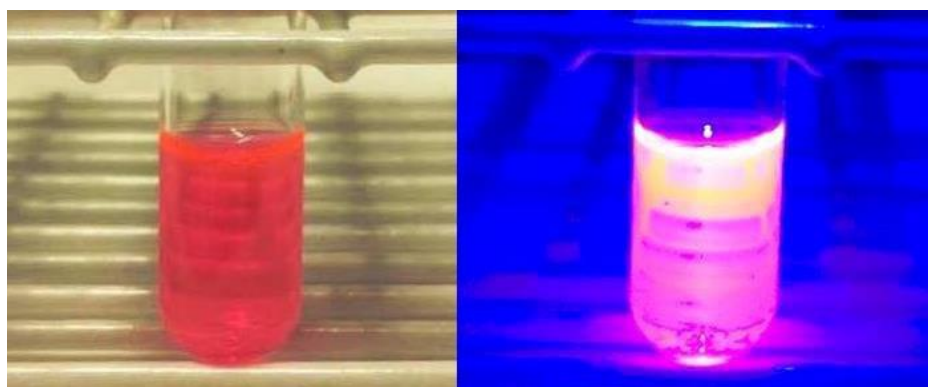
Essa alga é fonte de ι-carregenana, uma galactana sulfatada linear economicamente importante encontra de diversas macroalgas vermelhas. Sua estrutura química é formada por

subunidades alternadas de $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-galactose-4-sulfato}$ e $\rightarrow 4\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-galactose-2-sulfato}$ (MURANO et al., 1997; SOUSA et al., 2016). Foram relatadas atividades biológicas desse polissacarídeo presente na parede celular da macroalga *Solieria filiformis*, tais como: antioxidante, gastroprotetora e antinociceptiva (DE ARAÚJO et al., 2011b; SOUSA et al., 2016). As caracterizações reológicas e estruturais dessa galactana sulfatada também foram estudadas (HOLANDA, 2007), além disso, o gel de ι -carregenana de *S. filiformis* demonstrou possuir melhor firmeza, gomosidade e mastigabilidade que o os géis formados pela ι -carregenana comercial (LIMA et al., 2013).

1.4.1 R-ficoeritrina obtida da macroalga *Solieria filiformis* cultivada no litoral cearense

Por se tratar de um pigmento proteico, métodos clássicos de extração e purificação foram estabelecidos para a obtenção de R-ficoeritrina da macroalga *S. filiformis*, almejando a cada processo maiores valores de recuperação desse pigmento. O aspecto visual desse pigmento puro sob luz branca e luz azul pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Coloração e Fluorescência da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*



Fonte: Bastos-Filho, 2016. Legenda: A – Coloração da R-FE sob luz branca; B – Fluorescência da R-FE sob luz azul.

A partir da homogeneização por agitação mecânica combinada a cromatografia de troca iônica – após etapas de otimização – foram atingidos 62,32% de recuperação do R-PE, mostrando-se um processo mais efetivo frente aos anteriormente estudados pelo nosso grupo de pesquisa (Tabela 4) (LOPES, 2018).

Tabela 4 – Histórico do Rendimento e Recuperação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*

Etapas	Rendimento de R-FE (mg/g) *			Recuperação de R-FE (%)		
	Bastos-Filho (2016)	Brito (2017)	Lopes (2018)	Bastos-Filho (2016)	Brito (2017)	Lopes (2018)
Extração	0,14	0,16	0,17	100	100	100
Precipitação em sulfato de amônio	0,06	0,14	-	48,27	86,55	-
Cromatografia de Troca Iônica	0,03	0,06	0,11	21,82	42,91	62,32
Ultrafiltração em Vivaspin	-	-	0,06	-	-	37,69

Fonte: Adaptado de Lopes (2018). Legenda: *Calculado com base na massa úmida da macroalga *S. filiformis*;

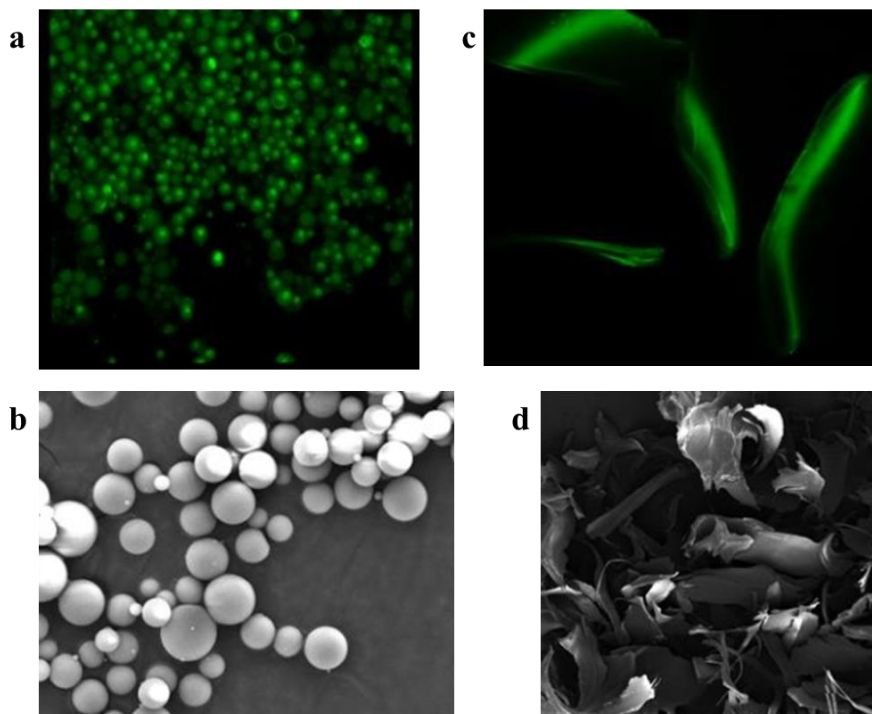
- Etapa não adotada na metodologia.

Além disso, as características espectroscópicas da R-FE pura, obtida da macroalga vermelha *S. filiformis*, foram relatadas por Bastos-Filho (2016). Os picos de absorção a 495 e 564 nm, o ombro de absorção a 540 nm e o pico de fluorescência a 575 nm quando excitada a 495 nm foram observados. Também foi constatado pelo mesmo trabalho que essa ficobiliproteína é composta por subunidades α , β e γ de massas 18, 20 e 37 kDa, respectivamente.

Também foi observado que a R-PE dessa macroalga manteve sua estrutura estável sob temperaturas de até 60 °C, apresentando alterações somente a partir de 70 °C, em que foi possível constatar alterações na sua estrutura, no seu perfil espectroscópico e na sua concentração. Além disso, foi observado que esse pigmento mantém suas características espectroscópicas e estruturais estáveis no pH de 6,5, sofrendo precipitação quanto menor o pH, e total perda de coloração quanto maior o valor (BASTOS FILHO, 2016; BRITO MONTEIRO, 2017). A R-FE de *S. filiformis* também demonstrou alta capacidade antioxidante (LOPES, 2018). Foram realizados trabalhos para a melhoria da estabilidade desse pigmento pelo método de encapsulamento (FERREIRA, 2021; PEIXOTO, 2020). A Figura 11 apresenta micrografias da R-FE encapsulada. Por fim, foi realizada uma análise sensorial visual da aplicação desse

pigmento em iogurte branco, com o fito de simular a substituição de corantes utilizados pela indústria (BRITO MONTEIRO, 2017).

Figura 11 – Micrografias do encapsulamento de R-PE



Fonte: Adaptado de Peixoto (2020). Legenda: (a-b): Microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão de microcapsulas de R-FE obtidas por atomização; (c-d) Microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão de R-PE encapsulada obtida por liofilização.

1.5 Métodos de extração de R-ficoeritrina

A R-ficoeritrina é um pigmento economicamente importante, com alto valor de mercado, variando seu preço de acordo com a pureza (Tabela 3), possuindo diversas patentes registradas nos bancos internacionais de propriedade intelectual, resumidamente apresentadas na Tabela 5. No banco de dados EPO (European Patent Office) foram encontradas aproximadamente 5,5 mil patentes para a palavra-chave “R-phycoerythrin”, distribuída entre métodos obtenção desse pigmento e suas aplicações em diversas áreas, tais como: indústria química, alimentícia, nutracêutica, farmacológica, biomédica, dentro outras. A mesma busca realizada no banco de patentes World Intellectual Property Organization (WIPO) resultou em aproximadamente 77 mil patentes. Esses números elevados demonstram a demanda por diversos setores da indústria de se obter essa biomolécula, sendo importante cada vez mais diferentes fontes e novos métodos de extração. Assim, foi realizada também uma busca

combinada dos termos “R-phycoerythrin” e “*Solieria filiformis*” e foi constatado que não existem registros de patentes para o pigmento vermelho obtido dessa macroalga, evidenciando a importância de incluí-la no rol de fontes de R-PE.

Tabela 5 – Patentes encontradas para R-ficoeritrina em três banco de dados

Número de registro	Aplicação	Espécie	Referência
CN1325729A	Medicamento para fototerapia de tumor	-	LI, 2001
WO03099039A1	Aditivo fluorescente para bebidas	-	KEILLER, 2003
PI04069846A2	Método de extração	<i>Galaxaura oblongata</i> <i>Halymenia ceylanica</i> <i>Heiminthocladia australis</i> <i>Porphyra dentata</i>	LU <i>et al.</i> , 2004
US2005009117A1	Kit diagnóstico tumoral	-	CHIUEH CHUANG-CHUN; CHAN ERR-CHENG; SHEN CHIA-RUI, 2005
CN1271085C	Método de extração	-	LIU; YUZHONG, 2006
CN101750482A	Sonda fluorescente	<i>Porphyra yezoensis</i>	ZHOU; MING, 2010
US20140148350	Biomarcador circulante para doenças	-	DAVID <i>et al.</i> , 2011
EP2419734A1	Imunoensaio para detecção viral	-	SCHOLL, DAVID, R.; BROWN, JAMES, L.; JOLLICK, JOSEPH; LOLLAR, 2012
CN104292316A	Método de extração	<i>Gracilaria verrucosa</i>	BING <i>et al.</i> , 2015
WO2015065887A1	Aditivo fluorescente para bebidas	<i>Grateloupia turuturu</i>	(MOFFITT; DELIC; FLYNN, 2015)
CN108037103A	Detecção de ácido nucleico	-	JUNLING, 2018
WO2021195708	Corante alimentício	-	RAYNES <i>et al.</i> , 2021

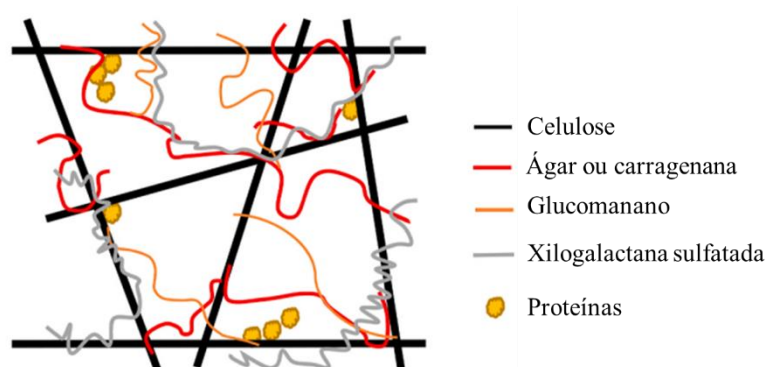
CN113321716A	Método de extração	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	JUN, 2021
KR102265441B1	Detecção do vírus da gripe aviária	-	EUN, 2021
WO2022096901	Produto para Tratamento/Prevenção da Hipertensão Arterial Pulmonar	-	ZHAO; OWEN; WILKINS, 2022
WO2022061166A1	Detecção de ácido nucleico	-	BROUGHTON, JAMES; CHEN, 2022
WO2022047389A1	Corante alimentício em substituto de carne	-	HERMES, TASHA; LIPKIE, TRISTAN; SHYAMALIE SENARATNE-LENAGALA, 2022

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: (-): dado não fornecido.

Assim, tendo em vista que a R-FE é um composto intracelular, são necessários métodos de rompimento da parede celular das macroalgas para a sua liberação durante o processo de extração (MITTAL *et al.*, 2017). Há diversos métodos relatados na literatura, tais como: maceração em nitrogênio líquido e/ou moinhos (SUDHAKAR *et al.*, 2015a), ultrasonicação (WANG *et al.*, 2015), homogeneização (HARNEDY; FITZGERALD, 2013) e também a combinação de dois ou mais métodos, a fim de se melhorar o rendimento do pigmento (LE GUILLARD *et al.*, 2015).

Contudo a presença de grandes concentrações de polissacarídeos na parede celular das macroalgas vermelhas dificulta a eficiência dos processos de extração e purificação, sendo necessárias várias operações unitárias para se alcançar um alto rendimento e eficiência, ressaltando que o acréscimo dessas operações é inversamente proporcional ao rendimento final do produto. Além disso, esses polissacarídeos presentes na parede celular dessas algas encontram-se entrelaçados entre si, formando uma matriz complexa a qual confere rigidez à parede celular e dessa forma reduz a capacidade de extração de biomoléculas intracelulares (Figura 12) (DUMAY *et al.*, 2013; KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982; MITTAL *et al.*, 2017).

Figura 12 – Esquema da estrutura da parede celular das macroalgas vermelhas



Fonte: Adaptado de Kostas *et al.* (2021).

Por ser uma molécula hidrossolúvel, a R-ficoeritrina é comumente extraída em solventes aquosos, sendo o tampão fosfato o mais utilizado (SUDHAKAR *et al.*, 2015a), a partir de diferentes estados da matéria-prima, podendo ser alga úmida (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013a; SUDHAKAR *et al.*, 2015a; WANG *et al.*, 2015), alga congelada (NIU; WANG; TSENG, 2006) e alga liofilizada (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000a; MUNIER *et al.*, 2014). A Tabela 6 apresenta detalhadamente as algas e os métodos utilizados para obtenção de R-FE e os seus respectivos rendimentos.

Tabela 6 - Métodos de extração e rendimentos de R-ficoeritrina de macroalgas vermelhas

Espécie	Método	Rendimento (mg/g)	Referência
<i>Palmaria palmata</i>	Homogeneização	1,00 ^a	GALLAND-IRMOULI <i>et al.</i> , 2000.
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Extração sólido-líquido em água	1,10 ^b	WANG, 2002.
<i>Polysiphonia urceolata</i>	Descongelamento em tampão	2,65 ^b	LIU <i>et al.</i> , 2005.
<i>Polysiphonia urceolata</i>	Extração sólido-líquido em tampão	1,57 ^b	NIU; WANG; TSENG, 2006.
<i>Heterosiphonia japonica</i>	Ultrasonicação	-	SUN <i>et al.</i> , 2009.

<i>Gracilaria verrucosa</i>	Hidrólise enzimática	6,25 ^c	MENSI <i>et al.</i> , 2012
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	Congelamento-descongelação	1,73 ^c	NIU <i>et al.</i> , 2013.
<i>Portieria hornemannii</i>	Aquecimento + Congelamento-descongelação	1,23 ^c	SENTHILKUMAR <i>et al.</i> , 2013.
<i>Palmaria palmata</i>	Homogeneização + Hidrólise enzimática	12,36 ^a	DUMAY <i>et al.</i> , 2013
<i>Polysiphonia urceolata</i>	Ultrasonicação	-	WANG <i>et al.</i> , 2015.
<i>Bangia fusco-purpurea</i>	Sonicação + Congelamento-descongelação + Homogeneização	-	WU <i>et al.</i> , 2015.
<i>Grateloupia turuturu</i>	Extração sólido-líquido em tampão	5,28 ^a	MUNIER <i>et al.</i> , 2015.
<i>Gracilaria crassa</i>	Maceração	0,50 ^c	SUDHAKAR <i>et al.</i> , 2015
<i>Halymenia floresia</i>	Congelamento-descongelação	1,36 ^c	MALAIRAJ, <i>et al.</i> , 2016.
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Hidrólise enzimática	1,99 ^a	NGUYEN <i>et al.</i> , 2017
<i>Centroceras clavulatum</i>	Homogeneização	0,20 ^c	NAIR <i>et al.</i> , 2018.
<i>Gelidium pusillum</i>	Hidrólise enzimática	0,30 ^a	MITTAL; RAGHAVARAO, 2018
<i>Bangia atropurpurea</i>	Sonicação	1,57 ^c	PUNAMPALAM; KHOO; SIT, 2018
<i>Solieria filiformis</i>	Homogeneização	0,17 ^c	LOPES, 2018
<i>Furcellaria lumbricalis</i>	Hidrólise enzimática	3,00 ^a	SALURI; KALDMÄE; TUVIKENE, 2019

<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Trituração em nitrogênio líquido + Homogeneização	-	GANESAN; SHANMUGAM, 2020
<i>Pyropia yezoensis</i>	Hidrólise enzimática	6,93 ^a	WANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	Homogeneização + Congelamento-descongelamento	0,19 ^b	ZHAO <i>et al.</i> , 2020

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: a – mg de R-Ficoeritrina /g de alga seca; b – mg de R-Ficoeritrina / g de alga congelada; c – mg de R-Ficoeritrina / g de alga úmida; (-): dado não fornecido.

Como pode ser observado, os estudos realizados com a utilização de enzimas na extração de R-FE demonstraram maiores rendimentos comparados às demais técnicas encontradas na literatura, sendo portanto uma alternativa aos métodos tradicionais e explicitando a importância das enzimas no processo de rompimento da parede celular das macroalgas, o que auxilia a extração de biomoléculas intracelulares, como a R-FE (NGUYEN *et al.*, 2017).

É importante observar que a eficiência desse método depende da composição da macroalga em estudo, o que determina a escolha dos tipos de enzimas aplicadas (FLEURENCE, 1999). Dumay *et al.* (2013), por exemplo, utilizaram xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* para a extração de R-FE de *P. palmata* devido a presença de polímeros de xilano presentes na parede celular dessa alga. Mittal e Raghavarao (2018), por sua vez, demonstraram que o consórcio das enzimas xilanase, celulase e agarase para a obtenção de melhor rendimento de R-FE, a partir da degradação da parede celular de *Gelidium pusillum*, foi mais eficiente, observando-se também a composição da alga em questão.

A aplicação de enzimas como método de extração de R-ficoeritrina de *S. filiformis* tem como fundamento a desestabilização da estrutura rígida da parede celular dessa macroalga. Uma vez que a parede celular dessa macroalga é composta primordialmente de carragenana e celulose, a escolha de enzimas celulases para esse processo pode estar associada à concepção de biorrefinaria, em que se utilizam estratégias de maior aproveitamento da biomassa algácea para obtenção de diferentes compostos, tendo em vista que os resíduos de extração de R-PE por métodos tradicionais apresentam coloração vermelha intensa (Figura 13) (BALINA; ROMAGNOLI; BLUMBERGA, 2017; LANGE *et al.*, 2020). Assim, além de se obter maiores rendimentos de pigmento ou de outros bioativos intracelulares dessa macroalga, é possível

aproveitar o seu resíduo de extração rico em ι-carragenana, um polissacarídeo sulfatado economicamente importante, o qual possui métodos de extração eficientes para a sua recuperação relatados na literatura, além de ter suas características físico-químicas e reológicas e atividades biológicas descritas (ALBA; KONTOGIORGOS, 2018; ANDRADE *et al.*, 2017; DE ARAÚJO *et al.*, 2011a; HOLANDA, 2007; LIMA *et al.*, 2013; PEÑUELA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2016).

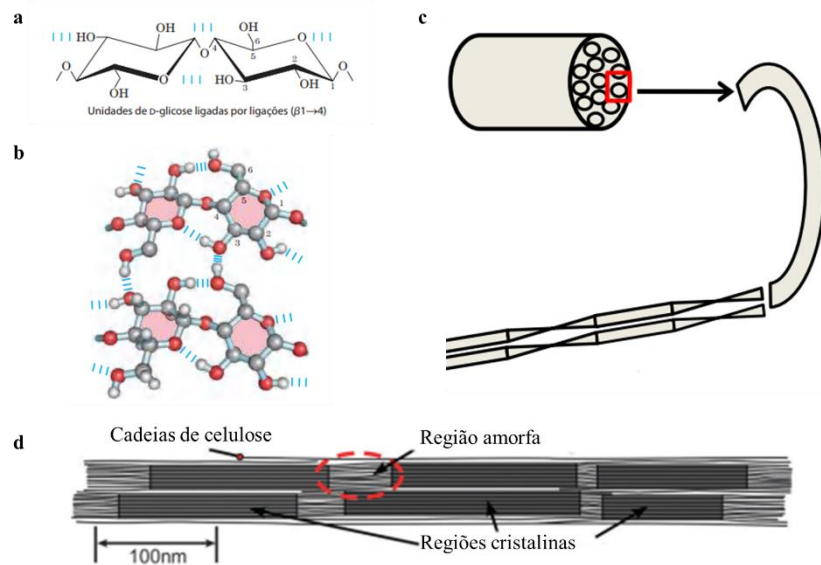
Figura 13 – Aspecto visual do resíduo de extração de R-FE de *Solieria filiformis* por homogeneização



Fonte: Elaborado pelo autor.

A celulose é um polissacarídeo encontrado na parede celular de diversos organismos, dentro ao quais as macroalgas. Trata-se de uma cadeia linear constituída de monômeros de D-glicose formando ligações glicosídicas do tipo $\beta 1 \rightarrow 4$ (Figura 14a). Há também ligações de hidrogênio intra e intercadeias (Figura 14b), o que promove a maior estabilidade e rigidez, formando complexos supra moleculares denominadas fibrilas de celulose (Figura 14c). Dentro destas fibrilas, encontram-se regiões em que as cadeias de celulose estão dispostas numa estrutura altamente ordenada (cristalina) e regiões que estão desordenadas (amorfas) (Figura 14d). Com isso, é possível utilizar as enzimas celulasas para a otimização da extração de R-PE, uma vez que essa enzimas hidrolisam ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 4$ presentes na celulose, desestabilizando a sua estrutura cristalina (MOON *et al.*, 2011; NELSON; COX, 2014b; YANG *et al.*, 2019)

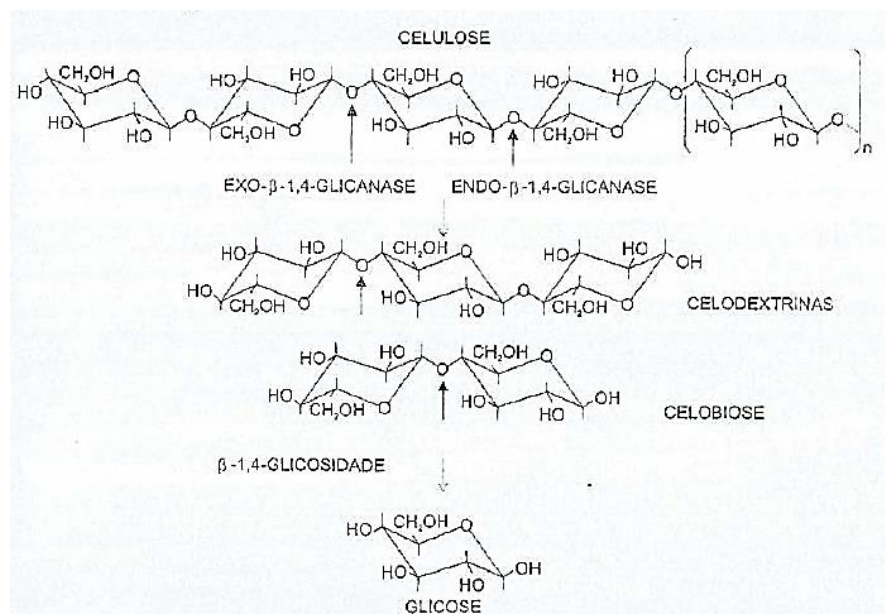
Figura 14 – Ligação glicosídica, ligações de hidrogênio e estrutura das fibrilas de celulose



Fonte: Adaptado de Kuhad *et al.* (2016); Moon *et al.* (2011); Nelson e Cox (2014a).

Celulase é um termo genérico para denominar três tipos de enzimas que hidrolisam a celulose: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases. As endoglucanases atacam preferencialmente as regiões amorfas presentes das fibrilas de celulose por serem alvos mais acessíveis e fáceis de hidrolisar, aumentando a exposição superficial da região cristalina e gerando celo-oligossacarídeos. As exoglucanases (celobiohidrolases e celodextrinases) atuam rompendo as terminações redutoras e não redutoras das cadeias, formando dímeros de celobiose. Por fim, as β -glucosidases atuam rompendo a celobiose em duas moléculas de glicose. Essas celuloses podem atuar isoladamente ou em consórcio, o que gera um efeito sinérgico que teoricamente facilita a degradação da celulose (Figura 15) (KUHAD *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019). O mecanismo de ação da hidrólise celulásica se dá por catálise ácido-base geral que se dá quando celulose é ligada ao sítio ativo da enzima, em que é um resíduo atua como ácido e inicia uma cadeia de transferência de elétrons, protonando o oxigênio presente na ligação O-glicosídica, rompendo essa ligação, ao passo que o elétrons presentes no oxigênio são transferidos para outro resíduo do sítio ativo, atuando como base (nucleófilo) (KUHAD *et al.*, 2016).

Figura 15 – Efeito sinérgico das enzimas celulases para a hidrólise de celulose



Fonte: BON; GÍRIO; PEREIRA (2008).

Tendo em vista a dificuldade para a obtenção de R-PE pelo processo de extração utilizando métodos tradicionais de rompimento celular, o presente trabalho propõe a utilização de enzimas celulases combinadas ao método físico (homogeneização) para otimizar o rendimento de extração do pigmento de *Solieria filiformis*, uma espécie nativa e cultivada no litoral do estado do Ceará e que demonstra sua importância como fonte de diversas biomoléculas.

2. PERMISSÃO LEGAL

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA dessa dissertação de mestrado está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, protocolado sob número: A482D49 - Uso de algas marinhas na busca por novas fontes de produtos naturais: isolamento, caracterização estrutural e suas aplicações.

3 ARTIGO REFERENTE À DISSERTAÇÃO

R-phycoerythrin from the *Solieria filiformis* macroalga: fluorescence in vivo and optimization of the extraction

Authors: ¹Francisco Lucas de Souza Lopes, ¹Acrísio José Uchoa Bastos Filho, ¹Vanessa Rodrigues, ¹Francisco Ewerton de Sousa Lima, ²Antonia Carlota de Souza Lima, ¹Mariana de Freitas Almeida, ^{1*}Márjory Lima Holanda-Araújo and ¹Ana Lúcia Ponte Freitas.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, CE, Brazil

² Department of Food Engineering, Federal University of Ceará, CE, Brazil

^{1*} Corresponding author. Phone: +55 85 3366-9826; Fax: +55 85 3366-9820.

E-mail: marjory.holanda@ufc.br

ABSTRACT

R-phycoerythrin (R-PE) is a photosynthetic pigment (phycobiliprotein) present in red macroalgae, which has wide industrial applications. The presence of polysaccharides in the cell wall of macroalgae hampers pigment extraction. Thus, biotechnological tools can be used to optimize this process. Therefore, the R-PE localization in the thallus, the extraction and the effect of the cellulase on the R-PE extraction from *Solieria filiformis* macroalga, a species cultivated on the coast of Ceará, Brazil, were evaluated. Laser confocal microscopy was used to identify the pigmented cells in the thallus. It was observed that freezing as a preservation method caused morphological modifications of the thallus, however, the pigmentation was preserved. The effect of the cellulase concentration, temperature and time were evaluated on the yield and purity index of the pigment extracted. Only thallus cortical cells presented R-PE fluorescence and the highest R-PE yield extraction observed ($0.1921 \pm 0.0086 \text{ mg g}^{-1}$ wet macroalga) was in the presence of the cellulase from *Aspergillus niger* at 200 U g^{-1} wet macroalga. The concentration enzyme, temperature and time positively influenced the R-PE extraction yield, but negatively influenced the pigment purity index. The best condition to extract the R-PE was 160 U g^{-1} wet macroalga, temperature $35 \text{ }^\circ\text{C}$ by 6 h, reaching 0.21 mg g^{-1} wet macroalga, with a purity index of 0.04.

Keywords: Phycobiliproteins; R-PE; Laser confocal microscopy; enzymatic extraction

1 INTRODUCTION

The phycobiliproteins present in red marine macroalgae (Rhodophyta) are water-soluble protein pigments present in the photosynthetic system, involved in light absorption (GLAZER, 1984b). The phycobiliproteins are structurally organized in supramolecular protein complexes called phycobilisomes, which are located in the external membrane of the thylakoids, facing the stroma of cortical cells (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; GANTT, 1980). Phycobilisomes constitute efficient transfer chains of electromagnetic radiation of the visible light spectrum, being able to absorb it at wavelengths (450-670 nm) in which chlorophyll *a* is inefficient and thus channel it to the reaction centre of photosystem II, in which this chlorophyll *a* is present (GLAZER, 1989; SFRISO; GALLO; BALDI, 2018). Their colour and spectral characteristics arise from the presence of linear tetrapyrrolic prosthetic groups (bilins or phycobilins) that are covalently linked, via thioether bonds, to the cysteine residues of the protein (JIANG; ZHANG; LIANG, 1999). However, the phycobilin is the photosynthetic pigment itself and has no biological function if it is not coupled to a protein (LOURENÇO, 2006).

According to their colouring, these phycobiliproteins can be divided into two types: phycoerythrin and phycocyanin, which are red and blue, respectively (O’CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980). They can also be classified into four distinct classes, according to their maximum wavelengths (λ_{\max}) in the visible light absorption spectrum region: phycoerythrin (PE) ($\lambda_{\max} = 495\text{-}570$ nm), phycoerythrocyanin (PEC) ($\lambda_{\max} = 575$ nm), phycocyanin (PC) ($\lambda_{\max} = 610\text{-}620$ nm) and allophycocyanin (APC) ($\lambda_{\max} = 650\text{-}655$ nm). Phycobiliproteins are composed of two different subunits (α and β) and a third subunit (γ), found in phycoerythrins, acting as a binding peptide (BRYANT; GLAZER; EISERLING, 1976). There are one or more phycobilins bound in each subunit and four different types can be found: phycoerythrobin (PEB, $\lambda_{\max} = 560$ nm), phycourobilin (PUB, $\lambda_{\max} = 450$ nm), phycocyanobilin (PCB, $\lambda_{\max} = 620\text{-}650$ nm) and phycoviolobilin (PXB, $\lambda_{\max} = 575$ nm) (BRYANT; GLAZER; EISERLING, 1976; GLAZER, 1984b).

Phycoerythrins, specifically, can be subdivided into four groups according to the organisms from which it originates: B-phycoerythrin (B-PE) ($\lambda_{\max} = 565$ nm, 545 nm, and a shoulder at 499 nm) for Bangiales; b-phycoerythrin (b-PE) ($\lambda_{\max} = 545$ nm, and a shoulder at 565 nm) and C-phycoerythrin (C-PE) ($\lambda_{\max} = 560$ nm) for Cyanobacteria; R-phycoerythrin (R-

PE) ($\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$, 498 nm , and a shoulder/peak at 545 nm) for Rhodophyta (BOGORAD, 1975; BRYANT; GLAZER; EISERLING, 1976). Their absorbance spectral differences are due to the number of phycobilins present in their composition. B-FE and R-FE are composed of α , β and γ subunits, being described as hexamer $(\alpha\beta)_6\gamma$ complexes, while b-FE and C-FE are formed by $(\alpha\beta)$ without the γ subunit (GLAZER *et al.*, 1983; SUN *et al.*, 2009).

In addition to its reddish colouration, the R-phycoerythrins are fluorescent and show high biotechnological, technological and diagnostic potential (ALTUG *et al.*, 2022; CESANA *et al.*, 2022; DAGNINO-LEONE *et al.*, 2022). In industrial products, these pigments emerge concerning synthetic dyes mainly because they are non-toxic, non-carcinogenic and present biological activities such as antioxidant, antidiabetic, immunosuppressive, antihypertensive and anticancer (DUMAY *et al.*, 2014). The R-FE represents an alternative for the reduction of synthetic dyes in the formulation of creams of makeup products (BEDOUX *et al.*, 2014; MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

Despite the wide application of these proteins and the large volume of macroalgae production in the world, reaching production of 32.4 million tonnes (\$13.3 billion) in 2018 (FAO, 2020), the R-FE extraction methods are inefficient, presenting low yields of the pigment in extract and still coloured wastes. Then physic and biochemical methods have been proposed to increase the extraction yield of the R-PE from red macroalgae (AUNG; KIM; EUN, 2022; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2022; SATHUVAN *et al.*, 2022). In addition, the purification steps contribute to the high price of the R-PE with high purity index, which was demonstrated by the phycobiliproteins market in 2018, which reached a value of USD 112.3 million, with expectations of doubling it in 2028 (TAN *et al.*, 2021b). Only the market of dyes intended for food projects USD 3.75 billion by 2022, with a large trend and share of natural pigments (ARYEE; AGYEI; AKANBI, 2018).

Considering that R-PE is an intracellular compound, cell wall disruption methods are required for its release during the extraction process. Several methods are reported in the literature, such as maceration, ultrasonication, and homogenization (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000b; NAIR *et al.*, 2018; SUDHAKAR *et al.*, 2015b; WANG *et al.*, 2015) and the combination of two or more methods to improve the extraction yield and pigment purification (LE GUILLARD *et al.*, 2015). However, the presence of large concentrations of polysaccharides in the cell wall of red macroalgae hinders the efficiency of the extraction and affects the purification steps, requiring several unit operations to achieve a high yield and

efficiency (DUMAY *et al.*, 2013; MITTAL *et al.*, 2017), noting that the addition of these operations is inversely proportional to the final yield of the product. The use of enzymes in the extraction step of R-PE from red macroalgae demonstrates the efficiency of this method in terms of increasing the yield in extract, being an alternative to traditional methods. The enzymes acted by breaking the cell wall of the *Grateloupia*, *Gelidium* and *Palmaria* macroalgae genus and others, facilitating the extraction of R-PE (DUMAY *et al.*, 2013; LE GUILLARD *et al.*, 2015; MENSI *et al.*, 2012; MITTAL; RAGHAVARAO, 2018; SALURI; KALDMÄE; TUVIKENE, 2019; WANG *et al.*, 2020).

The red macroalgae *Solieria filiformis*, (Solieriaceae, Gigartinales), is an economically important specie due to the presence of pure hydrocolloid iota-carrageenan in its composition (MURANO *et al.*, 1997). In its vegetative phase, *S. filiformis*, with a branched cylindrical filamentous thallus, presents cortical and medullary zones distinct from each other, with its cortex composed of four pigmented layers and its depigmented medulla. The cell wall of this alga is composed of a non-fibrillar amorphous matrix rich in ι-carrageenan and, as it belongs to the Florideophyceae class, by cellulose microfibrils (DE ARAÚJO *et al.*, 2011a; KLOAREG *et al.*, 2021; PERRONE; CECERE, 1994; STIGER-POUVREAU; BOURGOUGNON; DESLANDES, 2016). From this, strategies aiming at the maximum use of the biomass of *S. filiformis* can be implemented, since the ι-carrageenan is present in the residues of R-PE extractions, promoting the concept of biorefinery.

Therefore, knowing the economic potential of the red macroalgae *S. filiformis*, this work proposes to evaluate the localization of the R-PE in the macroalga thallus, the extraction and effect of the cellulase on yield and purity index of the pigment extracted from this specie. A brief micrographic analysis was carried out regarding the influence of freeze-thawing on this alga.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Algal Biomass

The red seaweed *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson was harvested from farming structures kept by Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG), located approximately 200 meters from the shore in the Flecheiras beach (03° 13' 06" S and 39° 16' 47" W), Trairí, Ceará, Brazil. The macroalga was transported in black plastic bags to the laboratory, where it was thoroughly washed with fresh water to remove epiphytes, salt, and sand. Then it was washed with distilled water and stored at -20° C until its use.

2.2 Chemicals

The analytical grade phosphate salts were acquired from Synth. Cellulase from *Aspergillus niger* (C1184), which is endoglucanase, and the Cellic CTec2 (SAE0020), a cellulase enzymes blend which is composed of β -glucosidases and different types of cellulases, were acquired from Sigma-Aldrich. All other reagents used in the study were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.3 Laser confocal microscopy of *S. filiformis* thallus

The *Solieria filiformis* thallus before and after thawing was cut transversally with a razor. Soaked in saline solution, the sections were arranged on slides and covered with coverslips. Subsequently, observations were immediately made under the Zeiss® Laser 543 1633 Confocal Optical Microscope, available at the UFC Analytical Centre. The R-PE found in the macroalga *S. filiformis* cells was excited at 488 nm and 633 nm, and the fluorescence emission peak was detected by the filters at 493-591 nm and 647-721 nm. The fluorescence of R-PE was represented in green colour.

2.4 R-PE enzymatic extraction from *S. filiformis*

Different concentrations of cellulase from *A. niger* (40, 60, 80, 120, 160, and 200 U g⁻¹ wet macroalga) from weighing, and Cellic CTec2 (5, 10, 20, 30 40, 60, 80, 120, 160, and 200 U g⁻¹ wm) from pipetting were evaluated. The wet macroalga (wm) was thawed, ground in an electric mill and then transferred to 50-mL falcon tubes with 25 mM phosphate buffer, pH 6.5 at a proportion of 1/26 (w/v), for each concentration of each enzyme. The reaction mixtures were incubated at 25 °C under stirring in a shaker incubator protected from light at 100 rpm for 6 h. The fixed conditions were selected following preliminary data about the stability of this pigment from this macroalga and its extraction productivity, and other reports in the literature. Subsequently, the material was centrifuged at 17,000 x g, 4 °C for 30 min. The content of R-PE and the pigment purity index were determined in supernatants. The negative control was performed without the addition of an enzyme. All reactions were performed in triplicate.

2.5 Optimization of the R-PE enzymatic extraction from *S. filiformis*

The effects of enzyme concentration (X₁), temperature (X₂), and reaction time (X₃) on the R-PE yield (Y₁) and R-PE purity index (Y₂) were evaluated. A 2³ Central Composite Rotational Design (CCRD), with 17 assays (8 factorial points, 6 axial points and 3 replicates in the central point) was performed for each enzyme, cellulase from *A. niger* (CCRD-A) and Cellic CTec2 (CCRD-B). Each factor in the designs was studied at three different levels (-1, 0 and +1), as shown in Table 1, as performed by Dumay *et al.* (2013), with modifications, to determine the best conditions for R-PE yield (Y₁) and purity index (Y₂). The range of the variable was defined by the preliminary assay (2.4) and from other reports in the literature. In the end, the material obtained in all reactions was centrifuged at 17,000 x g, 4 °C for 30 minutes. The supernatant obtained was evaluated as to the content of R-PE, and as the pigment purity index.

Table 1 – Coded and actual values of the independent variables used in the experimental designs for the optimization of the hydrolysis of *Solieria filiformis* biomass.

Experimental Design	Independent Variables	Unit	Coded and actual levels		
			-1	0	+1
CCRD-A	Enzyme concentration	U g ⁻¹ wm	80	120	160
	Temperature	°C	25	30	35
	Reaction time	h	4	5	6
CCRD-B	Enzyme concentration	U g ⁻¹ wm	40	80	120
	Temperature	°C	25	30	35
	Reaction time	h	4	5	6

The experimental data sets of the CCRDs experiments were used to fit the second-order equations (Eq. 1) by Response Surface Methodology, for each response variable, in which Y represent the response variables (R-PE yield and R-PE purity index).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Where β_0 is the constant coefficient; $X_i X_j$ is the independent variable that influences the response variables Y; β_i is the linear coefficient relative to I; β_{ii} is the quadratic coefficient relative to I; β_{ij} is the interaction coefficient relative to ij; k is the number of factors. The quality of the fit of the polynomial model equation was expressed as the coefficient of determination, R^2 and adjusted coefficient of determination, R^2_{adj} (FERREIRA *et al.*, 2021; SVETLIZKY *et al.*, 2022).

The hydrolysis reactions of the wet biomass were carried out in 50-mL falcon tubes with 25 mM phosphate buffer, pH 6.5. The reaction mixtures were incubated under stirring in a shaker incubator protected from light at 100 rpm. After that, the materials were centrifuged at 17,000 x g, 4 °C for 30 min. The content of R-PE and the pigment purity index were determined in supernatants.

2.6 Spectroscopy

The concentration of R-PE of *S. filiformis* resulting from each hydrolysis reaction was determined in a spectrophotometer (Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro), from Equation 2 proposed by Sampath-Wiley and Neefus (2007):

$$R - PE \left(\frac{mg}{ml} \right) = 0,1247 [(A_{564} - A_{730}) - 0,4583 (A_{618} - A_{730})] \quad (2)$$

Where A_{564} , A_{730} e A_{618} were the absorbances at 564, 730 and 618 nm, respectively.

Equation 3, proposed by Senthilkumar *et al.* (2013), was used for the purity index calculations of R-phycoerythrin:

$$PI = \frac{A_{564}}{A_{280}} \quad (3)$$

Where A_{564} e A_{280} were the absorbances at 564 and 280 nm, respectively

The R-PE yield ($mg\ g^{-1}\ wm$) was calculated according to Equation 4:

$$Y_{R-PE} = \frac{R - PE_c}{Sf} \quad (4)$$

Where $R-PE_c$ was the content present in the extraction supernatants (mg) and Sf was the mas of the wet macroalga (wm) used at the extraction (g).

The absorbances were measured in spectrophotometer Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro. The conversions from wet mass to dry mass were performed considering that after thawing and grinding, the mass of the dry macroalga (dm) is $4.85 \pm 0.26\ %$ (data previously collected by the research group).

2.7 Statistical analysis

The results were expressed as means \pm SD. (Standard Deviation). To verify the statistical differences between the groups, the method of analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's test of comparisons of means at a significance level of 95%. The statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software version 6.01 for Windows, GraphPad Software (La Jolla, California, USA). The experimental designs for CCRD and their analysis were carried out by using the software STATISTICA (version 14.0, TIBCO Software Inc.). The regression coefficients (linear, quadratic and interaction) involved in the models were investigated by the Pareto analysis of variance at a significance level of 95%.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Laser confocal microscopy of *S. filiformis* thallus

For the first time, it was possible to carry out a study on the influence of the freezing preservation process of the macroalgae *Solieria filiformis* using laser confocal microscopy.

The laser confocal micrographs of the thallus from *S. filiformis* before and after thawing were shown in Figure 1. The transverse section of the thallus from freshly harvested macroalga shown in Fig. 1a presents the smooth cylindrical aspect of the thallus with the fluorescence of the cortical cells evidencing the presence of the R-PE only in these cells, not been observed the pigment in medullar cells of the thallus centre, as described by Perrone and Cecere (1994). Figure 1b shows the integrity of the pigmentation along the cortex. The presence of the R-PE and its fluorescence in the cortical cells were preserved (Fig. 1c), although the freeze-thaw process caused wrinkles in the thallus surface and small depigmented regions (Fig. 1d).

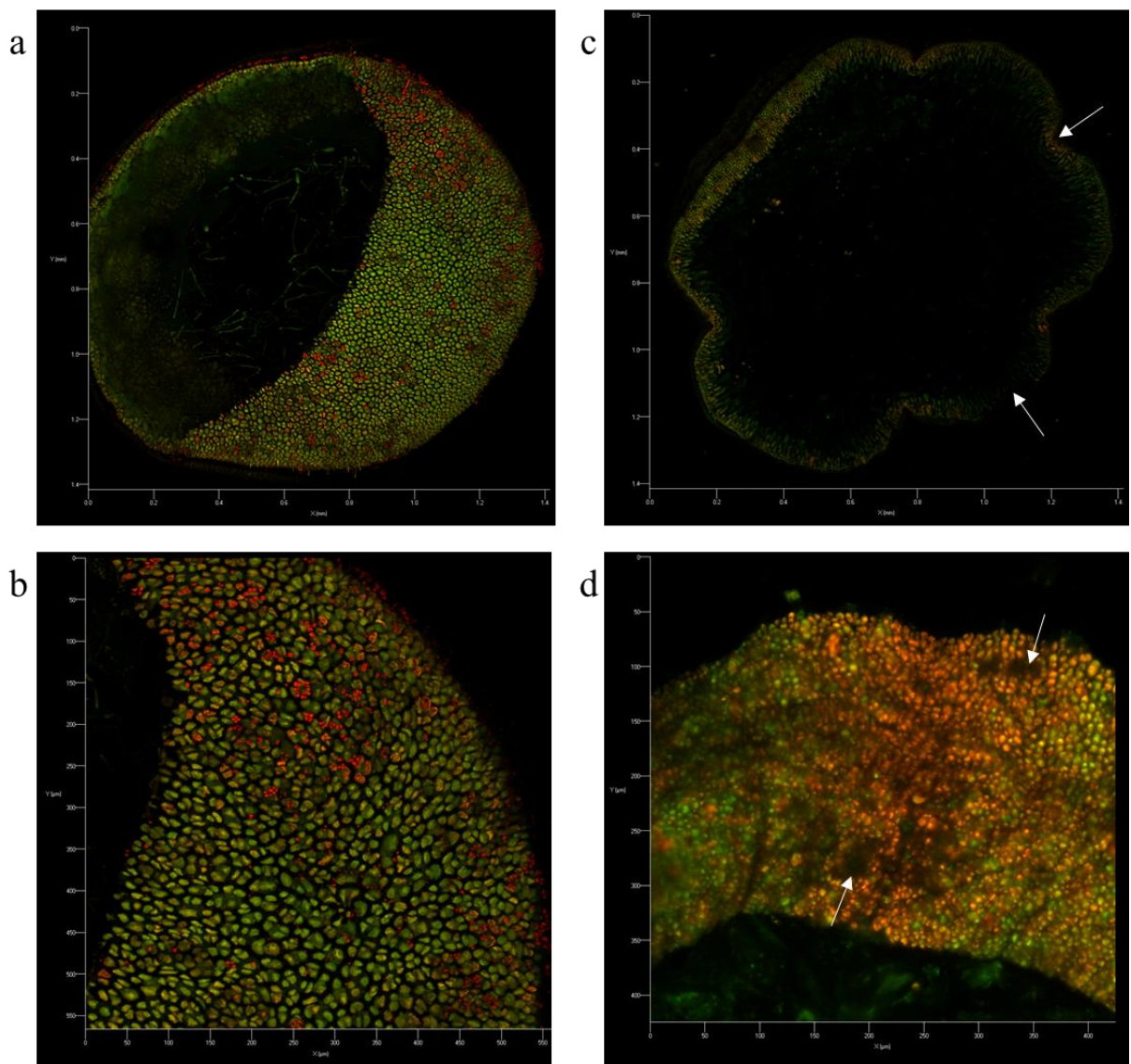
Freezing is one of the most used methods to preserve macroalgae biomass for phycobiliproteins extraction. The changes observed in the micrographs may have been caused by the formation of ice that causes damage to the cellular structures, such as colour modification, softening of the thallus and loss of intracellular material by dripping (LI; ZHU; SUN, 2018). As they were stored at - 20°C, such as slow freezing, there was probably initial ice formation in the intercellular spaces, causing the transport of intracellular water out of the cells due to the osmotic gradient. For this reason, there was the formation of large extracellular ice crystals, cell dehydration and thus their deformation, causing cell shrinkage and cell membrane integrity loss, leading to cell death (REID, 1997; SCHUDEL; PRAWIRANTO; DEFRAEYE, 2021).

Thus, during thawing there is a decrease in the intracellular compounds, such as R-FE, due to denaturation caused by the osmotic gradient and extravasation, which explains the depigmented regions in the micrographs, and, therefore, causes a negative impact on the recovery of this pigment (ALBERS *et al.*, 2021; LI; ZHU; SUN, 2018).

Although there is a loss of intracellular material, it is known that the freeze-thaw process can assist the process of biomolecules extraction. Thus, to circumvent this problem,

combined biochemical and physical extraction methods, such as the application of enzymes associated with homogenization, may be implemented to take better advantage of the algae structure damaged by this preservation step. Therewith, larger quantities of R-FE can be extracted, which can be associated with the optimization of the phycocolloid extraction, as the iota-carrageenan that is present in the residue of the extraction of this pigment.

Figure 1- Laser confocal microscopy of cross-sections of the thallus from *S. filiformis* before and after thawing

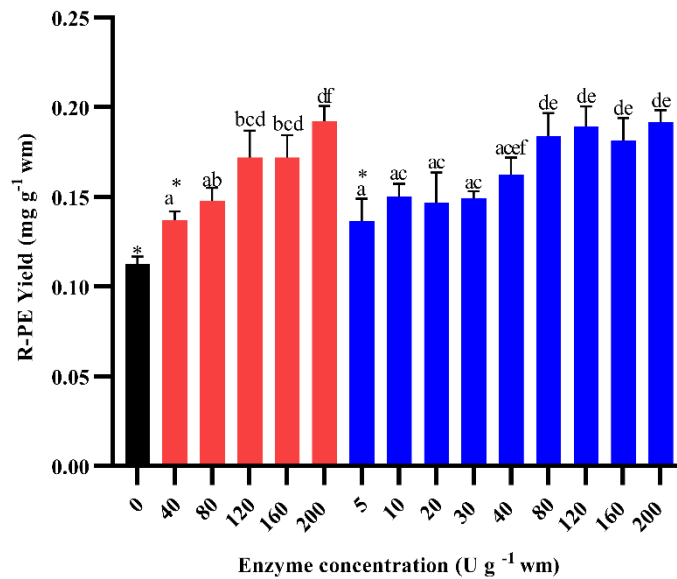


Source: Prepared by the author. Legend: a,b - transversal section of the fresh thallus of *Solieria filiformis*. c,d - transversal section of the thallus of *Solieria filiformis* after the freeze-thaw process. White arrows indicate wrinkling and depigmentation of the thallus.

3.2 R-PE enzymatic extraction from *S. filiformis*

In the extraction of R-PE from *S. filiformis* performed with Enz-A, the minimum and maximum yields found were 0.1371 ± 0.0048 and 0.1921 ± 0.0086 mg g⁻¹ wm, respectively, which represented 21.5% and 70.2% more pigment than the concentration found in the without enzyme extraction (0.1128 ± 0.0039 mg g⁻¹ wm). Fig. 2 show that only the extraction performed with 40 U g⁻¹ wm did not significantly differ from the control. The concentration of 120 U g⁻¹ wm there was no significant difference among the concentrations 80, 160 e 200 U g⁻¹ wm and reached 0.1719 ± 0.0150 mg g⁻¹ wm, being 52.39% more than the control and the best condition for extraction of R-PE.

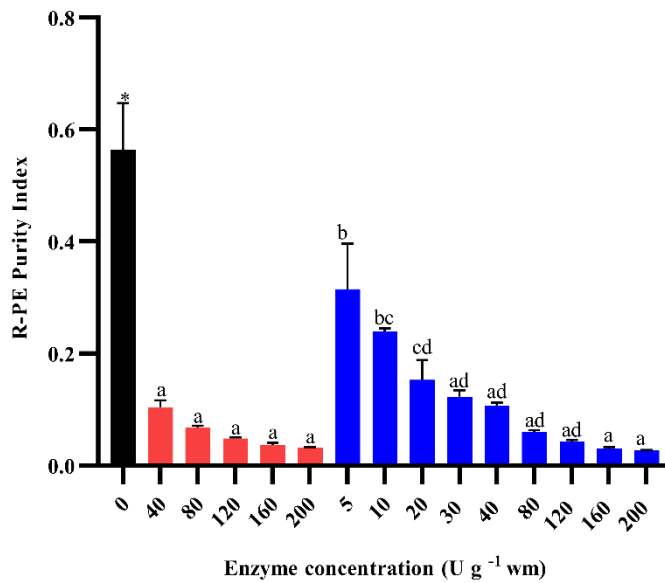
Figure 2- Effect of Enz-A and Enz-B on the yield of R-PE from *S. filiformis*



Source: Prepared by the author. Legend: Bar in black - extraction without enzyme. Bars in red – extraction performed with Enz-A. Bars in blue – extraction performed with Enz-B. The results were analysed by one-way ANOVA, followed by the Turkey test ($p < 0.05$). All means were calculated based on triplicates. Bars marked with asterisks and/or equal letters showed no statistical difference.

Figure 3 shows the purity index of R-PE from *S. filiformis* extracted with Enz-A. The R-PE extracted without Enz-A presented a PI of 0.5641 ± 0.0827 , being higher than the R-PE extracted with Enz-A. The concentration of 40 U g⁻¹ w_m the PI was 0.1041 ± 0.0121 , 5.4 times lower than the control. The addition of enzymes caused an increase in absorbance measured at 280 nm.

Figure 3 - Effect of Enz-A and Enz-B on the purity index of R-PE from *S. filiformis*



Source: Prepared by the author. Legend: Bar in black - extraction without enzyme. Bars in red – extraction performed with Enz-A. Bars in blue – extraction performed with Enz-B. The results were analysed by one-way ANOVA, followed by the Turkey test ($p < 0.05$). All means were calculated based on triplicates. Bars marked with asterisks and/or equal letters showed no statistical difference.

The extraction of R-PE with Enz-B showed minimum and maximum yields of 0.1366 ± 0.0124 and 0.1916 ± 0.0068 mg g⁻¹ w_m respectively, which represented 21.08% and 69.79% more pigment than found in extraction without Enz-B (Fig. 2). Only the extraction performed with 5 U g⁻¹ w_m, did not present a significant difference of the R-PE extraction without enzyme. Following a similar profile to the extraction performed with Enz-A, the concentration of 80 U g⁻¹ w_m, was not significantly different from the 40, 120, 160 and 200 U

g^{-1} wm. Therefore, this concentration reached $0.1840 \pm 0.0127 \text{ mg g}^{-1} \text{ wm}$, being 63.12% higher than extraction without Enz-B. However, $80 \text{ U g}^{-1} \text{ wm}$ concentration was chosen as the best condition for extraction of R-PE with Enz-B.

Regarding the PI of R-PE, the extractions carried out with Enz-B presented also a significant reduction compared to the control, as shown in Fig. 3. However, differently from the profile presented for the extraction with Enz-A, there was a gradual decrease with increasing enzyme concentration, which stabilized in the concentration of $160 \text{ U g}^{-1} \text{ wm}$ with a value of 0.0303 ± 0.0027 , 18.5 times lower than that achieved by the control.

Both enzymes, Enz-A and Enz-B, presented better yields of R-PE from *S. filiformis* when compared with the control. However, it was necessary to use a lower concentration of Enz-B to achieve a 7.03% higher yield of R-PE compared to the best concentration found for Enz-A. This is because Enz-B is a mixture of cellulase enzymes of various types, which act synergistically to break the cellulose glycosidic bonds, while Enz-A is composed of only one type of cellulase, which proved to require a higher concentration to achieve a statistically similar value.

The addition of both enzymes in the step of extraction of R-PE from *S. filiformis* caused an increase in absorbance measured at 280 nm, reducing the purity of the extracts because these enzymes are also proteins. This result was different from that found by Wang *et al.* (2020). The authors observed that the use of agarase for extraction of R-PE from *Pyropia yezoensis* increased the purity index of the pigment. This difference in results should be evaluated together with the scope of the works and the polysaccharide composition of the studied species. Wang *et al.* (2020) conducted a study that aimed to achieve the best yield of R-PE using an enzyme that degrades agar. In the present work, the aim was to achieve better yields of R-PE, preserving the structure of iota-carrageenan present in the extraction residues, which can be used in a biorefinery conception for the best use of macroalgae biomass. For this reason, only cellulase enzymes were used.

3.3 Optimization of the R-PE enzymatic extraction from *S. filiformis*

The yield and purity index of the R-PE extracted from *S. filiformis* obtained for the conditions tested in CCRD-A are shown in Table 2. The highest yield of R-PE was achieved at

160 U g⁻¹ wm, 35 °C and 6 h (assay 8), being 0.2106 mg g⁻¹ wm (equivalent value to 4.3422 mg g⁻¹ dm) and PI of 0.0398. Already the highest PI was verified at 80 U g⁻¹ wm, 35 °C and 6 h (assay 4), being 0.0544. This implied that the combination of the three variables at their highest levels led to a higher yield of R-PE, but with a low purity index, which may be due to the presence of cellulase in the solution.

Table 2 - Experimental matrix with the values (levels) of the dependent and independent variables evaluated in the CCRD-A for the R-Phycoerythrin extraction from *Solieria filiformis*

Assay number	Independent Variables			Dependent Variable	
	Enzyme Concentration (U g ⁻¹ wm), X ₁	Temperature (°C), X ₂	Time (h), X ₃	R-PE yield (mg g ⁻¹ wm), Y ₁	R-PE purity index, Y ₂
1	80.0	25.0	4.0	0.1075	0.0429
2	80.0	25.0	6.0	0.1282	0.0464
3	80.0	35.0	4.0	0.1549	0.0476
4	80.0	35.0	6.0	0.1759	0.0544
5	160.0	25.0	4.0	0.1422	0.0255
6	160.0	25.0	6.0	0.1457	0.0271
7	160.0	35.0	4.0	0.1734	0.0326
8	160.0	35.0	6.0	0.2106	0.0389
9	52.7	30.0	5.0	0.1285	0.0529
10	187.3	30.0	5.0	0.1582	0.0271
11	120.0	21.6	5.0	0.1322	0.0323
12	120.0	38.4	5.0	0.1924	0.0415
13	120.0	30.0	3.3	0.1343	0.0327
14	120.0	30.0	6.7	0.1582	0.0370
15	120.0	30.0	5.0	0.1567	0.0370
16	120.0	30.0	5.0	0.1484	0.0336
17	120.0	30.0	5.0	0.1517	0.0345

Source: Prepared by the author. Data shown are the mean ± SD, n = 3.

The R² and adjusted R²_{adj} were determined for the two dependent variables being, respectively, 0.95 and 0.90 for Y₁, and 0.97 and 0.94 for Y₂, which indicated a good model fit for extraction of the R-PE from *S. filiformis* in presence of the Enz-A. The regression equations

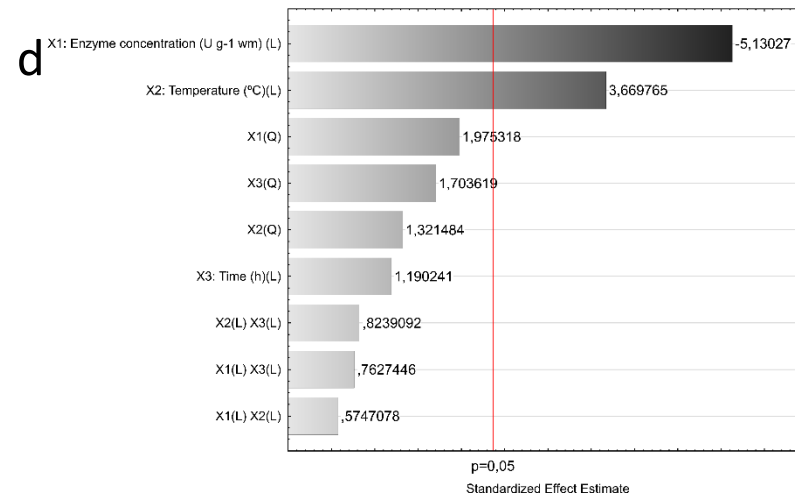
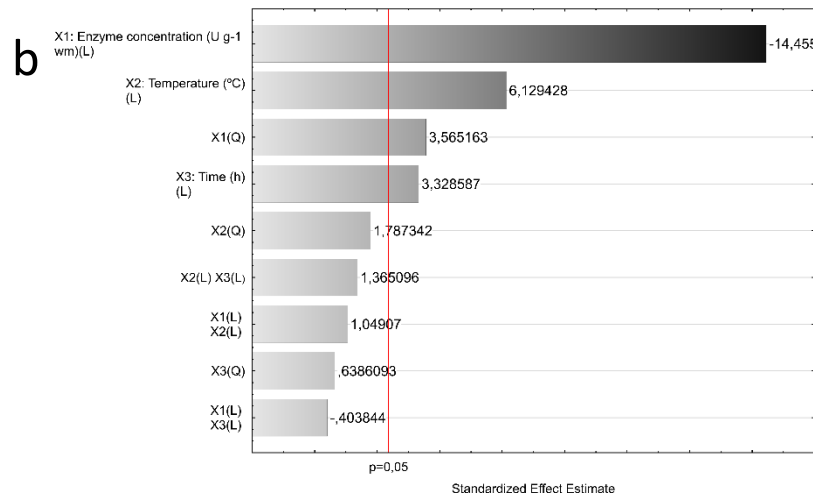
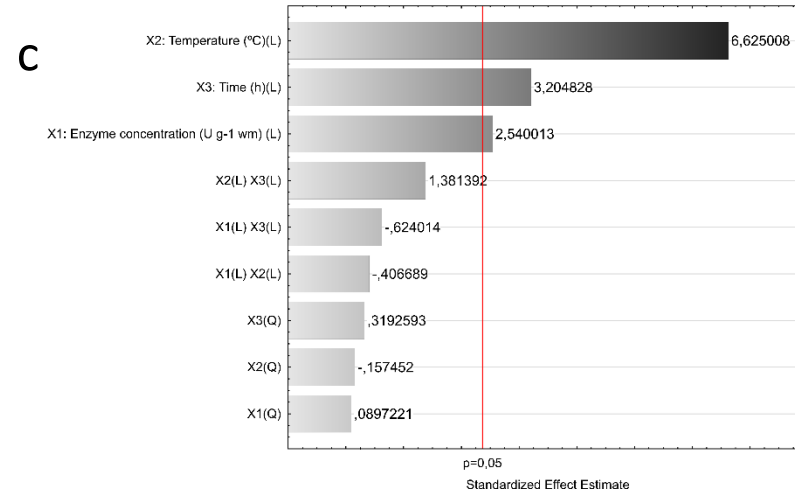
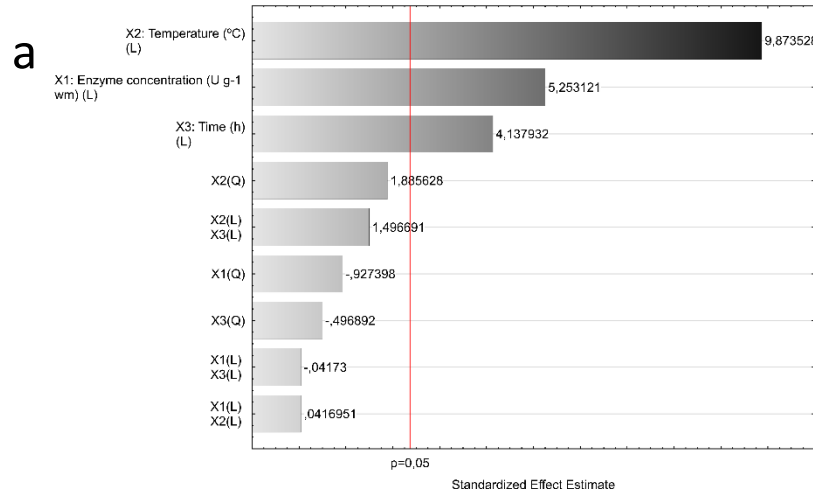
5 and 6 represent the yield and purity index of R-PE extracted from *S. filiformis* in presence of the Enz-A:

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & 1.84 \times 10^{-1} + 6.13 \times 10^{-4} \times X_1 - 1.38 \times 10^{-6} \times X_1^2 - 1.08 \times 10^{-2} \times X_2 \\
 & + 1.79 \times 10^{-4} \times X_2^2 + 5.9 \times 10^{-7} \times X_1 X_2 - 2.95 \times 10^{-6} \times 5X_1 \\
 & + 8.47 \times 10^{-4} \times 5X_2 - 5.09 \times 10^{-2}
 \end{aligned} \tag{5}$$

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & 1.38 \times 10^{-1} + 6.10 \times 10^{-4} \times X_1 - 1.37 \times 10^{-6} \times X_1^2 - 3.41 \times 10^{-3} \times X_2 \\
 & + 4.40 \times 10^{-5} \times X_2^2 + 3.83 \times 10^{-6} \times X_1 X_2 - 7.39 \times 10^{-6} \times 5X_1 \\
 & + 1.99 \times 10^{-4} \times 5X_2 - 2.60 \times 10^{-2}
 \end{aligned} \tag{6}$$

The three independent variables influenced positively the increase in R-PE yield extratecnt ($p < 0.05$), with the temperature being the most determinant, as shown in the Pareto chart (Fig. 4a). No interaction achieved a significant effect on the yield of pigment obtained. There was also no significant influence of the interactions on the pigment purity index, except for the quadratic effect of enzyme concentration (Fig. 4b). On the other hand, it was possible to identify that the enzyme concentration influenced negatively the purity index ($p < 0.05$), contrary to the effects of temperature and time. Thus, although higher yields were observed, the presence of the enzyme in the extracts led to low rates of pigment purity. However, as it is a step to obtain larger amounts of R-PE and consider economic factors and the final application of the pigment, subsequent separation and purification steps may circumvent this effect (DUMAY *et al.*, 2015; GU *et al.*, 2018; XU; WANG; HOU, 2020). It is important to mention that the presence of polysaccharides in R-PE extracts by traditional methods results in solutions with high viscosity, hindering the subsequent purification steps, such as ultrafiltration and chromatography. It is suggested that the use of enzymes in the extraction of R-PE may reduce the viscosity of the medium, improving the conditions of pigment purification.

Figure 4 - Pareto standard graphs for the effects of the process parameters on the R-PE yield and R-PE purity index.



Source: Prepared by the author. Legend: Effects of the process parameters with Enz-A on (a) R-PE yield, (b) R-PE purity index, and with Enz-B on (c) R-PE yield, (d) R-PE purity index under a statistical significance of $p < 0.05$.

In the response surface graphs (Fig. 5), in which the influences of the interactions of two factors are presented, fixing the third factor at level 0, it was also possible to visualize the linear influence of the independent variables for both the yield and the purity index of R-PE from *S. filiformis*, being that for the yield the highest levels tested (enzyme concentration: 160 U/g wet biomass; temperature: 35 °C; time: 6 h) reached better results (Fig. 5 a-c). Meanwhile, for pigment purity, lower concentrations led to better values (Fig. 5 d-e), with temperature and time more preponderant for obtaining better values for this response variable (Fig. 5 d-f).

In turn, the yield and purity index of the R-PE extracted from *S. filiformis* obtained for the conditions tested in CCRD-B are shown in Table 3. Similarly, the highest yield of R-PE was achieved at 120 U g⁻¹ wm, 35 °C and 6 h (assay 8), being 0.2100 mg g⁻¹ wm (equivalent value to 4.3298 mg g⁻¹ dm) and PI of 0.0524. Already the highest PI was verified at 40 U g⁻¹ wm, 35 °C and 6 h (assay 4), being 0.0739. This implied that the combination of the three independent variables at their highest levels led to a higher yield of R-PE, but with a low purity index, which may be due to the presence of enzymes in the solution.

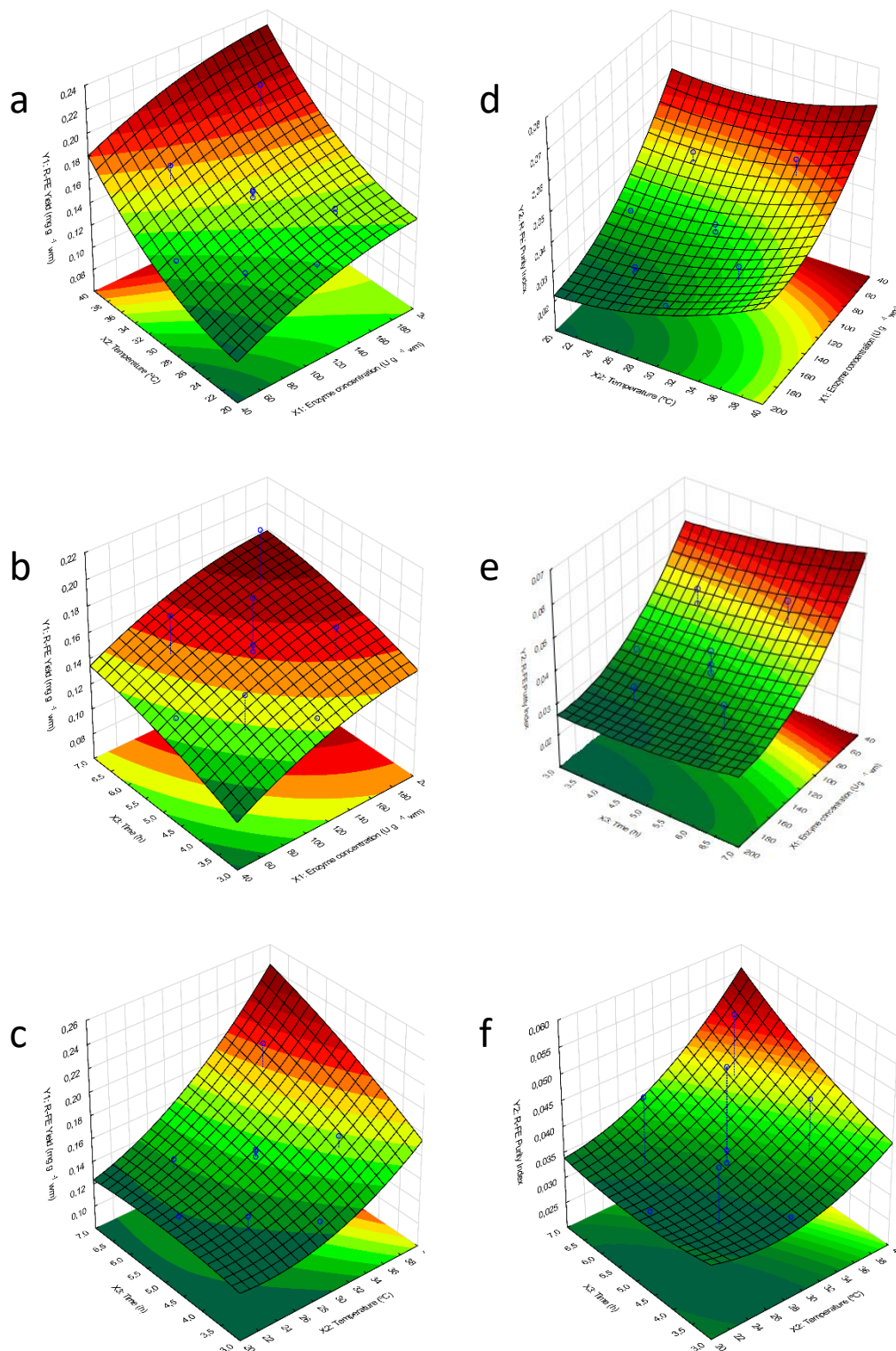
The regression equations 7 and 8 were for the yield and purity index of R-PE extracted from *S. filiformis* in presence of the enzyme blend, respectively.:

$$Y_1 = 7.74 \times 10^{-2} + 8.67 \times 10^{-4} \times X_1 + 2.27 \times 10^{-7} \times X_1^2 + 5.47 \times 10^{-4} \times X_2 - 2.55 \times 10^{-5} \times X_2^2 - 9.79 \times 10^{-6} \times X_1 X_2 - 7.51 \times 10^{-5} \times 5X_1 + 1.33 \times 10^{-3} \times 5X_2 - 1,42 \times 10^{-1} \quad (7)$$

$$Y_2 = 1.18 \times 10^{-1} - 8.26 \times 10^{-4} \times X_1 - 1.45 \times 10^{-2} \times X_2 + 8.48 \times 10^{-6} \times X_1 X_2 + 5.63 \times 10^{-5} \times 5X_1 + 4.86 \times 10^{-4} \times 5X_2 - 8.21 \times 10^{-2} \quad (8)$$

The values of R² and adjusted R²_{adj} were determined for the two response variables being, respectively, 0.90 and 0.77 for Y₁, and 0.87 and 0.71 for Y₂, which indicated for both cases that the model adjusted to the variability data. However, it was reasonable concerning the model improvement, but with values close to 0.80 (SVETLIZKY *et al.*, 2022).

Figure 5 - Response Surface Graphs showing the interactions of the effects between two variables on the R-PE yield and its purity index, for the model carried out with Enz-A.



Source: Prepared by the author. Legend: a – the interactive effect of enzyme concentration and temperature on R-PE yield, b – the interactive effect of enzyme concentration and time on R-PE yield, c - the interactive effect of temperature and time on R-PE yield, d - the interactive effect of enzyme concentration and temperature on R-PE purity index, e - the interactive effect of enzyme concentration and time on R-PE purity index, and f – the interactive effect of temperature and time on R-PE purity index.

Table 3 - Experimental matrix with the values (levels) of the dependent and independent variables evaluated in the CCRD-B for the R-Phycocerythrin extraction from *Solieria filiformis*

Assay number	Independent Variables			Dependent Variable	
	Enzyme Concentration (U g ⁻¹ wm), X ₁	Temperature (°C), X ₂	Time (h), X ₃	R-PE yield (mg g ⁻¹ wm), Y ₁	R-PE purity index, Y ₂
	1	40.0	25.0	4.0	0.0953
2	40.0	25.0	6.0	0.1232	0.0476
3	40.0	35.0	4.0	0.1481	0.0671
4	40.0	35.0	6.0	0.1803	0.0739
5	120.0	25.0	4.0	0.1449	0.0200
6	120.0	25.0	6.0	0.1384	0.0261
7	120.0	35.0	4.0	0.1676	0.0434
8	120.0	35.0	6.0	0.2100	0.0524
9	12.7	30.0	5.0	0.1346	0.0570
10	147.3	30.0	5.0	0.1429	0.0246
11	80.0	21.6	5.0	0.0975	0.0280
12	80.0	38.4	5.0	0.1744	0.0444
13	80.0	30.0	3.3	0.1219	0.0316
14	80.0	30.0	6.7	0.1608	0.0462
15	80.0	30.0	5.0	0.1512	0.0326
16	80.0	30.0	5.0	0.1414	0.0322
17	80.0	30.0	5.0	0.1446	0.0338

Source: Prepared by the author. Data shown are the mean \pm SD, n = 3.

The Enz-B has in its composition cellulases and β -glucosidases, that act synergistically to transform cellulose into smaller molecules. Nevertheless, inhibition processes or even access problems of some of these enzymes to their respective substrates may have occurred, which was also described by Mittal and Raghavarao (2018) for the cellulase assay.

The Pareto chart presented in Fig. 4c corroborates this information when it shows a low positive influence of the enzyme concentration on the yield of R-PE extracted ($p < 0.05$). Through Fig. 4c it was possible to verify that besides the enzyme concentration, temperature and time also influenced positively the increase of R-PE yield. No interaction reached a significant effect on the amount of pigment obtained. For the pigment purity (Fig. 4d), it was possible to see that time did not present a significant influence, unlike the other linear variables.

Similar to the profile seen for the design performed with the Enz-A, the enzyme concentration negatively influenced the purity index ($p < 0.05$), contrary to the effect of temperature.

The response surface graphs (Fig. 6a-c) show the linear influence of the independent variables on the R-PE yield, being the highest levels tested (enzyme concentration: 120 U g⁻¹ wm, temperature: 35 °C, time: 6 h) reached the best results. Meanwhile, for the purity index, the time did not influence significantly (Fig. 6e-f), while it was possible to see the high influence of temperature and enzyme concentration (Fig. 6d-f). For the concentration, it was important that the lower its value, the better the purity indexes, on the other hand, for the temperature, the higher values were more important for the purity of the pigment.

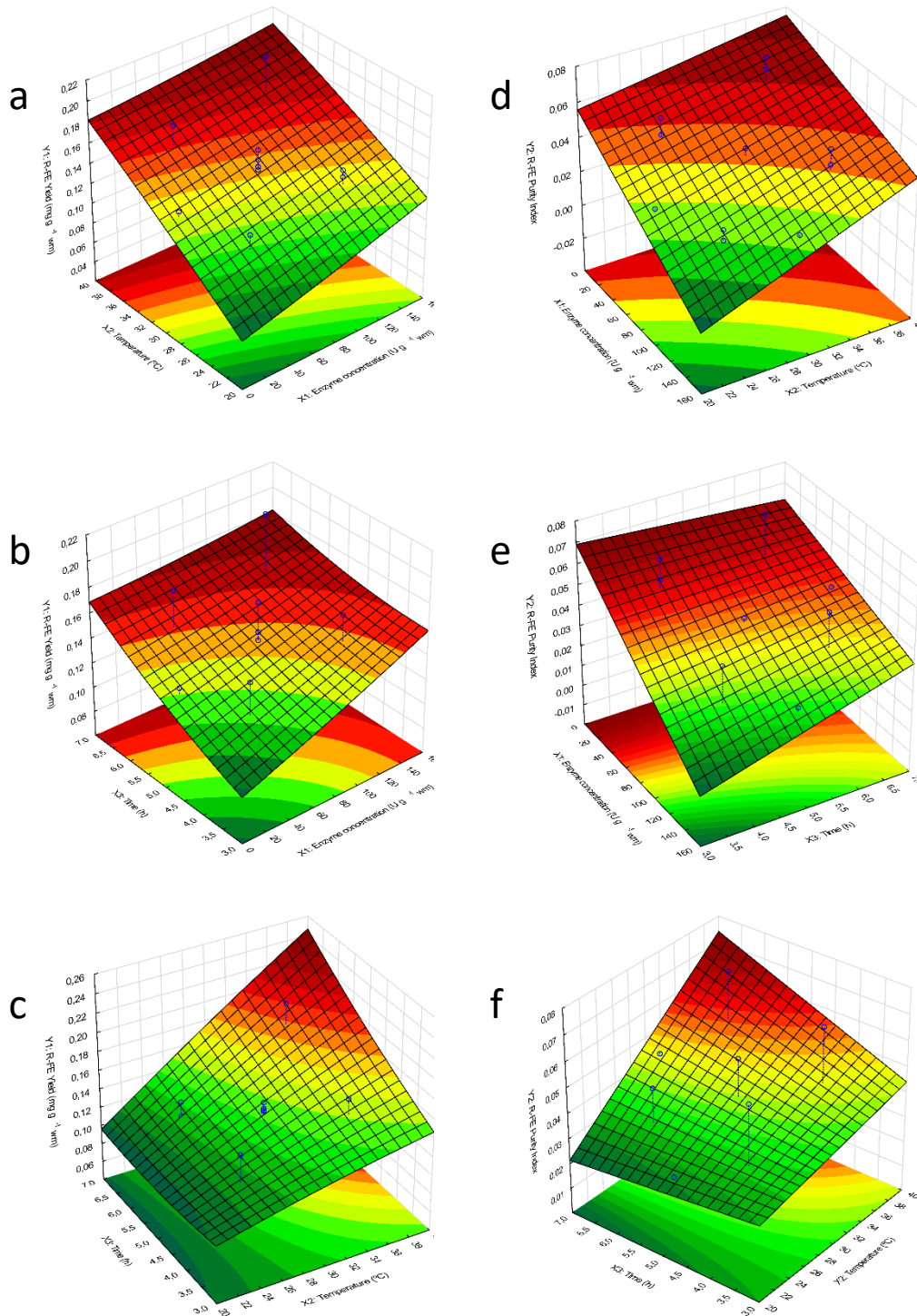
Similar R-PE yields were achieved in both models studied above, highlighting that for the cellulase blend enzyme, higher purity was achieved than for Enz-A. However, considering the R² and adjusted R²_{adj} values, the extraction with Enz-B demonstrated the need for adjustments, such as performing tests with other variables or even replacing the levels studied. Therefore, the extraction in the presence of Enz-A showed better results, reaching an optimization of 86.70% higher than the method without enzyme.

The temperature proved to be the most relevant variable for this study. Although its value for ideal R-PE extraction is close to 25 °C (DUMAY *et al.*, 2013; MITTAL; RAGHAVARAO, 2018; WANG *et al.*, 2020), for the present work higher temperatures (around 35 °C) proved to be more relevant, a value close to that found by Mittal and Raghavarao (2018) (31 °C) for the assay performed with cellulase. The temperature is an important factor because R-PE is a protein pigment that may suffer denaturation processes under thermal stress. However, under the temperature of 35 °C, the R-PE from *S. filiformis* does not suffer denaturation, according to preliminary data.

Various factors such as species, seasonality, depth of cultivation ropes at sea, and other cultural conditions can directly influence the results (RAMUS *et al.*, 1976; WANG *et al.*, 2020). The robust presence of polysaccharides in the cell wall of macroalgae is also a preponderant factor. However, the present work demonstrated that it is possible to perform an extraction method with the aid of enzymatic hydrolysis also for a carrageenophytic red alga present and cultivated on the Brazilian Northeast coast. This promotes the importance of this biomass to obtain various bioproducts under a concept of biorefinery since the *Solieria filiformis* is a source of ι-carrageenan, (which would be integrated into the residue of this

extraction) as well as lectins and other biomolecules of interest. A relevant value of R-PE was reached, including this species in the list of sources of this commercially important pigment.

Figure 6 - Response Surface Graphs showing the interactions of the effects between two variables on the R-PE yield and its purity index, for the model carried out with Enz-B.



Source: Prepared by the author. Legend: a – the interactive effect of enzyme concentration and temperature on R-PE yield, b – the interactive effect of enzyme concentration and time on R-PE yield, c - the interactive effect of temperature and time on R-PE yield, d - the interactive effect of enzyme concentration and temperature on R-PE purity index, e - the interactive effect of enzyme concentration and time on R-PE purity index, and f – the interactive effect of temperature and time on R-PE purity index.

4 Conclusions

In this study, it was possible to briefly visualize the influence of the freezing preservation process on the integrity of the thallus of the macroalgae *Solieria filiformis*, while still preserving the pigmentation of the cortical cells. The thallus presented deformation with some depigmented regions because of the ice crystals formation. Further biochemical analyses are suggested to elucidate quantitatively the modifications undergone by this conservation stage on this macroalga. It was concluded that the presence of cellulase, either endoglucanase alone or cellulase mixture, increased the extraction yield of R-phycoerythrin if compared to the results with control. However, the cellulase mixture, composed of endoglucanase, exoglucanase and beta-glucose, showed a better result, since it required lower concentrations with better purity indices. Finally, it is also concluded that the extraction process with the addition of cellulase enzymes was optimized, with temperature having the greatest influence on the best yields of R-phycoerythrin in both designs, CCRD-A and CCRD-B. On the other hand, the enzyme concentration influenced negatively the purity index in both delineations. For CCRD-B the model showed to need adjustment, while for CCRD-A the model showed a good fit. Therefore, in this study, CCRD-A was the design chosen as the best for the optimization of the extraction process of R-phycoerythrin from *Solieria filiformis*.

Declaration of competing interest

The authors declare no financial interests or personal interests that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Thanks to Acrísio José Uchoa Bastos Filho (*in memorian*) for all the support and assistance in the execution of this work. Thanks to Antonia Carlota de Souza Lima for her support in the statistical analyses. Thanks to the Central Analítica of Federal University of Ceará for the support in the micrographs analysis. This work was carried out under the concession of a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) scholarship.

REFERÊNCIAS

- ABREU, T. M. *et al.* Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 111, p. 534–541, mai. 2018.
- ALBA, K.; KONTOGIORGOS, V. Seaweed polysaccharides (agar, alginate carrageenan). *In: Encyclopedia of Food Chemistry*. Amsterdam: Elsevier. p. 240–250. 2018.
- ALBERS, E. *et al.* Influence of preservation methods on biochemical composition and downstream processing of cultivated *Saccharina latissima* biomass. **Algal Research**, [s.l.], v. 55, p. 102261, mai. 2021.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (R-FE)**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/52412>. Acesso em: 09 mai. 2022a.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (C-FC)**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/52468>. Acesso em: 09 mai. 2022b.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (AFC)**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sial/a7472>. Acesso em: 09 mai. 2022c.
- ALTUG, H. *et al.* Advances and applications of nanophotonic biosensors. **Nature Nanotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 5–16, jan. 2022.
- ALVES, A. W. S. **Técnicas de maricultura da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* em Flecheiras, Trairi-Ceará: Rendimentos de biomassa e extração de ágar**. [S.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.
- ANDERSEN, R. A. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. Chichester: Wiley Blackwell, p. 1–20. 2013.
- ANDRADE, R. M. *et al.* In vitro inhibition of thrombin generation by sulfated polysaccharides from the marine alga *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson (Solieriaceae , Rhodophyta) Inibição in vitro de geração de trombina por polissacarídeos sulfatados da alga marinha. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, [s.l.], v. 5, p. 1–10, 2017.
- APT, K. E.; COLLIER, J. L.; GROSSMAN, A. R. Evolution of the phycobiliproteins. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 248, n. 1, p. 79–96, 1995.
- ARYEE, A. N. A.; AGYEI, D.; AKANBI, T. O. Recovery and Utilization of Seaweed Pigments in Food Processing. **Current Opinion in Food Science**, [s.l.], v. 19, p. 113–119, 2018.
- AUNG, T.; KIM, S. J.; EUN, J. B. A hybrid RSM-ANN-GA approach on optimisation of extraction conditions for bioactive component-rich laver (*Porphyra dentata*) extract. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 366, p. 130689, jan. 2022.
- BAGHEL, R. S. *et al.* Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. **Green Chem.**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 2436–2443, 2015.
- BALINA, K.; ROMAGNOLI, F.; BLUMBERGA, D. Seaweed biorefinery concept for sustainable use of marine resources. **Energy Procedia**, [s.l.], v. 128, p. 504–511, 2017a.

BALINA, K.; ROMAGNOLI, F.; BLUMBERGA, D. Seaweed biorefinery concept for sustainable use of marine resources. **Energy Procedia**, [s.l.], v. 128, p. 504–511, 2017b.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. General Overview. In: BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. (Eds.). . **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. 2. ed. London: CRC Press., p. 1–48. 2014

BASTIAENS, L. *et al.* Biorefinery of algae: Technical and economic considerations. In: **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**. [s.l: s.n.]. p. 327–345.

BASTOS FILHO, A. J. U. **Purificação e caracterização do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha Solieria filiformis (Kützting) P. W. Gabrielson**. [S.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.

BAWEJA, P. *et al.* Biology of Seaweeds. In: FLEURENCE, J.; LEVINE, I. (Eds.). . **Seaweed in Health and Disease Prevention**. Lewiston: Elsevier Inc. p. 41–106. 2016.

BEDOUX, G. *et al.* Bioactive components from seaweeds: Cosmetic applications and future development. In: BOURGOUGNON, N. (Ed.). . **Advances in Botanical Research**. Vannes: Elsevier, v. 71p. 345–378. 2014a.

BEDOUX, G. *et al.* Bioactive Components from Seaweeds: Cosmetic Applications and Future Development. **Advances in Botanical Research**, [s.l.], v. 71, p. 345–378, 1 jan. 2014b.

BING, L. *et al.* **Efficient separation and purification method of Gracilaria verrucosa reagent grade R-phycoerythrin**, 2015. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/052312293/publication/CN104292316A?q=pn%3DCN104292316A> Acesso em: 12 mai. 2022

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (B-FE)**. Disponível em: <https://columbiabiosciences.com/product/surelight-b-phycoerythrin-b-pe>. Acesso em: 09 mai. 2022a.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (R-FE)**. Disponível em: <https://columbiabiosciences.com/product/surelight-r-phycoerythrin>. Acesso em: 09 mai. 2022b.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (R-FC)**. Disponível em: <https://columbiabiosciences.com/product/rpc>. Acesso em: 09 mai. 2022d.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (AFC)**. Disponível em: <https://columbiabiosciences.com/product/surelight-allophycocyanin-apc>. Acesso em: 09 mai. 2022c.

BOGORAD, L. Phycobiliprotein: Complementary Chromatic Adaptation. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, [s.l.], v. 26, p. 369–401, 1975.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae: structure and reproduction**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA, N. Enzimas na Produção de Etanol. In: BON, E. *et al.*

(Eds.). . **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1. ed. [s.l.] Interciência, 2008. p. 508.

BRITO MONTEIRO, Á. A. **Otimização da extração de R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson e sua aplicação como corante natural em alimentos**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

BROUGHTON, JAMES; CHEN, J. **COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTION OF A NUCLEIC ACID**, 2022. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/080776375/publication/WO2022061166A1?q=pn%3DWO2022061166A1> Acesso em: 12 mai. 2022

BRYANT, D. A. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. **Microbiology**, [s.l.], 1982.

BRYANT, D. A.; GLAZER, A. N.; EISERLING, F. A. Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. **Archives of Microbiology**, [s.l.], v. 110, n. 1, p. 61–75, 1976.

CASTRO, P.; HUBER, M. E. Produtores primários multicelulares: macroalgas e plantas. In: CASTRO, P.; HUBER, M. E. (Eds.). **Biologia Marinha**. 8. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda. p. 102–114. 2012.

CESANA, P. T. *et al.* A biohybrid strategy for enabling photoredox catalysis with low-energy light. **Chem**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 174–185, jan. 2022.

CHANG, W. R. *et al.* Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], 1996.

CHEN, H. W. *et al.* Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 8, p. 1337–1344, 2014.

CHEN, X. *et al.* Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 77, p. 468–474, 2017.

CHIUEH CHUANG-CHUN; CHAN ERR-CHENG; SHEN CHIA-RUI. **Diagnostic kit and method using phycoerythrin to label tumor tissues and cells**, 2005. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/033563298/publication/US2005009117A1?q=pn%3DUS2005009117A1>. Acesso em: 12 mai. 2022

CONTRERAS-MARTEL, C. *et al.* Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: A case of perfect hemihedral twinning. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 52–60, 2001.

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**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.

DAGNINO-LEONE, J. *et al.* Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 20, p. 1506–1527, jan. 2022.

DANTAS, A. C. M. ***Gracilaria birdiae* como biomassa para a produção de pigmento e**

ágar sob o conceito de biorrefinaria e sua importância no mercado brasileiro. [S.l.] Universidade Federal do Ceará, 2018.

DAVID, S. *et al.* **CIRCULATING BIOMARKERS FOR DISEASE**, 2011. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=US97631845&_cid=P10-L33QCY-77779-3>. Acesso em: 12 mai. 2022

DE ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 1207–1215, 2011a.

DE ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 1207–1215, 30 ago. 2011b.

DUCRET, A. *et al.* Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], 1998.

DUMAY, J. *et al.* Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 131, p. 21–27, 2013.

DUMAY, J. *et al.* Phycoerythrins: Valuable proteinic pigments in red seaweeds. In: BOURGOUGNON, N. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. Nantes: Elsevier. v. 71p. 321–343. 2014

DUMAY, J. *et al.* Extraction and Purification of R-phycoerythrin from Marine Red Algae. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s.l.], v. 1308, p. 109–117, 2015.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 1–25, 2010.

EUN, P. J. **Composition for detecting avian influenza virus based on chemiluminescence and use thereof**, 2021. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/076412197/publication/KR102265441B1?q=pn%3DKR102265441B1>. Acesso em: 12 mai. 2022

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Protists: Algae and Heterotrophic Protists. In: **Biology of Plants**. 8. ed. New York: W.H. Freeman and Company, [s.l.], 317–365. 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). The State of World Fisheries and Aquaculture. **INFORM**, [s.l.], v. 32, n. 6, p. 6–10, 2020.

FERREIRA, N. *et al.* Response surface approach to optimize the removal of the critical raw material dysprosium from water through living seaweeds. **Journal of environmental management**, [s.l.], v. 300, dez. 2021.

FERREIRA, V. R. **CARACTERIZAÇÃO DA MICROCÁPSULA DO PIGMENTO NATURAL RFIÇOERITRINA DA MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis***. [S.l.] Universidade Federal do Ceará, 2021.

FLEURENCE, J. The enzymatic degradation of algal cell walls: A useful approach for improving protein accessibility? **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 11, p. 313–314, 1999.

GALLAND-IRMOULI, A. V. *et al.* One-step purification of R-phycoerythrin from the red

macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [s.l.], v. 739, n. 1, p. 117–123, 2000a.

GALLAND-IRMOULI, A. V. *et al.* One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [s.l.], v. 739, n. 1, p. 117–123, fev. 2000b.

GANESAN, A. R.; SHANMUGAM, M. Isolation of phycoerythrin from *Kappaphycus alvarezii*: a potential natural colourant in ice cream. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 32, n. 6, p. 4221–4233, dez. 2020.

GANTT, E. Structure and Function of Phycobilisomes: Light Harvesting Pigment Complexes in Red and Blue-Green Algae. **International Review of Cytology**, [s.l.], v. 66, p. 45–80, 1980.

GLAZER, A. L. E. X. A. N. D. E. R. N. A MACROMOLECULAR COMPLEX OPTIMIZED FOR LIGHT ENERGY TRANSFER Cyanobacteria ('blue-green algae') are widely credited with the introduction of oxygen-evolving photosynthesis into the biosphere. Fossil stromatolites, believed to mark the appearance of bi. [s.l.], v. 768, p. 29–51, 1984a.

GLAZER, A. N. *et al.* The structure of a «simple phycobilisome. **Annales de l'Institut Pasteur Microbiology**, [s.l.], v. 134, n. 1, p. 159–180, 1983.

GLAZER, A. N. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. **BBA Reviews On Bioenergetics**, [s.l.], v. 768, n. 1, p. 29–51, 1984b.

GLAZER, A. N. Light Harvesting by Phycobilisomes. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 47–77, 1985.

GLAZER, A. N. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 264, n. 1, p. 1–4, 1989.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], 1994.

GLAZER, A. N.; STRYER, L. Phycofluor probes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 423–427, [s.l.], 1984.

GLAZER, N.; HIXSON, C. S. Characterization of R-Phycocyanin [S.l.], v. 2, n. 14, p. 5487–5495, 1975.

GRAHAM, J. E.; GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. [s.l.: s.n.].

GRILLO, G. *et al.* From Seaweeds to Cosmeceutics: A Multidisciplinary Approach. **Sustainability** 2021, Vol. 13, Page 13443, [s.l.], v. 13, n. 23, p. 13443, 4 dez. 2021.

GU, D. *et al.* Purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* by centrifugal precipitation chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s.l.], v. 1087–1088, n. December 2017, p. 138–141, 2018.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 1057–1063, 2012.

GUIRY, M. D. **The Seaweed Site: information on marine macroalgae**. Disponível em:

<http://www.seaweed.ie/>. Acesso em: 16 mar. 2018.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway**. Disponível em: <https://www.algaebase.org>. Acesso em: 10 maio. 2022.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 375–382, 2013.

HEMLATA; FATMA, T. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [s.l.], v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009.

HERMES, TASHA; LIPKIE, TRISTAN; SHYAMALIE SENARATNE-LENAGALA, L. **PIGMENT FOR MEAT SUBSTITUTE COMPOSITIONS**, 2022. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/077951824/publication/WO2022047389A1?q=pn%3DWO2022047389A1>. Acesso em: 12 mai. 2022

HOLANDA, M. L. **Iota-carragenana da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* versus iota-carragenana comercial: propriedades estruturais e reológicas**. [S.l.] Universidade Federal do Ceará, 2007.

HOLANDA, T. DE B. L. **Obtenção de biomassa da macroalga agarófita *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) através da germinação de esporos em condições de laboratório**. Fortaleza, Brasil: Universidade Federal do Ceará, 2016.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. **Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation** *Journal of Applied Phycology*, [s.l.], 2011.

HURD, C. L. *et al.* **Seaweed ecology and physiology, second edition**. [s.l: s.n.].

IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. Natural products from seaweeds. In: **Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application**. [s.l: s.n.]. p. 51–81.

ISAILOVIC, D.; LI, H. W.; YEUNG, E. S. Isolation and characterization of R-phycoerythrin subunits and enzymatic digests. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1051, n. 1–2, p. 119–130, 2004.

JANG, J. S. *et al.* Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. **Bioprocess and biosystems engineering**, [s.l.], v. 35, n. 1–2, p. 11–18, jan. 2012.

JIANG, T.; ZHANG, J. P.; LIANG, D. C. Structure and function of chromophores in R-Phycoerythrin at 1.9 Å Resolution. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 224–231, 1999.

JUN, L. P. Y. **Efficient separation and purification method for reagent-grade R-type phycoerythrin of *gracilaria lemaneiformis***, 2021. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/077424738/publication/CN113321716A?q=pn%3DCN113321716A>. Acesso em: 12 mai. 2022

JUNLING, W. J. L. Y. R. N. Z. **Method for detecting DNA hybridization by surface cationized R-phycoerythrin**, 2018. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/062095100/publication/CN108037103A?q=pn%3DCN108037103A>. Acesso em: 12 mai. 2022

- KADAM, S. U. *et al.* Extraction of biomolecules from seaweeds. In: TIWARI, B. K.; TROY, D. J. (Eds.). **Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications**. San Diego: Academic Press. p. 243–269. 2015
- KAISER, M. J. *et al.* Primary Production Processes. In: **Marine Ecology: Processes, Systems, and Impacts**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press. p. 33–87. 2011
- KAWSAR, S. M. A *et al.* Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization, out. 2011.
- KEHOE, D. M. Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 20, p. 9029–9030, 2010.
- KEHOE, D. M.; GUTU, A. Responding to Color: The Regulation of Complementary Chromatic Adaptation. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 127–150, 2006.
- KEILLER, D. **DRINK CONTAINING FLUORESCENT AGENT**, 2003. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/029585819/publication/WO03099039A1?q=pn%3DWO03099039A1>. Acesso em: 12 mai. 2022
- KLOAREG, B. *et al.* Role and evolution of the extracellular matrix in the acquisition of complex multicellularity in eukaryotes: A macroalgal perspective. **Genes**, [s.l.], v. 12, n. 7, jul. 2021.
- KLOTZ, A. V.; GLAZER, A. N. Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], 1985.
- KOSTAS, E. T. *et al.* Macroalgal biorefinery concepts for the circular bioeconomy: A review on biotechnological developments and future perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 151, p. 111553, nov. 2021.
- KUHAD, R. C. *et al.* Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 55, p. 249–272, mar. 2016.
- KULA, M.-R.; KRONER, K. H.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In: **Reaction Engineering. Advances in Biochemical Engineering**. 24. ed. Berlin: Springer, 1982. p. 73–118.
- LANGE, L. *et al.* Opportunities for seaweed biorefinery. In: TORRES, M. D.; KRAAN, S.; DOMINGUEZ, H. (Eds.). **Sustainable Seaweed Technologies**. 1. ed. Copenhagen: Elsevier, 2020. p. 3–31.
- LE GUILLARD, C. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. **Algal Research**, [s.l.], v. 12, p. 522–528, 2015.
- LEE, D. *et al.* Anti-inflammatory effects of dulse (*Palmaria palmata*) resulting from the simultaneous water-extraction of phycobiliproteins and chlorophyll a. **Food Research International**, [s.l.], v. 100, p. 514–521, 2017.
- LEE, R. E. Basic characteristics of the algae. In: **Phycology**. [s.l.: s.n.]. p. 3–29.
- LI, D.; ZHU, Z.; SUN, D. W. Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 75, p. 46–55, 1 maio 2018.

- LI, G. W. Z. L. G. **Application of R-phycoerythrin in preparing photosensitive medicine for phototherapy of tumor**, 2001. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/004661599/publication/CN1325729A?q=pn%3DCN1325729A>. Acesso em: 12 mai. 2022
- LIMA, T. D. B. *et al.* **Perfil de Textura de Géis Aquosos Elaborados a Partir da iota-Carragenana da Alga Marinha Vermelha Solieria filiformis**. Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Anais...2013.
- LIMA, T. DE B. **Cultivo da alga marinha vermelha Solieria filiformis (Kützing) P.W. Gabrielson: textura de géis aquosos e lácteos**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2012.
- LIN, H.; QIN, S. Tipping points in seaweed genetic engineering: Scaling up opportunities in the next decade. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 3025–3045, 2014.
- LIU, L. N. *et al.* One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from Polysiphonia urceolata. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 116, n. 1, p. 91–100, 2005.
- LIU, Z. Y.; YUZHONG, L. Z. **Rapid separating purification of R-phycoerythrin**, 2006. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/035067226/publication/CN1271085C?q=pn%3DCN1271085C>. Acesso em: 12 mai. 2022
- LOPES, F. L. DE S. **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA VERMELHA Solieria filiformis E DETERMINAÇÃO DA SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2018.
- LOURENÇO, S. O. A Diversidade das Algas. In: **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, p. 33–129. 2006.
- LU, C. *et al.* **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE FICOERITRINA DE ALTA DENSIDADE ÓTICA E DISPOSITIVO PARA O MESMO**, 2004. Disponível em: <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=684680&SearchParameter=FICOERITRINA &Resumo=&Titulo=>. Acesso em: 1 mai. 2022
- MAIA, R. A. **Estabelecimento de condições de cultivo in vitro e análise histológica da macroalga vermelha Gracilaria cornea J. Agardh**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.
- MAKKAR, H. P. S. *et al.* Seaweeds for livestock diets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, [s.l.], v. 212, p. 1–17, 2016.
- MANIRAFASHA, E. *et al.* Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 109, p. 282–296, 2016a.
- MANIRAFASHA, E. *et al.* Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 109, p. 282–296, 15 maio 2016b.
- MATHUR, C. *et al.* Enteromorpha intestinalis derived seaweed liquid fertilizers as prospective biostimulant for Glycine max. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 58, n. 6, p. 813–820, 2015.
- MAYER, A. M. S. *et al.* Marine pharmacology in 2003–4 : Marine Compounds with

Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-inflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; affecting the Cardiovascular, Immune. **Comparative Biochemistry & Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 145, n. 4, p. 553–581, 2008.

MENSI, F. *et al.* A statistical approach for optimization of R-phycoerythrin extraction from the red algae *Gracilaria verrucosa* by enzymatic hydrolysis using central composite design and desirability function. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 915–926, 26 ago. 2012.

MITTAL, R. *et al.* Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 38, p. 92–103, 2017.

MITTAL, R.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction of R-Phycoerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*, employing consortia of enzymes. **Algal Research**, [s.l.], v. 34, n. September 2017, p. 1–11, 2018.

MITTAL, R.; SHARMA, R.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Novel adsorption approach for the enrichment of R-Phycoerythrin from marine macroalga *Gelidium pusillum*. **Algal Research**, [s.l.], v. 62, p. 102605, mar. 2022.

MIYABE, Y. *et al.* Structural Properties of Phycoerythrin from Dulse *Palmaria palmata*. **Journal of Food Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 1, 2017.

MOFFITT, J.; DELIC, J.; FLYNN, A. **BEVERAGE ADDITIVES AND FERMENTED BEVERAGES COMPRISING A FLUORESCENT PROTEIN**, 2015. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/053004985/publication/WO2015065887A1?q=pn%3DWO2015065887A1>. Acesso em: 12 mai. 2022

MOON, R. J. *et al.* Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 40, n. 7, p. 3941–3994, jun. 2011.

MUNIER, M. *et al.* Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, [s.l.], 2014.

MUNIER, M. *et al.* One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 992, p. 23–29, 2015.

MURAMATSU, M.; HIHARA, Y. **Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: From gene expression to physiological responses** **Journal of Plant Research**, [s.l.], 2012.

MURANO, E. *et al.* Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiellia subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Marine Chemistry**, [s.l.], 1997.

NAIR, D. *et al.* Identification, purification, biochemical and mass spectrometric characterization of novel phycobiliproteins from a marine red alga, *Centroceras clavulatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 114, p. 679–691, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, [s.l.], 2014a.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014b. p. 1298.

- NGUYEN, H. P. T. N. *et al.* Mastocarpus stellatus as a source of R-phycoerythrin : optimization of enzyme assisted extraction using response surface methodology. [*s.l.*], v. 29, p. 1563–1570, 2017.
- NIU, J. *et al.* Comprehensive extraction of agar and R-phycoerythrin from gracilaria lemaneiformis (Bangiales, Rhodophyta). **Indian Journal of Marine Sciences**, [*s.l.*], v. 42, n. 1, p. 21–28, 2013.
- NIU, J. F.; WANG, G. C.; TSENG, C. K. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga Polysiphonia urceolata Grev. **Protein Expression and Purification**, [*s.l.*], 2006.
- O’CARRA, P.; MURPHY, R. F.; KILLILEA, S. D. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. **Biochemical Journal**, [*s.l.*], v. 187, n. 2, p. 303–309, 1980.
- OLIVEIRA, A. C. V. **Efeitos da aplicação do extrato bruto da alga vermelha Gracilaria birdiae em cultura de alface (Lactuca sativa)**. [*s.l.*] Universidade Federal do Ceará, 2017.
- PALIWAL, C. *et al.* Antioxidant, anti-nephrolithe activities and in vitro digestibility studies of three different cyanobacterial pigment extracts. **Marine Drugs**, [*s.l.*], v. 13, n. 8, p. 5384–5401, 2015.
- PAN, Q. *et al.* Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from porphyra haitanensis. **Biological Research**, [*s.l.*], v. 46, n. 1, p. 87–95, 2013.
- PARMAR, A. *et al.* Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. **Bioresource Technology**, [*s.l.*], 2011.
- PATEL, A. K. *et al.* Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, [*s.l.*], v. 279, p. 385–392, 1 maio 2019.
- PEIXOTO, G. P. DE A. **R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA VERMELHA Solieria filiformis: PURIFICAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MICROCÁPSULA**. [*s.l.*] Universidade Federal do Ceará, 2020.
- PEÑUELA, A. *et al.* Environmentally friendly valorization of solieria filiformis (Gigartinales, rhodophyta) from IMTA using a biorefinery concept. **Marine Drugs**, [*s.l.*], v. 16, n. 12, 2018.
- PERRONE, C.; CECERE, E. TWO SOLIERIACEAN ALGAE NEW TO THE MEDITERRANEAN: AGARDHIELLA SUBULATA AND SOLIERIA FILIFORMIS (RHODOPHYTA, GIGARTINALES)1. **Journal of Phycology**, [*s.l.*], v. 30, n. 1, p. 98–108, 1 fev. 1994.
- PUNAMPALAM, R.; KHOO, K. S.; SIT, N. W. Evaluation of antioxidant properties of phycobiliproteins and phenolic compounds extracted from Bangia atropurpurea. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, [*s.l.*], v. 14, n. 2, p. 289–297, 2018.
- PURCELL-MEYERINK, D. *et al.* Aquaculture Production of the Brown Seaweeds Laminaria digitata and Macrocystis pyrifera: Applications in Food and Pharmaceuticals. **Molecules** **2021**, Vol. 26, Page 1306, [*s.l.*], v. 26, n. 5, p. 1306, 28 fev. 2021.
- RAJA, K.; KADIRVEL, V.; SUBRAMANIYAN, T. Seaweeds, an aquatic plant-based protein for sustainable nutrition - A review. **Future Foods**, [*s.l.*], v. 5, p. 100142, 1 jun. 2022.

- RAMUS, J. *et al.* Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth. **Marine Biology** 1976 **37:3**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 223–229, set. 1976.
- RAYNES, J. *et al.* **FOOD COLOURING AGENTS**, 2021. Disponível em: https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=WO2021195708&_cid=P10-L33QCY-77779-1. Acesso em: 12 mai. 2022
- REID, D. S. Overview of Physical/Chemical Aspects of Freezing. **Quality in Frozen Foods**, [s.l.], p. 10–28, 1997.
- REIS, A. *et al.* Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 66, n. 3, p. 181–187, 1998.
- REVIERS, B. DE. **Biologie et phylogénie des algues**. 1. ed. Paris: Éditions Belin, 2002. v. 2
- ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Prospects for the cultivation of economically important carrageenophytes in Southeast Mexico. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 415–419, 2 jun. 2011.
- RODRÍGUEZ, H. *et al.* Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Biotechnology**, 1991.
- SAGERT, S.; SCHUBERT, H. ACCLIMATION OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF PALMARIA PALMATA (RHODOPHYTA) TO LIGHT QUALITIES THAT PREFERENTIALLY EXCITE PHOTOSYSTEM I OR PHOTOSYSTEM III. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 547–554, 1995.
- SALURI, M.; KALDMÄE, M.; TUVIKENE, R. Extraction and quantification of phycobiliproteins from the red alga *Furcellaria lumbricalis*. [s.l.], v. 37, p. 115–123, 2019.
- SAMARAKOON, K.; JEON, Y. J. **Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review** **Food Research International**, [s.l.], 2012.
- SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D. An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phycoerythrin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 123–129, 2007.
- SANTA-CRUZ-BIOTECHNOLOGY. Santa Cruz Biotechnology (R-PE). Disponível em: <https://www.scbt.com/p/r-phycoerythrin-11016-17-4>. Acesso em: 11 mai. 2022
- SATHUVAN, M. *et al.* Single-step purified R-phycoerythrin transmits cellular imaging functionalities in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 194, p. 563–570, 1 jan. 2022.
- SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Estado da Arte**, [s.l.], v. 3, p. 6–24, 2007.
- SCHOLL, DAVID, R.; BROWN, JAMES, L.; JOLLIK, JOSEPH; LOLLAR, R. **DIRECT FLUORESCENCE IMMUNOASSAY FOR VIRAL ANTIGENS**. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/042269670/publication/EP2419734A1?q=pn%3DEP2419734A1> Acesso em: 1 mai. 2022
- SCHUDEL, S.; PRAWIRANTO, K.; DEFRAEYE, T. Comparison of freezing and convective dehydrofreezing of vegetables for reducing cell damage. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 293, p. 110376, mar. 2021.
- SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied

- research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 113–136, 2008.
- SENTHILKUMAR, N. *et al.* Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycocerythrin from *Portieria hornemannii*. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 55, p. 150–160, 2013a.
- SENTHILKUMAR, N. *et al.* Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycocerythrin from *Portieria hornemannii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 55, p. 150–160, 2013b.
- SFRISO, A. A.; GALLO, M.; BALDI, F. Phycocerythrin productivity and diversity from five red macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 30, p. 2523–2531, 2018.
- SILVA, R. L. *et al.* Structure of a Bed of *Gracilaria* spp. (Rhodophyta) in Northeastern Brazil. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 517–524, jan. 1987.
- SONANI, R. R. *et al.* Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 245, p. 325–331, 2017.
- SONNENBERG, A.; BAARS, J.; HENDRICKX, P. Biorefineries: adding value to the sustainable utilisation of biomass. [S.l.], p. 1–16, 2007.
- SOUSA, W. M. *et al.* Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 152, p. 140–148, 2016.
- STADNICHUK, I. N. **Phycobiliproteins: Determination of chromophore composition and content** **Phytochemical Analysis**, [s.l.], 1995.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 5, p. 483–501, 2011.
- STIGER-POUVREAU, V.; BOURGOUGNON, N.; DESLANDES, E. Carbohydrates from Seaweeds. In: FLEURENCE, J.; LEVINE, I. (Eds.). **Seaweed in Health and Disease Prevention**. Plouzané: Elsevier Inc., 2016. p. 223–274.
- SUDHAKAR, M. P. *et al.* Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. **Algal Research**, [s.l.], v. 8, p. 115–120, 2015a.
- SUDHAKAR, M. P. *et al.* Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. **Algal Research**, [s.l.], v. 8, p. 115–120, 1 mar. 2015b.
- SUN, L. *et al.* Promising fluorescent probes from phycobiliproteins. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, [s.l.], 2003.
- SUN, L. *et al.* Isolation, purification and characteristics of R-phycocerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**, [s.l.], v. 64, n. 2, p. 146–154, 2009.
- SVETLIZKY, D. *et al.* The influence of laser directed energy deposition (DED) processing parameters for Al5083 studied by central composite design. [S.l.], 2022.
- TAN, H. T. *et al.* Uncovering Research Trends of Phycobiliproteins Using Bibliometric Approach. **Plants** **2021**, Vol. 10, Page 2358, [s.l.], v. 10, n. 11, p. 2358, 1 nov. 2021a.

TAN, H. T. *et al.* Uncovering research trends of phycobiliproteins using bibliometric approach. **Plants**, [s.l.], v. 10, n. 11, nov. 2021b.

TANDEAU DE MARSAC N, C.-B. G. Molecular composition of cyanobacterial. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 74, n. 4, p. 1635–1639, 1977.

TAYLOR, E. L.; TAYLOR, T. N.; KRINGS, M. Algae. In: THOMAS, N. T.; EDITH, L. T.; KRINGS, M. (Eds.). . **Paleobotany**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 121–160.

THERMOFISHER. **ThermoFisher (R-FE)**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P801/>. Acesso em: 09 mai. 2022.

TRIVEDI, J. *et al.* Algae based biorefinery - How to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 295–307, 2015.

TRIVEDI, N. *et al.* An integrated process for the extraction of fuel and chemicals from marine macroalgal biomass. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, p. 1–8, 2016.

TROELL, M. *et al.* **Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems** *Aquaculture*, 2009.

WANG, C. *et al.* Response surface optimization of enzyme-assisted extraction of R-phycoerythrin from dry *Pyropia yezoensis*. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 1429–1440, abr. 2020.

WANG, G. Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography. **Chromatographia**, [s.l.], v. 56, n. 7–8, p. 509–513, 2002.

WANG, L. *et al.* Characteristics of an R-phycoerythrin with two γ subunits prepared from red macroalga *Polysiphonia urceolata*. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 10, n. 3, 2015.

WU, Q. *et al.* Effects of physicochemical factors and in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activity of R-phycoerythrin from red algae *Bangia fusco-purpurea*. **International Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 1445–1451, 2015.

XU, Y.; WANG, Q.; HOU, Y. Efficient Purification of R-phycoerythrin from Marine Algae (*Porphyra yezoensis*) Based on a Deep Eutectic Solvents Aqueous Two-Phase System. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 18, n. 12, 4 dez. 2020.

YANG, S. *et al.* Applications of enzymatic technologies to the production of high-quality dissolving pulp: A review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 281, p. 440–448, 1 jun. 2019.

ZHAO, L.; OWEN, D.; WILKINS, M. **TREATMENT OF PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION**, 2022. Disponível em:

https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=WO2022096901&_cid=P10-L33PYE-74099-2. Acesso em: 12 mai. 2022

ZHAO, M. *et al.* Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 73, n. 1, p. 58–64, 2015.

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

ZHOU, C. C. P. H. C. L. J. L. Q. W. M.; MING, C. C. H. P. L. C. L. J. W. Q. Z. **Method for**

preparing porphyra yezoensis R-phycoerythrin fluorescence probe, 2010. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/042477773/publication/CN101750482A?q=pn%3DCN101750482A>. Acesso em: 12 mai. 2022.