



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

CAROLINE LANDIM PEIXOTO

**PRODUÇÃO DO EDULCORANTE D-TAGATOSE A PARTIR DO HIDROLISADO
ÁCIDO DE KAPPA-CARRAGENANA**

FORTALEZA

2017

CAROLINE LANDIM PEIXOTO

PRODUÇÃO DO EDULCORANTE D-TAGATOSE A PARTIR DO HIDROLISADO
ÁCIDO DE KAPPA-CARRAGENANA

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof^º. Dr^ª. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientador: Me. George Meredite Cunha de Castro.

FORTALEZA

2017

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)

P43p Peixoto, Caroline Landim.
Produção do edulcorante d-tagatose a partir do hidrolisado ácido de kappa-carragenana / Caroline Landim Peixoto. – 2017.
43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.
Coorientação: Prof. Me. George Meredite Cunha de Castro.

1. Síntese química;. 2. Ácido sulfúrico. 3. Galactose;. 4. Algas Vermelhas;. 5. Galactanas. I. Título.
CDD 661

CAROLINE LANDIM PEIXOTO

PRODUÇÃO DO EDULCORANTE D-TAGATOSE A PARTIR DO HIDROLISADO
ÁCIDO DE KAPPA-CARRAGENANA

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Universidade Federal do Ceará pela formação acadêmica e estrutura física.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Márjory Lima Holanda Araújo**, por me receber em seu laboratório, pela excelente orientação e tempo investido em mim e em meu trabalho.

Aos membros do Laboratório de Aplicações Biotecnológicas de Algas e Plantas, **Christina Veríssimo, Ingrid Queiroz, Ewerton Lima, Áurea Brito, Vilmara Farias e Carol Dantas**, pela amizade e pelos momentos de descontração no laboratório. Em especial ao **George Meredith** e o **Acrísio Bastos** por me ensinar tudo que sei dentro do laboratório.

Aos membros do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) por terem cedido espaço e equipamentos, em especial a **Profa. Norma Benevides**, a **Ticiano Lima** e ao **Antônio Neto**.

À parceria com o Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio) em especial a **Profa. Luciana Gonçalves** e o **Guilherme Rúben** pelo apoio, espaço e equipamentos cedidos, e ajuda fundamental com os experimentos.

A todos os meus professores, que me formaram como profissional e como ser humano. Por amarem sua profissão e por transmitir essa paixão em forma de ciência.

À coordenação do curso de Biotecnologia, em especial ao **Gilmar da Costa**, pela orientação e apoio, imprescindíveis para a minha conclusão de curso.

Aos meus amigos de curso, **Marcus Rafael, Lia Pinho, Larissa Queiroz, Artur Hermano, Wallady Barroso, Ellivelton Lima, Raíssa Lima, Clara Maia, Carol Xavier, Augusto Filho** pela experiência acadêmica, conversas, almoços no RU e saídas. Vocês fizeram minha permanência na UFC muito mais produtiva e prazerosa.

À minha amiga de curso e da vida **Tayná Fiúza**, pelas incontáveis horas de estudo, pela parceria nos meus projetos, viagens e festas, e por acreditar em mim quando eu mais precisei.

Ao meu companheiro **João Filho**, por me amar e apoiar nos momentos em que mais precisei, por estar sempre por perto e me acolher em seu abraço.

Aos meus familiares, em especial meus pais, **Jaqueline Landim e Álvaro Peixoto**, por acreditarem em mim e nas minhas escolhas, por me incentivarem não desistir dos meus sonhos, minha avó **Francisca Landim**, pelo carinho e cuidado, e meus irmãos, **Catherine e Álvaro**, por estarem sempre presentes e pelos momentos de descontração.

“Onde não pudes amar, não te demores”

Frida Kahlo

RESUMO

A tagatose é um edulcorante natural e funcional raro, com poder adoçante semelhante à sacarose, e que não adiciona calorias ao alimento. Sua produção pode ser por via química ou enzimática, ambas utilizando galactose como matéria-prima. O presente trabalho objetivou hidrolisar quimicamente a κ -carragenana extraída da macroalga *Hypnea musciformis* a fim de produzir D-galactose e posteriormente convertê-la em D-tagatose com L-arabinose isomerase. Inicialmente, foram avaliados os efeitos da temperatura e concentração de ácido sulfúrico sobre a geração de açúcar redutor e galactose por meio da hidrólise ácida da κ -carragenana extraída da macroalga. Em seguida, a galactose foi submetida a bioconversão enzimática a tagatose. Como resultados, a temperatura e concentração de ácido no modo linear apresentaram efeitos significativos e positivos para a geração de açúcar redutor e galactose, bem como as suas interações. O teor máximo de açúcares redutores foi de 7,0 g.L⁻¹ nos hidrolisados, enquanto de galactose e glucose foram de 1,4 e 0,2 g.L⁻¹, respectivamente. Surpreendentemente, os resultados sugeriram ainda uma concentração de 1,7 g.L⁻¹ de tagatose nos hidrolisados. Quanto ao teste enzimático, não foi observada uma conversão de D-galactose em D-tagatose pela enzima utilizada, devido a presença de tagatose no hidrolisado. Portanto, foi possível concluir que a κ -carragenana extraída de *H. musciformis* se mostrou uma fonte de galactose para obtenção de tagatose por via química e enzimática. Todavia, mais estudos são necessários a fim de elucidar o mecanismo de produção química e enzimática da tagatose a partir de galactanas de macroalgas marinhas.

Palavras-chave: Síntese química; Ácido sulfúrico; Galactose; Algas Vermelhas; Galactanas

ABSTRACT

Tagatose is a natural, functional, rare sweetener, with sweetness equivalent to sucrose, and non-caloric. The production of D-tagatose can be chemical or enzymatical, both using galactose as feedstock. The present work aimed to chemically hydrolyze κ -carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* to produce D-galactose and then convert it into D-tagatose using L-arabinose isomerase. Initially, the effects of temperature and sulfuric acid concentration on the generation of reducing sugar and galactose through the acid hydrolysis of κ -carrageenan extracted from the macroalga were evaluated. Then galactose was subjected to enzymatic bioconversion to tagatose. As results, the temperature and concentration of acid in the linear mode had significant and positive effects for the generation of reducing sugar and galactose, as well as their interactions. The maximum content of reducing sugars was 7.0 g.L⁻¹ in the hydrolysates, while the galactose and glucose were 1.4 and 0.2 g.L⁻¹, respectively. Surprisingly, the results further suggested a concentration of 1.7 g.L⁻¹ tagatose in the hydrolysates. Regarding the enzymatic assay, a conversion of D-galactose into D-tagatose was not observed by the enzyme, due to the presence of tagatose in the hydrolyzate. Therefore, it was possible to conclude that κ -carrageenan extracted from *H. musciformis* was shown to be a source of galactose for chemical and enzymatic production of tagatose. However, further studies are needed to elucidate the mechanism of chemical and enzymatic production of tagatose from marine macroalgae galactans.

Keywords: Chemical synthesis; Sulfuric acid; Galactose; Red algae; Galactans

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Características e estrutura química dos principais edulcorantes disponíveis no mercado.....	16
Figura 2	– Isomerização de L-arabinose em L-ribulose e isomerização de D-galactose em D-tagatose catalisados pela L-AI.....	19
Figura 3	– Estrutura química representando a unidade repetitiva da agarose.....	20
Figura 4	– Estruturas químicas representando as unidades repetitivas de a) κ -carragenana; b) ι -carragenana e c) λ -carragenana.....	21
Figura 5	– <i>Hypnea musciformis</i>	22
Figura 6	– Influência da temperatura e da concentração de H ₂ SO ₄ sobre a geração de ART em hidrolisado ácido de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> . (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Curva de contorno.....	30
Figura 7	– Influência da temperatura e da concentração de H ₂ SO ₄ sobre a geração de galactose em hidrolisado ácido de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> . (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Curva de contorno.....	32
Figura 8	– Efeitos da temperatura e concentração de H ₂ SO ₄ na produção de ART nos hidrolisados de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> para p = 0,05.....	35
Figura 9	– Efeitos da temperatura e concentração de H ₂ SO ₄ na produção de galactose nos hidrolisados de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> para p = 0,05.....	37
Figura 10	– Perfil cromatográfico do hidrolisado de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> , (a) antes da reação enzimática e (b) depois da reação enzimática. (→) galactose; (●●●▶) tagatose.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Correlação entre os valores preditos e observados experimentalmente para a variável resposta ART obtidos nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis*..... 32
- Gráfico 2 – Correlação entre os valores preditos e observados experimentalmente para a variável resposta Geração de Galactose obtidos nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis*..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de ensaios com os valores codificados (e reais) das variáveis independentes, três pontos centrais (C) e ordem randômica dos ensaios realizados para a hidrólise ácida da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	26
Tabela 2 – Teores de ART preditos e observados nos hidrolisados de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> obtidos sob diferentes condições reacionais segundo o DCCR.....	30
Tabela 3 – Análise de variância do modelo matemático para a geração de ART por meio da hidrólise ácida da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	31
Tabela 4 – Composição monossacarídica dos hidrolisados ácidos da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	34
Tabela 5 – Análise de variância do modelo matemático para a geração de galactose por meio da hidrólise ácida da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	36
Tabela 6 – Composição monossacarídica do hidrolisado ácido de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> de maior teor de monossacarídeos antes e após a atividade enzimática da L-arabinose isomerase.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
ART	Açúcar Redutor Total
APAFG	Associação de Produtores de Algas de Fecheiras e Guagiru
DCCR	Delineamento de Composto Central e Rotacional
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
ι	Iota
κ	Kappa
λ	Lambda
μ	Micro
KHz	Quilohertz
kDa	Quilodalton
kcal	Quilocaloria
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
M	Molar
N	Normal
g.L ⁻¹	Gramas por litro
G	Gravidade
H	Horas
min	Minutos
°C	Graus Celsius
%	Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Edulcorantes	15
1.2	Biotecnologia na Indústria de Edulcorantes	17
1.2.1	Aplicação da L-Arabinose Isomerase na produção de Tagatose	18
1.3	Galactanas de macroalgas marinhas vermelhas como fonte de galactose.....	19
2.	OBJETIVOS.....	24
2.1.	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Processamento e Padronização da Macroalga	24
3.2	Extração e padronização da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	25
3.3	Efeito da concentração de ácido e temperatura de reação sobre a obtenção de ART e galactose a partir da hidrólise ácida da κ -carragenana de <i>H.musciformis</i>	25
3.4	Determinação dos teores de Açúcar Redutor Total (ART) nos hidrolisados	26
3.5	Determinação dos teores de monossacarídeos nos hidrolisados	27
3.6	Obtenção da enzima L-arabinose isomerase	27
3.7	Bioconversão enzimática de galactose em D-tagatose	28
3.8	Análises estatísticas	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Extração da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	29
4.2.	Efeito da temperatura e concentração de ácido sobre os teores de ART nos hidrolisados ácidos de κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	29
4.3	Efeitos da temperatura e concentração do H_2SO_4 sobre o teor de galactose e Tagatose nos hidrolisados ácidos da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i>	33
4.4	Bioconversão de galactose proveniente da hidrólise ácida da κ -carragenana de <i>H. musciformis</i> em tagatose pela enzima L-arabionose isomerase	38
5.	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Edulcorantes

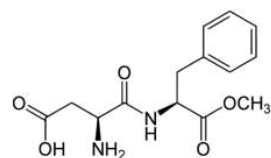
Edulcorantes são aditivos alimentares utilizados para conferir sabor doce aos alimentos. Alguns destes compostos possuem alto poder adoçante, chegando a ser 13000 vezes mais doce que a sacarose. Os edulcorantes podem ser divididos em duas classes: Calóricos (*bulk sweeteners*) que conferem calorias ao produto além do sabor doce e Não Calóricos (*intense sweeteners*) que conferem sabor doce, porém sem calorias, com exceção do aspartame, que confere 4 kcal por grama de produto por ser composto por aminoácidos (DUARTE et al., 2017; GRENBY, 1991).

Inicialmente, adoçantes artificiais eram usados exclusivamente em alimentos para diabéticos, doentes crônicos caracterizados por apresentarem altos níveis de glicose sanguínea devido à resistência à insulina ou carência relativa de insulina. A insulina é um hormônio produzido no pâncreas, responsável pelo transporte de glicose da corrente sanguínea para as células, onde é usada como energia. A falta ou ineficiência da insulina em um diabético resulta na permanência da glicose no sangue – hiperglicemia, causando danos teciduais. Nesses casos, a redução do consumo de açúcar é recomendada (IDF, 2016; BALAKUMAR; MAUNG-U; JAGADEESH, 2016).

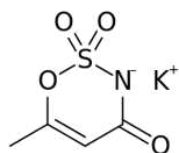
Por outro lado, a escassez de açúcar verificada durante a Segunda Guerra Mundial e as mudanças no conceito de estética promovendo a magreza, também encorajaram pessoas saudáveis a substituírem açúcar por adoçantes artificiais. Atualmente a demanda por produtos alimentícios de baixa caloria e com menor adição de açúcar vem aumentando significativamente, e à medida que esta demanda cresce, aumenta a projeção de vendas de edulcorantes. A exemplo disso, a taxa de crescimento anual de vendas de bebidas, produtos de confeitaria, panificação e sorvetes com redução de açúcar foi de 3,4%, 4,9%, 3,8%, e 3,2% respectivamente, nos anos subsequentes de 2012 a 2015 (DIOGO et al., 2013; SYLVETSKY; ROTHER, 2016).

A Tabela 1 apresenta os principais edulcorantes disponíveis no mercado atualmente, tanto os de mesa quanto os utilizados na indústria de alimentos, bem como as suas características como aporte calórico, natureza, poder adoçante, tipo de produção e estrutura química.

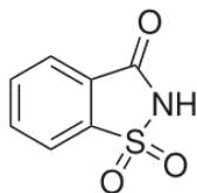
Figura 1 – Características e estrutura química dos principais edulcorantes disponíveis no mercado.



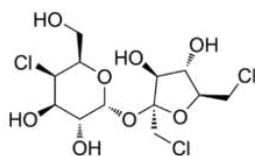
¹ASPARTAME
Artificial
Calórico
*200 vezes



²ACESULFAME-K
Artificial
Não-calórico
*200 vezes



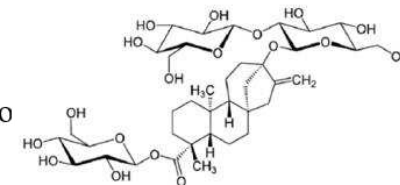
³SACARINA
Artificial
Não-calórico
*500 vezes



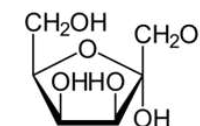
⁴SUCRALOSE
Artificial
Não-calórico
*600 vezes



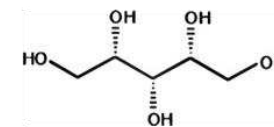
STÉVIA⁵
Natural
Não-calórico
*200 vezes



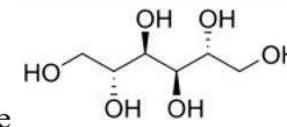
TAGATOSE⁶
Natural
Não-calórico
*Equivalente



XILITOL⁷
Natural
Calórico
*Equivalente



MANITOL⁸
Natural
Não-calórico
*2/3 da sacarose



Referências: (⁷EDWARDS et al., 2016; ⁴JIE et al., 2017; ¹KIRKLAND; GATEHOUSE, 2015; ⁴LIN et al., 2017; ⁶MANJASETTY; CHANCE, 2006; ³MOKHTARUDDIN et al., 2017; ⁵NGUYEN et al., 2016; ¹OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; ⁷PAPPU; GUMMADI, 2017; ⁶PATEL et al., 2017; ²PUNTURAT; HUANG, 2015; ¹RASHIDIAN; FATTAHI, 2009; ²RICHARDS et al., 2016; ⁷SANTI et al., 2016; ⁸SU et al., 2016; ⁵VASCONCELOS et al., 2017; ²VYMAZAL; DVORAKOVA BREZINOVA, 2016; ⁸ZELIN et al., 2017)

*Doçura referente à sacarose

Fonte: Autoria própria

A D-Tagatose (α -D-tagato-2,6-piranoose) é um edulcorante natural e funcional por promover o crescimento da microbiota intestinal. É considerado seguro, não apresenta gosto residual e, portanto, pode ser aplicado em diferentes produtos da indústria de alimentos, incluindo suplementos alimentares dietéticos de baixa caloria. Possui também propriedades aplicáveis na área médica, como anti-hiperglicemiante aliviando sintomas da diabetes. A tagatose, uma hexocetose natural rara, é um isômero da galactose e ocorre naturalmente em goma de *Sterculia setigera* e em pequenas quantidades em produtos lácteos (LEVIN, 2002; OH, 2007; PATEL et al., 2017) Apesar da ampla possibilidade de aplicações e das propriedades benéficas à saúde, a tagatose atualmente só é produzida industrialmente por uma empresa europeia, a Damhert (damhert.be).

1.2 Biotecnologia na Indústria de Edulcorantes

Os edulcorantes podem ser produzidos de 3 maneiras: extraídos de fontes naturais, produzidos quimicamente ou biotecnologicamente. Um exemplo de edulcorante extraído de fontes naturais é a Stévia (PURKAYASTHA et al., 2016). As folhas da planta *Stevia rebaudiana* (Bertoni) apresentam componentes de sabor doce, os glicosídeos de steviol, sendo o conjunto destes glicosídeos chamado de Stévia. Porém produtos à base de plantas podem apresentar limitações de escalabilidade. Para obtenção de uma produção sustentável, é sugerido o desenvolvimento de métodos biotecnológicos de produção, que envolvam cultura de células vegetais ou fermentação microbiana por exemplo (PHILIPPE et al., 2014).

Já como exemplos de edulcorantes produzidos quimicamente são relatados o acesulfame-K, a sacarina e o ciclamato, os quais são sais com estruturas químicas semelhantes, porém variam em doçura. Uma qualidade atribuída a estes edulcorantes é a estabilidade, porém conferem um sabor residual amargo. Apesar da sua produção química ser mais barata, apresenta dificuldades na recuperação do produto e formação de subprodutos indesejáveis (CHAUBEY et al., 2013; GRENBY, 1991; MOKHTARUDDIN et al., 2017).

O xilitol e o manitol também são produzidos quimicamente por hidrogenação catalítica de D-xilose pura e de uma mistura de frutose e glucose, respectivamente, sob altas temperatura e pressão. Com relação ao manitol, o rendimento é de 25% de manitol e 75% de sorbitol. Já a produção de sucralose também envolve processos complexos, incluindo síntese de sucrose-6-acetato, cloração e desacetilação, sendo a síntese de

sucrose-6-acetato uma etapa chave para a produção de sucralose. Entretanto, as condições de reação do método químico são complicadas.

Por outro lado, a produção biotecnológica de xilitol vem se mostrando potencialmente atrativa para substituir o processo químico, uma vez que ocorre sob condições muito mais brandas e utiliza resíduos industriais e misturas de açúcares como matéria-prima (DASGUPTA et al., 2017). Recentemente, a produção enzimática de manitol a partir de frutose tem chamado atenção de pesquisadores, devido a especificidade da enzima e a pureza dos produtos gerados (KOKO et al., 2016). E pela alta eficiência e especificidade, enzimas vêm sendo utilizadas para produzir sucralose (JIE et al., 2017).

Com relação a tagatose, a produção industrial a partir de lactose ocorre em duas fases, a primeira sendo enzimática e a segunda química. Na primeira fase, a lactose é hidrolisada enzimaticamente em glucose e galactose em proporções iguais, e na segunda fase, a galactose é convertida em tagatose (MANZO, 2013) por isomerização química descrita em patente, usando hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) como agente complexante, sob condições alcalinas (pH 12) (BEADLE; SAUNDERS; WAJDA JR, 1991). Este processo tem algumas desvantagens, como a dificuldade de purificação, geração de resíduos químicos e formação de subprodutos.

Assim sendo, para a produção de tagatose, a bioconversão tem sido explorada, principalmente a isomerização de D-galactose em D-tagatose promovida pela enzima L-arabinose isomerase (LIANG et al., 2012; RHIMI et al., 2011).

Diante do exposto, o desenvolvimento de sistemas biotecnológicos e suas aplicações em processos industriais vêm abrindo novos horizontes para a biotecnologia industrial (WANG et al., 2009). A engenharia metabólica também vem contribuindo com a utilização de microrganismos como plataformas para produção comercial de metabólitos de relevância, por meio do aumento da expressão de genes de interesse e inibição de genes indesejáveis (TANIGUCHI; OKANO; HONDA, 2017). Ferramentas biotecnológicas como a engenharia metabólica e a biologia sintética podem ser aliadas na aplicação de enzimas na produção industrial de edulcorantes (CHOI; HAN; KIM, 2015).

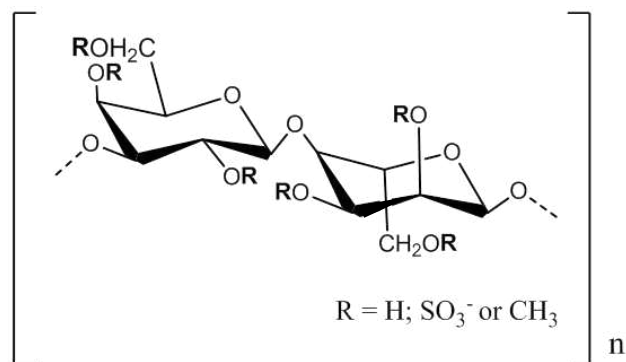
1.2.1 Aplicação da L-Arabinose Isomerase na produção de Tagatose

L-arabinose isomerase (L-AI, EC 5.3.1.4) é uma enzima utilizada industrialmente para a produção *in vitro* de D-tagatose usando D-galactose como substrato. Encontrada

comparação com biomassas terrestres, apresentam dentre outras vantagens, uma eficiência fotossintética 6-8% maior; pouca ou nenhuma lignina em sua composição, o que tem facilitado a extração e o pré-tratamento de polissacarídeos; e a possibilidade de cultivo eficientemente no mar, sem utilizar irrigação para sua produção e terras cultiváveis que competem com a produção de alimentos (FERNAND et al., 2016; JUNG et al., 2013; LEHAHN; INGLE; GOLBERG, 2016; RODRIGUES et al., 2015)

De acordo com os tipos de galactanas (homopolissacarídeos de galactose) biossintetizadas pelas macroalgas marinhas vermelhas, ágar e carragenanas, as espécies são classificadas em agarófitas e carragenófitas, respectivamente. O principal componente do ágar é a agarose (Fig. 2), composta por D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose com ligações α -1,3- e β -1,4- alternadas. Já a agarpectina, correspondente a menor fração do ágar, é composta por D-galactose com ligações β -1,3- e β -1,4- e não contribui para a propriedade gelificante do polissacarídeo (RIOUX; BEAULIEU; TURGEON, 2017; YUN; CHOI; KIM, 2015).

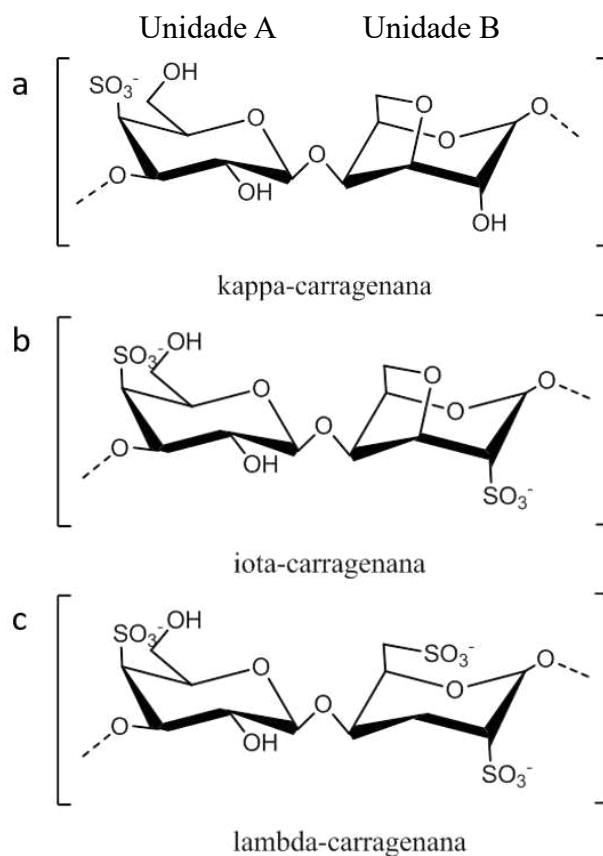
Figura 3 – Estrutura química representando a unidade repetitiva da agarose



Fonte: autoria própria

As carragenanas são galactanas sulfatas que se diferenciam do ágar por apresentarem apenas unidades enantioméricas D-galactose unidas por ligações α -1,3- e β -1,4- alternadas. O padrão de sulfatação e a presença de 3,6-anidro-D-galactose por dímero tem relação direta com as propriedades físico-químicas e reológicas dessas moléculas e, portanto, as classes mais utilizadas comercialmente são: Kappa (κ), Iota (ι) e Lambda (λ) carragenanas, cujas estruturas químicas estão mostradas na Fig. 3 (BARBEYRON et al., 2000; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Figura 4 – Estruturas químicas representando as unidades repetitivas de a) κ -carragenana; b) ι -carragenana e c) λ -carragenana



Fonte: autoria própria

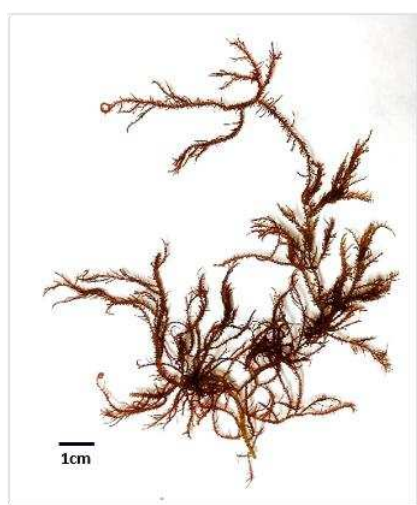
A κ -carragenana apresenta a menor quantidade de éster sulfato por dímero (no carbono 4 da unidade A) além da presença de 3,6-AG, características que contribuem para a formação de um gel rígido e quebradiço. A λ -carragenana apresenta a maior quantidade de éster sulfato (no carbono 4 da unidade A e nos carbonos 2 e 4 da unidade B) e não apresenta 3,6-AG, características estruturais que impedem a formação de gel. A ι -carragenana apresenta 2 grupos éster sulfato por dímero (no carbono 4 da unidade A e no carbono 2 da unidade B) e presença de 3,6-AG contribuindo para a formação de um gel mais fraco e elástico (MICHON et al., 2005; YUN et al., 2016).

No litoral brasileiro são encontradas espécies de macroalgas vermelhas agarófitas como as do gênero *Gracilaria*, especialmente *G. cervicornis* (MARINHO-SORIANO et al., 2006) *G. cornea* (COURA et al., 2017) e *G. birdiae* (BEZERRA; MARINHO-SORIANO, 2010) e carragenófitas, dentre elas as espécies *Solieria filiformis* (DE ARAÚJO et al., 2011) e *Hypnea musciformis* (BRITO et al., 2016).

A macroalga marinha vermelha da espécie *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.

Lamouroux, mostrada na Figura 4, é biossintetizadora de κ -carragenana (ARMAN; QADER, 2012). *H. musciformis* é a espécie mais conhecida do gênero *Hypnea*, e está distribuída nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. Vem sendo explorada comercialmente no Brasil, e é considerada uma espécie importante economicamente devido seu alto rendimento de κ -carragenana, crescimento rápido e tolerância a diferentes condições ambientais (COSENZA et al., 2014; SCHMIDT et al., 2012).

Figura 5 – *Hypnea musciformis*



Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Hypneaceae

Gênero: *Hypnea*

Espécie: *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux

Fonte: autoria própria

Carneiro et al. (2014) estudaram a composição centesimal de *H. musciformis* seca e obtiveram os seguintes resultados: 14,17% \pm 1,28 de umidade, 14,14% \pm 1,23 de cinzas, 17,12% \pm 0,99 de proteínas, 0,33 \pm 0,01% de lipídios e 54,24% \pm 0,57 de carboidratos.

Essa composição centesimal é similar em diferentes espécies de algas vermelhas, mostrando altos teores de cinzas, proteínas e carboidratos quando comparadas às plantas. Por esses motivos, esses organismos vêm sendo objetos de estudos que visam, principalmente, a hidrólise da biomassa algácea para obtenção de meios nutritivos ricos em carboidratos fermentescíveis para diferentes finalidades, incluindo a produção de compostos químicos de alto valor agregado e biocombustíveis (SHOBANA et al., 2017).

Polissacarídeos provenientes de macroalgas podem ser eficientemente hidrolisados por ácidos diluídos, como ácido sulfúrico (H₂SO₄) e ácido clorídrico (HCl). A hidrólise da biomassa algácea com ácido sulfúrico provoca uma alteração na parede celular desses organismos tornando possível a obtenção de oligômeros e carboidratos

simples. Além disso a geração de componentes tóxicos, como 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF), ácido levulínico e ácido fórmico, tem sido baixa quando comparada a materiais lignocelulósicos, provocada principalmente por condições de hidrólise mais brandas. Os fatores chave para uma hidrólise ácida otimizada são temperatura de reação, concentração de ácido, concentração de biomassa e tempo de reação (MATEO et al., 2014; PARK et al., 2012, 2014; WEI; QUARTERMAN; JIN, 2013).

Já os processos de hidrólise das galactanas previamente extraídas da biomassa algácea têm como objetivo disponibilizar oligo ou monossacarídeos para uso direto ou posterior, em processos de conversão biológica ou enzimática. Consideradas pré-tratamentos, as hidrólises podem ser classificadas em despolimerizações química ou enzimática. A hidrólise enzimática de galactanas é seletiva em relação à produção de carboidratos, porém ainda é menos acessível industrialmente devido ao alto custo associado. Já a hidrólise química desses polissacarídeos é bem adequada para processos de escala industrial (AGBOR et al., 2011; PATEL; CHAPLA; SHAH, 2017)

Assim sendo, essas galactanas vem sendo hidrolisadas com diferentes finalidades. Sun et al. (2015) hidrolisaram quimicamente κ -carragenana comercial de grau alimentício para caracterização estrutural e análise da atividade antioxidante dos oligossacarídeos gerados. As condições de hidrólise foram 1% de κ -carragenana, 0,1 M de HCl à 60 °C por 4 h e obtiveram uma variedade de carboidratos com diferentes massas moleculares, incluindo monossacarídios (3,6-anidro-D-galactose e D-galactose), tri-, penta-, hepta- e nona-sacarídeos.

Kaminska-Dwórznička et al. (2015) hidrolisaram κ -carragenana comercial (1%) com HCl e H₂SO₄ (pH 3) para aplicação na produção de *sorbet* visando avaliar o efeito de oligossacarídeos no processo de recristalização. Após 3 h de hidrólise com HCl a massa molecular inicial do polissacarídeo foi reduzida em 13 vezes, e após 1,5 h de hidrólise com H₂SO₄ a massa molecular inicial foi reduzida 10,5 vezes.

Kalitnik et al. (2013) estudando a atividade antiviral de oligossacarídeos provenientes da hidrólise da κ -carragenana de *Chondrus armatus*, observaram que as condições de hidrólise dessa galactana (1%) com 0,1 N de HCl por 4h à 60°C e 24h à 37°C gerou majoritariamente carboidratos de massas moleculares entre 1,2 e 3,0 kDa, dentre eles D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose (respectivamente 20 e 10% do peso seco inicial).

Diante disso, até o presente momento não há na literatura relatos da produção de edulcorantes a partir de polissacarídeos de macroalgas marinhas. Apesar das macroalgas

pardas possuírem manitol em sua composição, um edulcorante natural pouco calórico com várias aplicações na indústria de alimentos, ele não é explorado a partir dessa fonte pois sua extração não é um processo lucrativo (ZELIN et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter D-tagatose a partir dos produtos da hidrólise ácida da κ -carragenana extraída da macroalga vermelha *Hypnea musciformis*, por bioconversão utilizando a enzima L-arabinose isomerase.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair a κ -carragenana da macroalga *Hypnea musciformis*;
- Obter uma condição otimizada de hidrólise ácida para geração de altos teores de açúcar redutor e galactose a partir da κ -carragenana extraída de *H. musciformis*;
- Obter D-tagatose por bioconversão da galactose proveniente da hidrólise da κ -carragenana, utilizando a enzima L-arabinose isomerase.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Processamento e Padronização da Macroalga

A alga marinha da espécie *Hypnea musciformis* foi colhida em cordas de cultivo localizadas a aproximadamente 300 metros da costa, na praia de Flecheiras (03°13'06"S – 39°16'47" W), município de Trairi, Ceará, mantidas pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) em parceria com o Laboratório de Lectinas e Carboidratos (CARBOLEC) e o Laboratório de Aplicações Biotecnológicas de Algas e Plantas (BioAP), ambos localizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A alga úmida foi transportada para o BioAP, onde foram retiradas epífitas, lavadas exaustivamente com água corrente seguida de água destilada e secas à 25°C. A alga seca (10% de umidade) foi triturada em moinho elétrico e as partículas padronizadas entre 0,2 e 0,8 mm (20 a 80 mesh).

3.2 Extração e padronização da κ -carragenana de *H. musciformis*

A alga *H. musciformis* foi submetida à extração da κ -carragenana segundo a metodologia descrita por Rodrigues e colaboradores (2011). Um becker contendo a macroalga seca e triturada e água destilada na concentração de 1,5% (m/v) foi mantido à temperatura de 80°C e agitação constante (370-400 rpm) durante 4 horas. Após esse período, o homogenato foi filtrado em malha de *nylon* de trama fina e o resíduo sólido foi submetido à uma reextração nas mesmas condições. Os carboidratos presentes no filtrado foram precipitados com etanol 96° GL na proporção 1:1 (v/v) por um período de 24 horas. O precipitado foi separado por filtração em malha de *nylon* de trama fina e posteriormente seco em estufa de circulação de ar à temperatura de 25 °C. Após triturado em moinho elétrico, o carboidrato foi denominado κ -carragenana e padronizado em 0,2 mm (80 mesh).

3.3 Efeito da concentração de ácido e temperatura de reação sobre a obtenção de ART e galactose a partir da hidrólise ácida da κ -carragenana de *H.musciformis*

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de duas variáveis independentes e 3 níveis, com 3 pontos centrais, foi utilizado para avaliar os efeitos da concentração de ácido sulfúrico e temperatura sobre a produção de açúcares redutores totais e galactose a partir da hidrólise da κ -carragenana de *H. musciformis*. As hidrólises foram conduzidas em volume 30 mL de solução ácida com 2% de κ -carragenana por 20 minutos em banho-maria digital termostatizado (Nova Instruments).

A Tabela 1 mostra os valores codificados (e reais) das variáveis independentes e a ordem randômica dos ensaios.

Tabela 1 – Matriz de ensaios com os valores codificados (e reais) das variáveis independentes, três pontos centrais (C) e ordem randômica dos ensaios realizados para a hidrólise ácida da κ -carragenana de *H. musciformis*.

Experimento	Concentração de H ₂ SO ₄ (M)	Temperatura (°C)
10 (C)	0 (0,60)	0 (70,0)
6	0 (0,60)	+ α (91,2)
7	- α (0,03)	0 (70,0)
2	+1 (1,00)	-1 (55,0)
4	+1 (1,00)	+1 (85,0)
1	-1 (0,20)	-1 (55,0)
3	-1 (0,20)	+1 (85,0)
5	0 (0,60)	- α (48,0)
9 (C)	0 (0,60)	0 (70,0)
11 (C)	0 (0,60)	0 (70,0)
8	+ α (1,17)	0 (70,0)

Fonte: autoria própria

Após a reação de hidrólise, cada hidrolisado (n = 11) foi centrifugado para separação do resíduo sólido da macroalga. Os sobrenadantes foram analisados quanto aos teores de Açúcares Redutores Totais (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), galactose, glucose e tagatose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os resultados de ART e galactose obtidos nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis* sob as condições reacionais estabelecidas pelo DCCR foram avaliados através da aplicação de Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e Análise de Resíduos para obtenção das condições de hidrólise que contribuem para os maiores rendimentos de bioconversão.

3.4 Determinação dos teores de Açúcar Redutor Total (ART) nos hidrolisados

A determinação dos teores de açúcar redutor total nos hidrolisados da κ -carragenana de *H. musciformis* seguiu a metodologia Somogyi-Nelson (1945). Em um tubo de ensaio foram adicionados 200 μ L de amostra, 160 μ L do “reagente Somogyi I” e 40 μ L do “reagente Somogyi II”. A mistura foi aquecida a 100 °C em banho maria por 5 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente foi adicionado 200 μ L do “reagente de Nelson” e 2,4 mL de água destilada para proceder a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 540 nm.

3.5 Determinação dos teores de monossacarídeos nos hidrolisados

A determinação dos teores dos monossacarídeos glucose, galactose e tagatose nos hidrolisados da κ -carragenana de *H.musciformis* foi realizada utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema Waters (Walters, Milford, MA, EUA) equipado com detector de índice refrativo Waters 2414 com duas colunas diferentes, coluna 1 para determinação de glucose e coluna 2 para determinação de galactose e tagatose. 1) Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), onde o eluente utilizado foi ácido sulfúrico 5 mM em água ultrapura (Simplicity 185, Millpore, Billeria, MA, EUA) à um fluxo de 0,5 mL/ min a 65 °C e tempo de corrida de 30 minutos; e 2) REZEX RCM Monossacarídeo (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil), na qual o eluente utilizado foi água ultrapura (Simplicity 185, Millpore, Billeria, MA, EUA) à um fluxo de 0,6 ml/min a 65 °C e tempo de corrida 25 min. A quantificação destes compostos foi realizada através das áreas dos picos observados nos cromatogramas convertidos através de uma curva padrão construída para cada composto analisado.

3.6 Obtenção da enzima L-arabinose isomerase

O extrato enzimático neste estudo foi produzido através da engenharia genética, onde o gene produtor da enzima L-AI contido na cepa de *Enterococcus faecium* foi expresso em *Escherichia coli*, BL21. Os trabalhos de clonagem e expressão foram realizados em parceria com o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia-LemBiotech e a Universidade Nacional do Litoral (UNL), em Santa Fé, Argentina. A cepa recombinante foi reativada em placa contendo meio Luria-Bertani (LB) + ampicilina por 24 horas à 37°C. As colônias selecionadas das placas, foram transferidas para o inóculo, contendo meio LB e mantidas em agitação (200 rpm) a 20 °C, 16 horas. Posteriormente, adicionou-se o agente indutor IPTG (isopropiltiogalactosídeo) 0,5mM, mantendo o processo fermentativo a 30 °C, 200 rpm por 17 horas (*overnight*).

As células obtidas de *E. coli* (BL21), foram concentradas por centrifugação, a 4°C, 7000 g, lavadas, ressuspendidas em tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 150 mM) e armazenadas em congelador a -18 °C. Programou-se o sonicador Qsonica Q500, com ponta de sonicação padrão de 19 mm, a 20 KHz, por 3 minutos com intervalos de 10 segundos. O processo foi repetido 3 vezes, para que houvesse completa ruptura celular.

Todo o processo foi realizado em banho de gelo. Ao final, o extrato foi centrifugado a 15000 g, e o sobrenadante contendo o extrato enzimático foi armazenado em congelador.

3.7 Bioconversão enzimática de galactose em D-tagatose

A metodologia cisteína-carbazol-ácido sulfúrico, desenvolvida por Dische e Borenfreund (1951), e a CLAE utilizando coluna REZEX RCM Monossacarídeo (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil), foram utilizadas para avaliar a atividade da L-arabinose isomerase na bioconversão da galactose, presente no hidrolisado da κ -carragenana de *H. musciformis*, em D-tagatose. O hidrolisado foi previamente dialisado contra água destilada e concentrado por ultrafiltração em membrana (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) à 5000 g por 30 minutos.

Em um microtubo foi adicionado 100 μ L de enzima em tampão fosfato e 400 μ L do hidrolisado contendo galactose. No branco foi utilizado apenas tampão fosfato em substituição da enzima. A reação foi mantida a 50 °C por 1 h. Uma alíquota foi retirada para análise de CLAE.

A reação foi diluída 1:200 e uma alíquota de 250 μ L foi retirada, adicionada de 50 μ L de cisteína 1,5%, 1,4 mL de ácido sulfúrico 70% e 50 μ L de carbazol 0,12%. Foi deixado para reagir por 15 minutos e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560 nm.

3.8 Análises estatísticas

A elaboração do DCCR, a obtenção dos modelos matemáticos preditivos e a construção das SR (utilizando erro puro) foram realizados com o auxílio do software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Para a decisão estatística, foram considerados significativos os valores de “p” menores que 0,05 (nível de significância de 95%). As avaliações de significância dos níveis dos fatores e as interações entre os fatores foram realizadas empregando Análise de variância (ANOVA) e Teste t (distribuição de Student). Foram elaborados modelos matemáticos preditivos considerando os efeitos dos fatores sobre as variáveis resposta estudadas. A qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada por meio do coeficiente de determinação R^2 .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração da κ -carragenana de *H. musciformis*

O rendimento da extração aquosa da κ -carragenana de *H. musciformis* foi de 45,75% com base na biomassa da macroalga seca, corroborando com Rodrigues e colaboradores (2011), que obtiveram 44,77% utilizando a mesma metodologia. A reextração conduzida com a mesma metodologia não obteve κ -carragenana, indicando que o máximo já havia sido extraído na primeira extração.

4.2. Efeito da temperatura e concentração de ácido sobre os teores de ART nos hidrolisados ácidos de κ -carragenana de *H. musciformis*

A Tabela 2 exhibe os teores de ART preditos e observados nos hidrolisados da κ -carragenana de *H. musciformis* obtidos sob diferentes condições reacionais segundo o DCCR. Os resultados observados foram muito próximos dos preditos, indicando que os erros de execução foram muito reduzidos. A maior concentração de ART foi de 7,004 g.L⁻¹, obtida no experimento 4, com temperatura de 85 °C e 1,0 M de ácido sulfúrico, enquanto o menor teor de ART foi 0,441 g.L⁻¹ no hidrolisado sob a condição de 55 °C e 0,2 M de H₂SO₄. A média e o desvio padrão da média de ART obtidos dos 3 ensaios relacionados ao ponto central foi de 3,198 ± 0,34 g.L⁻¹, sugerindo a reprodutibilidade do experimento.

Tabela 2 – Teores de ART preditos e observados nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis* obtidos sob diferentes condições reacionais segundo o DCCR.

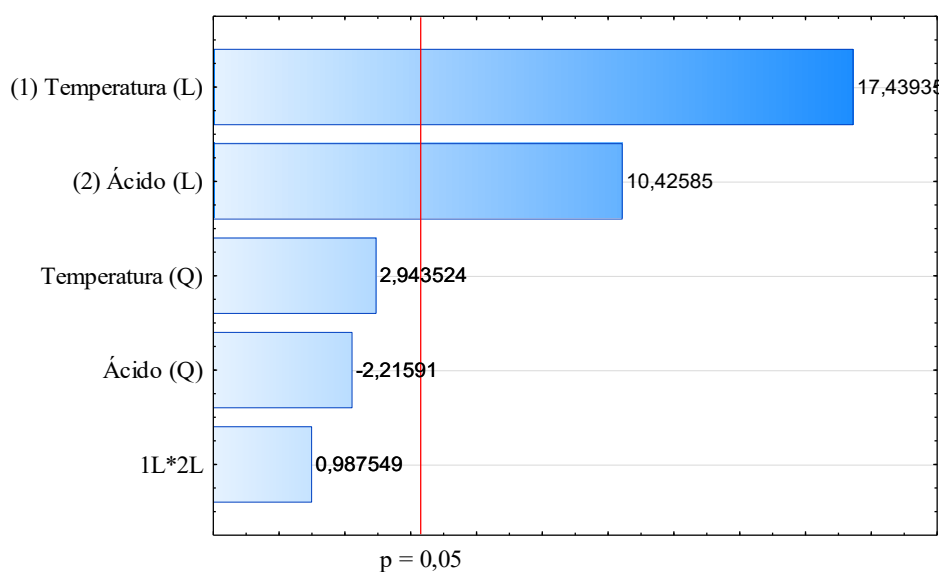
Experimento	Temperatura (°C)	[H ₂ SO ₄] (M)	ART (g.L ⁻¹)	
			Preditos	Observados
1	55,0	0,20	0,077	0,441
2	55,0	1,00	2,275	2,565
3	85,0	0,20	3,982	4,206
4	85,0	1,00	6,861	7,004
5	48,0	0,60	0,997	0,697
6	91,2	0,60	7,048	6,900
7	70,0	0,03	0,733	0,455
8	70,0	1,17	4,350	4,157
9 (C)	70,0	0,60	3,193	3,089
10 (C)	70,0	0,60	3,193	3,585
11 (C)	70,0	0,60	3,193	2,921

(C): Pontos Centrais.

Fonte: autoria própria

Os efeitos da temperatura e da concentração de H₂SO₄ para a geração de ART pelo processo de hidrólise ácida da κ -carragenana da macroalga *H. musciformis* estão mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Efeitos da temperatura e concentração de H₂SO₄ na produção de ART nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis* para p = 0,05



Fonte: autoria própria

De acordo com o gráfico de Pareto da Figura 5, a variável independente que mais afetou, de forma positiva, a geração de ART foi a temperatura. Porém, um aumento quadrático na temperatura não tem efeito significativo na geração de ART. A concentração de H₂SO₄ se comportou da mesma forma, afetou de forma positiva a geração de ART em modo linear, porém o modo quadrático não mostrou efeitos significativos.

As variáveis consideradas nesse estudo foram explicadas por um modelo matemático quadrático (Equação 1) onde o teor de ART foi dado em função de X₁ e X₂.

$$Y = 1,13837178 - 0,140832967 * X_1 + 0,00189537037 * X_1^2 + 3,5971636 * X_2 - 2,00651042 * X_2^2 + 0,0283333333 * X_1 * X_2 \quad \text{Eq. (1)}$$

onde Y é o teor de ART (g.L⁻¹), X₁ é a Temperatura (°C) e X₂ é concentração de ácido (M).

Os valores de F_{calculado} a partir da regressão foram F_{Regressão} = 317,93 e F_{Falta de ajuste} = 1,57, sendo o primeiro maior que o tabelado e o segundo menor como mostrado na Tabela 3. O valor de F_{Regressão} maior que o tabelado indica que a regressão foi significativa e explica os resultados obtidos com base nos fatores estudados no intervalo de confiança 95%, e o F_{Falta de ajuste} menor que o tabelado indica que o modelo tem bom ajuste.

Tabela 3 – Análise de variância do modelo matemático para a geração de ART por meio da hidrólise ácida da κ-carragenana de *H. musciformis*.

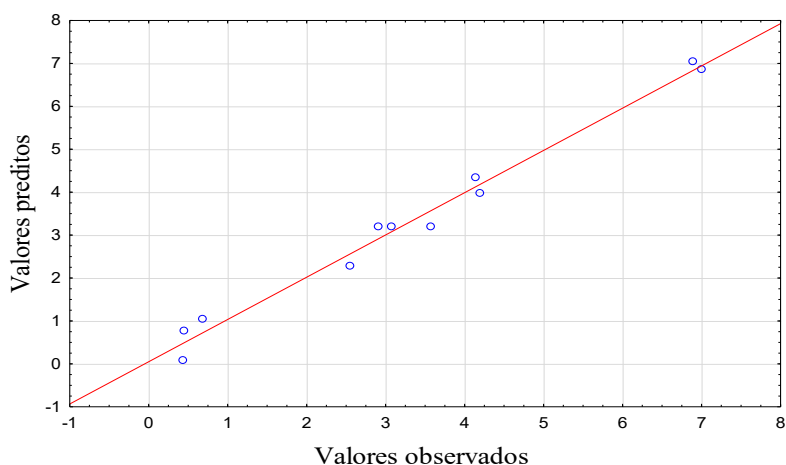
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	50,6587	5	50,6587	317,9393	62,9582
Resíduos	0,79667	5	0,15933		
Falta de ajuste (FA)	0,55961	3	0,18654	1,57369	0,0821
Erro Puro (EP)	0,23707	2	0,11853		
R ²	0,98000				

F_(0,05; 5; 5) = 5,05; F_(0,05; 3; 2) = 19,16

Fonte: autoria própria

O valor do coeficiente de determinação (R²) foi de 0,98, indicando um bom ajuste do modelo à resposta avaliada. Esse resultado foi reforçado pela grande diferença entre os F_{calculados} e F_{tabelados} expresso em F_{cal}/F_{tab}. A significância estatística do modelo observada a partir da análise de variância foi confirmada pela distribuição normal dos resíduos apresentados entre os valores experimentais e teóricos, exibidos no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Correlação entre os valores preditos e observados experimentalmente para a variável resposta ART obtidos nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis*.

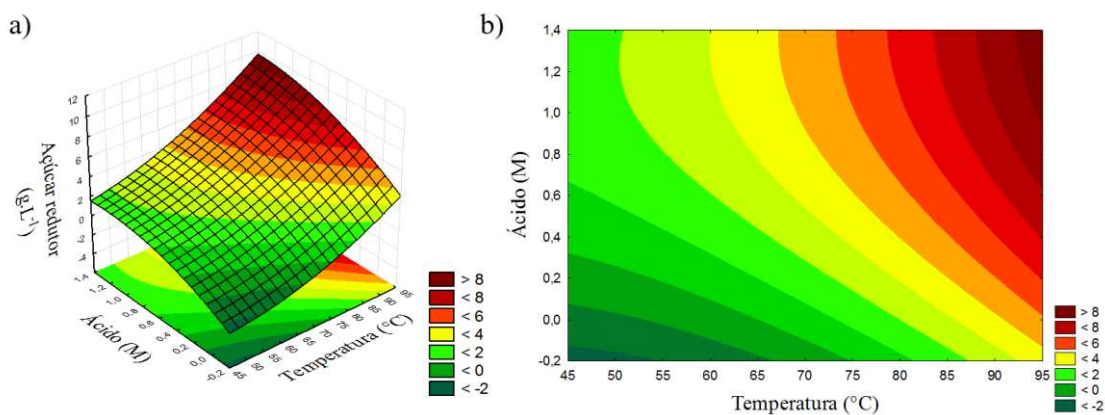


Fonte: autoria própria

Dessa forma, pôde-se verificar pela distribuição apresentada no gráfico que os valores obtidos nos experimentos, representados pelos círculos azuis, estavam próximos dos valores preditos, representados pela linha vermelha. Esse resultado mostra desvios positivos e negativos na mesma proporção, não sendo observado comportamento tendencioso.

A metodologia de superfície de resposta definiu as condições mais adequadas que maximizam a geração de ART. Os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno para a variável resposta ART indicaram a influência da temperatura e da concentração de ácido na hidrólise ácida (H_2SO_4) de κ -carragenana de *H. musciformis* (Figura 7).

Figura 7 – Influência da temperatura e da concentração de H_2SO_4 sobre a geração de ART em hidrolisado ácido de κ -carragenana de *H. musciformis*. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Curva de contorno.



Fonte: autoria própria

A curva de contorno mostrou uma superfície bidimensional cuja resposta é expressa por um diagrama de diferentes cores que mostram concentrações de ART superiores à 2 g.L⁻¹ e inferiores à 8 g.L⁻¹.

Pela análise da Figura 7b foi possível observar áreas referentes à mesma concentração de Açúcares Redutores Totais, mas que foram correspondentes às faixas de concentrações de ácido e temperaturas diferentes, significando, por exemplo, que para se atingir uma mesma concentração de ART (>8 g.L⁻¹), é possível utilizar diferentes combinações dos fatores concentração de ácido/temperatura (M/°C) de 0,8/95 ou 1,4/90. Dessa forma, pode-se escolher quais parâmetros utilizar considerando outros aspectos de processos produtivos, como o custo ou corrosão de equipamentos.

O maior teor de ART, obtido no experimento 4 do delineamento (ácido sulfúrico 1,0 M, 85°C), foi de 7,0 g.L⁻¹, o que representa 35% da concentração inicial de carragenana. Um aumento no teor de ART não significa um aumento direto na concentração de monossacarídeos, mas em um maior grau de hidrólise, pois além dos monossacarídeos, oligossacarídeos também são gerados na hidrólise. Por isso, se faz necessária uma análise mais acurada da composição de monossacarídeos dos hidrolisados.

Kim e Lee (2016) estudaram a influência da temperatura e do tempo de hidrólise de κ -carragenana (1%) na geração de ART utilizando diversos ácidos diluídos (0,1 M). A maior concentração de ART (17,14 g.L⁻¹) obtida foi utilizando ácido fórmico à 120°C por 120 min, porém essa condição de hidrólise gerou 4,74 g.L⁻¹ de HMF.

A obtenção de ART também foi avaliada após a hidrólise ácida de biomassa algácea por Sudhakar et al. (2017) quando hidrolisou quimicamente a alga *Gracilaria edulis* com ácido sulfúrico 1% (v/v), a 121°C por 15 min, e obteve 16,56 g.L⁻¹ de ART. Porém a biomassa em questão é formada por dois polissacarídeos principais, celulose e galactanas, e sua hidrólise gera glucose e galactose respectivamente, diferentemente do presente trabalho, que estuda a hidrólise da galactana purificada, obtendo principalmente galactose como produto de hidrólise.

4.3 Efeitos da temperatura e concentração do H₂SO₄ sobre o teor de Galactose e Tagatose nos hidrolisados ácidos da κ -carragenana de *H. musciformis*

A análise dos teores de galactose nos hidrolisados da κ -carragenana de *H. musciformis* mostrou a presença de outros monossacarídeos como apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição monossacarídica dos hidrolisados ácidos da κ -carragenana de *H. musciformis*.

Exp	Temp (°C)	[H ₂ SO ₄] (M)	Glucose (g.L ⁻¹)	Galactose (g.L ⁻¹)	Tagatose (g.L ⁻¹)
1	55,0	0,20	0,114	0,076	1,625
2	55,0	1,00	0,227	0,619	1,648
3	85,0	0,20	0,130	0,115	1,666
4	85,0	1,00	0,244	1,458	1,617
5	48,0	0,60	0,167	0,360	1,653
6	91,2	0,60	0,228	0,859	1,629
7	70,0	0,03	0,060	0,068	1,724
8	70,0	1,17	0,218	0,868	1,692
9 (C)	70,0	0,60	0,173	0,327	1,666
10 (C)	70,0	0,60	0,199	0,363	1,634
11 (C)	70,0	0,60	0,144	0,345	1,624

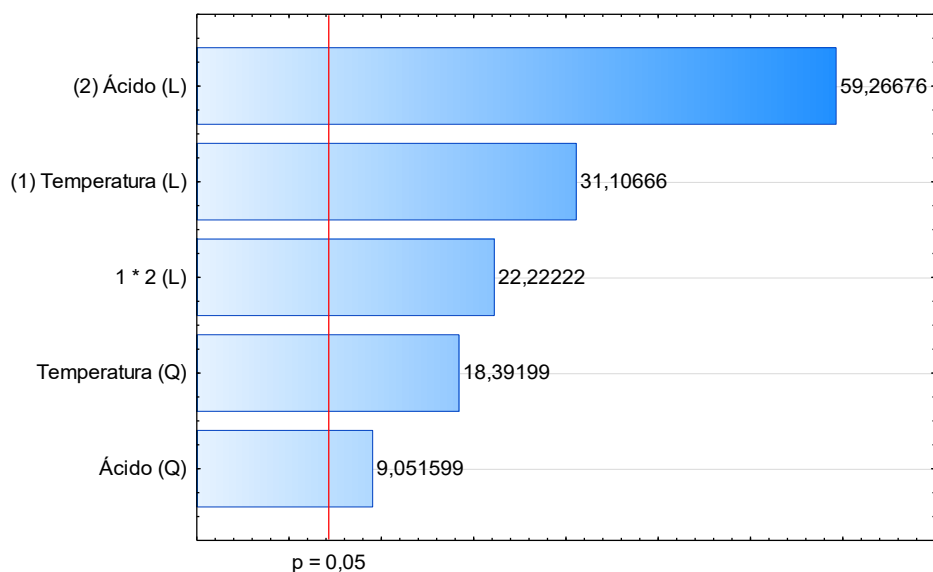
(C): Pontos Centrais

Fonte: autoria própria

Além de galactose e tagatose, teores de glucose também foram observados. As concentrações de galactose variaram entre 0,06 a 1,45 g.L⁻¹ e as de glucose foram menores, variando de 0,06 a 0,24 g.L⁻¹. A presença de glucose nos hidrolisados sugere a contaminação da κ -carragenana extraída de *H. musciformis* por pequenas concentrações de celulose. Já as elevadas concentrações de tagatose observadas nos hidrolisados, as quais foram mais constantes, variando entre 1,61 e 1,72 g.L⁻¹ não eram esperadas. O experimento 4, onde foi observada a maior concentração de ART (7 g.L⁻¹) apresentou 0,24 g.L⁻¹ de glucose, 1,45 g.L⁻¹ de galactose e 1,61 g.L⁻¹ de tagatose, correspondendo a 3,42, 20,71 e 23,00% dos monossacarídeos, respectivamente. Esses resultados sugerem a presença de oligossacarídeos remanescentes no hidrolisado, fato que implica na ampliação dos níveis das variáveis considerados no DCCR para otimização das condições de hidrólise da κ -carragenana visando a obtenção de altos teores de monossacarídeos. Por outro lado, a presença de tagatose no hidrolisado já foi um bom resultado, visto que não há relatos na literatura desse tipo de produção.

Os efeitos das variáveis independentes sobre a geração de galactose pelo processo de hidrólise da κ -carragenana da macroalga *H. musciformis* estão mostrados na Figura 8.

Figura 8 – Efeitos da temperatura e concentração de H₂SO₄ na produção de galactose nos hidrolisados de κ-carragenana de *H. musciformis* para p = 0,05



Fonte: autoria própria

Todas as variáveis independentes, sejam lineares, quadráticas ou a interação, afetaram de forma positiva a geração de galactose, o que indica que aumentos dessas variáveis refletirão em maior concentração de galactose. Os fatores considerados nesse estudo foram explicados por um modelo quadrático (Equação 2) onde o teor de galactose foi calculado em função de X_1 e X_2 .

$$Y = 3,44360459 - 0,0934858953 * X_1 + 0,000619166667 * X_1^2 - 1,90462369 * X_2 + 0,428515625 * X_2^2 + 0,0333333333 * X_1 * X_2 \quad \text{Eq. (2)}$$

onde Y é a Concentração de Galactose (g.L⁻¹), X_1 é a Temperatura (°C) e X_2 é concentração de H₂SO₄ (M).

Os valores de $F_{\text{calculados}}$ a partir da regressão foram $F_{\text{Regressão}} = 113,28$ e $F_{\text{Falta de ajuste}} = 78,69$, sendo ambos maiores que os $F_{\text{s tabelados}}$ 5,05 e 19,16 respectivamente. O valor de $F_{\text{Regressão}}$ maior que o tabelado indica que a regressão foi significativa e explica os resultados obtidos com base nas variáveis estudadas no intervalo de confiança 95%, e o $F_{\text{Falta de ajuste}}$ maior que o tabelado indica que o modelo necessita de ajuste.

Tabela 5 – Análise de variância do modelo matemático para a geração de galactose por meio da hidrólise ácida da κ -carragenana de *H. musciformis*.

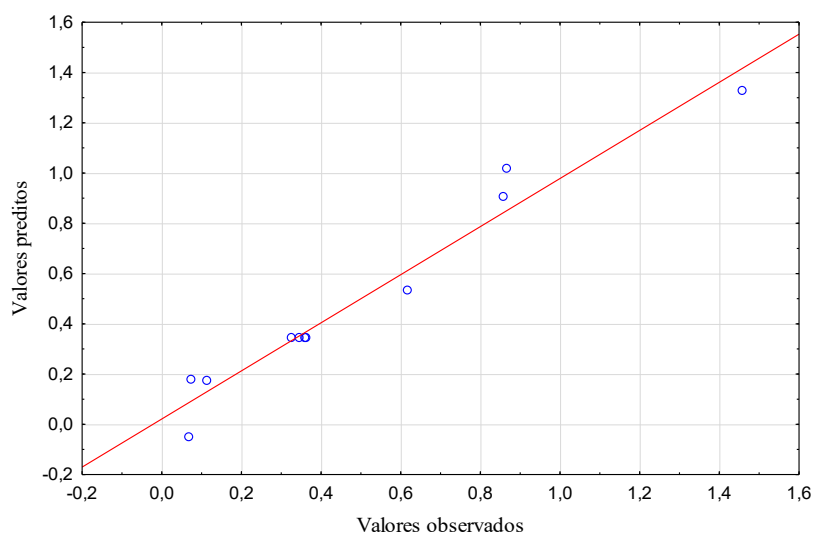
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcal	Fcal/Ftab
Regressão	1,74772	5	1,74772	113,2845	22,43258
Resíduos	0,077139	5	0,015428		
Falta de ajuste	0,076491	3	0,025497	78,69393	4,107199
Erro Puro	0,000648	2	0,000324		
R^2	0,95720				

$F_{(0,05; 5; 5)} = 5,05$; $F_{(0,05; 3; 2)} = 19,16$

Fonte: autoria própria

O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,95, indicando um bom ajuste do modelo à resposta avaliada. A significância estatística do modelo observada a partir da análise de variância foi confirmada pela distribuição normal dos resíduos apresentados entre os valores experimentais e teóricos, exibidos no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Correlação entre os valores preditos e observados experimentalmente para a variável resposta Geração de Galactose obtidos nos hidrolisados de κ -carragenana de *H. musciformis*.



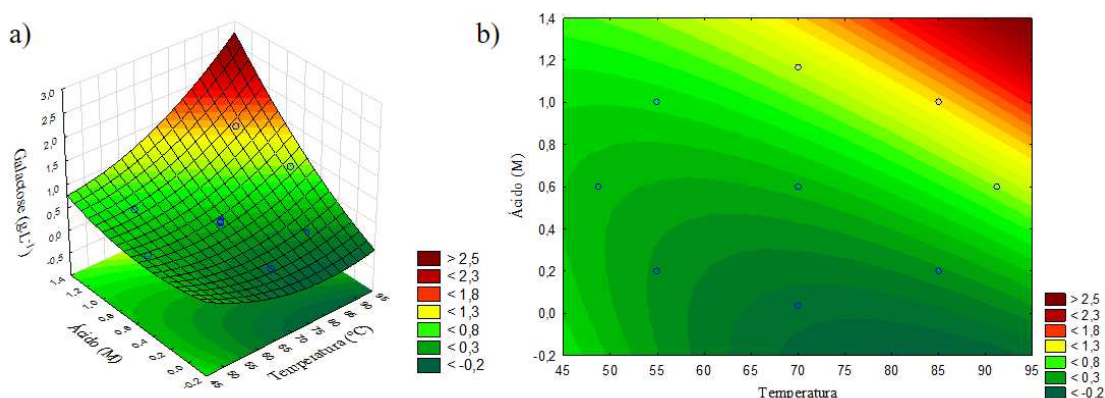
Fonte: autoria própria

Dessa forma, foi possível verificar pela distribuição apresentada no gráfico que os valores obtidos nos experimentos, representados pelos círculos azuis, estavam próximos dos valores preditos, representados pela linha vermelha. Esse resultado mostra desvios

positivos e negativos na mesma proporção, não sendo observado comportamento tendencioso.

A metodologia de superfície de resposta definiu as condições mais adequadas que maximizam a geração de galactose. Os gráficos de superfície de resposta (Figura 9a) e curvas de contorno (Figura 9b) para a variável resposta concentração de galactose indicaram a influência da temperatura e da concentração de ácido na geração de galactose após a hidrólise de *H. musciformis*.

Figura 9 – Influência da temperatura e da concentração de H₂SO₄ sobre a geração de galactose em hidrolisado ácido de κ-carragenana de *H. musciformis*. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Curva de contorno.



Fonte: autoria própria

A curva de contorno mostrou uma superfície bidimensional cuja resposta foi expressa por um diagrama de diferentes cores que mostraram concentrações de galactose superiores à 0,3 g.L⁻¹ e inferiores à 2,5 g.L⁻¹, os quais representaram os valores reais. A maior concentração de galactose obtida no presente trabalho foi de 1,45 g.L⁻¹ com ácido sulfúrico 1,0 M, à 85°C.

Kim e Lee (2016) estudaram a influência da temperatura e do tempo de hidrólise de κ-carragenana (1%) na geração de D-galactose utilizando diversos ácidos diluídos (0,1 M). A maior concentração de D-galactose (8,23 g.L⁻¹) obtida foi utilizando ácido clorídrico à 120°C por 60 min, porém essa condição de hidrólise gerou 2,14 g.L⁻¹ de HMF.

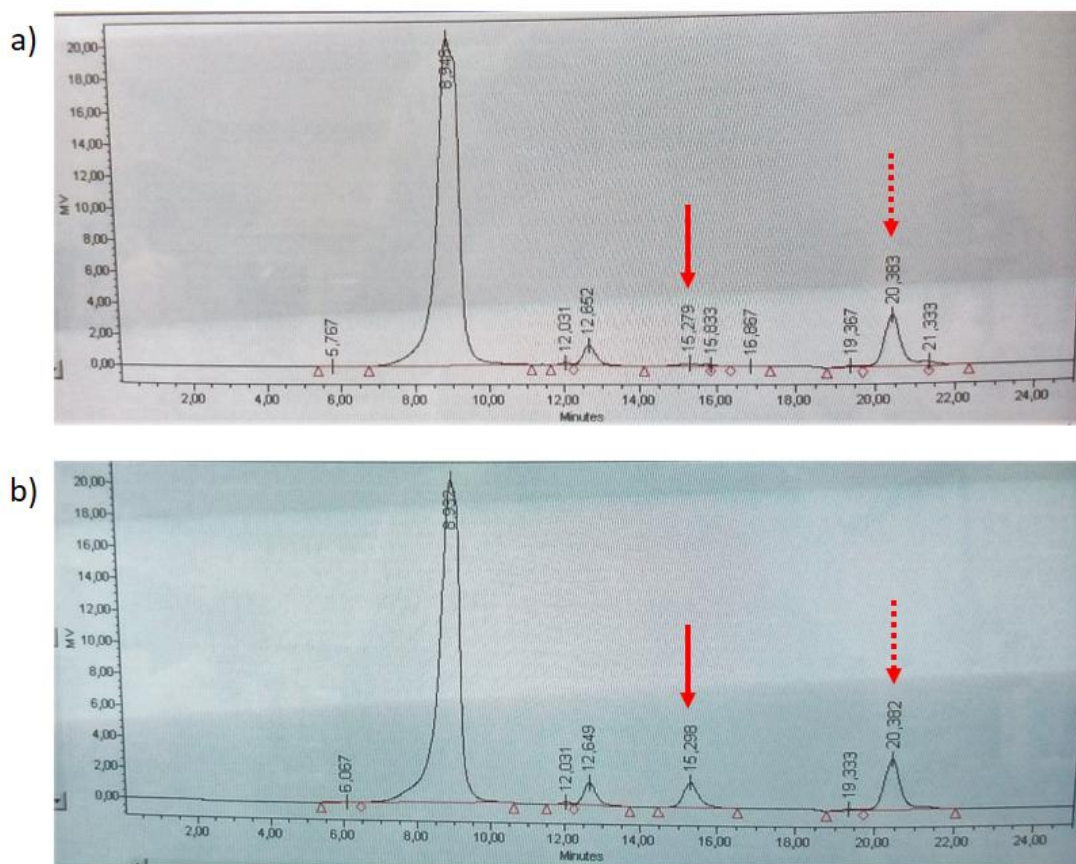
Meinita, Hong e Jeong (2012) hidrolisaram *Kappaphycus alvarezii* (10%) com 0,2 M de H₂SO₄ à 130°C por 15 min e obtiveram 23,87 g.L⁻¹ de galactose, porém esta condição também gerou 4,85 g.L⁻¹ de HMF. Porém a biomassa em questão é formada por dois polissacarídeos principais, celulose e galactanas, e sua hidrólise gera glucose e

galactose respectivamente, diferentemente do presente trabalho, que estuda a hidrólise da galactana purificada, obtendo principalmente galactose como produto de hidrólise. Estes resultados apontam que o modelo pode ser melhorado para aumentar a geração de galactose.

4.4 Bioconversão de galactose proveniente da hidrólise ácida da κ -carragenana de *H. musciformis* em tagatose pela enzima L-arabinose isomerase

Os perfis cromatográficos do hidrolisado de κ -carragenana de *H. musciformis* de maior teor de monossacarídeos antes e após a atividade enzimática da L-arabinose isomerase estão mostradas na Figura 10. Os respectivos teores de galactose e tagatose estão mostrados na Tabela 8.

Figura 10 – Perfil cromatográfico do hidrolisado de κ -carragenana de *H. musciformis*, (a) antes da reação enzimática e (b) depois da reação enzimática. (→) galactose; (→) tagatose.



Fonte: autoria própria

Tabela 6 – Composição monossacarídica do hidrolisado ácido de κ -carragenana de *H. musciformis* de maior teor de monossacarídeos antes e após a atividade enzimática da L-arabinose isomerase.

	Galactose (g.L ⁻¹)	Tagatose (g.L ⁻¹)
Antes	0,0378	1,5298
Após	0,1774	1,3927

Fonte: autoria própria

Uma etapa prévia à bioconversão enzimática, de concentração do hidrolisado, mostrou a formação de um precipitado, o qual foi removido por centrifugação. Posteriormente, a determinação dos teores de monossacarídeos por CLAE mostrou que o precipitado se tratava de galactose, uma vez que houve uma redução no seu teor inicial no hidrolisado.

Após o ensaio colorimétrico para quantificação da tagatose foi verificada coloração indicativa da presença de tagatose, mesmo na ausência da L-arabinose isomerase, se mostrando, portanto, inconclusivo. No entanto, esse resultado corroborou a presença de tagatose nos hidrolisados já observada por meio da CLAE. Além disso, de acordo com os teores de galactose e tagatose observados após a bioconversão foi observado um aumento no teor de galactose, sugerindo a inversão da atividade enzimática, uma vez que o meio continha maior concentração de tagatose e menor de galactose. A reação inversa da enzima L-arabinose isomerase, produzindo galactose a partir de tagatose, contribui ainda mais para os indícios de obtenção desse edulcorante apenas por meio da hidrólise química da κ -carragenana de *H. musciformis*. Porém novos estudos serão necessários para confirmar essa hipótese.

5. CONCLUSÃO

A hidrólise ácida da κ -carragenana extraída da macroalga *H. musciformis* gerou galactose, glucose e tagatose, no entanto estudos posteriores são necessários para confirmar a produção do edulcorante. Além disso, a bioconversão da galactose presente no referido hidrolisado por meio da L-arabinose isomerase pode aumentar o rendimento de produção da tagatose.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.
- ARMAN, M.; QADER, S. A. U. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1264–1271, 2012.
- BALAKUMAR, P.; MAUNG-U, K.; JAGADEESH, G. Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 600–609, 2016.
- BARBEYRON, T. et al. i-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of k-carrageenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35499–35505, 2000.
- BEADLE, J. R.; SAUNDERS, J. P.; WAJDA JR, T. J. Process for manufacturing tagatose. 1991.
- BEZERRA, A. F.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1813–1817, 2010.
- BRITO, T. V. et al. Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 957–964, 2016.
- CARNEIRO, J. G. et al. Analysis of some chemical nutrients in four Brazilian tropical seaweeds. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 137, 2014.
- CHAUBEY, A. et al. Bioconversion of sucralose-6-acetate to sucralose using immobilized microbial cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 91, p. 81–86, 2013.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.
- COSENZA, V. A. et al. Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 780–789, 2014.
- COURA, C. O. et al. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 76–84, 2017.
- DASGUPTA, D. et al. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, v. 197, p. 9–21, 2017.

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**, v. 86, n. 3, p. 1207–1215, 2011.

DIOGO, J. S. G. et al. Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: A 2010 survey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 548–553, 2013.

DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugar and trioses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 192, p. 579–582, 1951.

DUARTE, L. M. et al. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared. **Food Research International**, 2017.

EDWARDS, C. H. et al. The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 158–166, 2016.

FERNAND, F. et al. Offshore macroalgae biomass for bioenergy production: Environmental aspects, technological achievements and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 35–45, 2016.

GRENBY, T. H. Intense sweeteners for the food industry: an overview. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 2–6, 1991.

JIE, S. et al. Acetylation and deacetylation for sucralose preparation by a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* WZS01. **Journal of Bioscience & Bioengineering**, p. 10–14, 2017.

JUNG, K. A. et al. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 182–190, 2013.

KALITNIK, A. A. et al. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 1, p. 65–72, 2013.

KAMIŃSKA-DWÓRZNICKA, A. et al. The influence of kappa carrageenan and its hydrolysates on the recrystallization process in sorbet. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 162–165, 2015.

KIM, J. A.; LEE, S. B. Production of 3,6-anhydro-D-galactose from k-carrageenan using acid catalysts. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 79–86, 2016.

KIRKLAND, D.; GATEHOUSE, D. “Aspartame: A review of genotoxicity data”. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 161–168, 2015.

- KOKO, M. Y. F. et al. Characterization of a thermostable mannitol dehydrogenase from hyperthermophilic *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 with potential application in mannitol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 122–128, 2016.
- LEHAHN, Y.; INGLE, K. N.; GOLBERG, A. Global potential of offshore and shallow waters macroalgal biorefineries to provide for food, chemicals and energy: Feasibility and sustainability. **Algal Research**, v. 17, p. 150–160, 2016.
- LEVIN, G. V. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. **Journal of medicinal food**, v. 5, n. 1, p. 23–36, 2002.
- LIANG, M. et al. Bioconversion of D-galactose to D-tagatose: Continuous packed bed reaction with an immobilized thermostable L-arabinose isomerase and efficient purification by selective microbial degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1469–1474, 2012.
- LIN, H. et al. Cold incineration of sucralose in aqueous solution by electro-Fenton process. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p. 218–225, 2017.
- MANJASETTY, B. A.; CHANCE, M. R. Crystal Structure of Escherichia coli L-Arabinose Isomerase (ECAI), The Putative Target of Biological Tagatose Production. **Journal of Molecular Biology**, v. 360, n. 2, p. 297–309, 2006.
- MANZO, R. M. Preparación y caracterización de derivados insolubilizados de la enzima L-arabinosa isomerasa para su empleo en la bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa. p. 332 f, 2013.
- MARINHO-SORIANO, E. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2402–2406, 2006.
- MATEO, S. et al. Optimization of acid hydrolysis of olive tree pruning residue. Fermentation with *Candida guilliermondii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 39–46, 2014.
- MEI, W. et al. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus coagulans* NL01 and its application for D-tagatose production. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 55, 2016.
- MEINITA, M. D. N.; HONG, Y. K.; JEONG, G. T. Comparison of sulfuric and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1–2, p. 123–128, 2012.
- MEN, Y. et al. Enzymatic conversion of d-galactose to d-tagatose: Cloning, overexpression and characterization of l-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. **Microbiological Research**, v. 169, n. 2–3, p. 171–178, 2014.
- MICHON, C. et al. Structure evolution of carrageenan/milk gels: Effect of shearing, carrageenan concentration and nu fraction on rheological behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 3, p. 541–547, 2005.

- MOKHTARUDDIN, N. S. M. et al. Unusual saccharin-N,O (carbonyl) coordination in mixed-ligand copper(II) complexes: Synthesis, X-ray crystallography and biological activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1139, p. 1–9, 2017.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 375–380, 1944.
- NGUYEN, T. T. H. et al. Production of steviol from steviol glucosides using B-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 93–94, p. 157–165, 2016.
- OH, D. K. Tagatose: Properties, applications, and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 1–8, 2007.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações Biológicas: Contribuições E Perspectivas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.
- PAPPU, S. M. J.; GUMMADI, S. N. Artificial neural network and regression coupled genetic algorithm to optimize parameters for enhanced xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 136–145, 2017.
- PARK, J. H. et al. Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: A practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 83–88, 2012.
- PARK, J. H. et al. Simultaneous utilization of galactose and glucose by *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 65, p. 213–218, 2014.
- PATEL, H.; CHAPLA, D.; SHAH, A. Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 109, p. 323–331, 2017.
- PATEL, M. J. et al. A single and two step isomerization process for D-tagatose and L-ribose bioproduction using L-arabinose isomerase and D-lyxose isomerase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 27–33, 2017.
- PHILIPPE, R. N. et al. Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 155–161, 2014.
- PUNTURAT, V.; HUANG, K. L. Degradation of acesulfame in aqueous solutions by electro-oxidation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 63, p. 286–294, 2015.
- PURKAYASTHA, S. et al. Steviol glycosides in purified stevia leaf extract sharing the

- same metabolic fate. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 125–133, 2016.
- RASHIDIAN, M.; FATTAHI, A. Comparison of thermochemistry of aspartame (artificial sweetener) and glucose. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 127–133, 2009.
- RHIMI, M. et al. Production of d-tagatose, a low caloric sweetener during milk fermentation using l-arabinose isomerase. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3309–3315, 2011.
- RICHARDS, S. et al. Removal and attenuation of sewage effluent combined tracer signals of phosphorus, caffeine and saccharin in soil. **Environmental Pollution**, p. 1–9, 2016.
- RIOUX, L.-E.; BEAULIEU, L.; TURGEON, S. L. Seaweeds: a traditional ingredients for new gastronomic sensation. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 255–265, 2017.
- RODRIGUES, D. et al. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. **Food Chemistry**, v. 183, p. 197–207, 2015.
- RODRIGUES, J. A. G. et al. Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 33, n. 2, p. 137–144, 2011.
- SANTI, E. et al. Antimicrobial evaluation of new metallic complexes with xylitol active against *P. aeruginosa* and *C. albicans*: MIC determination, post-agent effect and Zn-uptake. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 67–75, 2016.
- SCHMIDT, É. C. et al. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. **Aquatic Botany**, v. 100, p. 8–17, 2012.
- SHOBANA, S. et al. A review on the biomass pretreatment and inhibitor removal methods as key-steps towards efficient macroalgae-based biohydrogen production. **Bioresource Technology**, 2017.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61–68, 1945.
- SU, W. et al. Polymorphism of D-mannitol: Crystal structure and the crystal growth mechanism. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 358–362, 2016.
- SUDHAKAR, M. P. et al. Biosaccharification and ethanol production from spent seaweed biomass using marine bacteria and yeast. **Renewable Energy**, v. 105, p. 133–139, 2017.
- SUN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant activities of k-carrageenan oligosaccharides degraded by different methods. **Food Chemistry**, v. 178, p. 311–318, 2015.

- SYLVETSKY, A. C.; ROTHER, K. I. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. **Physiology and Behavior**, v. 164, p. 446–450, 2016.
- TANIGUCHI, H.; OKANO, K.; HONDA, K. Modules for in vitro metabolic engineering: Pathway assembly for bio-based production of value-added chemicals. **Synthetic and Systems Biotechnology**, p. 1–10, 2017.
- VASCONCELOS, M. A. et al. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 101, p. 1–7, 2017.
- VYMAZAL, J.; DVORAKOVA BREZINOVA, T. Removal of saccharin from municipal sewage: The first results from constructed wetlands. **Chemical Engineering Journal**, v. 306, p. 1067–1070, 2016.
- WANG, Y. et al. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 989–995, 2009.
- WEI, N.; QUARTERMAN, J.; JIN, Y. S. Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 70–77, 2013.
- XU, W. et al. L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2985–2992, 2014.
- YUN, E. J. et al. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 311–318, 2016.
- YUN, E. J.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Red macroalgae as a sustainable resource for bio-based products. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 247–249, 2015.
- ZELIN, J. et al. Selective liquid-phase hydrogenation of fructose to D-mannitol over copper-supported metallic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 319, p. 48–56, 2017.