



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

FRANCISCO LUCAS DE SOUZA LOPES

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA R-FICOERITRINA DA
MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* E DETERMINAÇÃO DA
SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

FORTALEZA

2018

FRANCISCO LUCAS DE SOUZA LOPES

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA R-FICOERITRINA DA
MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* E DETERMINAÇÃO DA SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Monografia apresentada ao Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Insumos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientador: Me. Acrísio José Uchoa Bastos Filho.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- L852o Lopes, Francisco Lucas de Souza.
Otimização do processo de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* e determinação da sua capacidade antioxidante / Francisco Lucas de Souza Lopes. – 2018.
74 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.
Coorientação: Prof. Me. Acrísio José Uchoa Bastos Filho.
1. Corante natural vermelho. 2. Pigmento fluorescente. 3. Macroalga marinha vermelha. 4. Atividade antioxidante. I. Título.

CDD 661

FRANCISCO LUCAS DE SOUZA LOPES

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA R-FICOERITRINA DA
MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* E DETERMINAÇÃO DA SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Monografia apresentada ao Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Insumos Biotecnológicos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Me. Acrisio José Uchôa Bastos Filho (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Renata Line da Conceição Rivanor
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Roberta Cristiane Cavalcante Costa
Secretaria da Saúde do Estado do Ceará (SESA)

À minha avó, Maria Lucimar, *in memoriam*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Laura e Weber, que sempre lutaram por mim e me deram todo o apoio para que eu estivesse aqui.

Ao meu irmão, Ramon, pelo companheirismo e atenção.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Márjory Holanda, por ter me recebido na sua equipe. Por todo conhecimento e ajuda, pelas conversas descontraídas e pela energia contagiante.

Ao meu coorientador, Acrisio Bastos, pela paciência e pela ajuda durante esse período que estive no laboratório, pela alegria de trabalhar, pela amizade, paciência e companhia.

Às participantes da banca examinadora, Dra. Renata Line da Conceição Rivanor e a Ms. Roberta Cristiane Cavalcante Costa, pela disponibilidade e pelas sugestões.

À profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides que permitiu o uso de equipamentos e reagentes do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC), contribuído para a realização deste trabalho.

Ao Neto e à Jéssica, que voluntariamente ajudaram na realização de várias etapas desse trabalho. Muito obrigado pela sua disponibilidade e amizade.

À Thais, pela ajuda com os ensaios de atividade antioxidante.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP), Éwerton, Ingrid, Ana Carolina, Asaf, Carolina, Ticiano, George, Cirlânio, Edna, Pedro e Gabrielle. Foi um prazer conviver diariamente com vocês durante esse período.

Aos integrantes CARBOLEC, Anderson, Pedro, Vitória e João Victor. Obrigado!

À Coordenação do curso de Bacharelado em Biotecnologia, por estar sempre prontamente disponível a ajudar os alunos e melhorar a nossa formação.

Ao Gilmar Ferreira, secretário do curso, que sempre nos ajuda nos momentos em que mais precisamos. Pela sua atenção, gentileza e disponibilidade.

Ao corpo docente da Biotecnologia UFC e à quarta turma da Biotecnologia UFC.

Aos meus amigos do curso, que são muitos. Entre eles: Vanessa, Joaquim, Lennon, Amanda, Mateus, Bruna, Milena, Cristiane, Larissa, Rhaynan. Eder, Chris, Bruno, Patrícia, Matheus Girão, Beatriz, Luca, Jackson, João Pedro, Brenda, Dayane, Jéssica, Letícia, Larisse, Jonathan, Matheus Finger. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos durante essa longa caminhada!

À minha amiga Carolina Gomes, pela amizade e apoio incondicional.

Aos amigos dos tempos de escola, Loraynne, Vanessa, Welton e Darlan, de quem sempre tive apoio.

Aos amigos Matheus Alexandre, Daniel Macêdo e Wallace Martins, pelo companheirismo e apoio, mesmo que de longe.

Aos amigos que fiz durante o intercâmbio, Natália, Noêmia, Alice, Thiago, Martina, Florian, Belén, Jeronimo, Africa, Enrique, Yan, Gabriela, Isabela e Victor. Muito obrigado pela companhia em todas as situações que passamos durante aquele ano.

Ao Movimento Ocupa Biotec, pelas amizades conquistadas, pelo momento de organização e resistência e compartilhamento de conhecimentos e vivências.

À CAPES, pela oportunidade de participar do Programa Ciências sem Fronteiras, a maior experiência acadêmica e pessoal que puder ter.

Ao Programa Integrado de Qualificação Discente e à Liga Nacional dos Acadêmicos em Biotecnologia, em nome dos professores André Luís Coelho da Silva e Ana Lúcia Ponte Freitas, pelo aprendizado e experiência de liderança e de trabalho em equipe que pude vivenciar.

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

Às agências de fomento CAPES e CNPq, pela disponibilização de recursos para realização do trabalho.

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

“Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.” (Fernando Pessoa)

RESUMO

A R-Ficoeritrina (R-FE) é um pigmento fotossintético (ficobiliproteína) presente em macroalgas vermelhas, o qual tem sido aplicado como sonda fluorescente em citometria, microscopia, imunquímica e apresentado atividades biológicas importantes para a saúde humana tais como antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória. A R-FE também tem aplicação como corante alimentício e em produtos farmacológicos e cosméticos. Entretanto, o rendimento dos métodos de extração, bem como o de purificação desse pigmento de macroalgas ainda é baixo. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo otimizar o processo de purificação da R-FE da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*, com o intuito de elevar o rendimento do pigmento puro, e determinar a sua atividade antioxidante. Para tanto, foi realizada uma extração de 6 horas contínuas em tampão fosfato de potássio (PB) 25 mM, pH 6,5, após trituração em moinho elétrico por três minutos. Em seguida, o extrato bruto da *S. filiformis* foi submetido a uma cromatografia de troca-iônica em matriz de DEAE-Sephacel. Após isso, com a finalidade de aumentar o índice de pureza do pigmento, foi realizada uma ultrafiltração em Vivaspin de membrana de 100 kDa. O pigmento obtido após o processo de ultrafiltração foi utilizado para a realização dos ensaios de atividade antioxidante, a partir de três métodos. O pico cromatográfico alcançou rendimento de $0,11 \pm 0,008$ mg de R-FE/ g de alga úmida e recuperação de $62,32 \pm 2,23\%$, valor até três vezes maior que o atingido em trabalhos que utilizaram a mesma macroalga para a obtenção de R-FE. Após a ultrafiltração, o material retido atingiu recuperação de $37,69 \pm 1,267\%$, valor cerca de 12% menor que o relatado na literatura, todavia atingiu índice de pureza superior de $2,36 \pm 0,146$. A R-FE pura atingiu elevada capacidade antioxidante nos três métodos testados, atingindo, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, capacidade quelante do íon ferroso de $94,75 \pm 1,86\%$, sequestro do radical DPPH em $79,04 \pm 0,66\%$ e do radical ABTS, $97,98 \pm 0,52\%$. Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que o processo de purificação foi otimizado, alcançando rendimento, recuperação e índice de pureza superiores aos relatados na literatura, gerando um esquema de purificação mais rápido e eficiente. Além disso, a atividade antioxidante dessa ficoeritrina, se demonstrou elevada por três métodos testados.

Palavras-chave: Corante natural vermelho; Pigmento fluorescente; Macroalga marinha vermelha; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

R-Phycoerythrin (R-PE) is a photosynthetic pigment (phycobiliprotein) present in red macroalgae, which has been applied as a fluorescent probe in cytometry, microscopy, immunochemistry and has been presented important biological activities for human health such as antioxidant, antitumor and anti-inflammatory. R-PE also has application as a food colorant and in pharmacological and cosmetic products. However, the yield of the extraction methods as well as the purification of this macroalgal pigment is still low. Thus, the present work aimed to optimize the R-PE purification process of the red marine macroalgae *Solieria filiformis*, in order to increase the yield of the pure pigment, and to determine its antioxidant activity. For that, a continuous 6-hour extraction was carried out in 25 mM potassium phosphate buffer (PB), pH 6.5, after grinding in an electric mill for three minutes. Then, the crude extract of *S. filiformis* was subjected to ion exchange chromatography on a DEAE-Sephacel matrix. Thereafter, in order to increase the purity index of the pigment, a 100 kDa membrane Vivaspin ultrafiltration was performed. The pigment obtained after the ultrafiltration process was used to carry out the antioxidant activity tests, using three methods. The chromatographic peak reached a yield of 0.11 ± 0.008 mg of R-PE / g of wet algae and recovery of $62.32 \pm 2.23\%$, value up to three times higher than that reached in works that used the same macroalgae for obtaining R-PE. After the ultrafiltration, the retained material achieved a recovery of $37.69 \pm 1.267\%$, a value about 12% lower than that reported in the literature, but reached a higher purity index of 2.36 ± 0.146 . The pure R-PE reached a high antioxidant capacity in the three tested methods, reaching a concentration of 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ferrous ion chelating capacity of $94.75 \pm 1.86\%$, sequestration of the DPPH radical in 79.04 ± 0 , 66% and the ABTS radical, $97.98 \pm 0.52\%$. In view of the obtained results, it was possible to conclude that the purification process was optimized, achieving a yield, recovery and purity index higher than those reported in the literature, generating a faster and more efficient purification scheme. In addition, the antioxidant activity of this phycoerythrin was shown to be elevated by three methods tested.

Keywords: Natural red dye; Fluorescent pigment; Red seaweed macroalgae; Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Produtos oriundos das macroalgas e seus métodos e processos de obtenção ..	22
Figura 2	– Aspecto da coloração dos pigmentos azul e vermelho purificados da macroalga marinha <i>Hypnea musciformis</i>	24
Figura 3	– Conceito de biorrefinaria para obtenção e aplicação de produtos derivados de macroalgas	27
Figura 4	– Espectro de Absorção dos Pigmentos Fotossintetizantes Ficoeritrina, Ficociana e Clorofila <i>a</i> presentes em Macroalgas Vermelhas	28
Figura 5	– Radiação Eletromagnética	29
Figura 6	– Representação da Membrana do Tilacóide e dos Ficobilissomos	30
Figura 7	– Representação da Estrutura do Ficobilissomo	31
Figura 8	– Formação dos Discos Hexaméricos das Ficobiliproteínas	32
Figura 9	– Estruturas Químicas das Ficobilinas	33
Figura 10	– Estruturas das Ficoeritrinas	34
Figura 11	– Estrutura Tridimensional das Subunidades α e β , do Trímero e do Hexámero da R-Ficoeritrina da Macroalga Vermelha <i>Gracilaria chilensis</i>	36
Figura 12	– Características espectroscópicas da R-Ficoeritrina purificada da macroalga vermelha <i>Solieria filiformis</i>	37
Figura 13	– Macroalga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae)	45
Figura 14	– Protocolo de extração da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha <i>Solieria filiformis</i>	46
Figura 15	– Aspecto visual da coloração e da fluorescência do o PIII-DEAE, VSR e do permeado após etapa de ultrafiltração em membrana de polietersulfona	56
Figura 16	– Protocolo otimizado de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha <i>Solieria filiformis</i>	57

Figura 17 – Aspecto visual de amostras do extrato bruto proteico e das soluções de R-FE obtidas em cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis* sob a luz branca e a luz azul..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pigmentos, Componentes da Parede Celular e Função Ecológica de Macroalgas Verdes, Marrons e Vermelhas.....	21
Tabela 2 – Valor comercial de ficobiliproteínas	25
Tabela 3 – Distribuição geográfica, métodos de purificação, rendimentos e índices de pureza de R-Ficoeritrina de macroalgas vermelhas	40
Tabela 4 – Tabela de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i> utilizando o processo otimizado	57
Tabela 5 – Comparação entre os valores do rendimento, recuperação e índice de pureza da R-FE nas etapas de extração e purificação relatados na literatura e no presente trabalho	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da quelação do íon ferroso pela R-FE purificada de <i>S. filiformis</i>	61
Gráfico 2 – Efeito do sequestro do radical DPPH pela R-FE purificada de <i>S. filiformis</i>	62
Gráfico 3 – Efeito do sequestro do radical ABTS ^{•+} pela R-FE purificada de <i>S. filiformis</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ι	Iota
κ	Kappa
λ_{\max}	Comprimento de onda de absorção máxima
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
A_0	Absorbância a 517 ou 562 de DPPH ou FeSO_4
A_{280}	Absorbância a 280 nm
A_{564}	Absorbância a 564 nm
A_{618}	Absorbância a 618 nm
A_{730}	Absorbância a 730 nm
Ab	Absorbância a 517 ou 562 de R-FE
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AC	Alga congelada
AFC	Aloficocianina
AIE	Agência Internacional de Energia
APAFG	Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru
AS	Alga seca
AU	Alga úmida
B-FE	B-Ficoeritrina
b-FE	b-Ficoeritrina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BioAP	Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos
BSA	Albumina sérica bovina
CARBOLEC	Laboratório de Carboidratos de Lectinas
CF	Fator de acoplamento
C-FE	C-Ficoeritrina
CU-FE	CU-Ficoeritrina
DBBM	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
DEAE	Dietilaminoetil

DIC	Dainippon Ink & Chemicals
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato
ETP-Sf	Extrato total proteico de <i>Solieria filiformis</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
FeSO ₄	Sulfato ferroso
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
IEA	International Energy Agency
IP	Índice de Pureza
kDa	Quilodalton
m/v	Massa/volume
MeOH	Metanol
PB	Tampão fosfato de potássio, 0,025M, pH 6,5
PCB	Ficocianobilina
PEB	Ficoeritrobilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIII-DEAE	Pico eluído com PB acrescido de 0,5 M de NaCl em matriz de DEAE-Sephacel
PS	Fotossistema
PUB	Ficourobilina
PXB	Ficoviolobilina
R-FE	R-Ficoeritrina; Concentração de R-Ficoeritrina
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
UFC	Universidade Federal do Ceará
US\$	Dólar dos Estados Unidos
VSR	Material retido no vivaspin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Algas Marinhas: características gerais, classificação e importância ecológica	19
1.2	Importância econômica, aplicações das macroalgas marinhas e biorrefinaria	21
1.3	Propriedades estruturais e espectroscópicas das Ficobiliproteínas	26
1.3.1	<i>Ficoeritrinas</i>	33
1.4	Extração e Purificação do Pigmento Vermelho R-Ficoeritrina	37
1.5	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas	39
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo Geral	43
2.2	Objetivos Específicos	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	Materiais	44
3.1.1	<i>Macroalga marinha vermelha Solieria filiformis</i>	44
3.1.2	<i>Reagentes Químicos</i>	44
3.2	Métodos	46
3.2.1	<i>Extração da R-ficoeritrina de Solieria filiformis</i>	46
3.2.2	<i>Otimização do protocolo de purificação da R-ficoeritrina de S. filiformis</i>	46
3.2.2.1	<i>Cromatografia de Troca Iônica</i>	47
3.2.2.2	<i>Ultrafiltração</i>	47
3.2.3	<i>Teores de proteína, Rendimentos, Recuperação e Índices de pureza de R-Ficoeritrina</i>	47
3.2.3.1	<i>Dosagem de proteínas totais</i>	47
3.2.3.2	<i>Quantificação de pigmentos e índice de pureza</i>	47
3.2.3.3	<i>Rendimento de proteínas totais e de R-ficoeritrina</i>	48
3.2.3.4	<i>Recuperação de R-Ficoeritrina</i>	49
3.2.4	<i>Atividade antioxidante in vitro da R-Ficoeritrina pura</i>	49
3.2.4.1	<i>Quelação do íon ferroso</i>	49
3.2.4.2	<i>Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato</i>	50
3.2.4.2	<i>Sequestro do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)</i>	51

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Extração da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i>	52
4.2	Otimização do protocolo de purificação da R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> .	53
4.2.1	<i>Cromatografia de Troca Iônica</i>	53
4.2.2	<i>Ultrafiltração</i>	55
4.3	Atividade antioxidante in vitro da R-Ficoeritrina pura	60
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas Marinhas: características gerais, classificação e importância ecológica

O termo “alga” é inteiramente desprovido de valor taxonômico, uma vez que designa organismos muito distintos entre si, quanto a sua organização, origem, composição química e morfologia, 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).

Algas são um grupo heterogêneo de seres vivos de complexa taxonomia (MAKKAR *et al.*, 2016), sendo, de modo geral, definidos 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 sendo que as diversas espécies, individualmente, 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. Podem ser, ainda, 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, 2006a).

Segundo Baweja *et al.* (2016, p. 45, tradução nossa)

A distribuição das algas depende de 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, simbiontes, parasitas e doenças).

As algas, em todos esses ecossistemas, 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 grandemente 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, 2006a; SAMARAKOON; JEON, 2012; TAYLOR; TAYLOR; KRINGS, 2009). Além do mais, “elas proveem abrigo e área reprodutiva para peixes, invertebrados, aves e mamíferos.” (BAWEJA *et al.*, 2016, p. 45, tradução nossa).

A classificação das algas é extremamente complexa e até mesmo confusa, dado que está em constante transformação. (REVIERS, 2002). Portanto, faz-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 fitoplânctons, 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 não apresentarem origem comum, 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). De acordo com Makkar *et al.* (2016), as macroalgas podem ser classificadas, também, nos seguintes filos:

- Chlorophyta: possui coloração verde, principalmente, pela predominância das clorofilas *a* e *b*, apesar de também possuir caroteno e xantofila, com predominância de β-caroteno. Os principais gêneros desse filo incluem *Ulva*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Chaetomorpha* e *Cladophora*.

- Ochrophyta com coloração marrom, principalmente pela presença de ficoxantina. Seus principais gêneros incluem *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Saccharina*, *Macrocystis*, *Nereocystis* e *Sargassum*.

- Rhodophyta possui coloração vermelha devido à predominância do pigmento ficoeritrina. Os principais gêneros incluem *Pyropia*, *Porphyra*, *Chondrus*, *Palmaria* e *Gracilaria*.

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
Chlorophyta (Algas verdes)	Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides	Celulose, carbonato de cálcio em algas calcárias	Produtores primários; as algas calcárias são fontes importantes de calcário nos recifes de corais
Ochrophyta (Algas marrons)	Clorofila <i>a</i> , <i>c</i> , xantofilas	Celulose, alginatos	Produtores primários; são os principais componentes das florestas de <i>kelps</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

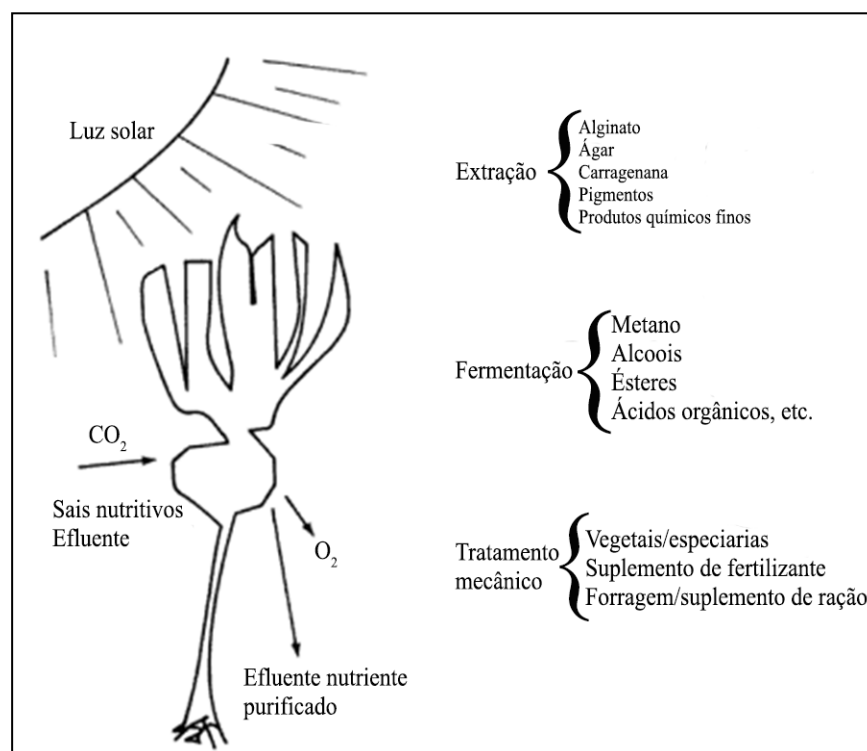
Fonte: Modificado de Castro & Huber (2012).

1.2 Importância econômica, aplicações das macroalgas marinhas e biorrefinaria

A diversidade de espécies de macroalgas e sua ampla composição bioquímica significa que elas representam uma fonte potencial 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). Esses e outros produtos, tendo a alga como biomassa, podem ser obtidos através de diversos métodos e processos (Figura 1).

Figura 1 – Produtos oriundos das macroalgas e seus métodos e processos de obtenção



Fonte: Adaptado de Lobban e Harrison (1997), tradução nossa.

Diante disso, o cultivo de macroalgas marinhas tem crescido exponencialmente nas últimas décadas, atingindo 30,1 milhões de toneladas em 2016, o que representa 11,67 bilhões de dólares, com significativa participação de países asiáticos (11,63 bilhões de dólares), para atender a demanda alimentícia e industrial (FAO, 2018). Nos últimos dez 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). Esses dados demonstraram que há pelo menos 2 décadas o país é altamente dependente da importação para suprir a sua demanda.

Cerca de 145 gêneros de macroalgas marinhas têm sido utilizados para a alimentação humana de modo direto, sobretudo nos países orientais, como China e Japão (FLEURENCE; MORANÇAS; DUMAY, 2018). Nesse sentido, pode-se destacar as algas vermelhas do gênero *Porphyra*, popularmente conhecido por “nori”, no Japão, que não apresentam alto valor nutricional, contudo fornecem sais essenciais, bem como inúmeras vitaminas, sendo amplamente consumidas em sopas e sushis (EVERT; EICHHORN, 2013; HASAN; CHAKRABARTI, 2009).

As algas Wakame (*Undaria pinnatifida*), kombu (*Saccharina japonica*) e o gênero *Ulva* também são cultivadas e utilizadas para a alimentação (EVERT; EICHHORN, 2013; HASAN; CHAKRABARTI, 2009).

As macroalgas marinhas também vêm sendo utilizadas como fertilizantes orgânicos do solo, a fim de aumentar a produtividade das plantações (ABDEL-RAOUF N, 2012; CALVO; NELSON; KLOPPER, 2014). Mathur *et al.* (2015) relatam o potencial biofertilizante do extrato aquoso da macroalga marinha verde *Enteromorpha intentalis* como alternativa aos fertilizantes químicos. Oliveira (2017) demonstrou que o extrato bruto de *Gracilaria birdiae* apresenta potencial biofertilizante em alface (*Lactuca sativa*).

Do ponto de vista das aplicações ambientais, espécies de macroalgas marinhas como as dos gêneros *Gracilaria* e *Ulva* são adequadas para a biorremediação (TROELL *et al.*, 2009). Há relatos de aplicações de macroalgas na produção de combustíveis alternativos aos fósseis, como a produção de hidrogênio combustível, biogás, como o metano, e biodiesel (HERRMANN *et al.*, 2015).

As macroalgas marinhas dispõem, ainda, de diversos compostos bioativos de alto valor farmacológico e medicinal (EL GAMAL, 2010). Por exemplo, o cicloeuodesmol isolado da macroalga verde *Chondria appositoclada* apresentou potente atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (FENICAL; SIMS, 1974 *apud* EL GAMAL, 2010). Capisterones isolados da macroalga verde *Panicillus capitatus* exibiram potente atividade antifúngica contra o patógeno de algas marinhas *Lindra thallasiae* (PUGLISI *et al.*, 2004 *apud* EL GAMAL, 2010). Os metabólitos bromofenólicos denominados vidalóis A e B, isolados da macroalga vermelha *Vidalia obtusiloba*, apresentaram atividade anti-inflamatória, atuando por meio da inibição da enzima fosfolipase (WIEMER *et al.*, 1991 *apud* EL GAMAL, 2010). Elatol, um álcool halogenado encontrado na macroalga vermelha *Laurencia elata*, inibiu seis espécies de bactérias patogênicas humanas com atividades antibacterianas significativas contra *Staphylococcus epidermis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella sp* (VAIRAPPAN, 2003 *apud* EL GAMAL, 2010). Foram relatados efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina isolada da macroalga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (DA CONCEIÇÃO RIVANOR *et al.*, 2014). Alguns compostos extraídos da macroalga marinha *Solieria filiformis* também apresentaram atividades biológicas relevantes, tais como lectinas com atividades anti-inflamatória e antiinflamatória (ABREU, 2012) e carboidratos sulfatados com atividades antioxidante e gastroprotetora (SOUSA *et al.*, 2016).

Merecem grande destaque os ficocolóides (alginatos, ágaros 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).

Os alginatos encontram sua principal aplicação na indústria alimentícia, mas também são utilizados na indústria têxtil. O ágar, principalmente produzido no Japão, é aplicado na fabricação de moldes dentários, como base de cosméticos, como meio de cultura para microrganismos e cultura de tecidos, ou como gel de eletroforese (EVERT; EICHHORN, 2013). As carragenanas são utilizadas para a estabilização coloidal de tintas, cosméticos e laticínios, sendo extraídas comercialmente das espécies *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*, *Iridaea* spp., *Eucheima* spp. e *Kappaphycus* spp. (EVERT; EICHHORN, 2013; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

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 2), tornando-se moléculas de potencial aplicação biotecnológica, sobretudo porque há uma carência de corantes naturais na indústria (GLAZER, 1984; REIS *et al.*, 1998; SCHIOZER; BARATA, 2007). Tais pigmentos ganham importante destaque 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 ou até a substituição total na formulação de cremes e produtos de maquiagem (BEDOUX *et al.*, 2014).

Figura 2 – Aspecto da coloração dos pigmentos azul e vermelho purificados da macroalga marinha *Hypnea musciformis*.



Fonte: Costa (2016).

No que concerne a aplicação desses pigmentos naturais em alimentos, a ficoeritrina extraída da macroalga *Solieria filiformis* foi utilizada como corante em formulações de iogurte de morango para fins de análise sensorial do atributo da cor (BRITO, 2017).

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 um alto valor comercial atualmente, como pode ser observado na Tabela 2. Esse alto valor de mercado das ficobiliproteínas foi estimado em mais de 60 milhões de dólares em 2013 (BOROWITZKA, 2013). Além disso, o mercado de corantes destinados a alimentos projeta 3,75 bilhões de dólares para 2022, com grande tendência e participação dos pigmentos naturais (MARKETSANDMARKET, 2017 *apud* ARYEE; AGYEI; AKANBI, 2018). Vale ressaltar que o valor comercial de ficobiliproteínas está correlacionado ainda com o grau de pureza e aplicação desses pigmentos.

Tabela 2 - Valor comercial de ficobiliproteínas

Molécula	Prefixo	Marca	Valor (em US\$.mg ⁻¹)	Referência
Ficoeritrina (FE)	B	Columbia Biosciences	27,00	(BIOSCIENCES, 2018a)
	R	Columbia Biosciences	10,00	(BIOSCIENCES, 2018b)
	R	ProZyme	26,00	(PROZYME, 2018a)
	B	Sigma-Aldrich	377,00	(ALDRICH, 2018a)
	R	Sigma-Aldrich	156,00	(ALDRICH, 2018b)
Ficocianina (FC)	C	ProZyme	26,00	(PROZYME, 2018b)
	C	Sigma-Aldrich	157,00	(ALDRICH, 2018c)
Aloficocianina (AFC)	-	Columbia Biosciences	53,00	(BIOSCIENCES, 2018c)
	-	ProZyme	26,00	(PROZYME, 2018c)
	-	Sigma-Aldrich	361,00 ^a	(ALDRICH, 2018d)

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: a –AFC vendida em volume de 5 mL.

Visando o aproveitamento máximo da biomassa macroalgácea, surge o conceito de

biorrefinaria, que é identificado como o caminho mais promissor de uma 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). Desse modo, a extração de pigmentos, como a R-Ficoeritrina, pode estar incorporada nesse conceito, associada à obtenção de ficocolóides e outros compostos oriundos dessa biomassa.

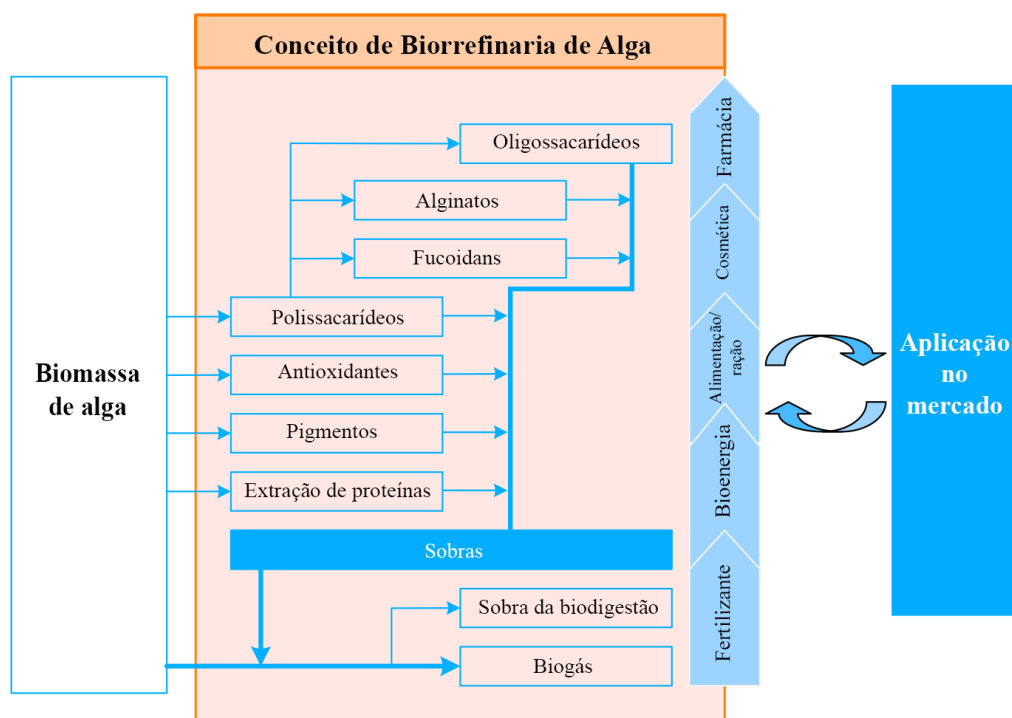
Biorrefinar, segundo Agência Internacional de Energia (AIE) (do inglês, International Energy Agency – IEA), é “o processamento sustentável de utilização de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis (alimentos, rações, materiais e produtos químicos) e energia (combustíveis, energia, calor)” (SONNENBERG; BAARS; HENDRICKX, 2007). A biorrefinaria, portanto, surge como um modo de diminuir os impactos negativos sobre o meio ambiente, criando 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 (BALINA; ROMAGNOLI; BLUMBERGA, 2017).

É também um conceito que cresce em proeminência e importância, impulsionado pelas necessidades da indústria em termos de desenvolvimento de negócios e eficiência de recursos, [...]. Em particular, acredita-se que as biorrefinarias desempenham um papel importante na transição para uma bioeconomia, na qual materiais renováveis e de base biológica substituem os produtos fósseis (HAGMAN *et al.*, 2018, tradução nossa).

Os produtos derivados da matéria-prima podem ser divididos em produtos comercializáveis ou produtos utilizados como insumos para outras operações para a obtenção de produtos de valor agregado. Os resíduos e sobras obtidos após cada etapa de tratamento são utilizados como influxo de matéria-prima para uma cadeia de produção paralela na abordagem em cascata (Figura 3). Somente as sobras de biomassa de baixa qualidade podem ser usadas para a produção de energia. Desse modo, busca-se minimizar a quantidade de resíduos de algas para um sistema de resíduos quase nulo (BALINA; ROMAGNOLI; BLUMBERGA, 2017).

Já é descrito na literatura um esquema de biorrefinaria para macroalgas vermelhas, como é o caso de Baghel *et al.* (2015), o qual 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.

Figura 3 – Conceito de biorrefinaria para obtenção e aplicação de produtos derivados de macroalgas



Fonte: Balina, Romagnoli e Blumberga (2017), tradução nossa

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. Lima (2012) avaliou o cultivo de *Solieria filiformis* por esporulação natural no mar, enquanto que Alves (2016) avaliou 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.

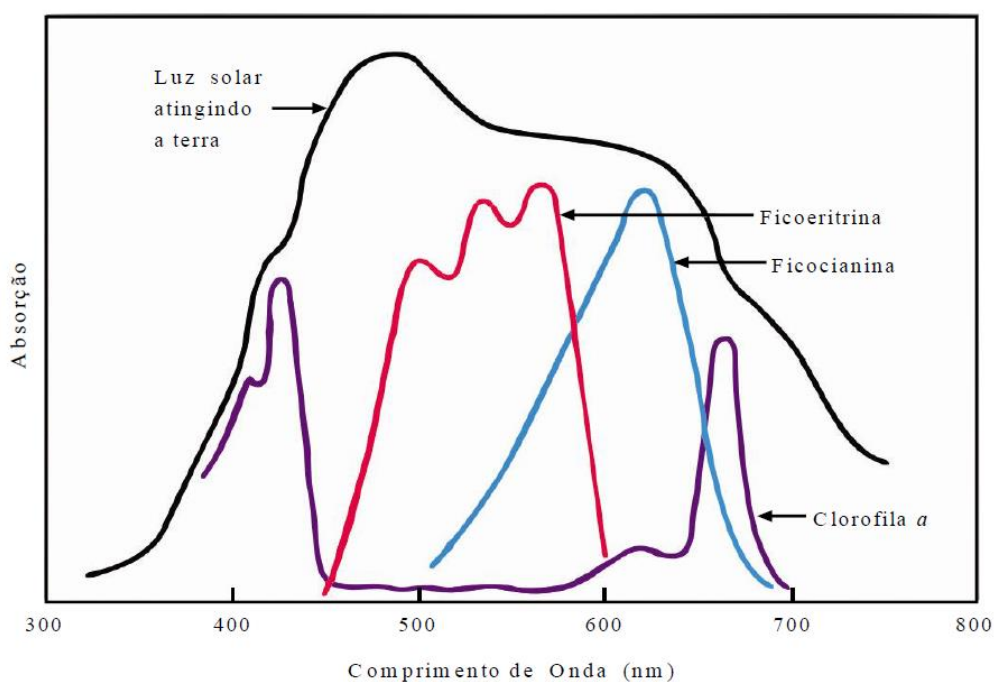
1.3 Propriedades estruturais e espectroscópicas das Ficobiliproteínas

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 efetivamente o pigmento fotossintético, mas ele não apresenta papel funcional se não houver uma proteína acoplada” (LOURENÇO, 2006, p. 44).

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 4): ficoeritrina (FE) (λ_{max} = 495-570 nm), ficoeritrocianina (FEC) (λ_{max} = 575 nm), ficocianina (FC) (λ_{max} = 610-620 nm) e aloficocianina (AFC) (λ_{max} = 650-655 nm) (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; BRYANT; GLAZER; EISERLING, 1976; GLAZER, 1984b).

Figura 4 – Espectro de Absorção dos Pigmentos Fotossintetizantes Ficoeritrina, Ficociana e Clorofila *a* presentes em Macroalgas Vermelhas.

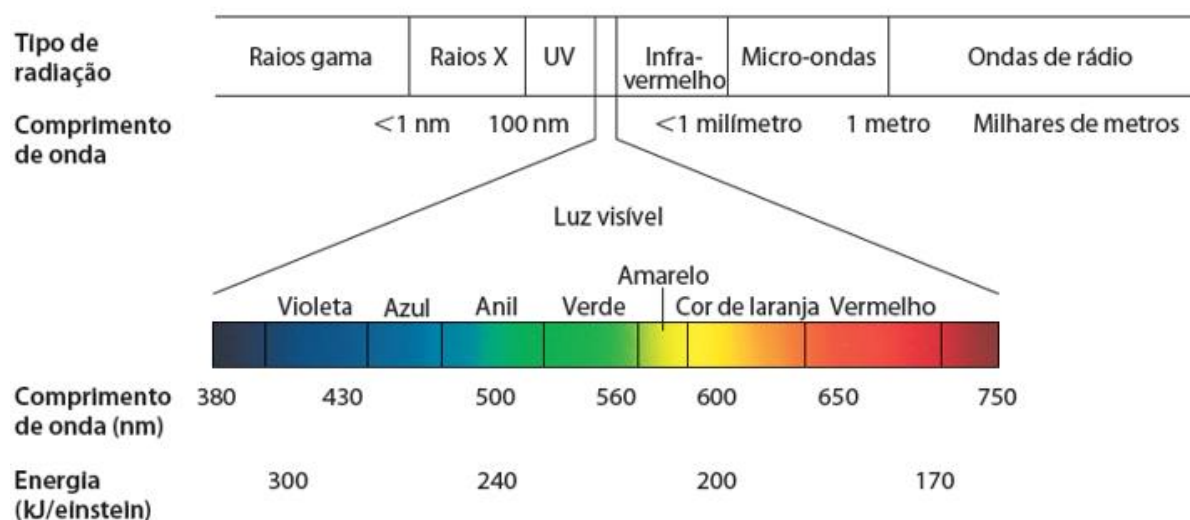


Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

As ficobiliproteínas fazem parte de uma eficiente cadeia de transferência de radiação eletromagnética do espectro da luz visível (Figura 5), sendo capazes de canalizá-la para o centro de reação do fotossistema II, onde está presente a clorofila *a* (GLAZER, 1989; NELSON; COX, 2014; 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 5 – Radiação Eletromagnética.



Fonte: Nelson e Cox (2014).

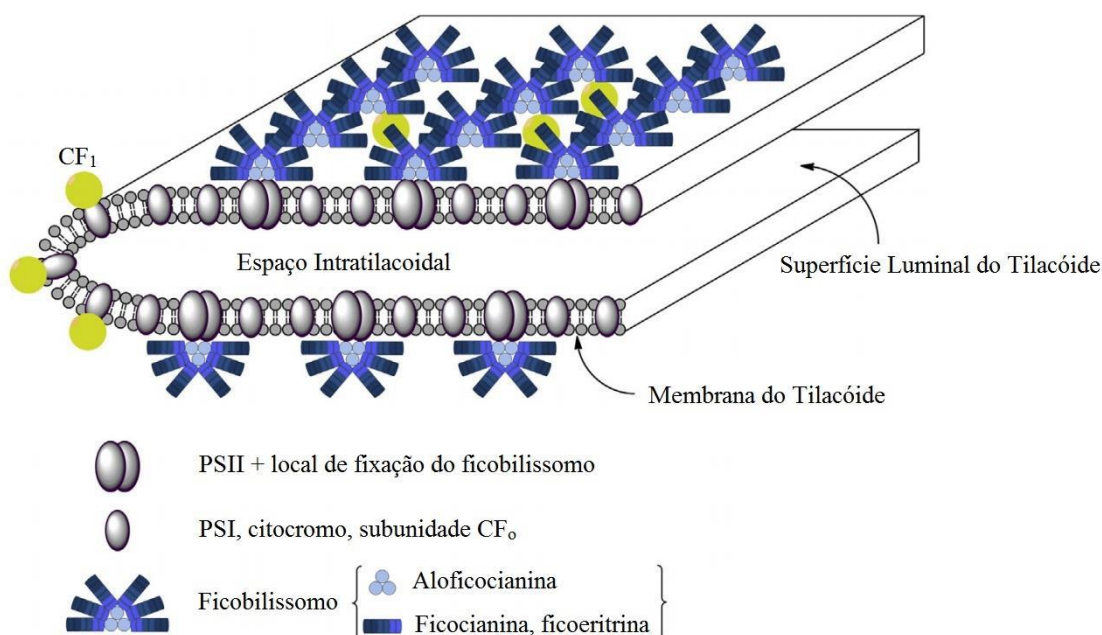
As ficobiliproteínas absorvem luz numa região do espectro em que a clorofila é ineficiente (450-670 nm), o que permite que as algas, como as rodófitas, ocupem ambientes aquático, como lagos e oceanos, nos quais, preferencialmente, a radiação de altos comprimentos de onda é filtrada pela água – predominantemente 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, 2014; 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 6) (GLAZER, 1985; HURD *et al.*, 2014; LOURENÇO, 2006a).

Figura 6 – Representação da Membrana do Tilacóide e dos Ficobilissomos.



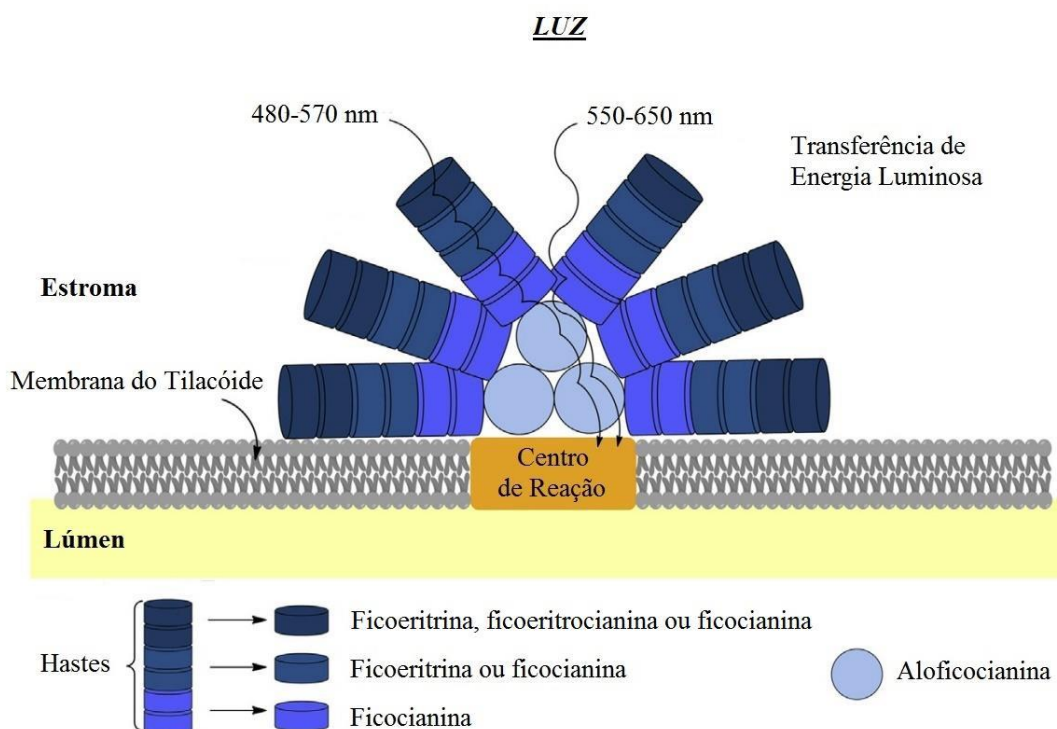
Fonte: Adaptado de Dumay *et al.* (2014). Legenda: CF – Fator de acoplamento; PS – Fotossistema.

A estrutura dos ficobilissomos (Figura 7) 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, 2014; PARMAR *et al.*, 2011).

Outrossim, 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, 2006a).

Figura 7 – Representação da Estrutura do Ficobilissomo.



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

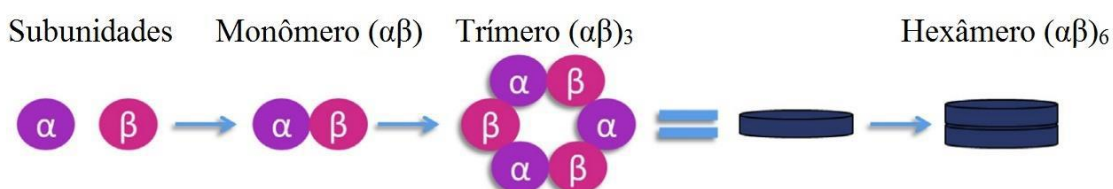
A morfologia dos ficobilissomos varia de acordo com organismo, sendo que, em macroalgas vermelhas assume uma estrutura hemi-elipsoidal, compondo-se de duas subestruturas bem definidas: as hastes e o núcleo. As hastes são constituídas pelos pigmentos ficoeritrina e ficocianina, de tal modo que a ficoeritrina, 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.*, 2000; GLAZER; HIXSON, 1975). As subunidades formam discos hexaméricos, como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Formação dos Discos Hexaméricos das Ficobiliproteínas.



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

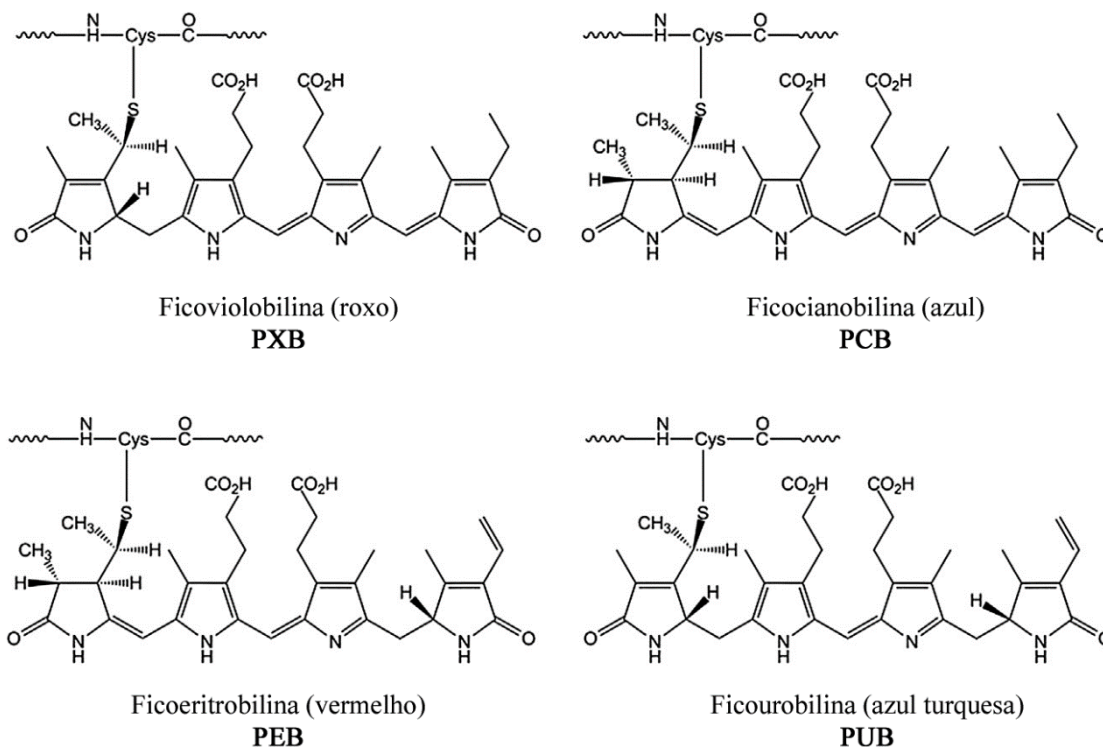
A ficoeritrina é encontrada tanto na forma hexamérica com as subunidades α e β e γ [$(\alpha\beta)_6\gamma$], assim como sem a subunidade gama γ [$(\alpha\beta)_6$], variando de acordo com o tipo de ficoeritrina isolada; a ficoeritrocianina pode ser encontrada tanto na forma trimérica [$(\alpha\beta)_3$], 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 9.

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 9 – Estruturas Químicas das Ficobilinas.



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

1.3.1. Ficoeritrinas

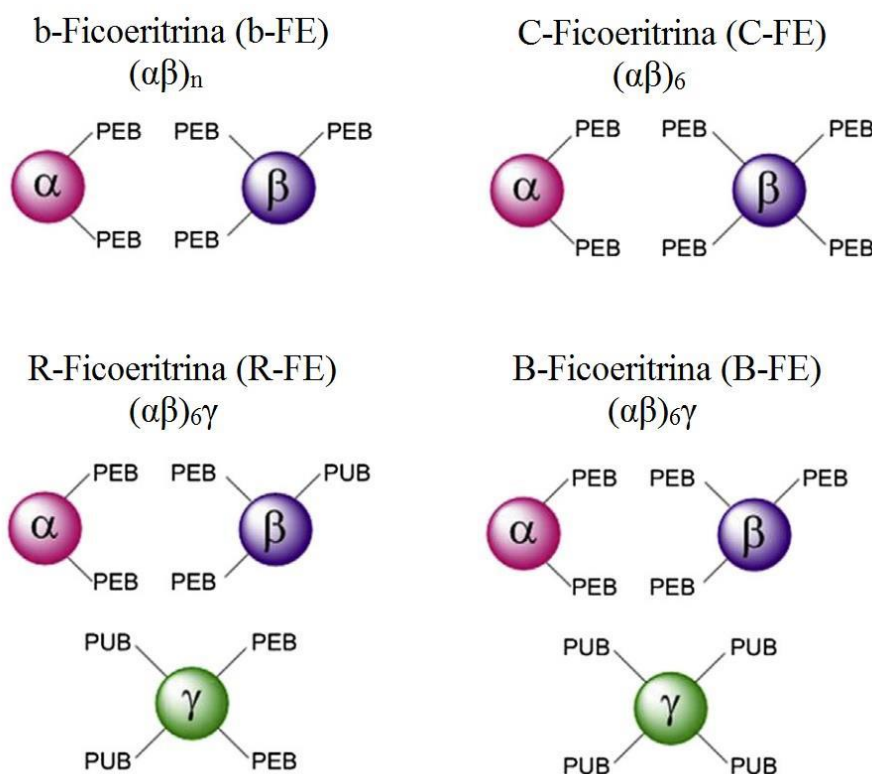
As ficoeritrinas são os pigmentos majoritários encontrados nas macroalgas vermelhas, constituindo um grupo variado de ficobiliproteínas devido às suas características espectroscópicas (DUMAY *et al.*, 2014; GLAZER, 1994). Elas também são conhecidas por representarem a classe das ficobiliproteínas mais 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, as ficoeritrinas podem ocorrer em diferentes formas de acordo com a espécie da alga, sendo divididas em cinco grupos: B-Ficoeritrina (B-FE) [$\lambda_{\text{max}} = 565 \text{ nm}$, 545 nm , e um ombro a 499 nm], b-Ficoeritrina (b-FE) [$\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$, e um ombro a 565 nm], C-Ficoeritrina (C-FE) [$\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$], CU-

Ficoeritrina (CU-FE) [$\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}, 540 \text{ nm e/ou } 565 \text{ nm}$] e R-Ficoeritrina (R-FE) [$\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}, 498 \text{ nm e um ombro/pico a } 545 \text{ nm}$] (BRYANT, 1982; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; SUN *et al.*, 2009). A CU-Ficoeritrina 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 10) (GLAZER *et al.*, 1983; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; SUN *et al.*, 2009).

Figura 10 – Estruturas das Ficoeritrinas.



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

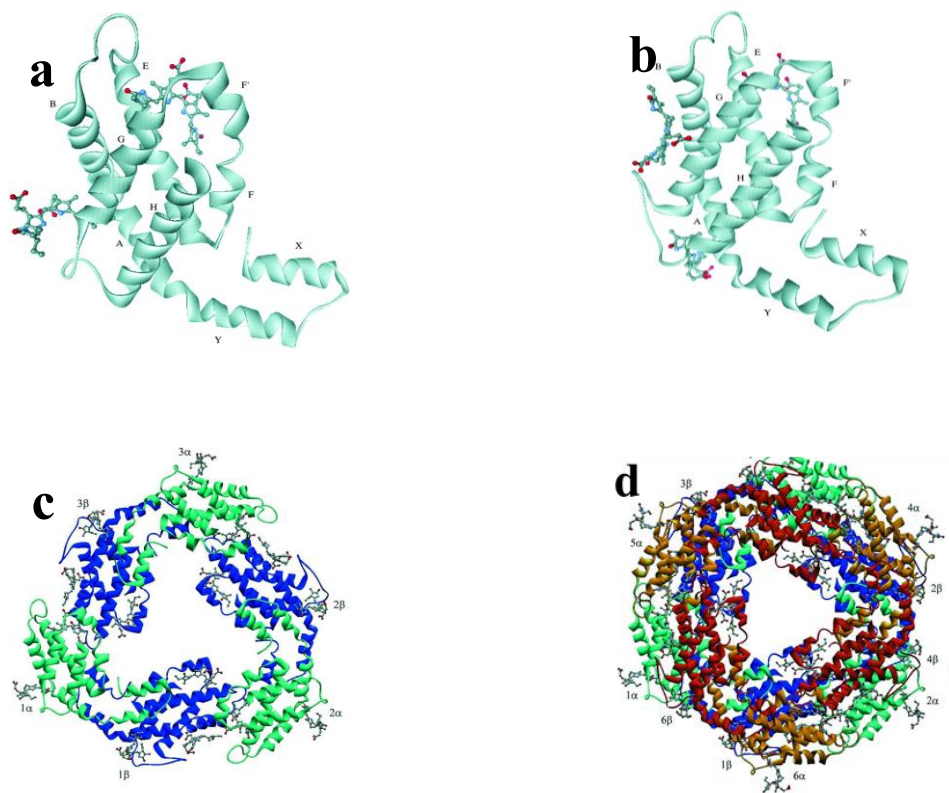
As subunidades α , β e γ que compõem a R-FE possuem em torno de 18, 20 e 35 kDa, respectivamente, e formam complexos hexaméricos $(\alpha\beta)_6\gamma$, de 240 kDa. A subunidade γ se encontra no centro da molécula e é responsável pela ligação de dois trímeros $(\alpha\beta)_3$, conferindo maior estabilidade 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).

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 11a) e β (Figura 11b), além de determinar as estruturas trimérica (Figura 11c) e hexamérica (Figura 11d) 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*.

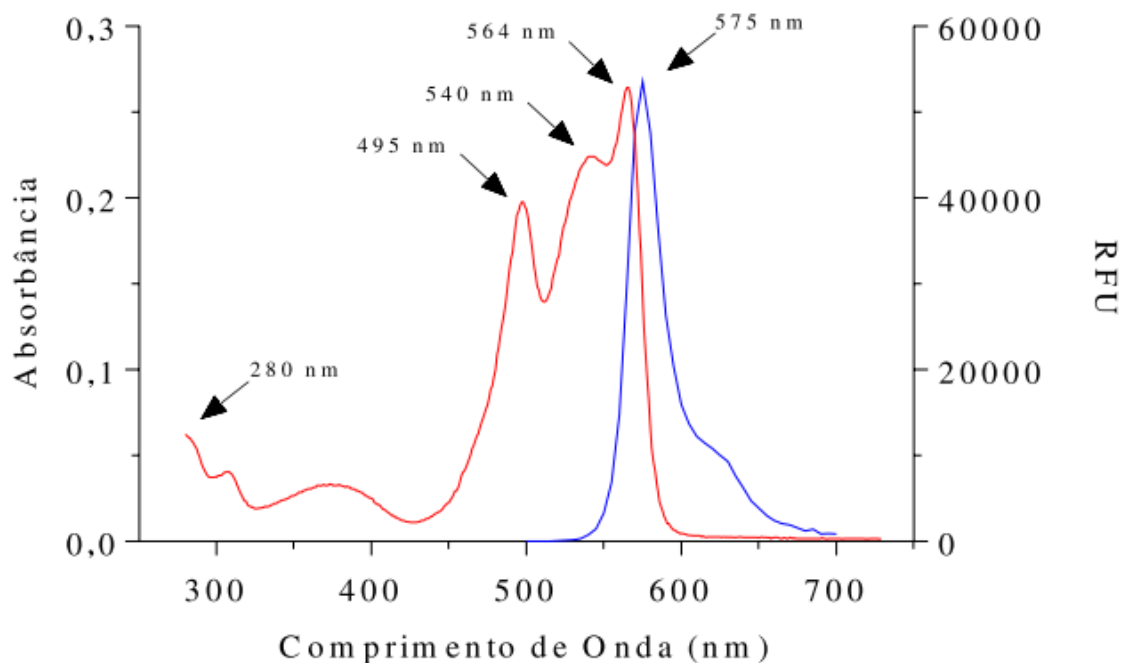
Figura 11 – Estrutura Tridimensional das Subunidades α e β , do Trímero e do Hexâmero da R-Ficoeritrina da Macroalga Vermelha *Gracilaria chilensis*.



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.

As características espectroscópicas da R-FE pura, extraída 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 estão evidenciados na Figura 12.

Figura 12 - Características espectroscópicas da R-Ficoeritrina purificada da macroalga vermelha *Solieria filiformis*.



Fonte: Bastos-Filho (2016). Legenda: Linha vermelha: Espectro de absorção; Linha azul: Espectro de fluorescência; RFU: Unidade Relativa de Fluorescência

1.4 Extração e Purificação da Ficobiliproteína R-Ficoeritrina

Devido à R-Ficoeritrina ser um composto intracelular, são necessários métodos de rompimento da parede celular para a sua eficiente 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 (MUNIER *et al.*, 2014; SUDHAKAR *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015), ultrassonicação (LE GUILLARD *et al.*, 2015; MITTAL *et al.*, 2017), homogeneização (HARNEDY; FITZGERALD, 2013), catálise enzimática (DUMAY *et al.*, 2013; MITTAL; RAGHAVARAO, 2018), e também a combinação de dois ou mais métodos, a fim de se melhorar o rendimento de pigmento (LE GUILLARD *et al.*, 2015). Contudo a presença de grandes concentrações de polissacarídeos na parede celular das rodófitas 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 (KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982; MITTAL *et al.*, 2017).

Por ser uma molécula hidrossolúvel, a R-Ficoeritrina é comumente extraída em solventes aquosos – sendo o tampão fosfato o mais utilizado (SUDHAKAR *et al.*, 2015) – a partir de diferentes estados da matéria-prima, podendo ser alga úmida (GU *et al.*, 2018; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013a; SUDHAKAR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015), alga congelada (NIU; WANG; TSENG, 2006) e alga liofilizada (DENIS *et al.*, 2009a; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; MUNIER *et al.*, 2014).

Na indústria, as ficoeritrinas são requeridas numa pureza adequada a sua aplicação final e a sua purificação é um processo difícil devido à presença de polissacarídeos no extrato bruto, os quais conferem elevada viscosidade ao material quando liberados durante a homogeneização, ocasionando diferentes níveis de pureza, o que influi diretamente sobre a variação de preços desses pigmentos (MENSI *et al.*, 2014; MITTAL *et al.*, 2017).

Por se tratar de uma proteína, a R-Ficoeritrina passa por métodos clássicos de purificação numa combinação de várias técnicas, tais como precipitação por sulfato de amônio – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –, cromatografias de troca iônica e de exclusão molecular e hidroxapatita (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000).

O fracionamento proteico com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é o método imediatamente utilizado após a extração dos pigmentos das macroalgas vermelhas, como primeira etapa de purificação, segundo a literatura (NAIR *et al.*, 2018; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013a; SUN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015), alcançando índices de pureza de 1,4 (LIU *et al.*, 2005), 1,62 (NAIR *et al.*, 2018) e 2,38 (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013) de R-Ficoeritrina das espécies *Polysiphonia urceolata*, *Centroceras clavulatum* e *Bangia fusco-purpurea*, respectivamente.

A etapa seguinte de purificação de proteínas e, portanto, de pigmentos, é representada pelas cromatografias, que são aplicadas com o objetivo de aumentar o IP das biomoléculas. Cromatografias de troca-iônica (carga das moléculas), exclusão molecular (tamanho das moléculas), interação hidrofóbica (hidrofobicidade) e hidroxapatita (afinidade) foram utilizadas para a purificação de R-FE de diversas macroalgas vermelhas. Senthilkumar *et al.* (2013) e Wu *et al.* (2015) alcançaram índices de pureza de 5,1 e 5,2 para R-FE das espécies *Bangia fusco-purpurea* e *Portieria hornemannii*, respectivamente. Nair *et al.* (2018), por sua vez, encontraram pureza de 6,34 para a R-FE da macroalga *Centroceras clavulatum*. Cromatografias sequenciadas também foram relatadas na literatura. Bastos-Filho (2016) alcançou pureza 4,5 para R-FE da macroalga *S. filiformis* utilizando em sequência as cromatografias de troca-iônica e de exclusão molecular.

Eletroforese também foi utilizada como método de purificação de R-Ficoeritrina da macroalga *Palmaria palmata*, alcançando IP de 3,2, como relatado por Galland-Irmouli *et al.* (2000). Sathuvan *et al.* (2016) obtiveram pureza 5,9 para a R-FE da macroalga *Halymenia floresia*.

A Tabela 3 mostra os diferentes esquemas de purificação de ficoeritrina oriundas de diversas espécies de macroalgas vermelhas, com as suas respectivas distribuições geográficas, bem como as operações unitárias, rendimentos e índices de pureza alcançados.

1.5 Atividade antioxidante *in vitro* de ficobiliproteínas

Oxidação pode ser definida como a conversão de dado composto num derivado com menor número de elétrons, sendo o procedimento contrário chamado redução. A oxidação é fundamental para a sobrevivência das células, tendo-se que essa dependência produz radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais exercem importantes papéis metabólicos, como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de biomoléculas (ALVES *et al.*, 2010; ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Contudo, quando em excesso, as ERO podem causar efeitos deletérios, como danos a ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e organelas, provocando alterações das funções celulares, o que pode desencadear doenças como o envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, câncer, dentre outras (ALVES *et al.*, 2010; K.BALIN; R.G. ALLEN, 2015; MINELLI *et al.*, 2009). A oxidação também pode afetar os alimentos, sendo a maior causa da sua rancidez e deterioração da sua qualidade nutricional, coloração, sabor, textura e segurança, acarretando na sua depreciação e rejeição por parte dos consumidores (ALVES *et al.*, 2010; ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Os organismos podem sintetizar substâncias antioxidantes capazes de combater os radicais livres, prevenindo os danos oxidativos. Um antioxidante, portanto, pode ser definido como sendo uma substância que em baixas concentrações, em comparado com o substrato oxidável, atrase ou iniba significativamente a oxidação desse substrato. Porém nem sempre o metabolismo produz esses compostos em quantidades suficientes, sendo necessárias adquiri-los de fontes externas. Desse modo, têm-se buscado e avaliado compostos capazes de prevenir ou minimizar esses danos à saúde humana e até aos alimentos, sendo as algas uma importante fonte

Tabela 3 – Distribuição geográfica, métodos de purificação, rendimentos e índices de pureza de R-Ficoeritrina de macroalgas vermelhas.

Espécie	Distribuição	Protocolo	Rendimento	IP	Referência
<i>Palmaria palmata</i>	A; AA; AN; AF; AS; EU; IOA	E	0,56 ^a	3,20	GALLAND-IRMOULI <i>et al.</i> , 2000.
<i>Gracilaria verrucosa</i>	A; AA; AC; AF; AN; AS; EU; IC; IOA; IOI; IOP; OC	PSA + IHLE	0,14 ^b	4,40	WANG, 2002.
<i>Corallina elongata</i>	AA; AS; EU; IOA; IOP	HA + EM	0,60 ^a	6,67	ROSSANO <i>et al.</i> , 2003.
<i>Polysiphonia urceolata</i>	EU	PSA + TI	1,53 ^b	5,60	LIU <i>et al.</i> , 2005.
<i>Polysiphonia urceolata</i>	EU	PSA + IF + HA	0,34 ^b	3,90	NIU; WANG; TSENG, 2006.
<i>Heterosiphonia japonica</i>	AA; AN; EU	PSA + EM + EM + TI	-	4,89	SUN <i>et al.</i> , 2009.
<i>Porphyra yezoensis</i>	AA, AN, EU, OA	EM + HA	0,32 ^b	3,20	CHUNER <i>et al.</i> , 2012.
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	AA; AN; AS; IOP	PSA + IF + TI	0,36 ^c	4,20	NIU <i>et al.</i> , 2013.
<i>Portieria hornemannii</i>	AA; AF; IOP	PSA + TI	0,80 ^c	5,21	SENTHILKUMAR <i>et al.</i> , 2013.
<i>Polysiphonia urceolata</i>	EU	PSA + EM + TI	-	5,26	WANG <i>et al.</i> , 2015.
<i>Bangia fusco-purpurea</i>	A; AA; AC; AF; AN; AS; EU; IOA; IOP; OC	PSA + TI	-	5,10	WU <i>et al.</i> , 2015.
<i>Grateloupia turuturu</i>	AA; AF; AN; AS; EU; IOP; OC	TI	1,41 ^a	2,89	MUNIER <i>et al.</i> , 2015.
<i>Halymenia floresia</i>	AA; AC; AF; AN; AS; EU; IC; IOA; IOI; IOP; OC	E	1,36 ^c	5,9	MALAIRAJ, <i>et al.</i> , 2016.
<i>Centroceras clavulatum</i>	AA; AC; AF; AN; AS; EU; IC; IOA; IOI; IOP; OC	PSA + TI + E	0,013 ^c	6,4	NAIR <i>et al.</i> , 2018.
<i>Bangia atropurpurea</i>	AA	PSA + EM	0,78 ^c	5,42	PUNAMPALAM; KHOO; SIT, 2018.
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	AA; AN; AS; IOP	CPC	0,5 ^c	6,5	GU <i>et al.</i> , 2018.

Fonte: Adaptado de Bastos-Filho (2016) Legenda: Índice de Pureza (IP). Dados de distribuição das macroalgas encontrado no AlgaeBase (GUIRY; GUIRY, 2016), sendo: Antártida (A); Ásia (AA); América Central (AC); África (AF); América do Norte (AN); América do Sul (AS); Europa (EU); Ilhas do Caribe (IC); Ilhas do Oceano Atlântico (IOA); Ilhas do Oceano Índico (IOI); Ilhas do Oceano Pacífico (IOP); Oceano Atlântico (OA); Oceania (OC). Protocolo: não fornecido (-); Precipitação por Sulfato de Amônio (PSA); Interação Hidrofóbica (IF); Troca Iônica (TI); Exclusão Molecular (EM); Hidroxiapatita (HA); Interação Hidrofóbica com Leito Expandido (IHLE); Eletroforese (E); Cromatografia de Precipitação Centrífuga (CPC). Rendimento: 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.

de diversos compostos bioativos com capacidade antioxidante, dentre os quais as ficobiliproteínas (ALVES *et al.*, 2010; ANTOLOVICH *et al.*, 2002; CHEW *et al.*, 2008; MUNIR *et al.*, 2013).

Existe um amplo acervo de métodos disponíveis na literatura para a determinação da atividade antioxidante de diversos compostos. Alguns métodos envolvem ensaios químicos com substratos lipídicos, enquanto outros envolvem ensaios mais complexos utilizando técnicas instrumentais. A avaliação da capacidade antioxidante não pode se basear somente em uma única metodologia, fazendo-se necessário métodos outros para caracterizar completamente uma substância como antioxidante e para, conseqüentemente, comprovar sua atividade, pois não existe um método único e universal para a determinação dessa atividade biológica (ALVES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2015). Dentre os métodos encontrados, os mais utilizados para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* de ficobiliproteínas são: a quelação do íon ferroso, sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato (DPPH) e o sequestro do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS).

A capacidade de quelação do íon ferroso (Fe^{2+}) por uma substância é um parâmetro de grande relevância para a investigação de sua atividade antioxidante, pois o Fe^{2+} é altamente reativo e pode provocar a peroxidação de lipídios e inativar enzimas, desencadeando reações desfavoráveis em sistemas biológicos (ALVES *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2016).

A molécula de DPPH se caracteriza por ser um radical livre estável devido a deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula, o que lhe confere uma coloração violeta. O ensaio, portanto, se baseia na capacidade de uma dada substância sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina, através da doação de um átomo de hidrogênio ou da transferência de um elétron, causando a perda da sua coloração violeta até um amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2015).

A utilização do método de sequestro do radical ABTS é importante, em termos de confirmação de atividade antioxidante de ficobiliproteínas, porque é mensurada espectroscopicamente no comprimento de onda de 734 nm, no qual são minimizadas quaisquer interferências de cor desses pigmentos ou de outros componentes presentes na solução reacional (ANTOLOVICH *et al.*, 2002)

Relatos na literatura mostram a atividade antioxidante da ficocianina de *Arthrospira platensis* (PAN-UTAI; IAMTHAM, 2018; WU *et al.*, 2016) da ficoeritrina de *Halomicronema* (PATEL *et al.*, 2018) e de *Lyngbya* sp. (SONANI *et al.*, 2014), sendo todas espécies de cianobactérias. Especificamente, foi demonstrada a atividade antioxidante de R-FE de algumas espécies de macroalga, *Bangia fusco-purpurea* (WU *et al.*, 2015), *Portieria hornemannii*

(SENTHILKUMAR et al., 2013b) e *Hypnea pseudomusciformis* (CHOW; OLIVEIRA; AMORIM, 2018).

Desse modo, diante da ampla aplicação em diversos setores da indústria, do seu alto valor comercial e dos baixos rendimentos de R-FE purificada de macroalgas vermelhas, sobretudo das espécies com potencial de cultivo no litoral nordestino brasileiro, o presente trabalho objetivou extrair e otimizar o processo de purificação da R-FE da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* cultivada no litoral cearense, bem como determinar a sua atividade antioxidante *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar o processo de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*, visando alcançar maiores rendimento, recuperação e índice de pureza e determinar a sua atividade antioxidante.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair a R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *S. filiformis*;
- Determinar o rendimento, recuperação e índice de pureza da R-Ficoeritrina após aplicação do extrato total em cromatografia de troca iônica;
- Determinar o rendimento, recuperação e índice de pureza da R-Ficoeritrina após ultrafiltração da fração cromatográfica;
- Estabelecer um comparativo entre os rendimentos, recuperação e índice de pureza da R-Ficoeritrina purificada por diferentes esquemas de purificação e o esquema proposto pelo presente trabalho;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* da R-Ficoeritrina com maior índice de pureza.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 *Macroalga marinha vermelha Solieria filiformis*

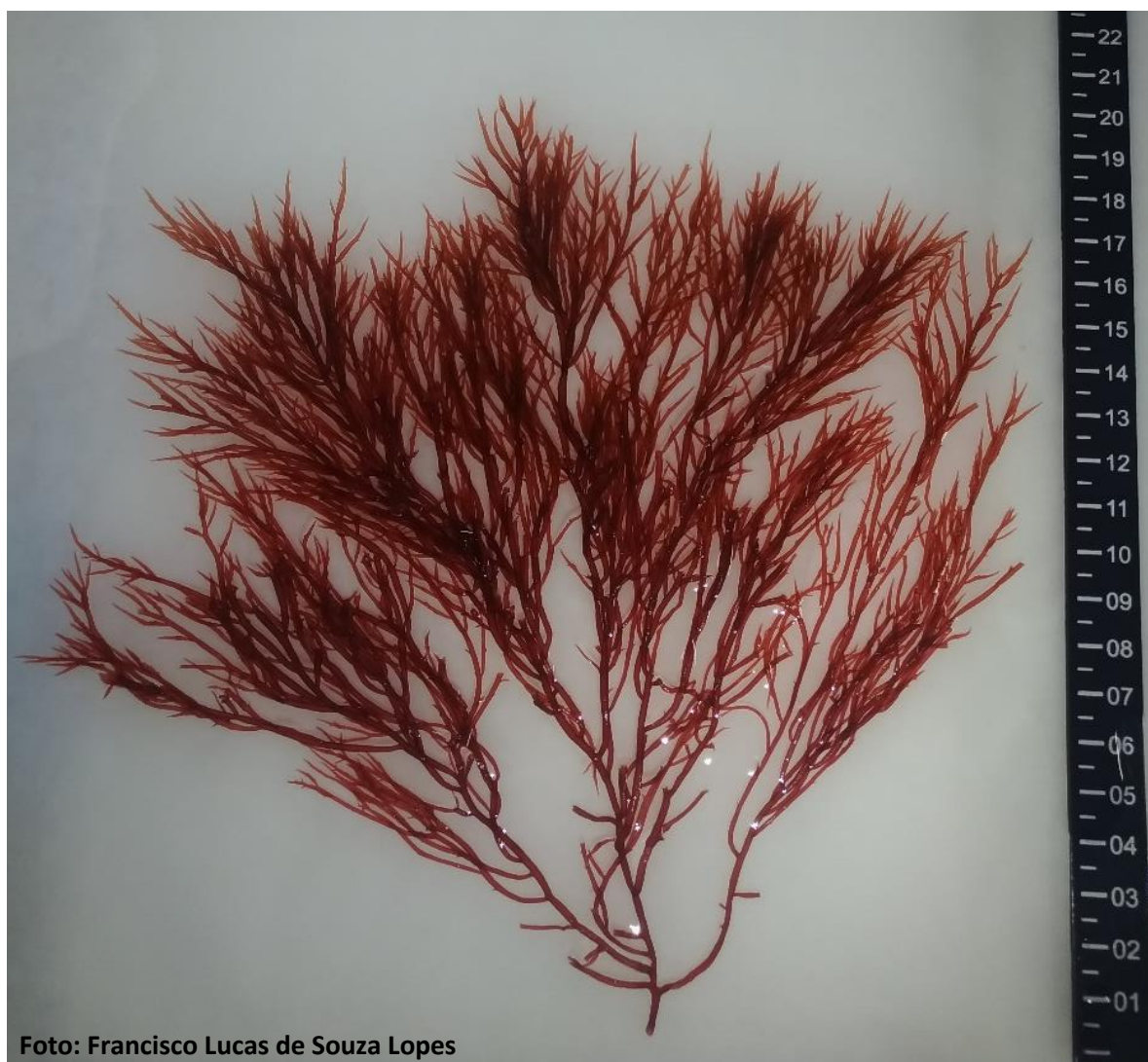
A macroalga marinha vermelha *S. filiformis* (Figura 13) foi coletada em cordas de cultivo localizadas a 200 metros da costa, situadas na praia de Flecheiras (03°13'06" S – 39°16'47" W), município de Trairi, a 130 km de Fortaleza, no litoral oeste do Estado do Ceará, Brasil, onde são mantidas pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG), em parceria com o Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP) e o Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC), ambos localizados na Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus do Pici, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM).

A macroalga foi transportada em sacos plásticos pretos para o laboratório, onde foram exaustivamente lavadas com água corrente para a retirada de epífitas, sal e grãos de areia, e, em seguida, com água destilada. Após esse processo de lavagem e separação, a macroalga foi armazenada a -20° C até a sua utilização.

3.1.2 *Reagentes Químicos*

Coomassie Brilliant Blue G-250 e a albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Sigma-Aldrich. A matriz cromatográfica DEAE-Sephacel e o concentrador de amostra Vivaspín foram adquiridos da GE Healthcare. Todos os demais reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

Figura 13 – Macroalga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae).



Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Gênero: Solieria

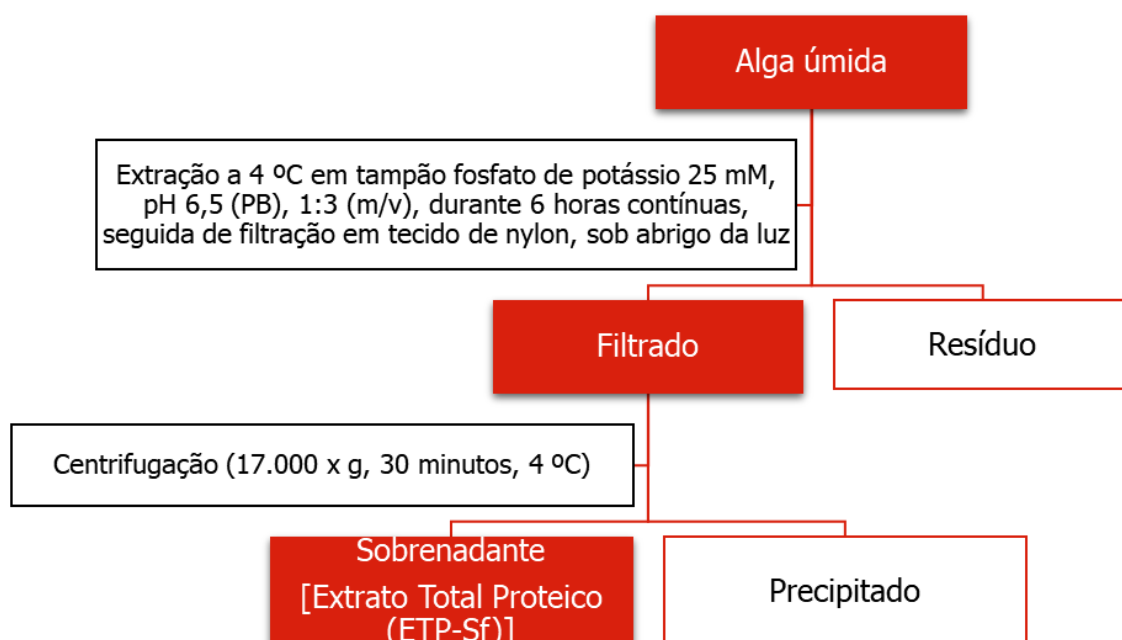
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

Segundo o protocolo proposto por Bastos Filho (2016) (Figura 14), a macroalga úmida foi triturada em liquidificador industrial em contato com tampão fosfato de potássio 0,025 M (PB) na proporção de 1:3 (m/v), pH 6,5, e em seguida o material foi mantido sob agitação mecânica por 6 horas contínuas protegido da luz. Posteriormente, o homogenato foi filtrado em tecido de trama fina, o resíduo descartado e o filtrado centrifugado a 17.000 x g, 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi denominado extrato total proteico de *Solieria filiformis* (ETP-Sf) e foi avaliado quanto ao teor de proteínas e R-Ficoeritrina e quanto ao rendimento e índice de pureza do pigmento. O ETP-Sf foi considerado o ponto de partida para os cálculos de recuperação de cada etapa do processo de purificação da R-FE. A conversão de unidade entre massa úmida e massa seca foi feita considerando que a alga úmida contém em média 90% de umidade. Foram realizadas 3 extrações independentes para efeito dos cálculos de rendimento, recuperação e índice de pureza em cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis*.

Figura 14 - Protocolo de extração da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *Solieria filiformis*.



Fonte: Bastos-Filho (2016).

3.2.2 Otimização do protocolo de purificação da R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

3.2.2.1 Cromatografia de Troca Iônica

O ETP-Sf foi submetido à cromatografia de troca iônica em matriz DEAE Sephacel, previamente equilibrada com PB, em coluna de vidro de dimensões de 4 x 50 cm, sob fluxo de 1,0 mL/min. Após a eluição da fração não retida, as proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com PB contendo NaCl nas concentrações 0,1, 0,5, 1,0 M e a fração cromatográfica mais pigmentada foi dialisada (*cutoff* 12 kDa) contra água destilada para posterior avaliação do teor de proteínas e R-FE e avaliação de rendimento, recuperação e índice de pureza do pigmento.

3.2.2.2 Ultrafiltração

A fração cromatográfica com maior teor de R-Ficoeritrina foi submetida à ultrafiltração em concentrador de amostra Vivaspin (*cutoff* 100 kDa), a 1000 x g, a 4 °C, durante 20 minutos. A fração retida no filtro e o filtrado foram avaliados quanto aos seus teores de proteína e R-FE e quanto ao rendimento, recuperação e índice de pureza do pigmento.

3.2.3 Teores de proteína, Rendimentos, Recuperação e Índices de pureza de R-Ficoeritrina

3.2.3.1 Dosagem de proteínas totais

Os teores de proteínas totais das amostras obtidas de cada etapa do processo de purificação foram determinados seguindo o método proposto por Bradford (1976), utilizando-se de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para tanto, foram aplicados 2,5 mL do reagente de Bradford em 100 µL das amostras. As leituras das absorbâncias foram feitas em triplicata em comprimento de onda igual a 595 nm em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 2100 pro).

3.2.3.2 Quantificação de pigmentos e índice de pureza

A determinação das concentrações R-FE de *S. filiformis*, resultantes das extrações e das etapas de purificação foi realizada a partir da Equação 1 proposta por Sampath-Wiley e Neefus (2007):

$$R - FE = 0,1247 [(A_{564} - A_{730}) - 0,4583 (A_{618} - A_{730})] \quad (1)$$

Onde:

R-FE: Concentração de R-Ficoeritrina (mg/mL);

A₅₆₄: Absorbância a 564 nm;

A₆₁₈: Absorbância a 618 nm;

A₇₃₀: Absorbância a 730 nm.

Para os cálculos dos índices de pureza da R-Ficoeritrina utilizou-se a Equação 2, proposta por Senthilkumar *et al.*(2013):

$$IP = \frac{A_{564}}{A_{280}} \quad (2)$$

Onde:

IP: Índice de pureza;

A₂₈₀: Absorbância a 280 nm;

A₅₆₄: Absorbância a 564 nm.

3.2.3.3 Rendimento de proteínas totais e de R-Ficoeritrina

As amostras obtidas das etapas de extração e de purificação foram avaliadas quanto ao rendimento de proteínas totais e de R-Ficoeritrina, que foram calculados seguindo, respectivamente, as Equações 3 e 4:

$$R_{PT} = \frac{PT}{Sf} \quad (3)$$

Onde:

R_{PT} = Rendimento de proteínas totais (mg/g AU);

PT = Teor de proteínas totais (mg);

Sf = Massa de alga úmida (g AU).

$$R_{R-FE} = \frac{R - FE}{Sf} \quad (4)$$

Onde:

R_{R-FE} = Rendimento de R-Ficoeritrina (mg/g);

R-FE = Teor de R-Ficoeritrina (mg R-FE);

Sf = Massa de alga úmida (g AU).

3.2.3.4 Recuperação de R-Ficoeritrina

Para os cálculos da recuperação de R-Ficoeritrina em cada etapa de purificação utilizou-se a Equação 5:

$$\eta = \frac{R - FE_n}{R - FE_0} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

η = Recuperação de R-Ficoeritrina (%);

$R-FE_n$ = Teor de R-Ficoeritrina em uma determinada etapa (mg);

$R-FE_0$ = Teor de R-Ficoeritrina do extrato (mg).

3.2.4 Atividade antioxidante *in vitro* da R-Ficoeritrina pura

Para a determinação da atividade antioxidante da R-Ficoeritrina da macroalga marinha *Solieria filiformis*, foram realizados ensaios de quelação do íon ferroso, sequestro do radical DPPH e sequestro do radical ABTS. Todos os ensaios foram realizados com três amostras de R-FE pura obtidas após a etapa de ultrafiltração de três processos de purificação independentes.

3.2.4.1 Quelação do íon ferroso

A capacidade de quelação de íons ferrosos da R-FE pura foi determinada de acordo com o método de Chew *et al.* (2008), com modificações. Nesta ordem, em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de sulfato ferroso 0,1 mM ($FeSO_4$) e 1 mL de ferrozina 0,25 mM [ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico] à 1 mL de R-FE pura em diferentes concentrações (31,25, 62,50, 125, 250 e 500 $\mu g/mL$). Os tubos de ensaio foram agitados em vortex e mantidos em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente e sob abrigo da luz. Em seguida, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 562 nm (A_{562}). Todas as reações foram

realizadas em triplicata. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi utilizado como controle positivo, sendo preparado nas mesmas concentrações que a amostra para posterior análise e comparação dos resultados, os quais foram expressos em porcentagem de atividade quelante, calculada de acordo com a Equação 6:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \frac{[A_0 - (A - A_b)]}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

$A_0 = A_{562}$ dos reagentes (1 mL de FeSO_4 + 1 mL de ferrozina + 1 mL de água destilada);

$A = A_{562}$ da reação (1 mL de FeSO_4 + 1 mL de ferrozina + 1 mL de amostra);

$A_b = A_{562}$ da amostra (2 mL de água destilada + 1 mL de amostra).

3.2.4.2 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato

O sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato (DPPH) foi avaliado de acordo com o método descrito por Blois (1958), com modificações. Primeiramente, 300 μL de R-FE pura, em diferentes concentrações (31,25, 62,50, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), foram homogeneizadas em vortex com 200 μL de metanol (MeOH). Em seguida, a essas soluções foram adicionadas 2,5 mL de DPPH 75 μM (solubilizado em MeOH). A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente por 40 minutos, sob abrigo da luz. Transcorrido o tempo de repouso, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm (A_{517}). Todas as reações foram realizadas em triplicata. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como controle positivo, sendo preparado nas mesmas concentrações que a amostra para posterior análise e comparação dos resultados, os quais foram expressos em porcentagem de sequestro de DPPH, que foi calculado de acordo com a equação 7:

$$\text{Sequestro de DPPH (\%)} = \frac{[A_0 - (A - A_b)]}{A_0} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$A_0 = A_{517}$ dos reagentes (500 μL de metanol + 2,5 mL de DPPH);

$A = A_{517}$ da reação (300 μL de amostra + 200 μL de metanol + 2,5 mL de DPPH);

$A_b = A_{517}$ da amostra (300 μL de amostra + 2,7 mL de água destilada).

3.2.4.3 Sequestro do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O sequestro do radical livre radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi avaliada de acordo com o método descrito por Xu *et al.* (2018), com modificações. Primeiramente, o radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação entre 5 mL de ABTS 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM. A mistura obtida foi mantida sob abrigo da luz por 16 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, o radical ABTS^{•+} foi diluído em água destilada até que fosse obtida absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm (A_{734}). Após isso, 800 µL do radical ABTS^{•+} foram adicionados a 200 µL de R-FE pura (em diferentes concentrações: 31,25, 62,50, 125, 250 e 500 µg/mL). A mistura reacional foi homogeneizada em vortex e mantida sob abrigo da luz por 6 minutos. Transcorrido o tempo de repouso, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 734 nm. Todas as reações foram realizadas em triplicata. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo, sendo preparado nas mesmas concentrações que a amostra para posterior análise e comparação dos resultados, os quais foram expressos em porcentagem de captura de ABTS, que foi calculado de acordo com a equação 8:

$$\text{Sequestro de ABTS (\%)} = \frac{[A_0 - (A - A_b)]}{A_0} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

$A_0 = A_{734}$ dos reagentes (200 µL de água + 800 µL de radical ABTS);

$A = A_{734}$ da reação (200 µL de amostra + 800 µL de radical ABTS);

$A_b = A_{734}$ da amostra (200 µL de amostra + 800 µL de água destilada).

3.2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como médias \pm D.P. (Desvio Padrão). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos, foi utilizado o método de análise de variância *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Turkey. Considerou-se significativos os valores com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 6.01 para Windows, GraphPad Software (La Jolla, California, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

A extração da R-Ficoeritrina de *S. filiformis* apresentou um rendimento de $0,17 \pm 0,012$ mg de R-FE/ g de alga úmida (mg R-FE/g AU). O rendimento equivalente, caso fosse utilizado 1,0 g da macroalga seca, seria de 1,7 mg de R-FE/ g (mg R-FE/g AS). O índice de pureza da R-FE no extrato protéico total foi de $0,62 \pm 0,027$. Tais valores corroboram com o rendimento do extrato obtido por Bastos-Filho (2016) e Brito (2017) para a R-FE da mesma macroalga vermelha.

Há na literatura diversos relatos sobre a extração do pigmento R-Ficoeritrina de várias macroalgas vermelhas, obtidos por diversas metodologias. Dado que a R-FE é uma molécula intracelular, métodos de rompimento da parede celular são necessários para a sua liberação. No presente trabalho, o rompimento mecânico da macroalga, em liquidificador industrial na presença de tampão, aumentou a superfície de contato da alga com o meio externo favorecendo a extração. Todavia, há a presença de polissacarídeos que dificultam mecanicamente esse processo, exigindo métodos de rompimento dessa barreira mecânico-biológica mais eficazes (KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982; MITTAL *et al.*, 2017).

Punampalam, Khoo e Sit (2018), por exemplo, alcançaram rendimento de 1,58 mg R-FE/g AS, com IP de 0,59, a partir da macroalga *Bangia atropurpurea*, enquanto que Malairaj *et al.* (2016) atingiram rendimento de 1,36 mg R-FE/a AU para a alga vermelha *Halymenia floresia*, com pureza elevada de 1,5. Ambos os trabalhos apresentaram rendimentos de extração do pigmento vermelho parecidos ou superiores ao alcançado para *S. filiformis*, todavia os referidos autores se utilizaram de métodos mais dispendiosos para a indústria, podendo dificultar a aplicação comercial do pigmento em virtude do valor de processos caros, tais como congelamento-descongelamento, sonicação e liofilização para a obtenção de seus extratos. O presente trabalho, que utilizou como fonte de pigmento a macroalga *S. filiformis*, obteve rendimento de 1,7 mg R-FE/g AS utilizando apenas agitação mecânica, o que faz do método adotado mais econômico que os exemplos supracitados.

Outros trabalhos, por outro lado, executaram metodologias mais baratas e similares à utilizada nesse trabalho. Denis *et al.* (2009b), por exemplo, obtiveram a partir do contato da macroalga *Grateloupia turuturu* com tampão fosfato e com água destilada, rendimentos de apenas 1,07 mg R-FE/g AS e 1,00 mg R-FE/g AS com IP de 0,11 e 0,12, respectivamente, os quais representam valores inferiores aos alcançados pelo presente trabalho. Sudhakar *et al.*

(2015), por sua vez, obtiveram, a partir da extração com tampão fosfato da macroalga vermelha *Gracilaria crassa*, rendimento superior ao encontrado ao obtido para a espécie *S. filiformis*, alcançando 0,37 mg R-FE/g AU, com pureza 0,36. Por último, Dantas (2018), a partir da alga *Gracilaria birdiae*, alcançou rendimento de 0,154 mg R-FE/g AU, com IP de 0,304, seguindo metodologia semelhante ao do presente trabalho, alcançado rendimento similar ao encontrado para a espécie utilizada por este trabalho.

Essa variação de rendimentos e de índices de pureza quando comparado com os valores obtidos para a macroalga *S. filiformis* devem-se também ao fato de que essas macroalgas possuem composições polissacarídicas e proteicas distintas entre si, fato que impactam diretamente sobre a quantidade e a pureza do pigmento liberado pelos processos de extração. Além disso, a localização geográfica em que a alga é coletada, a sua posição na coluna d'água, a incidência e absorção de luz, a disponibilidade de nutrientes e as relações interespecíficas com animais, microrganismos e outras algas também podem influenciar na quantidade de pigmento presente na alga.

4.2 Otimização do protocolo de purificação da R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

4.2.1 Cromatografia de Troca Iônica

A aplicação direta do extrato bruto proteico de *S. filiformis* em cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel o fracionamento dos pigmentos, sendo o maior rendimento observado no pico eluído com PB contendo NaCl 0,5 M (PIII-DEAE), o qual apresentou uma coloração rosa intensa. O referido rendimento foi de R-FE $0,106 \pm 0,008$ mg R-FE/ g AU, equivalente a uma recuperação de $62,32 \pm 2,230\%$, com IP de $1,58 \pm 0,009$ (Tabela 5). Tais resultados, quando comparados com os dados disponíveis na literatura para a mesma macroalga, representaram melhorias consideráveis na recuperação de R-FE.

Bastos-Filho (2016), que utilizou a mesma espécie de alga, alcançou rendimento de R-FE de apenas 0,0297 mg R-FE/ g AU após metodologia de purificação que compreendeu precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de troca iônica. Na mesma sequência metodológica, o autor alcançou recuperação de somente 21,82% e IP de 1,63. Todos esses dados, em comparação aos obtidos pelo presente trabalho, indicam que a exclusão da etapa de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi responsável por um aumento de até três vezes em termos de rendimento e de recuperação. Brito (2017), que também propôs uma otimização do protocolo de purificação de R-FE de *S. filiformis*, alcançou, após a sequência de precipitação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

sob temperatura de congelamento e cromatografia de troca iônica, rendimento de 0,0605 mg R-FE/ g AU, recuperação de 42,91% e IP de 1,15. Esses valores apresentados pela autora também se mostram inferiores aos alcançados por esse trabalho, que foram de cerca duas vezes maiores em termos de rendimento e de até 50% maior em termos de recuperação, confirmando a otimização.

A exclusão da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se deu devido à R-FE de *S. filiformis* apresentar distribuição em todas as faixas de saturação do sulfato de amônio, sugerindo que há diferenças nas cargas líquidas do pigmento vermelho presente no extrato proteico (BASTOS-FILHO, 2016). Assim sendo, a escolha de apenas uma faixa de fracionamento levaria a grandes perdas no seu rendimento. Além de ocasionar uma elevação do rendimento de R-FE, a exclusão da etapa de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ representou ganhos em economia, uma vez que se trata de um processo que demanda um longo tempo, uma etapa de congelamento (48 horas) de elevado consumo de energia, etapas de centrifugações, grandes quantidades de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas e os grandes volumes de água necessários para realizar o processo de diálise.

Munier *et al.* (2015) também realizaram a purificação da R-FE da macroalga vermelha *Grateloupia turuturu* diretamente em cromatografia de troca iônica, alcançando rendimento de 1,41 mg R-FE/ g AS, com pureza de 2,89, valores superiores aos alcançados por este trabalho. Contudo, a sua recuperação foi cerca duas vezes menor que a obtida nesse trabalho, sendo de apenas 27%. Vale ressaltar que o alto rendimento de pigmento com baixa recuperação ainda utilizou metodologias mais caras para a sua extração (por exemplo, extração com nitrogênio líquido e liofilização), as quais elevam o valor final do pigmento puro. Ao contrário do que os autores obtiveram, o presente trabalho alcançou rendimento menor, porém com recuperação elevada, tornando-o mais vantajoso por apresentar metodologia menos onerosa para a indústria. Os demais trabalhos encontrados na literatura para outras macroalgas se utilizaram de diferentes metodologias de purificação. Wang (2002), a partir da macroalga *Gracilaria verrucosa*, atingiu alto grau de pureza, 4,4, com apenas duas etapas de purificação: precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Interação Hidrofóbica com Leito Expandido (IHLE), todavia com rendimento de apenas 0,14 mg de R-Ficoeritrina/ g de alga congelada (mg R-FE/ g AC). Além de apresentar rendimento inferior ao do presente trabalho, a sequência metodológica adotada por Wang (2002) é mais custosa, impactando o valor final do pigmento purificado.

Nair *et al.* (2018), executaram uma metodologia de purificação da R-FE da macroalga *Centroceras clavulatum*, semelhante à utilizada por Bastos-Filho (2016) e Brito (2017), com as etapas de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de troca iônica. Os autores, Nair *et al.* (2018), atingiram alto IP ao final do processo, 6,4, contudo com baixo

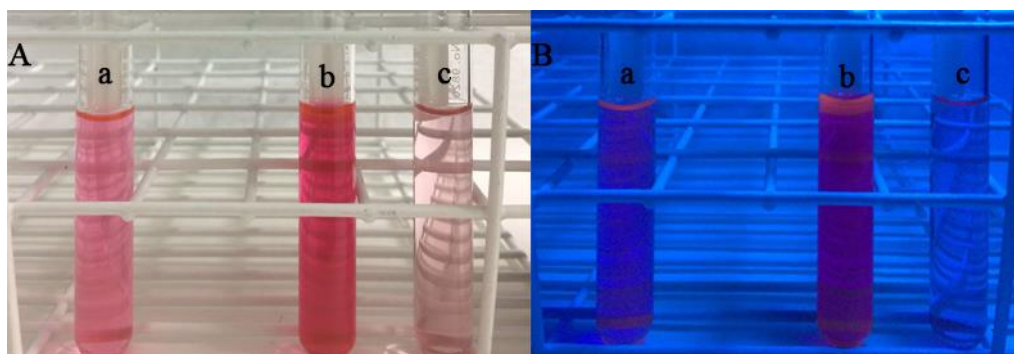
rendimento de 0,013 mg R-FE/g AU, o que representa recuperação de apenas 6,4%. Os valores apresentados demonstram perdas significativas em rendimento de pigmento, isto é, atingiram quantidades de pigmento superiores (rendimento de 0,202 mg R-FE/g AU) aos alcançados pelo presente trabalho, quando comparados os rendimentos de extração; todavia, nas etapas de purificação houve decréscimos significativos, de 88,6% após a precipitação com sulfato de amônio e de 93,6% após a cromatografia de troca iônica (considerando o rendimento de extração o valor inicial). Esses dados demonstram a eficácia da metodologia proposta pelo presente trabalho.

O índice de pureza da R-FE é determinante sobre a sua aplicação final. Quando em baixos níveis de pureza, o pigmento vermelho das macroalgas pode ser utilizado nas indústrias alimentícia e cosmética, por exemplo. Por outro lado, elevados índices de pureza permitem aplicações mais refinadas, como em aplicações biomédicas, farmacológicas ou ainda como marcadores moleculares (REIS *et al.*, 1998). Portanto, com a finalidade de se obter pureza maior do pigmento vermelho R-FE que possibilite ampliar as alternativas de sua aplicação, o PIII-DEAE foi dialisado para a retirada do tampão de eluição e centrifugado para a eliminação de suspensões e, em seguida, submetido a ultrafiltração em Vivaspin de *cutoff* 100 kDa, dado que o pigmento apresenta massa molecular de 240 kDa (DUMAY *et al.*, 2014).

4.2.2 Ultrafiltração

Após ultrafiltração do PIII-DEAE, o filtrado de coloração rosa clara e sem fluorescência foi descartado e o material retido (vivaspin retido, VSR) de intensa coloração e fluorescência foi coletado (Figura 15), alcançando um rendimento de $0,064 \pm 0,002$ mg R-FE/ g AU, o que representou uma recuperação de $37,69 \pm 1,267$ %, com IP de $2,36 \pm 0,146$.

Figura 15 – Aspecto visual da coloração e da fluorescência do o PIII-DEAE, VSR e do permeado após etapa de ultrafiltração em membrana de polietersulfona.



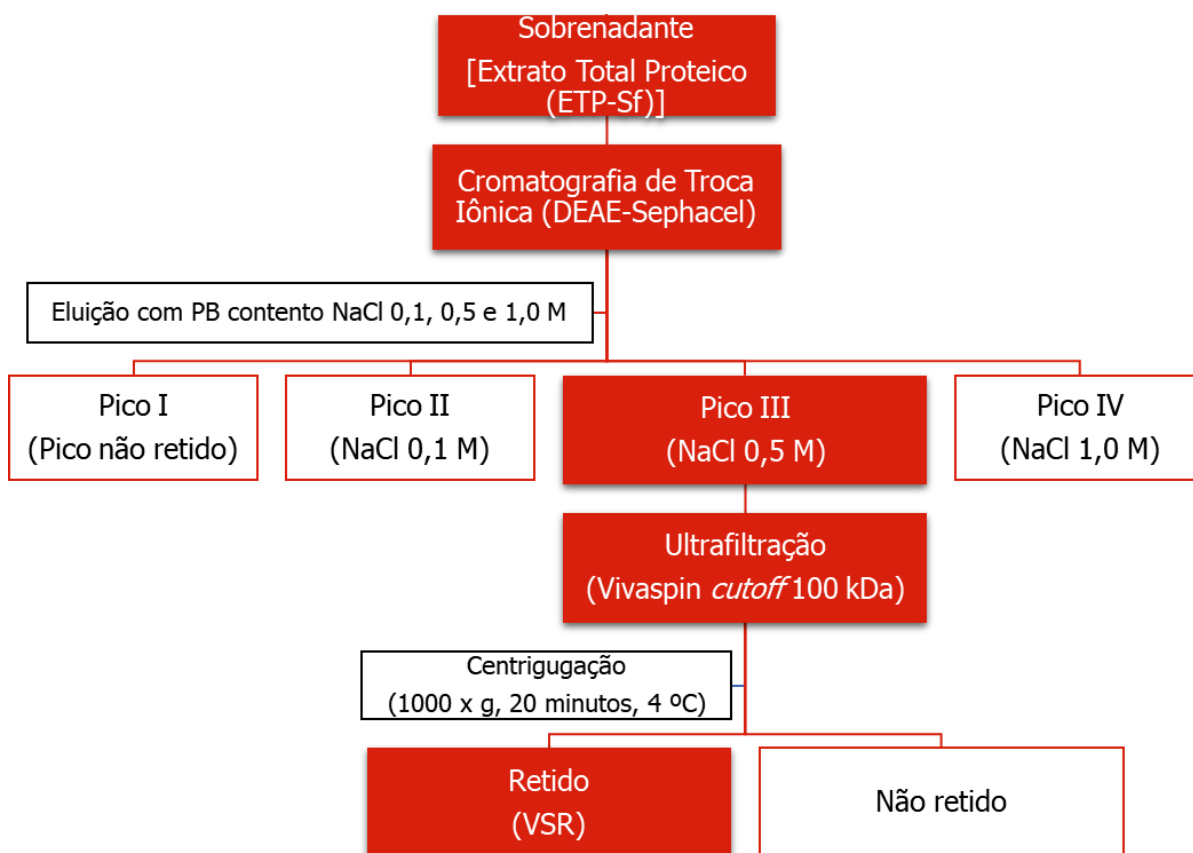
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A – Coloração do PIII-DEAE, VSR e do filtrado do processo de ultrafiltração sob luz branca. B – Fluorescência do PIII-DEAE, VSR e do filtrado do processo de ultrafiltração sob luz azul; a – PIII-DEAE; b – VSR; c – filtrado do processo de ultrafiltração.

Ainda que o rendimento do VSR, quando comparado com PIII-DEAE, tenha se mantido superior aos relatados por trabalhos que demonstraram resultados de purificação de R-FE de *S. filiformis*, a recuperação se apresentou 12,16% menor que a alcançada por Brito (2017). Contudo, dado que a finalidade desta etapa foi elevar o índice de pureza do pigmento, o resultado foi satisfatório, resultando numa pureza de até duas vezes maior em relação aos trabalhos para a mesma macroalga.

Desse modo, o rendimento, a recuperação e o índice de pureza observados nessa etapa do processo de purificação da R-FE, se mostraram superiores aos encontrados na literatura para *S. filiformis*, concluindo que essa metodologia, esquematizada na Figura 16, é mais rápida, mais econômica e contribui de forma eficiente para a purificação da R-Ficoeritrina dessa alga vermelha.

De acordo com os diferentes índices de pureza encontrados em cada etapa do processo, é possível, ainda, escolher para qual aplicação biotecnológica o pigmento poderia ser destinado. A Tabela 4 apresenta os dados obtidos para rendimento, recuperação e índice de pureza para cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis*. A Tabela 5 apresenta um comparativo entre o processo otimizado de purificação da R-FE de *S. filiformis* estabelecido pelo presente trabalho e os processos já relatados para a mesma espécie de macroalga. A Figura 17 demonstra o aspecto visual de amostras do extrato bruto proteico e das soluções de R-FE obtidas em cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis* sob a luz branca e a luz azul.

Figura 16 – Protocolo otimizado de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *Solieria filiformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Tabela de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* utilizando o processo otimizado.

Etapas	Rendimento por massa de alga úmida (mg/g)		Rendimento por massa de alga seca (mg/g)	Recuperação (%)	Índice de Pureza
	Proteína Total	R-FE Total			
ETP-Sf	0,22 ± 0,005	0,17 ± 0,012	1,7	100,00	0,62 ± 0,027
PIII- DEAE	0,20 ± 0,008	0,11 ± 0,008	1,1	62,32 ± 2,230	1,58 ± 0,009
VSR	0,17 ± 0,011	0,06 ± 0,002	0,6	37,69 ± 1,267	2,36 ± 0,146

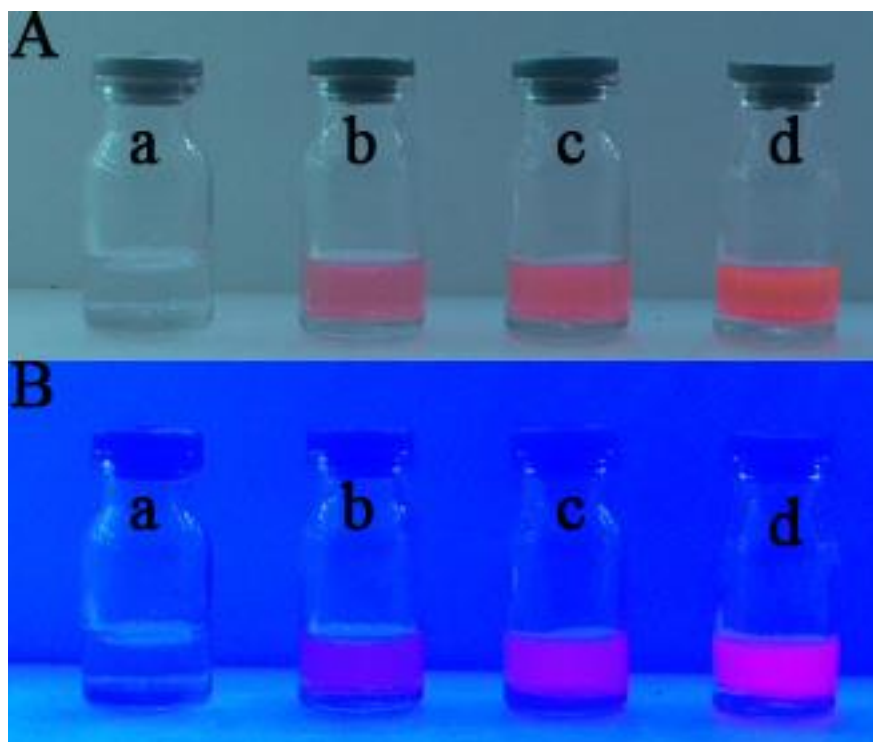
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: ETP-Sf: extrato total proteico de *Solieria filiformis*; PIII-DEAE: pico III da cromatografia de troca iônica; VSR: fração retida no Vivaspin.

Tabela 5 – Comparação dos valores do rendimento, recuperação e índice de pureza da R-FE nas etapas de extração e purificação entre os relatados na literatura e os obtidos no presente trabalho.

Etapas	Rendimento de R-FE (mg/g) *			Recuperação de R-FE (%)			Índice de Pureza		
	Bastos-Filho (2016)	Brito (2017)	Presente trabalho	Bastos-Filho (2016)	Brito (2017)	Presente trabalho	Bastos-Filho (2016)	Brito (2017)	Presente trabalho
ETP-Sf	0,14	0,16	0,17 ± 0,012	100	100	100	0,42	0,46	0,62 ± 0,027
F0/90	0,06	0,14 ^a	-	48,27	86,55	-	0,54	0,43	-
Pico III-DEAE	0,03	0,06	0,11 ± 0,008	21,82	42,91	62,32 ± 2,23	1,63	1,15	1,58 ± 0,009
VSR	-	-	0,06 ± 0,002	-	-	37,69 ± 1,267	-	-	2,36 ± 0,146

Fonte: Elaborado pelo autor; Bastos-Filho (2016); Brito (2017). Legenda: *Calculado com base na massa úmida da macroalga *S. filiformis*; ^aOtimização proposta pela autora; - Etapa não adotada na metodologia.

Figura 17 –Aspecto visual de amostras do extrato bruto proteico e das soluções de R-FE obtidas em cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis* sob a luz branca e a luz azul



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A – Coloração da R-FE em todas as etapas sob luz branca. B – Fluorescência da R-FE em todas as etapas sob luz azul; a – PB; b – ETP-Sf; c – PIII-DEAE; d – VSR.

Há poucos dados na literatura sobre ultrafiltração de ficobiliproteínas, além do fato desse método ser utilizado apenas como etapa de pré-purificação e concentração de amostras para posterior aplicação em cromatografias de exclusão molecular, não apresentando dados de rendimento e recuperação, como nas metodologias propostas por Rossano *et al.* (2003) para a macroalga *Corallina elongata*, e por Wang *et al.* (2015) para a espécie *Polysiphonia urceolata*. Por sua vez, Denis *et al.* (2009) utilizaram mecanismo em escala pré-industrial de escalonamento, Microlab40, fornecido pela VMA Industries. Primeiramente, no seu trabalho foram testadas diversas membranas de filtração, com poros de 10 a 300 kDa de diferentes materiais, em escala de bancada. Em seguida, foi selecionada a membrana de poliéster sulfona com poros de 30 kDa, a qual foi utilizada no equipamento de escala pré-industrial. O processo possibilitou uma retenção de 100% da R-FE de *Grateloupia turuturu* e permitiu a passagem de mais 30% de outras proteínas e mais de 60% de carboidratos. A partir do gráfico do espectro de absorvância do material retido, foi possível observar que o IP foi menor que o alcançado

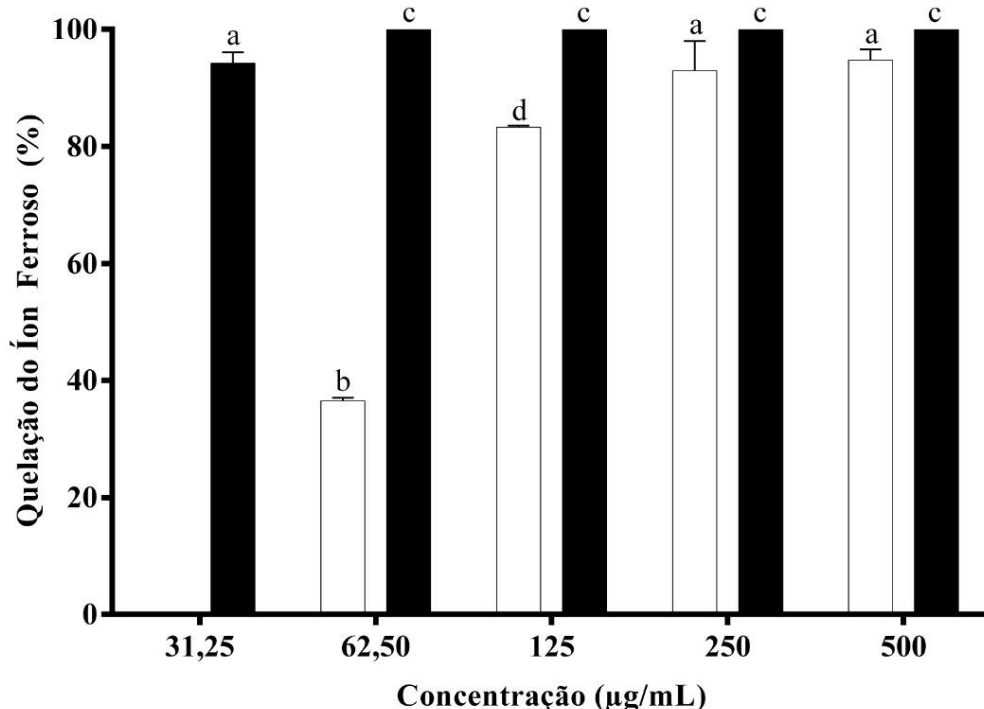
pelo presente trabalho. Contudo, o objetivo dos autores foi de concentrar a amostra para a sua posterior purificação, além de que foi utilizado o extrato diretamente nesse processo, ao contrário do que foi realizado na metodologia proposta pelo presente trabalho, que aplicou um pico de cromatografia de troca iônica, devido às membranas de Vivaspin exigirem material mais límpido para que a filtração seja eficiente. Denis *et al.* (2009b), em outro trabalho, utilizaram o chamado Amicon 8050 Stirred Cell, um mecanismo de ultrafiltração por centrifugação, que atingiu pureza de 0,5 e rendimento de 0,57 mg R-FE/ g AU. O elevado valor do rendimento se deve ao fato de os pesquisadores terem aplicado o extrato bruto diretamente no sistema de ultrafiltração, atingindo um valor de mais de sete vezes maior que o alcançado pela metodologia proposta para *S. filiformis*. Contudo, o índice de pureza para o método foi de quase cinco vezes menor que o IP atingido pelo presente trabalho.

4.3 Atividade antioxidante *in vitro* da R-Ficoeritrina pura

O presente trabalho realizou ensaio de três métodos distintos para a determinação da atividade antioxidante da R-FE purificada de *S. filiformis*. Todavia, além da diversidade de métodos, existe também ampla diversificação das metodologias utilizadas e dos mecanismos de mensuração, dificultando análises comparativas com outros trabalhos.

No presente trabalho, a R-Ficoeritrina purificada (VSR) da macroalga *S. filiformis* apresentou alta capacidade de quelação do Fe^{2+} , na qual a sua atividade máxima ($94,75 \pm 1,86\%$) foi observada na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, valor próximo ao alcançado pelo EDTA (100%), controle positivo deste ensaio (Gráfico 1). Numa concentração de apenas 125 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade de $92,93 \pm 5,08\%$, valor considerado já elevado, se comparado com outras ficobiliproteínas, resguardando as diferenças metodológicas. Sonani *et al.* (2014), por exemplo, só atingiu 86% de atividade quelante de Fe^{2+} numa concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ para a ficocianina de *Lyngbya* sp.

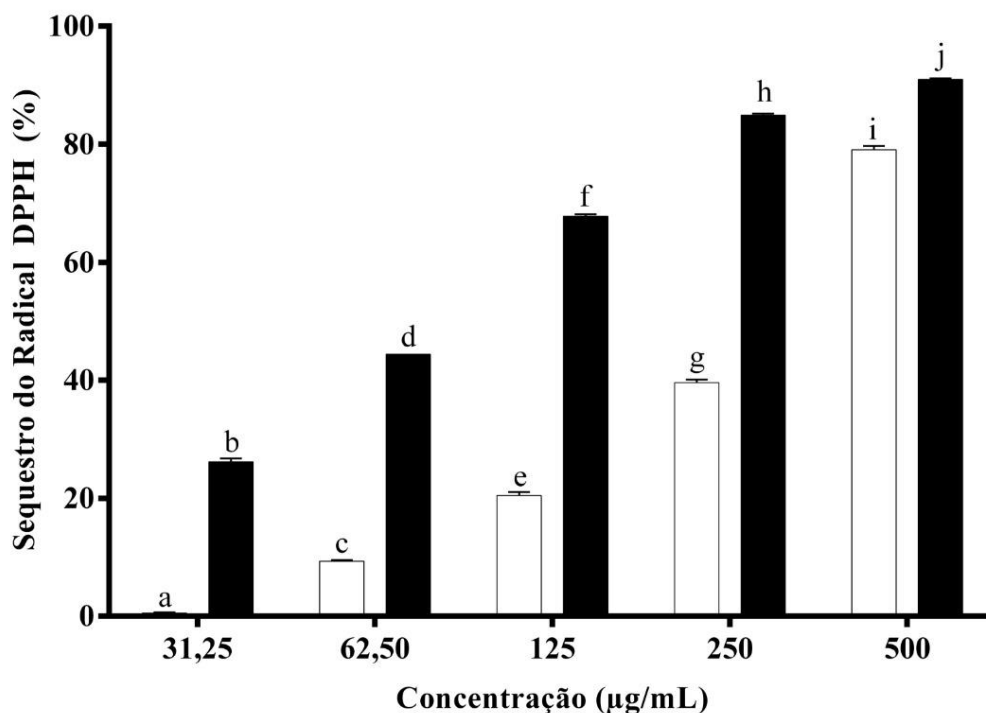
Gráfico 1 – Efeito da quelação do íon ferroso pela R-FE purificada de *S. filiformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: (□) R-FE; (■) EDTA. Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo de Turkey ($p < 0,05$), onde letras iguais indicam inexistência de diferença significativa.

A capacidade de sequestro do DPPH pela R-FE pura foi determinada por este trabalho, apresentando um perfil concentração-dependente, tendo sua atividade máxima de $79,04 \pm 0,66\%$ numa concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, valor de somente cerca de 10% menor ao encontrado para o BHT, controle positivo do ensaio (Gráfico 2). O BHT, um antioxidante sintético vastamente utilizado pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética apresenta algumas limitações, por ser tóxico e potencialmente carcinogênico (PANICKER *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2016). Desse modo, a R-FE de *S. filiformis* se apresenta como alternativa potencial como agente antioxidante.

Gráfico 2 – Efeito do sequestro do radical DPPH pela R-FE purificada de *S. filiformis*.

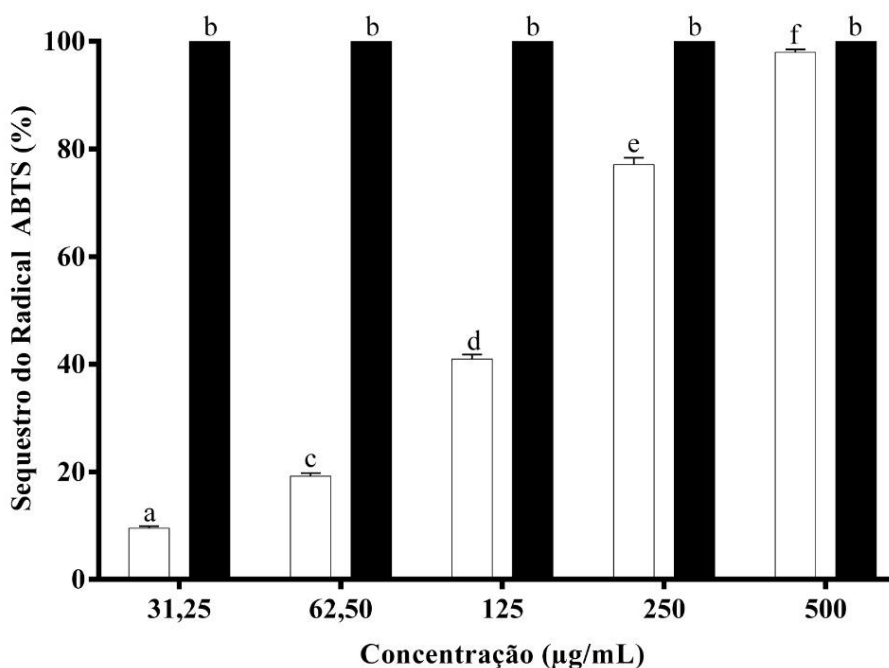


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: (□) R-FE; (■) BHT. Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$), onde letras iguais indicam inexistência de diferença significativa.

Senthilkumar *et al.* (2013b), que utilizaram metodologia similar para a R-FE da macroalga *Portieria hornemannii*, encontraram atividade antioxidante menor que a alcançada pelo presente trabalho. Os autores atingiram o máximo de apenas 43,55% de sequestro do radical DPPH, numa concentração dez vezes maior (5 mg/mL) que o presente trabalho na sua concentração máxima.

Por último, foi realizado o ensaio de captura do radical catiônico ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Trata-se de um método similar ao sequestro de DPPH, todavia num comprimento de onda em que há garantia de que não há interferência da coloração do pigmento. O controle positivo, ácido ascórbico, apresentou 100% de capacidade de sequestro do radical livre ABTS^{•+} em todas as concentrações testadas nesse ensaio. Já a R-FE pura apresentou atividade de $97,98 \pm 0,52\%$ quando foram administrados 500 µg/mL, apresentando também nesse ensaio um perfil concentração-dependente (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Efeito do sequestro do radical ABTS^{•+} pela R-FE purificada de *S. filiformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: (□) R-FE; (■) Ácido ascórbico. Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$), onde letras iguais indicam inexistência de diferença significativa.

Algumas constatações justificam a capacidade antioxidante da R-FE de *S. filiformis*. Por se tratar de uma proteína, a sua atividade antioxidante se origina da presença de alguns aminoácidos, como glutamato, aspartato, alanina, leucina, arginina, isoleucina, serina, glicina e treonina. (WU *et al.*, 2016). Aminoácidos hidrofóbicos são bons doadores de prótons assim como são bons quelantes de íons metálicos. Sonani *et al.* (2014) também justificaram a capacidade antioxidante da ficoeritrina de *Lyngbya* sp. pela presença desses aminoácidos. Além disso, acredita-se que a estrutura do anel de histidina e dos grupos carboxil e amino nas cadeias laterais de aminoácidos ácidos e básicos desempenham um papel importante no sequestro de íons metálicos. As subunidades α e β contêm cerca de 35 unidades desses resíduos. Além disso, essas subunidades se encontram na superfície externa das estruturas terciárias dessas proteínas, o que, somado a distribuição entre aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, é responsável pela alta performance dessa atividade biológica. Ademais, a R-FE contém uma estrutura tetrapirrólica linear, em que a presença de duplas ligações e capacidade de redução também contribuem para a atividade antioxidante total da R-FE (PATEL *et al.*, 2018).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, o processo de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi otimizado, uma vez que alcançou valores de rendimento, recuperação e índice de pureza superiores aos relatados na literatura. Além disso, a R-FE de *S. filiformis* que apresentou maior índice de pureza mostrou atividade antioxidante concentração-dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF N. Agricultural importance of algae. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, [s. l.], v. 11, n. 54, 2012.
- ABREU, T. M. **EFEITOS DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM ANIMAIS**. 2012. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2012.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (B-FE)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/75166?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 22jul. 2018a.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (R-FE)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52412?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 22jul. 2018b.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (C-FC)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52468?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 22jul. 2018c.
- ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (AFC)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a7472?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 22jul. 2018d.
- ALVES, A. W. S. **Técnicas de maricultura da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* em Flecheiras, Trairi-Ceará: Rendimentos de biomassa e extração de ágar**. 2016. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2016.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, [s. l.], 2010.
- ANDERSEN, R. A. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2013. p. 1–20.
- ANTOLOVICH, M. et al. **Methods for testing antioxidant activity**, 2002.
- 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.
- 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. In: ENERGY PROCEDIA 2017, **Anais...** [s.l: s.n.]
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. General Overview. In: BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. (Eds.). **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. 2. ed. London: CRC Press,

2014. p. 1–48.

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 (Kützing) P. W. Gabrielson**. 2016. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2016.

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

BEDOUX, G. et al. Bioactive components from seaweeds: Cosmetic applications and future development. In: **Advances in Botanical Research**. [s.l.] : Elsevier, 2014. v. 71p. 345–378.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (B-FE)**. Disponível em: <<http://stores.columbiabiosciences.com/surelight-b-phycoerythrin-b-pe-1mg/>>. Acesso em: 22jul. 2018a.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (R-FE)**. Disponível em: <<http://stores.columbiabiosciences.com/surelight-r-phycoerythrin-r-pe-1mg/>>. Acesso em: 22jul. 2018b.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (AFC)**. Disponível em: <<http://stores.columbiabiosciences.com/surelight-allophycocyanin-apc-1mg/>>. Acesso em: 22jul. 2018c.

BLOIS, M. S. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]**, 1958.

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

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae — their development and commercialisation. [s. l.], p. 743–756, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

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**. 2017. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2017.

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.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. **Agricultural uses of plant biostimulants**, 2014.

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., 2012. p. 102–114.

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.

CHEW, Y. L. et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 1067–1072, 2008.

CHUNER, C. et al. Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. **Natural Science**, [s. l.], v. 04, n. 08, p. 536–543, 2012.

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

DA CONCEIÇÃO RIVANOR, R. L. et al. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 34–43, 2014.

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**. 2018. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2018.

DENIS, C. et al. Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: Process definition and up-scaling. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 37–42, 2009. a.

DENIS, C. et al. Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Grateloupia turuturu*. **Botanica Marina**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 278–281, 2009. b.

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.], 2013.

DUMAY, J. et al. Phycoerythrins: Valuable proteinic pigments in red seaweeds. In: **Advances in Botanical Research**. [s.l: s.n.]. v. 71p. 321–343.

- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–25, 2010.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Protists: Algae and Heterotrophic Protists. In: **Biology of Plants**. 8. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2013. p. 317–365.
- FAO. FAO Aquaculture Newsletter. **FAO Aquaculture Newsletter**, [s. l.], v. 58, p. 66, 2018.
- FLEURENCE, J.; MORANÇAIS, M.; DUMAY, J. Seaweed proteins. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in Food Processing (Second Edition)**. 2. ed. Cambridge: Elsevier Ltd., 2018. p. 245–262.
- 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, 2000.
- 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, 1984. a.
- 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, 1984. b.
- 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. [s. l.], p. 105–112, 1994.
- GLAZER, A. N.; STRYER, L. Phycofluor probes. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 423–427, 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.].
- 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**. 2014. 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. 2016.

HAGMAN, L. et al. The role of biogas solutions in sustainable biorefineries. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 172, p. 3982–3989, 2018.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], 2013.

HASAN, M. R.; CHAKRABARTI, R. Use of algae & aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture. A review (FAO fisheries & aquaculture technical paper N 531). **FAO Fisheries Aquaculture Technical Paper**, [s. l.], v. 531, p. 135, 2009.

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.], 2009.

HERRMANN, C. et al. Ensiling of seaweed for a seaweed biofuel industry. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 196, p. 301–313, 2015.

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

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. **Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation**, 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.

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.

K.BALIN, A.; R.G. ALLEN. Oxidative Stress and Aging. **Encyclopedia of Endocrine Diseases**, [s. l.], v. 1, p. 659–663, 2015.

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, 2015. p. 243–269.

KAISER, M. J. et al. Primary Production Processes. In: **Marine Ecology: Processes, Systems, and Impacts.** 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2011. p. 33–87.

KAWSAR, S. M. a et al. Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps* : extraction , purification and characterization. **October**, [s. l.], 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.

KLOTZ, A. V.; GLAZER, A. N. Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], 1985.

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.

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.

LIMA, T. de B. **Cultivo da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson: textura de géis aquosos e lácteos**. 2012. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 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.

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. **Seaweed ecology and physiology**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

LOURENÇO, S. O. A Diversidade das Algas. In: **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. a. p. 33–129.

LOURENÇO, S. O. Tópicos Especiais Sobre Cultivo de Microalgas. In: **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. b. p. 453–475.

MAIA, R. A. **Estabelecimento de condições de cultivo in vitro e análise histológica da macroalga vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh**. 2016. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 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.

MALAIRAJ, S. et al. Qualitative and quantitative determination of R-phycoerythrin from *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh by polyacrylamide gel using electrophoretic elution technique. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1454, p. 120–126, 2016.

MANIRAFASHA, E. et al. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 109, p. 282–296, 2016.

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. Optimizing R-phycoerythrin purification from the red algae *Gracilaria verrucosa* in polymer-salt aqueous two-phase system using response surface methodology. **Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô**, [s. l.], v. 41, p. 63–77, 2014.
- MINELLI, A. et al. **Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer?**, 2009.
- 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.
- MIYABE, Y. et al. Structural Properties of Phycoerythrin from Dulse *Palmaria palmata*. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], 2017.
- 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.
- MUNIR, N. et al. Algae: A potent antioxidant source. **Sky J Microbiol Res**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 22–31, 2013.
- MURAMATSU, M.; HIHARA, Y. **Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: From gene expression to physiological responses**, 2012.
- 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.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan : a review. [s. l.], v. 2013, n. 4, p. 187–205, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- 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*)**. 2017. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2017.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], 2015.

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**, 2013.

PANICKER, V. et al. Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. **World Journal of Pharmacy and pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 758–763, 2014.

PARMAR, A. et al. Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2011.

PATEL, S. N. et al. Antioxidant activity and associated structural attributes of Halomicronema phycoerythrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], 2018.

PROZYME. **ProZyme (R-FE)**. Disponível em: <<http://prozyme.com/products/pb32?variant=10220895363>>. Acesso em: 22jul. 2018a.

PROZYME. **ProZyme (C-FC)**. Disponível em: <<http://prozyme.com/products/pb11>>. Acesso em: 22jul. 2018b.

PROZYME. **ProZyme (AFC)**. Disponível em: <<http://prozyme.com/products/pb20?variant=7900805955>>. Acesso em: 22jul. 2018c.

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.

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

RODRÍGUEZ, H. et al. Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], 1991.

ROSSANO, R. et al. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 289–293, 2003.

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.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y. J. **Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review**, 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). In: JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY 2007, **Anais...** [s.l.: s.n.]

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.

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-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 55, p. 150–160, 2013. a.

SENTHILKUMAR, N. et al. Further studies and biological activities of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 62, p. 107–116, 2013. c.

SFRISO, A. A.; GALLO, M.; BALDI, F. Phycoerythrin productivity and diversity from five red macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], p. 1–9, 2018.

SONANI, R. R. et al. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. {A}09DM: {An} antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. **Process Biochemistry**, [s. l.], 2014.

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.], 2016.

STADNICHUK, I. N. **Phycobiliproteins: Determination of chromophore composition and content**, 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.

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, 2015.

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-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], 2009.

- 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.
- TRIVEDI, J. et al. Algae based biorefinery - How to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], 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**, 2009.
- 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, H. L. et al. Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 2349–2362, 2016.
- 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.], 2015.
- XU, Y. et al. Optimization of the polysaccharide hydrolysate from *Auricularia auricula* with antioxidant activity by response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 113, p. 543–549, 2018.
- 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.