



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ROBERTA CRISTIANE CAVALCANTE COSTA

**PIGMENTOS AZUL (FICOCIANINA) E VERMELHO (R-FICOERITRINA) DA
MACROALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux
(Gigartinales, Rhodophyta): PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

**FORTALEZA
2016**

ROBERTA CRISTIANE CAVALCANTE COSTA

PIGMENTOS AZUL (FICOCIANINA) E VERMELHO (R-FICOERITRINA) DA
MACROALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux
(Gigartinales, Rhodophyta): PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do Título
de Mestre em Bioquímica. Área de
concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Norma Maria
Barros Benevides

Co-Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Márjory Lima
Holanda Araújo

FORTALEZA
2016

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)

C875p Costa, Roberta Cristiane Cavalcante.

Pigmentos azul (ficocianina) e vermelho (r-ficoeritrina) da macroalga marinha vermelha *Hypena musciformis* (Wulfen) Lamouroux (gigartinales, rhodophyta): purificação e caracterização parcial / Roberta Cristiane Cavalcante Costa. – 2016.
100 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

1. Pigmentos. 2. Corantes naturais. 3. *Hypena musciformis*. 4. Rodófitas. I. Título.

CDD 572

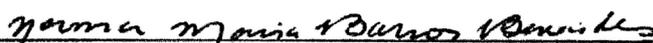
ROBERTA CRISTIANE CAVALCANTE COSTA

PIGMENTOS AZUL (FICOCIANINA) E VERMELHO (R-FICOERITRINA) DA
MACROALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux
(Gigartinales, Rhodophyta): PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

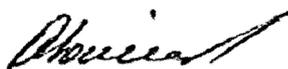
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do Título
de Mestre em Bioquímica. Área de
concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em 22 /07/2016.

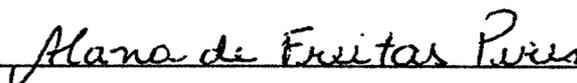
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Ponte Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a Dr.^a Alana de Freitas Pires
Centro Universitário Estácio do Ceará

A Deus,

Aos meus pais, Lúcia e Roberto.

Em memória ao meu tio Nilton.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e suporte nos momentos mais difíceis da minha vida.

À Prof^a Norma Maria Barros Benevides pela oportunidade de aprendizado, pela orientação, e pelo apoio profissional e por todos os esclarecimentos durante os desafios da carreira acadêmica.

À Prof.^a Márjory Lima Holanda pela excelente co-orientação, ensinamento, pela oportunidade de aplicar a Biotecnologia em benefício da sociedade, confiança e, principalmente, por todo o acompanhamento nesta caminhada de amadurecimento da minha vida e por todo o bom humor contagiante em cada dia desta rotina.

Ao Prof. Hermógenes David de Oliveira pelos ensinamentos, apoio, amizade e por todo encorajamento no meu crescimento profissional.

À Prof.^a Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas e a Prof^a Dr^a. Alana de Freitas Pires, por gentilmente integrarem a banca examinadora deste trabalho. Aos professores do curso Pós-graduação em Bioquímica, por terem contribuído com meu crescimento estudantil, profissional e pessoal. Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Alcântara de Miranda, por sempre tornar disponível o uso de equipamentos no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos (LABFRUTOS).

À Universidade Federal do Ceará (UFC): ao programa de criação e sustentação do curso de Pós-graduação em Bioquímica, do qual tive muito orgulho de participar; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro com a manutenção de custeio de projetos desenvolvidos no Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP) e no Laboratório de Carboidratos de Lectinas (Carbolec); também à Fundação de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pelo custeio de bolsas de pesquisa e projetos desenvolvidos no BioAP e no CarboLec.

A todos do Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP), por todo apoio e paciência durante todos os desafios impostos a nós. Em especial aos amigos Vilmara Farias, Augusto Filho e Andréa Costa pela amizade incondicional e apoio nesta conquista.

Aos técnicos, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela ajuda e amizade durante o desenvolvimento dessa pesquisa, em especial à amiga Roberta Laiz Albano por toda cumplicidade e pela linda amizade nos momentos felizes e tristes nesta vida acadêmica e ao meu amigo Acrísio Bastos Filho por toda força, apoio, momentos felizes e tristes, pela esperança e companheirismo em todas as etapas deste projeto.

Aos meus amigos biotecnologistas Cláudia Figueirêdo, Hugo Leite, Ítalo Gabriel, Emanuel Francelino, Raissa Rodrigues, Victor Texeira e Yasmine Lima pelas minhas melhores gargalhadas.

Aos meus pais, Lúcia e Roberto, a quem dedico todas as minhas conquistas, por me apoiarem de todas as formas possíveis durante toda a minha vida. Aos meus irmãos Arthur Felipe e José Roberto, por me propiciarem muitos dos meus melhores momentos de alegrias. À minha amiga Shirley Tânia, por todos os conselhos certos e apoio incondicional.

À minha família pela base e apoio emocional, em especial a todos de Morada Nova, os quais sempre foram o meu refúgio seguro.

Em memória ao meu tio Nilton, por ter me guiado pela vida toda, por sustentar toda a minha família e por sempre me manter segura e confiante; eterna e dolorosa saudade.

Ao meu namorado Rodolfo Cavalcante, por me propiciar tantos momentos felizes e sempre me apoiar em minhas decisões.

Este trabalho é resultado de todas essas amizades e todos os ensinamentos que carregarei comigo para as próximas etapas desta caminhada. Muito obrigada!

“E eu ainda sou bem moço pra tanta tristeza, e deixemos de coisa, cuidemos da vida, pois senão chega a morte ou coisa parecida, e nos arrasta moço sem ter visto a vida.” (Raimundo Fagner).

RESUMO

Pesquisas recentes têm mostrado que compostos produzidos por algas marinhas têm um incrível potencial biotecnológico com inúmeras aplicações industriais. Entretanto, os pigmentos naturais se destacam, porém os mesmos ainda não foram explorados de forma intensiva, principalmente quando obtidos a partir de macroalgas. Diante da necessidade do uso de compostos de origem natural, o presente trabalho teve por objetivo extrair e purificar os pigmentos da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*, também conhecidos como ficobiliproteínas, e caracterizar o pigmento vermelho R-Ficoeritrina (R-FE). Os pigmentos foram extraídos a partir da macroalga fresca em tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,5), seguidos por fracionamento por sulfato de amônio a 0-30% e 30-45% de saturação para posterior aplicação em colunas cromatográficas em matriz de DEAE-Sephacel e Sephacryl S-300. As análises espectrofotométricas das frações obtidas mostraram pigmentos relativos à referida espécie de macroalga, R-Ficocianina ($\lambda = 550$ e 610 nm), e R-FE, com picos de absorção a 495, 540 e 564 nm e emissão de fluorescência a 575 nm. Obteve-se a R-FE com recuperação de 15,75%, rendimento de 8,56 $\mu\text{g/g}$ (peso seco da alga) e índice de pureza de 4,17. Por eletroforese (PAGE-SDS) em condições redutoras, a R-FE apresentou três bandas proteicas com massas moleculares aparentes de 18, 20 e 37 kDa, referente as subunidades α , β e γ . A R-FE apresentou 95,35% da estrutura secundária em α -hélix, mantendo a estabilidade dessa estrutura até 60 °C e, a partir de 70 °C, foi observado alterações no espectro de absorção, ocorrendo reduções na absorção de 28,26% e emissão de fluorescência de 49,01%. O espectro de absorção da R-FE, quando armazenada por 20 dias, se manteve estável sob condições refrigeradas (-20 ° e 4 °C), entretanto quando armazenada a 25 °C, os picos máximos de absorção a 495, 540 e 564 nm apresentaram um decréscimo de 89,7, 89,7 e 92,8% respectivamente. Quanto a sua emissão de fluorescência, foi observado a perda de 38,8, 73,7 e 100% sob as temperaturas de - 20, 4 e 25°C, respectivamente, nos primeiros cinco dias. Foi possível extrair ficobiliproteínas e purificar especificamente o pigmento fluorescente R-FE com alto grau de pureza a partir da macroalga *Hypnea musciformis*, apresentando predominância de estrutura em α -hélix termoestável, propriedades espectroscópicas de elevada estabilidade e sobretudo em condições adequadas de armazenamento.

Palavras-chave: Pigmentos. Corantes naturais. *Hypnea musciformis*. Rodófitas

ABSTRACT

Recent researches have shown that substances produced by seaweeds have an amazing biotechnological potential with several industrial uses. However, the natural pigments stand out, but they have not been intensively explored yet, especially when obtained from macroalgae. Because of the need to use natural substances, this work intends to extract and purify the pigments of the *Hypnea musciformis* red sea macroalgae, as known as phycobiliproteins, and characterize the red pigment R-phycoerythrin (R-FE). The pigments were extracted from the fresh macroalgae in potassium phosphate buffer 25 mM (pH 6.5), followed by fractionation by ammonium sulfate 0-30% and 30-45% saturated for posterior application in chromatographic columns in DEAE-Sephacel and Sephacryl S-300 matrix. The spectrophotometric analysis of the obtained fractions showed pigments related to the said macroalgae species, R-phycoerythrin ($\lambda = 550$ and 610 nm), and R-FE, with absorption peaks at 495, 540 and 564 nm and fluorescence emission at 575 nm. It was obtained pure R-FE with 15.75% recovery, 8.56 $\mu\text{g/g}$ productivity (seaweed dry weight) and 4.17 purity index. By electrophoresis (PAGE-SDS) in reducing conditions, the R-FE showed three protein bands with 18, 20, and 37 kDa apparent molecular mass, relative to the α , β and γ subunits. The R-FE showed 95.35% of its secondary structure in α -helix, maintaining this structure stability until 60 °C. Starting from 70 °C, it was observed changes in the absorption specter, occurring reductions in absorption (28.26%) and fluorescence emission (49.01%). The R-FE absorption specter, when stored for 20 days, remained stable when in refrigerated conditions. However, when stored at 25 °C, the maximum absorption peaks at 495, 540 and 564 nm showed an 89.7, 89.7 and 92.8% decrease, respectively. Concerning its fluorescence emission, it was observed the loss of 38.8, 73.7 and 100% under the temperature of -20, 4 and 25 °C respectively within the first five days. It was possible to extract phycobiliproteins and purify specifically the R-FE fluorescent pigment with a high purity rate from *Hypnea musciformis*, showing thermostable α -helix structure predominance, highly stable spectroscopic properties and especially in proper storage conditions.

Keywords: Pigments. Natural dyes. *Hypnea musciformis*. Rhodophyta.

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Comprimentos de onda da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) visível ao homem.	25
Figura 2	Estrutura típica de um ficobilissomo e espectro de absorção dos pigmentos fotossintéticos das algas	27
Figura 3	Estrutura química das clorofilas a, b e d	28
Figura 4	Diagrama de associação das subunidades de uma ficobiliproteína	30
Figura 5	A: Modelo representativo da associação das subunidades e cromóforos da C-Ficocianina e R-Ficocianina; B: Estrutura química do cromóforo ficocianobilina; C: Estrutura química do cromóforo ficocianoeritrobilina	33
Figura 6	Modelos representativos das associações das subunidades e cromóforos das ficoeritrinas (A) e estrutura química do cromóforo ficourobilina (B).	35
Figura 7	Macroalga Vermelha <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta)	42
Figura 8	Colorações do EB-Hm e das F0/30 e F30/45 contendo os pigmentos da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	52
Figura 9	Aspectos visuais dos picos cromatográficos da F0/30 de <i>H.musciformis</i> em matriz de DEAE-Sephacel	55

Figura 10	Fluxograma de extração de pigmentos da macroalga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> .	64
Figura 11	Coloração e Fluorescência da R-FEHm	66
Figura 12	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE) da R-FEHm na presença e ausência de agente redutor	69
Figura 13	Efeito da temperatura sobre os espectros de absorção (A) e concentração (B) de R-FEHm	74

LISTA DE GRÁFICOS

		PÁGINA
Gráfico 1	Aspecto visual da coluna e cromatograma de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da F0/30 de <i>H. musciformis</i>	54
Gráfico 2	Cromatograma de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da F30/45 de <i>H. musciformis</i>	59
Gráfico 3	Cromatograma de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300 do P2-30/45	62
Gráfico 4	Espectros de absorção do EB-Hm e frações pigmentadas resultantes das etapas do processo de purificação da Ficocianina de <i>H. musciformis</i>	66
Gráfico 5	Espectros de absorção das frações pigmentadas resultantes das etapas de purificação da R-FE (F30/45) de <i>H. musiciformis</i>	67
Gráfico 6	Espectros de absorção e emissão de fluorescência da R-FEHm	70
Gráfico 7	Espectro de dicroísmo circular de R-FEHm	72
Gráfico 8	Efeito da temperatura sobre os espectros de emissão a 575 nm da R-FEHm	76
Gráfico 9	Termo desnaturação da R-FEHm durante o aquecimento de 25 a 100 °C por dicroísmo circular a 222 nm	77

Gráfico 10	Termoestabilidade da R-FEHm durante o aquecimento de 25 a 100 °C por dicroísmo circular a 222 nm.	79
Gráfico 11	Intensidade de Fluorescência (I.F.) da R-FEHm durante o armazenamento sob diferentes temperaturas.	80
Gráfico 12	Estabilidade dos picos de absorção da R-FEHm armazenada no escuro e sob a temperatura de -20°C durante vinte dias.	82
Gráfico 13	Estabilidade dos picos de absorção da R-FEHm armazenada no escuro e sob a temperatura de 4°C durante vinte dias.	83
Gráfico 14	Estabilidade dos picos de absorção da R-FEHm armazenada no escuro e sob a temperatura de 25°C durante vinte dias.	84

LISTA DE TABELAS

		PÁGINA
Tabela 1	Clorofilas e pigmentos acessórios biossintetizados pelas algas	26
Tabela 2	Aplicação e aspecto econômico de pigmentos ou associação de pigmentos extraídos de algas	31
Tabela 3	Protocolos utilizados para purificação de R-FE	39
Tabela 4	Purificação dos pigmentos presentes na F0/30 macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	57
Tabela 5	Purificação da R-FE da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	62
Tabela 6	Elementos de estrutura secundária, estimados a partir do espectro de dicroísmo circular, da R-FEHm em diferentes temperaturas	77
Tabela 7	Ficobiliproteínas da macroalga <i>H. musciformis</i> , purificação e caracterização.	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações gerais.....	18
1.2 As Algas marinhas e sua importância ecológica e econômica.....	19
1.2.1 O Filo <i>Rhodophyta</i>	22
1.3 Pigmentos de algas e importância econômica.....	24
1.3.1 Clorofilas.....	27
1.3.2 Carotenoides.....	29
1.3.3 Ficobiliproteínas.....	29
1.3.3.1 Ficocianinas	32
1.3.3.2 Ficoeritrinas.....	34
1.3.3.2.1 R-ficoeritrinas.....	36
1.4 Métodos de extração e purificação de R-ficoeritrinas	38
2 OBJETIVOS	41
2.1 Geral.....	41
2.2 Específicos	41
3 MATERIAIS	42
3.1 Macroalga vermelha <i>H. musciformis</i> (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, <i>Rhodophyta</i>).	42
3.2 Reagentes e outros materiais	43
4 MÉTODOS	44
4.1 Extração dos pigmentos da macroalga vermelha <i>H. musciformis</i>	44
4.2 Fracionamento proteico com sulfato de amônio.....	44
4.3 Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel	45
4.4 Cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300	45
4.5 Quantificações de proteínas e pigmentos das etapas de extração e purificação	46

4.5.1	Rendimento de proteínas	46
4.5.2	Rendimento e índice de pureza da R-FE de <i>H. musciformis</i>	46
4.5.3	Determinação da concentração de ficocianina	47
4.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	48
4.7	Espectros de absorção e fluorescência.....	48
4.8	Espectro de dicroísmo circular da R-ficoeritrina de <i>H. musciformis</i>	49
4.9	Estabilidade térmica das propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de <i>H. musciformis</i>	49
4.10	Estabilidade térmica das propriedades estruturais da R-ficoeritrina de <i>H. musciformis</i>.....	49
4.11	Estabilidade das propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de <i>H. musciformis</i> no armazenamento	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Extração dos pigmentos da macroalga vermelha <i>H. musciformis</i>	51
5.2	Fracionamento dos pigmentos extraídos de <i>H. musciformis</i>	52
5.3	Purificação dos pigmentos de <i>H. musciformis</i>.....	54
5.3.1	Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da F0/30.....	54
5.3.2	Cromatografia de troca iônica da F30/45	59
5.4	Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S-30	61
5.5	Espectros de absorção da R-FE durante as etapas de purificação.....	65
5.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	68
5.7	Caracterizações espectroscópicas da R-FEHm.	70
5.7.1	Espectros de absorvância e fluorescência.....	70
5.7.2	Espectro de dicroísmo circular de R-FE de <i>H. musciformis</i>.	72
5.8	Efeitos da temperatura e do armazenamento sobre a estabilidade espectroscópica da R-FE de <i>H. musciformis</i>.....	73
5.8.1	Termoestabilidade espectroscópica.....	73
5.8.2	Estabilidade no armazenamento.....	80

5.9 Considerações finais	85
6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Ao longo dos séculos, os oceanos têm sido uma fonte de grande riqueza e mistério para a humanidade. Desde muito cedo, o ser humano começou a utilizar este recurso para navegar em busca de novas fontes de alimentos e novos territórios, entretanto, o início da exploração do assoalho marinho só se deu em meados do século XIX e, somente nas últimas décadas, a investigação científica começou a mostrar as potencialidades deste recurso (WARNER, 2009). Os oceanos são um recurso verdadeiramente global, apresentando-se como o maior bioma do planeta, totalizando 361 milhões Km², uma profundidade média de 3.730 m e cobrindo cerca de 70% da superfície do planeta (CRAIG, 2005; DUARTE, 2006). As características físicas deste imenso corpo de água afetam direta ou indiretamente o cotidiano da população mundial, e os organismos vivos que nele habitam são importantes fontes de alimentos e produtos naturais (POMPONI, 2001; TARGETT *et al.*, 2002; DONIA & HAMANN, 2003; SIMMONS *et al.*, 2005; KARLESKINT *et al.*, 2010).

Muitos cientistas acreditam que os oceanos terão uma maior biodiversidade do que os continentes, uma vez que muito da vida marinha ainda é desconhecido e porque os oceanos têm uma capacidade 100 vezes maior para a existência de vida. Existem alguns exemplos que sustentam esta convicção, tais como os recifes e corais que são considerados os dois maiores depositários da biodiversidade marinha, uma vez que apresentam um elevado número de espécies por unidade de área (GRAY, 1997; SALA & KNOWLTON, 2006). Inicialmente, pensava-se que as zonas abissais (profundidades acima de 4.000 m) seriam pobres biologicamente, contudo suportam uma diversidade de espécies que pode rivalizar com as florestas tropicais (THORNE-MILLER, 1999). Deste modo, os oceanos revelam-se ser um grande desafio para os cientistas, conduzindo-os a exploração da sua biodiversidade, dos seus processos biogeoquímicos e das características físicas deste ambiente vasto e complexo.

Ao longo das últimas décadas, tem ocorrido um aumento constante do número de moléculas naturais isoladas a partir de organismos marinhos. O aumento da exploração de organismos marinhos, para a obtenção de novos produtos, tem sido coincidente com a invenção e desenvolvimento da tecnologia, nomeadamente do espectrômetro de ressonância magnética nuclear de alta resolução (meados da década 70), que veio desempenhar um papel chave na elucidação da estrutura dos

produtos naturais marinhos (HU *et al.*, 2011). Desde a década de 1970, mais de 15.000 estruturas de novos produtos naturais foram descobertas a partir de microrganismos, algas e invertebrados marinhos, exibindo uma espantosa variedade de atividades biológicas (JIMENEZ *et al.*, 2009). Estes organismos têm ganhado importância como componente integral dos ecossistemas marinhos, uma vez que são a base da cadeia alimentar e, de igual modo, também têm ganhado cada vez mais importância econômica, em grande parte devido à expansão da indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, onde os produtos oriundos de algas têm um lugar proeminente (DENNY & GAINES, 2007; YASUHARA-BELL *et al.*, 2010). De fato, as algas têm sido alvo de inúmeros estudos, destacando-se como um dos maiores produtores de moléculas bioativas, com elevados potenciais antimicrobianos, antioxidantes, anticoagulantes, anti-inflamatórios, antivirais e antitumorais (CHEW *et al.*, 2008; DÍAZ-RUBIO *et al.*, 2008; MAYER *et al.*, 2009; KHANAVI *et al.*, 2010). A exploração dessas ferramentas biotecnológicas contribui para o desenvolvimento sócio econômico do país através da geração de produtos que, comercializados, geram emprego e renda para vários setores (VALLE, 2005).

1.2 As Algas marinhas e sua importância ecológica e econômica

As algas apresentam uma enorme multiplicidade de espécies que são, em grande parte, correlacionadas entre si, representando assim um grupo polifilético, possuindo representantes nos Domínios Eubacterias e Eukarya, e vão desde organismos unicelulares microscópicos a gigantes *kelps*, conjunto de grandes algas pardas. São organismos fotossintetizantes, apesar de não possuírem folhas, raízes ou tecidos vasculares, e exercem um papel ecológico importante, semelhante ao das plantas terrestres, as quais têm função de produtores primários (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2007). São predominantemente aquáticas, sendo encontradas no mar, em águas estuárias, dulcícolas e em superfícies úmidas, observando-se que sua distribuição está diretamente ligada a fatores químicos e físicos, tais como temperatura, salinidade da água, disponibilidade de luz e correntes dos oceanos (RAVEN; EVERT; EICHORN, 1996). Nesses sistemas aquáticos, as algas incorporam energia solar em biomassa, atuam na mineralização e no ciclo de elementos químicos, sendo então consideradas o verdadeiro pulmão do mundo, uma vez que produzem mais oxigênio pela fotossíntese do que precisam na respiração,

liberando o excesso para o ambiente (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). Além disso, as algas participam naturalmente da reciclagem de nutrientes e do tratamento de resíduos, reagindo às mudanças na qualidade da água, sendo assim, consideradas ótimas biomonitoras de eutrofização (WERLINGER, 2004).

O termo não taxonômico “alga” compreende divisões, as quais estão relacionadas a critérios químicos, citológicos e morfológicos ligados aos tipos e às combinações de pigmentos fotossensibilizantes presentes nesses organismos; à natureza química das substâncias de reserva e das paredes celulares; à ausência ou à presença de flagelos; ao padrão e curso da mitose e da citocinese; à presença ou à ausência de membrana do retículo endoplasmático e ao tipo de complexidade de ciclo de vida. Esses organismos apresentam tamanhos e formas altamente variadas, podendo apresentar de 3 a 10 µm ou até mais de 70 m e encontra-se distribuídos nos diversos tipos de habitats, tais como, rochas, oceanos, superfícies de vegetais, solos e corpos de água doce (CARVALHO & ROQUE, 2000; FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

As algas também podem ser divididas didaticamente em dois grandes grupos: microalgas e macroalgas. As microalgas são unicelulares, algumas delas com algumas características semelhantes às das bactérias, como é o caso das cianofíceas ou algas azuis, também conhecidas como cianobactérias. São organismos procariontes, ou seja, não possuem mitocôndrias, retículo endoplasmático, núcleo definido ou plastídeos, ficando os tilacóides dispersos no citoplasma. A sua cor azul-esverdeada tem origem nos pigmentos Ficocianina e aloFicocianina presentes na membrana dos tilacóides (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2007). Existem vários grupos taxonômicos de microalgas marinhas, uma vez que existem mais diferenças do que similaridades entre esses organismos, no entanto, os principais grupos agregam as diatomáceas e os dinoflagelados, estes são os principais componentes do fitoplâncton marinho ou plâncton vegetal (RAVEN; EVERT; EICHORN, 1996).

As macroalgas marinhas são mais populares por serem maiores e visíveis a olho nu. As várias centenas de espécies existentes nos mares ocorrem principalmente fixas às rochas (bentônicas), podendo, no entanto crescer na areia, cascos de tartarugas, recifes de coral, raízes de mangue, cascos de barcos, pilares de portos, mas sempre em ambientes com a presença de luz e nutrientes. São muito abundantes na zona entre marés, onde formam densas faixas nos costões rochosos (RAMOS, 1998). Podem ser classificadas por Filos, em Chlorophytas (algas verdes),

Heterokontophytas (algas pardas) e Rhodophytas (algas vermelhas). Esta divisão baseia-se na diversidade e quantidade de pigmentos característicos que cada espécie usa para captar e dissipar a energia da luz, além da clorofila a, por exemplo, carotenoides, biliproteínas e outras clorofilas (DENNY E GAINES, 2007; STEELE *et al.*, 2009).

O primeiro registro da utilização de macroalgas foi encontrado no herbário chinês em 2.700 a.C e, desde então, elas têm sido usadas como alimento, ração e adubo em muitos países do mundo. As utilidades das macroalgas são conhecidas há milênios nos países orientais onde são amplamente usadas na alimentação por apresentarem elevado valor nutritivo e um baixo teor de calorias, pobres em gorduras (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). As macroalgas marinhas possuem polissacarídeos que se comportam, na sua grade maioria, como fibras sem valor calórico. São, por isso, a melhor forma de corrigir carências nutricionais da alimentação atual, devido ao seu amplo leque de constituintes: minerais, proteínas, vitaminas e fibras (SAÁ, 2002).

O ocidente, no entanto, só passou a se interessar pelas macroalgas após a segunda guerra mundial, quando o Japão deixou de exportar os ficocolóides, polissacarídeos coloidais extraídos das macroalgas que têm a propriedade de formar gel em solução aquosa. Eles apresentam ainda propriedades estabilizantes e emulsificantes, que são aplicadas em diversas indústrias (OLIVEIRA, 2005).

A produção mundial de macroalgas para atender a demanda industrial foi de 23,8 milhões de toneladas, em 2012, movimentando aproximadamente 6,6 bilhões de dólares. Alguns países asiáticos dominam essa produção, sendo as espécies de macroalgas vermelhas *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma spp.* as mais cultivadas (FAO, 2014).

No Brasil, no entanto, há poucos cultivos de macroalgas, sendo os gêneros *Gracilaria* e *Hypnea* os mais cultivados e, recentemente, o gênero *Kappaphycus*. Essas algas possuem importância econômica, pois são utilizadas como principal fonte de ficocolóides e produtos naturais com aplicações biotecnológicas em diversas áreas (FACCINI & BERCHEZ, 2000; PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002). Atualmente, as algas marinhas vermelhas possuem importância econômica e ecológica e muitas vezes, esse grupo, é considerado como a principal fonte de moléculas biologicamente ativas quando comparadas com outros grupos de algas, podendo ser um dos grupos mais antigos das algas eucarióticas (FLYNN, 2014).

1.2.1 O Filo *Rhodophyta*

As algas do filo *Rhodophyta*, conhecidas como algas vermelhas ou rodófitas, são organismos eucariontes fotossintetizantes, que não apresentam flagelos em nenhuma fase de vida (nem mesmo nos gametas), não possuem centríolos e sim anéis polares, apresentam um ou vários cloroplastos por célula contendo pirenóides e ficobilissomas. Essas algas vermelhas acumulam amido no citoplasma (polissacarídeo com estrutura similar ao glicogênio) e possuem parede celular rígida de celulose recoberta por mucilagem, podendo até apresentarem carbonato de cálcio (algas coralináceas). Estes organismos têm importante papel na produção primária, como fonte de alimento, produção de oxigênio e ciclagem de nutrientes. Ocorrem principalmente no ambiente marinho e estão amplamente distribuídos das regiões tropicais até as regiões polares (LEE, 2008; FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

Esta divisão constitui uma das principais linhagens monofiléticas dentro dos eucariotos, e segundo Yoon *et al.* (2006), está subdividida em seis classes *Bangiophyceae*, *Compsopogonophyceae*, *Florideophyceae*, *Porphyridiophyceae*, *Rhodellophyceae*, e *Stylonematophyceae*. Cerca de 700 gêneros e 6.000 espécies de algas compõem esse filo, aonde quase todas as algas são marinhas, conhecendo-se apenas cerca de 20 gêneros de água doce. Uma das vantagens evolutivas das algas vermelhas é a presença majoritária de pigmentos acessórios azuis e vermelhos, o que possibilita a sobrevivência dessas algas em profundidades onde a luz quase não penetra (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

Os membros da classe *Florideophyceae*, por exemplo, crescem por meio de células apicais e consistem inteiramente de filamentos ramificados nos quais as células estão ligadas por conexões estruturais entre células adjacentes, denominadas por “pit-connections” (GRAHAM & WILCOX, 2009). Esta classe foi classificada em ordens e famílias levando em conta a base do ciclo celular, modo de reprodução sexuada e constituição química da parede celular (FRESHWATER *et al.*, 1994). Dentro da classe *Florideophyceae*, a ordem *Gigartinales*, proposta em 1892 por Schmitz, é uma das principais possuindo cerca de 40 famílias (SAUNDERS; CHIOVITTI; KRAFT, 2004).

As macroalgas vermelhas contêm polissacarídeos sulfatados, denominados galactanas, os quais são classificados em carragenanas (extraídas de

gêneros como *Chondrus*, *Kappaphycus* ou *Mastocarpus*) ou ágaros (extraídos de gêneros como *Gelidium* ou *Gracilaria*) de acordo com a estereoisomeria das unidades de galactose que compõem o polímero. Apresentam propriedades espessantes ou geleificantes e há muito tempo são utilizados na indústria. Algumas macroalgas vermelhas são consumidas diretamente pelo homem: *Porphyra* (*nori*, constituindo a folha que envolve os *sushis*), cuja aquacultura é perfeitamente dominada no Japão; e *Palmaria palmata* (*dulse*), na Europa e na América do Norte. As rodófitas calcificadas exercem um papel de cimentação indispensável à constituição e à sobrevivência dos recifes de coral e, devido à sua microestrutura alveolada, algumas Corallinales podem ser utilizadas na constituição de pequenas próteses ósseas (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

O gênero *Hypnea*, pertencente à família Cystocloniaceae (SAUNDERS; CHIOVITTI; KRAFT, 2004), ordem Gigartinales, é bastante conhecido devido à sua distribuição geográfica, elevado número de espécies e importância econômica. Este gênero pode ser caracterizado por possuir um talo cilíndrico e achatado, com muitas ramificações, ramos laterais curtos, cistocarpos globulares, e tetrasporângios zonados (LAMOUREUX, 1813; MSHIGNEI, 1978; WOMERSELEY, 1994). O gênero *Hypnea* foi então estabelecido por Lamouroux (1813) baseado em seis espécies. Tal gênero possui cerca de 67 espécies descritas (GERALDINO *et al.*, 2010), nas quais o tamanho do talo varia de 3 centímetros a 50 centímetros. Essas espécies encontram-se distribuídas nas costas tropicais e subtropicais do mundo (GERALDINO *et al.*, 2009) e representam uma interessante fonte de κ -carragenana e ι -carragenana, galactanas sulfatadas presentes na matriz extracelular (KNUTSEN *et al.*, 1995) que são aplicadas como ficocolóides industriais nos EUA desde 1945. São utilizadas também como alimento nas Filipinas, e como vermífugo na Indonésia. As espécies *H. musciformis* e *H. cervicornis* já foram estudadas quanto à extração de lectinas com propriedades pró e anti-inflamatórias, antibióticas e antifúngicas, as quais são empregadas no diagnóstico e terapia do câncer (NAGANO *et al.*, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

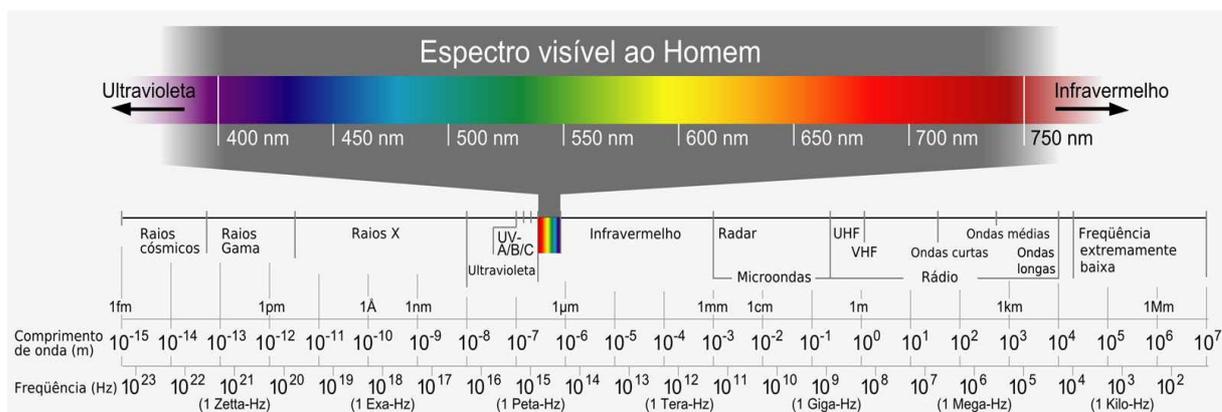
Por isso, muitos estudos estão sendo realizados no sentido de cultivar a espécie *Hypnea musciformis* em tanques, sistemas de lagoas e no mar (BERCHEZ & OLIVEIRA 1990; WALLNER *et al.*, 1992; REIS *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2006). Além disso, estudos recentes têm mostrado que, além do seu grande potencial comercial, a espécie pode ser utilizada na biorremediação de locais eutrofizados atuando como

um biofiltro (MARTINS & YOKOYA, 2010). Sendo assim, torna-se importante a realização de pesquisas que objetivem conhecer novas moléculas bioativas de interesse industrial e comercial destas espécies visando um maior aproveitamento desses organismos sob o aspecto de biorrefinarias.

1.3 Pigmentos de algas e importância econômica

Dentro do espectro eletromagnético da luz solar, a região entre 400 e 700 nm (radiação fotossinteticamente ativa ou simplesmente PAR, do inglês *Photosynthetic Active Radiation*), visível ao homem (Figura 1), é a mais importante para a vida no planeta, pois organismos fotossintetizantes, como as algas, são capazes de capturar e converter a energia solar desta região em energia química. Quanto mais longo é o comprimento de onda, menor é a energia e mais rapidamente se dá sua absorção, sendo assim, numa coluna de água, a luz vermelha desaparecerá rapidamente, ao passo que a luz azul penetrará mais profundamente, considerando-se a exceção da luz violeta, que terá suas partículas dispersas de forma mais rápida por possuírem menor comprimento de onda (ROSS & SULEV, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2009). Portanto, a absorção da luz depende diretamente da função dos pigmentos fotossintetizantes e pigmentos acessórios presentes em todas as algas.

Figura 1 - Comprimentos de onda da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) visível ao homem.



Fonte: Sociedade Brasileira de Física¹

Os pigmentos orgânicos são mais eficientes na absorção molecular de luz, uma ou duas ordens de magnitude, do que os pigmentos inorgânicos utilizados como tintas tais como o azul cobalto, cinábrio amarelo cromo, etc. Muitos pigmentos têm uma estrutura molecular característica de carbono, longas cadeias ou anéis fechados e, além disso, são particularmente estáveis por possuírem estrutura de ressonância, responsável também pela absorção de luz (BECKER, 1994). Nas macroalgas vermelhas estão presentes, além das clorofilas, pigmentos acessórios (Tabela 1) como as ficobiliproteínas que absorvem a energia dos fótons e repassam para o centro de reação fotossintético, aonde a clorofila presente é responsável pela a fotossíntese em si, daí então o nome de pigmentos acessórios (NELSON & COX, 2014).

¹Disponível em <<http://www.sbfisica.org.br/v1/novopion/index.php/publicacoes/imagens/130-espectro-eletromagnetico>>, acesso em maio 2016.

Tabela 1 – Clorofilas e pigmentos acessórios biossintetizados pelas algas.

Pigmento	Tipo	Cor	Distribuição
Clorofila	A	Verde	Algas, Cianobactérias
	B		Algas verdes
	C		Algas pardas, diatomáceas
	D		Algas vermelhas
Carotenoide	Carotenos	Laranja	Todas as algas, exceto cianobactérias
	Xantofilas	Amarela	Algas pardas, diatomáceas
Ficobilina	Ficoeritrinas	Vermelha	Algas vermelhas, cianobactérias
	Ficocianinas	Azul	

Fonte: adaptado de BioGeo learning².

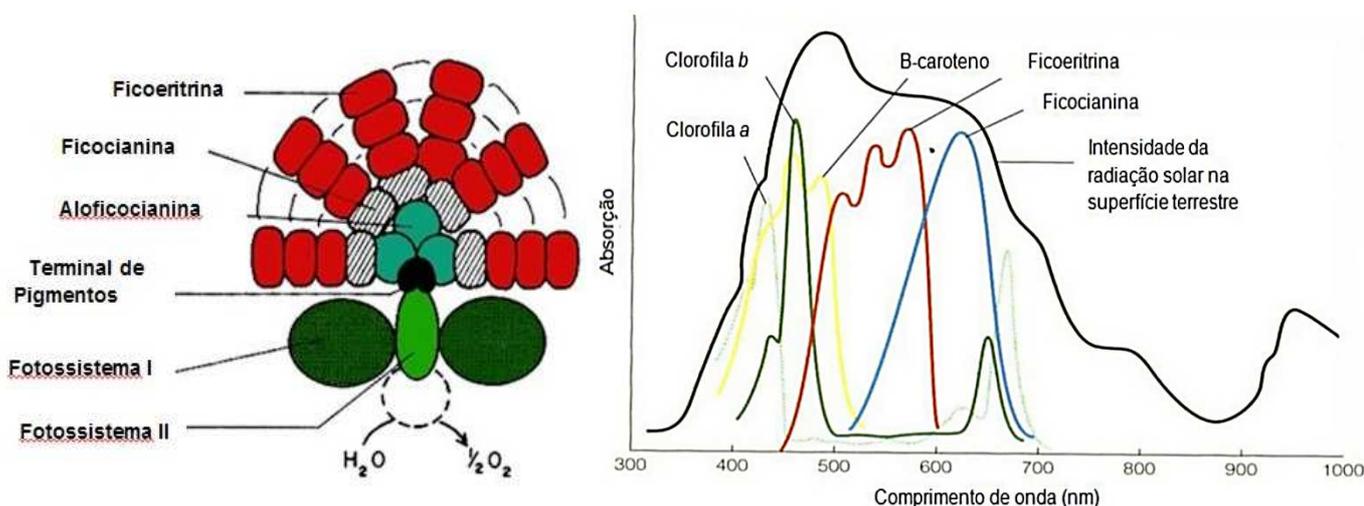
Juntos, os pigmentos formam um complexo altamente ordenado denominado ficobilissomo que está localizado na membrana dos tilacóides, arranjados perifericamente em cerca de três a seis camadas paralelas. Nos ficobilissomos os pigmentos dispõem-se de acordo com suas formas espectrais, onde é possível constatar as hastes contendo ficoeritrina e Ficocianina que emergem de um núcleo formado de aloFicocianina (AP) e aloFicocianina B (APB). Um núcleo central ligado à membrana tilacóide permite que as ficobiliproteínas se arranjam geometricamente para aperfeiçoar a captura de luz e transferência de energia, participando de uma cadeia de transferência de fótons em sequência: ficoeritrina > Ficocianina > aloFicocianina > clorofila *a* (KUDDUS *et al.*, 2013).

Dessa maneira, o espectro de absorção PAR das macroalgas vermelhas é aumentado possibilitando, assim, que elas cresçam nos mais diversos ambientes e em várias profundidades (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999; CAMPBELL & REECE, 2001). Segundo Grossman *et al.* (1993), essa característica é importante para as macroalgas que vivem em ambientes com flutuações de maré, onde a intensidade da luz na coluna d'água pode variar ao longo do dia e as propriedades

² Disponível em: <<http://biogeolearning.com/site/v1/biologia-10o-ano-idade-1-obtencao-de-materia/fotossintese-estrutura-do-cloroplasto/pigmentos-fotossinteticos/>>, acesso em maio 2016.

espectrais dos pigmentos acessórios contribuem para uma eficiência superior a 95% na captação e transferência de energia obtida da radiação solar (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura típica de um ficobilissomo e espectro de absorção dos pigmentos fotossintéticos das algas.

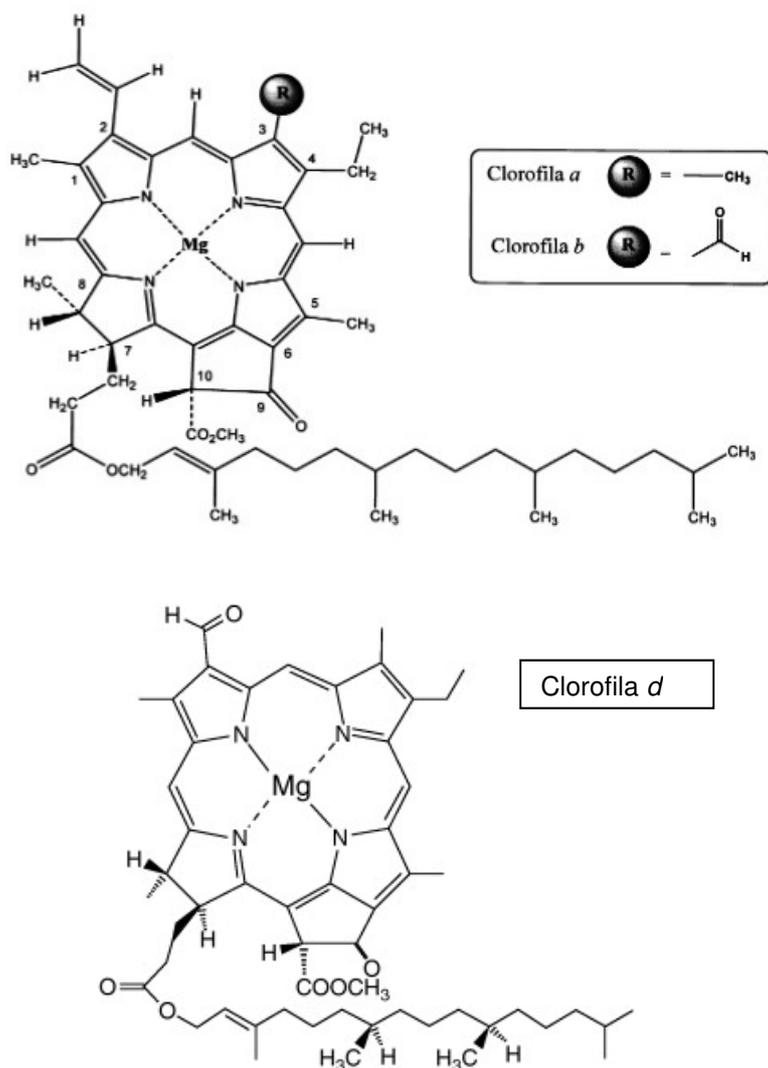


Fonte: Adaptado de UEVORA, 2008 e CAMPBELL & REECE, 2001.

1.3.1 Clorofilas

As clorofilas são substâncias com estruturas químicas formadas por complexos derivados da porfirina, com um átomo de Mg (magnésio) ao centro. As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes do carbono C-3 (Figura 3). As clorofilas são pigmentos verdes muito comuns em legumes e em várias frutas. Devido a sua cor e as propriedades físico-químicas, são também usadas como aditivos para produtos alimentícios. Estes pigmentos são quimicamente instáveis e podem ser alterados ou destruídos facilmente, modificando a percepção e a qualidade dos produtos. Em geral, as clorofilas são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e a degradação química (SCHOEFS, 2002). Este fato demonstra que pode ocorrer prejuízo em produtos que contenham clorofila e sejam indevidamente acondicionados (STREIT *et al.*, 2005).

Figura 3 – Estrutura química das clorofilas a, b e d.



Fonte: Adaptado de MIN CHEN & BLANKENCHIP, 2011 e STREIT *et al.*, 2005.

A clorofila c absorve luz azul mais intensamente diferentemente da luz vermelha quando comparada com as clorofilas a e b. Além disso, as estruturas químicas, diferentes de cada clorofila, ligam-se a proteínas de variadas formas alterando seu espectro de absorção. Encontrada somente em algas vermelhas, a clorofila d, é semelhante à clorofila a, porém, no anel I da molécula, o grupo (-O-CHO) substitui o grupo (-CH = CH₂), mostrado na Figura 3 (MIN CHEN & BLANKENCHIP, 2011). Além de serem usadas como corantes naturais, as clorofilas também são aplicadas como antioxidantes em produtos alimentares ou para preparar produtos enriquecidos (STREIT *et al.*, 2005). Precursores e derivados das clorofilas também são usados na medicina para tratamentos fotodinâmicos (BRITTON, 1995; SCHOEFS, 2002).

1.3.2 Carotenoides

Em contraste com o pequeno número de clorofilas, existem mais de 60 tipos de carotenoides, quase todos com a função primária de fotoproteção. Todos eles absorvem fortemente a energia na mesma área do espectro eletromagnético- EEM (do ultravioleta ao azul), mas a forma do espectro de absorção de cada carotenoide é única. (WEAVER E WRIGLEY, 1994; RICHARDSON, 1996).

Os carotenoides são pigmentos de cor alaranjada ou amarela, presentes nas membranas dos tilacóides e, portanto, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos e óleos. Considerados precursores de compostos essenciais para a vida como a vitamina A, devem ser ingeridos através da alimentação. São divididos em duas grandes classes, os carotenos, que são pigmentos livres de oxigênio em suas cadeias hidrocarbônicas e as xantofilas, que são seus derivados oxigenados. Apesar da grande diversidade e quantidade dessas moléculas, somente algumas são utilizadas comercialmente, principalmente o β -caroteno (pigmento amarelo) e a astaxantina. Suas principais aplicações são como corantes de alimentos, cosméticos ou alimentação animal (frango e peixe). Suas propriedades nutricionais e relevância terapêutica relacionam-se com a ação pró-vitamina A e no desempenho da prevenção de doenças associadas ao processo de estresse oxidativo como o câncer, catarata, arteriosclerose e retardo do processo do envelhecimento (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). Alguns carotenoides podem ser obtidos por via sintética e com menor custo, porém, sabe-se que a absorção do isômero natural é geralmente superior à do sintético (SPOLAORE *et al.*, 2006; GRAHAM e WILCOX, 2000; DUFOSSÉ *et al.*, 2005).

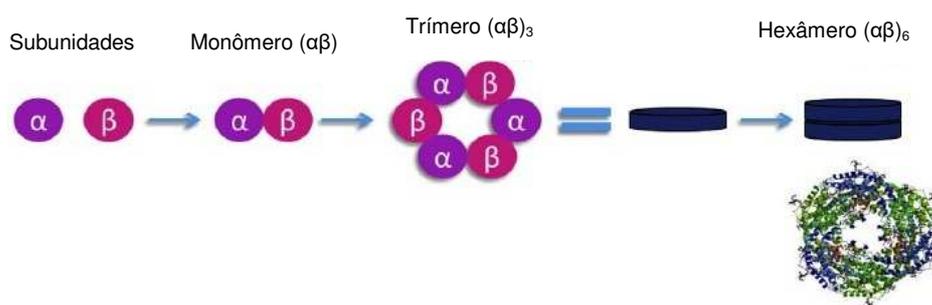
1.3.3 Ficobiliproteínas

No início dos anos 80, Ness Eisebeck, trabalhando com a cianobactéria *Oscillatoria* sp., descreveu um pigmento azul brilhante e solúvel em água, o qual chamou de saprocianina. Alguns anos depois, foi possível isolar pigmentos avermelhados e solúveis em água de macroalgas vermelhas, recebendo a denominação de ficoeritrinas. Em 1854, Stokes realizou as primeiras análises espectroscópicas desses pigmentos, observando a intensa fluorescência dessas moléculas. Ainda no final do século XIX, Molisch Hans obteve os primeiros cristais de

ficobiliproteínas, propondo a natureza proteica dessas biomoléculas, sendo essa teoria reforçada por diversos estudos posteriores, mostrando que ao contrário das clorofilas e carotenoides, de natureza lipídica, as ficobiliproteínas são hidrossolúveis, altamente fluorescentes e absorvem luz na área do espectro eletromagnético que fica entre as áreas de absorção dos carotenoides e clorofilas, como já demonstrado na Figura 2 (MARSAC, 2003).

As ficobiliproteínas são então formadas por uma parte proteica (apoproteína) ligada covalentemente a cromóforos denominados bilinas (grupo prostético) encontrados em cianobactérias, algas vermelhas e criptófitas (GLAZER, 1994). A maioria dessas moléculas são proteínas compostas por duas subunidades, α e β , as duas, provavelmente, vindas de um ancestral comum (GLAZER, 1989). Entretanto, ao contrário das demais ficobiliproteínas, as ficoeritrinas R-FE e β -ficoeritrina apresentam uma terceira subunidade γ , aumentando a estabilidade do pigmento. Esses tipos de subunidades são responsáveis por uma conformação em forma de disco, formada por hexâmeros $(\alpha\beta)_6$ (Figura 4), a qual permite que cada ficobiliproteína e um peptídeo de ligação montem a estrutura do ficobilissomo (SUN *et al.*, 2004).

Figura 4 – Diagrama de associação das subunidades de uma ficobiliproteína.



Fonte: Adaptado de DUMAY *et al.*, 2014.

Além de aumentar o espectro de captação de luz, as ficobiliproteínas têm como segunda função atuar como reserva de nitrogênio, onde em situações de carência, as proteínas que as compõem são degradadas, eliminando os ficobilissomos e liberando nitrogênio para os processos metabólicos essenciais, ocasionando uma mudança de coloração nas algas para um tom esverdeado, entretanto, quando o nível

de nitrogênio disponível estiver suficiente para a sobrevivência das algas, as ficobiliproteínas podem ser novamente sintetizadas e os ficobilissomos reconstituídos (LOURENÇO, 2006; JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014).

De acordo com suas características espectrais de absorbância, as ficobiliproteínas podem ser divididas em quatro principais grupos: ficoeritrina (FE) ($\lambda_{\max} = 495-570$ nm); ficoeritrocianina (FEC) ($\lambda_{\max} = 575$ nm); ficocianina (FC) ($\lambda_{\max} = 610-620$ nm); e aloficocianina (AFC) ($\lambda_{\max} = 650-655$ nm) (GLAZER, 1985; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995).

Sob o aspecto econômico, muitos estudos têm mostrado as aplicações biotecnológicas desses pigmentos, muitos relacionados às suas características espectroscópicas, estendendo-se desde a indústria farmacêutica até a alimentícia. A Tabela 2 mostra os pigmentos extraídos de algas ou produtos de sua associação já comercializados e aplicados em diferentes áreas médicas e industriais (GRAHAM & WILCOX, 2000; SILVA, 2008; ERIKSEN, 2008-a).

Tabela 2 – Aplicação e aspecto econômico de pigmentos ou associação de pigmentos extraídos de algas.

Molécula	Valor (US\$/mg)	Aplicação
AloFicocianina	6,00-25,00	Ensaio imunológico e diagnóstico
Astaxantina	2,50	Pigmento-corante (indústria de pescado)
Estreptavidina(β -Ficoeritrina)	50,00	Ensaio imunológico e diagnóstico
Ficocianina	25,00	Pigmento- corante (alimentos, fármacos, cosméticos), ensaios imunológicos e diagnósticos
IgG (R-FE)	50,00	Ensaio imunológico e diagnóstico
β -Ficoeritrina	3,25 – 25,00	Ensaio imunológico e diagnóstico
Ficoeritrina	0,30 – 3,00	Pigmento-corante

Fonte: Adaptado de SPOLARE *et al.*, (2006); DERNER (2006); PROZYME (2016-a); PROZYME (2016-b); PROZYME (2016-c)

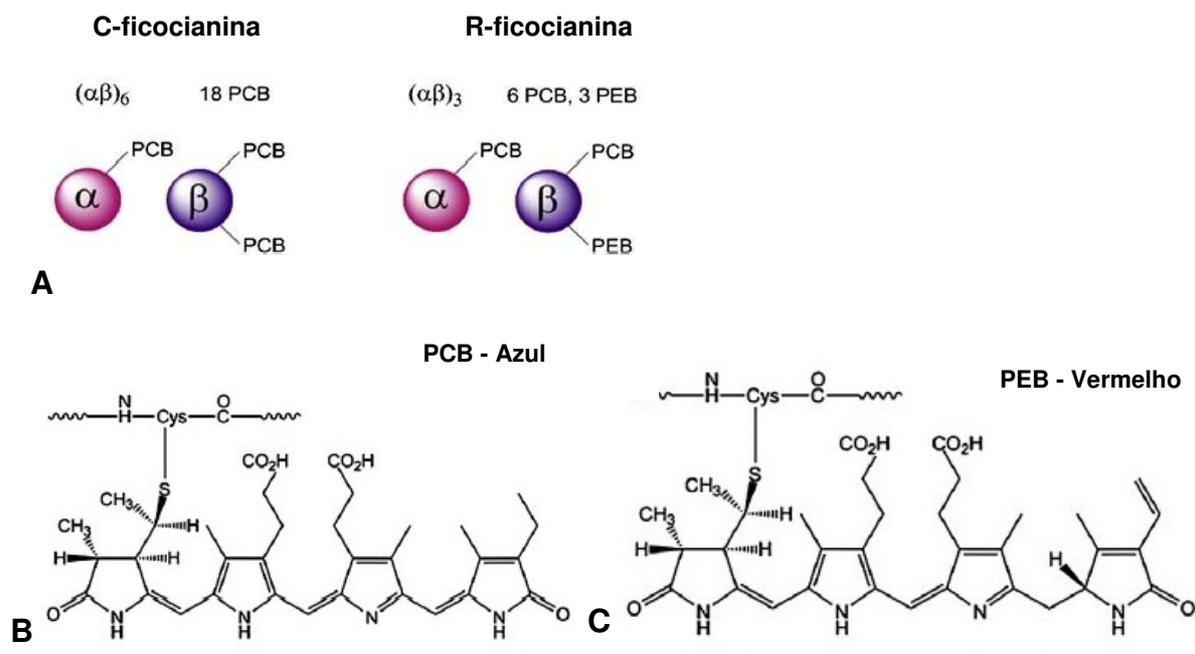
Em alimentos, a utilização de pigmentos naturais tem se elevado devido à preocupação dos consumidores com os efeitos prejudiciais à saúde apresentados pelos pigmentos sintéticos ou corantes. Portanto, o interesse e a busca por fontes de

pigmentos naturais têm aumentado significativamente e a presença deles tem sido motivo de *marketing* para muitos produtos (DUFOSSÉ, 2006). De acordo com Castilho (2010), a coloração dos alimentos é determinada pela presença de substâncias que além de colorir, trazem efeitos benéficos à saúde humana atuando na proteção do organismo e na prevenção de doenças, devido ao potencial antioxidante destas moléculas. Já é conhecido que a maioria dos pigmentos, extraídos de algas, são estáveis à baixa temperatura, em condições ácidas ou básicas, e também, na presença de alguns conservantes, possibilitando assim a sua aplicabilidade na indústria de alimentos como corantes (PATEL *et al.*, 2004; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013).

1.3.3.1 Ficocianinas

As ficocianinas destacam-se pelo seu uso como biocorantes de alimentos e, em menores quantidades, como traçadores de imunoensaios devido as suas propriedades fluorescentes. Também podem ser utilizadas como agentes antitumorais (REDDY *et al.*, 2003), anti-inflamatórios e anti-oxidantes (BHAT & MADYASTHA, 2001; ESTRADA *et al.*, 2001), em cosméticos, ensaios diagnósticos e na medicina, como potenciais fontes de nutracêuticos e fármacos (ERIKSEN, 2008-b; SETYANINGSIH; BINTANG; MADINA, 2015). Ficocianinas podem ser encontradas em cianobactérias, rodófitas e criptófitas, porém, dentre os organismos produtores destes pigmentos, destaca-se a *Spirulina platensis*, uma cianobactéria capaz de produzir quantidades elevadas de ficocianina (CHEN & ZHANG, 1996). Esse pigmento de coloração azul é uma ficobiliproteína composta de duas subunidades de monômeros α e β as quais contém pelo menos três ligações covalentes com cromóforos bilinas, numa cadeia aberta tetrapirrólica (DUMAY *et al.*, 2014). Dois tipos de ficocianinas são relatados na literatura: C-ficocianina e R-ficocianina, encontradas em rodófitas, cianobactérias e criptófitas. Ambas as subunidades do pigmento Ficocianina, α e β , são ligadas ao cromóforo ficocianobilina (PCB), entretanto, a R-ficocianina apresenta também o cromóforo ficoeritrobilina (PEB) ligado à subunidade β (Figura 5), o qual confere ao pigmento seu espectro de absorção específico com pico alto de absorção na região de 610 nm e outro pico mais baixo na região de 550 nm (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; DUMAY *et al.*, 2014;)

Figura 5 – **A**: Modelo representativo da associação das subunidades e cromóforos da C-ficocianina e R-ficocianina; **B**: Estrutura química do cromóforo ficocianobilina; **C**: Estrutura química do cromóforo ficocianoeritrobilina.



Fonte: Adaptado de: DUMAY *et al.*, 2014.

Fluorescente e com absorvidade extremamente alta, as ficocianinas possuem bandas de emissão e excitação em comprimentos de onda dentro da faixa do visível: absorção máxima a 620 nm e emissão máxima a 652 nm, é um pigmento proteico bastante estável em temperaturas entre 4 e 10 °C, com ponto isoelétrico (PI) próximo a 4,65 e que pode ser facilmente ligada a anticorpos e outras proteínas por técnicas bastante convencionais sem alterar suas características de espectro, além de possuir alto coeficiente de absorbância molar e emissão, estabilidade oligomérica, e alta foto-estabilidade (SILVA, 2008; PROZYME, 2016-a).

1.3.3.2 Ficoeritrinas

As ficoeritrinas são as principais responsáveis pela capacidade das algas vermelhas crescerem abundantemente em águas profundas, pois possuem um eficiente espectro de absorção de luz de 450 nm a 570 nm e, diante disso, as algas marinhas vermelhas são frequentemente encontradas em zonas mais baixas da região intermaré da costa do que as verdes e as pardas (SUN *et al.*, 2009).

Atualmente as ficoeritrinas podem ser divididas em cinco grupos, de acordo com seus espectros de absorção de luz e também de acordo com a sua ocorrência em diferentes espécies de algas: A β -ficoeritrina (β -FE) mostra uma absorção máxima na faixa de 546 a 565 nm com um ressalto em 499 nm e é comumente encontrada em microalgas vermelhas; a R-ficoeritrina (R-FE) com picos de absorção máxima a 568, 545 e 499 nm, encontrada em rodófitas; a C-ficoeritrina (C-FE) define-se por uma absorção máxima a 565 nm, a b-ficoeritrina (b-FE), com picos de absorção máxima em 545 nm, e um ombro a 565 nm e a CU-ficoeritrina (CU-FE) com absorção máxima em 498, 540 e/ou 565 nm (BOGORAD, 1975; GLAZER *et al.*, 1976; BRYANT, 1982; SIDLER, 1994). A C-ficoeritrina e a b-ficoeritrina podem ser encontradas em cianobactérias (D'AGNOLO *et al.*, 1993, BERMEJO; TALAVERA; ALVAREZ, 2001; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As R-FE e β -FE consistem comumente em três subunidades: α , β e γ , e suas estruturas são geralmente descritas como agregados hexaméricos como, por exemplo, $(\alpha\beta)_6\gamma$ ou $(\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3$, como mostrado na figura 6A. Na alga marinha vermelha *Aglaothamnion neglectum* existem duas diferentes subunidades γ possuindo massa molecular aparente de 31 kDa e 33 kDa denominadas, respectivamente, de γ e γ' (GROSSMAN, 1993). A alga *Rhodella violacea* apresenta também duas diferentes subunidades γ com massas moleculares aparente de 30 kDa e 32 kDa (BERNARD *et al.*, 1996).

As R-FEs são proteínas oligoméricas que possuem dois tipos de cromóforos denominados ficoeritrobilina (PEB) e ficourobilina (PUB), como já demonstrado na figura 7B, ligados por pontes de sulfeto as suas subunidades proteicas (SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011). Tanto a ficoeritrobilina quanto a ficourobilina conferem um grande espectro de absorção, podendo apresentar diversas interações com a estrutura polipeptídica (GLAZER, 1994). Cada subunidade α possui duas ficoeritrobilinas, enquanto a subunidade β possui duas ficoeritrobilinas e uma ficourobilina (SEPULVEDA-UGARTE *et al.* 2011).

1.3.3.2.1 R-ficoeritrinas

R-ficoeritrinas (R-FEs) são as ficobiliproteínas mais encontradas na maioria das macroalgas vermelhas. Este tipo de pigmento está presente na espécie *Palmaria palmata*, na qual as proteínas representam mais de 35% do peso seco da alga (MORGAN *et al.*, 1980; FLEURENCE, 1999). Esta alga é comumente usada na Europa como 'vegetal do mar' e como ingrediente na indústria alimentícia (INDERGAARD & MINSAS, 1991).

As R-FEs são constituídas pelas subunidades α , β e γ , que possuem em torno de 20, 21 e 30 kDa, respectivamente, e formam complexos hexaméricos $(\alpha\beta)_6\gamma$, de 240 a 260 kDa, onde dois trímeros $(\alpha\beta)_3$ estão dispostos na forma de disco, ligados pela subunidade γ , que está localizado no centro da cavidade formada por esses trímeros, conferindo mais estabilidade (CHANG *et al.*, 1996; WANG; ZHOU; ZENG, 1998; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; FLEURENCE, 2003; ROSSANO *et al.*, 2003; KAWSAR *et al.*, 2011). Elas possuem duas bilinas em sua estrutura, ficoeritrobilinas (PEB) e ficourobilinas (PUB), onde a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) da PUB para a PEB resulta em um pico de emissão máxima de fluorescência a 575 nm (JIANG *et al.*, 1999), o qual pode exibir uma intensidade vinte vezes maior que outros pigmentos, como a fluoresceína (FLEURENCE, 2004). Sendo assim as R-FEs também podem ser exploradas como marcadores fluorescentes, que são úteis em citometria de fluxo, imunoenaios fluorescentes, imunofenotipagem e outros estudos fluorescentes (ISAILOVIC *et al.*, 2006; SEKAR & CHANDRAMOHAN, 2008).

Diversos estudos mostram as aplicações biotecnológicas de R-FEs, muitas delas relacionadas às características espectroscópicas. As aplicações estendem-se desde a indústria farmacêutica até a alimentícia. Na indústria de alimentos e cosméticos, as R-FEs podem ser utilizadas como corantes devido a algumas propriedades, dentre elas, pode-se destacar o fato de serem estáveis a baixas temperaturas e também a temperaturas acima de 60 °C, em condições ácidas e básicas e, também, na presença de conservantes como o ácido cítrico (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013). Além disso, destaca-se o uso dessas moléculas como substâncias antioxidantes. Esse papel foi estudado inicialmente a partir de algas marinhas exploradas no Japão, na busca de aditivos para alimentos que substituísse os sintéticos (ROCHA *et al.*, 2007).

As R-FEs também podem ser utilizadas, por exemplo, na terapia fotodinâmica devido a presença de cromóforos (2 PUB e 1 PEB) que, além de apresentarem um melhor efeito na terapia, apresentam baixa toxicidade quando comparados com produtos comumente usados nessa técnica, sendo assim, esses pigmentos são considerados uma boa alternativa como agente fotossensibilizante (PAN *et al.*, 2013). Também já foi reportado atividades antidiabéticas (FITZGERALD *et al.*, 2011), imunodepressoras e anti-hipertensivas (CIAN *et al.*, 2012). Pan *et al.* (2013) verificou que a R-FE de *Porphyra haitanensis* aliada a terapia fotodinâmica era, também, bastante eficiente no processo de apoptose celular. Outra aplicação interessante está diretamente ligada com a ação dos grupos cromóforos desse pigmento, os quais conferem cor rósea intensa, o que sugere a aplicação deste pigmento como marcadores eletroforéticos e de cromatografias de exclusão molecular (ARAOZ *et al.*, 1998).

1.4 Métodos de extração e purificação de R-ficoeritrinas

De acordo com a literatura, as técnicas de extração de R-FEs são baseadas na tentativa de sensibilizar a parede celular para aumentar a liberação dos pigmentos para o meio. As técnicas mais utilizadas são de maceração por nitrogênio líquido e/ou moinhos (MUNIER *et al.*, 2014; SUDHAKAR *et al.*, 2015); extrações assistidas por ultrassom (SUN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015; LE GUILLARD *et al.*, 2015); extrações enzimáticas (DUMAY *et al.*, 2013); e, mais recentemente, as junções dessas técnicas com a finalidade de otimizar o rendimento do processo de extração, utilizando ultrassom e enzimas (LE GUILLARD *et al.*, 2015). Entretanto a presença de vários polissacarídeos, em grandes quantidades, nas paredes celulares das rodófitas dificulta a eficiência das extrações, principalmente as que são menos invasivas, como por exemplo, maceração por nitrogênio líquido (DUMAY *et al.*, 2014).

Apesar da grande variedade de procedimentos de extração de R-FE, comumente esses pigmentos são extraídos em tampão fosfato (5-50 mM, pH 7) a partir de diferentes estados da matéria-prima utilizada, podendo ser alga fresca (SUN *et al.*, 2009; DENIS *et al.*, 2009; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013; NIU *et al.*, 2013; SUDHAKAR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; LE GUILLARD *et al.*, 2015), alga congelada (WANG, 2002; LIU *et al.*, 2005; NIU; WANG; TSENG, 2006) e alga liofilizada (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; ROSSANO *et al.*, 2003; DENIS *et al.*, 2009; MUNIER *et al.*, 2014).

Dentre os métodos de separação e purificação de pigmentos tradicionais, os mais citados são processos que envolvem a combinação de precipitação por sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] e procedimentos cromatográficos de troca-iônica, exclusão molecular, interação hidrofóbica, interação hidrofóbica com leito-expandido, hidroxiapatita e eletroforese (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; WANG, 2002; NIU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015). Infelizmente, a maioria dos procedimentos cromatográficos faz uso de um gradiente de força iônica elevado. Algumas cromatografias necessitam ser repetidas em sequência por diversas vezes ou serem combinadas com outros métodos de separação, dada a certa dificuldade em conseguir uma maior recuperação de ficoeritrinas com alto coeficiente de purificação, em virtude de concentrações elevadas de polissacarídeos nas paredes (FICNER *et al.*, 1993; MacCOLL & EISELE, 1996; ZHANG & CHEN, 1999; ZHANG *et al.*, 2002).

Apesar da grande variação dentre os índices de pureza e de baixos rendimentos, alguns relatos apontam sucesso na extração e purificação de R-FE a partir de macroalgas. Li Sun *et al.* (2009) comprovaram a viabilidade da purificação e caracterização de R-FE extraída a partir da macroalga marinha *Heterosiphonia japonica*. Sarkar *et al.* (2011) também obtiveram a R-FE da espécie de alga *Amphiroa anceps* e, em outros estudos, Costa (2013) purificou parcialmente de R-FE da macroalga marinha *Hypnea musciformis*. Dumay *et al.* (2013) otimizaram o protocolo de extração de R-FE a partir de modificações na hidrólise da macroalga vermelha *Palmaria palmata*. Lu-Ning *et al.* (2005) realizaram a purificação da R-FE da macroalga *Polysiphonia urceolata* utilizando somente um passo de cromatografia de troca iônica. Sudhakar *et al.* (2015) purificaram a R-FE da macroalga *Gracilaria crassa* utilizando diferentes solventes como estabilizantes para posterior aplicação em alimentos. A Tabela 3 mostra alguns protocolos de purificação da R-FE a partir de um grama do peso seco da alga e seu índice de pureza (IP).

Tabela 3 – Protocolos utilizados para purificação de R-FE

Protocolo	Espécie	Rendimento (mg/g)	IP	Referências
CIH + CTI	<i>P. palmata</i>	0,152	3,60	WANG <i>et al.</i> , 2002
CIH + Hidroxiapatita	<i>P. urceolata</i>	0,425	3,90	NIU <i>et al.</i> , 2006
2 CEM + CTI	<i>H. japonica</i>	0,940	4,89	SUN <i>et al.</i> , 2009
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Hidroxiapatita	<i>P. yezoensis</i>	0,540	3,20	CHUNER <i>et al.</i> , 2012
CIH + CTI	<i>P. urceolata</i>	0,500	3,26	NIU <i>et al.</i> , 2006
(NH ₄) ₂ SO ₄ + CTI	<i>P. hornemannii</i>	0,810	5,20	SENYHILKUMAR <i>et al.</i> , 2013

Fonte: Adaptado de DUMAY *et al.*, 2014. **Legenda:** CIH (Cromatografia de Interação Hidrofóbica); CTI (Cromatografia de Troca Iônica); CEM (Cromatografia de Exclusão Molecular); (NH₄)₂SO₄ (Precipitação por Sulfato de Amônio).

Além da necessidade da indústria por pigmentos naturais, torna-se necessário conhecer mais sobre a purificação de pigmentos naturais a partir de macroalgas devido ao limitado número de estudos relatados na literatura, principalmente quando relacionados às macroalgas marinhas do litoral brasileiro, as quais são abundantes e apresentam possibilidades de cultivo no mar, com a finalidade de se obter elevadas taxas de crescimento e contrir para a preservação da

biodiversidade da vida marinha (BRAVIN; YONESHIGUE-VALENTIN; YOCIE, 2002). Ademais, torna-se necessário o estudo aprofundado sobre a caracterização desses pigmentos e a avaliação do seu potencial biotecnológico.

Diante do exposto, a macroalga marinha vermelha *H. musciformis* torna-se um potente alvo do presente estudo, tanto pela importância econômica de obtenção de seus produtos, quanto por sua grande viabilidade na costa litoral cearense em cultivos já estabelecidos. Além disso, pouco se tem conhecimento sobre os pigmentos dessa espécie de alga, visto que Costa (2013) relata somente a purificação parcial de R-FE da referida alga.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo extrair e purificar os pigmentos – fluorescentes ficobiliproteínas (R-ficocianina e R-ficoeritrina) da macroalga marinha vermelha *H. musciformis* e caracterizar as propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina.

2.2 Específicos

- Extrair as ficobiliproteínas presentes na macroalga marinha *H. musciformis*;
- Purificar parcialmente a R-Ficocianina de *H. musciformis*;
- Purificar a R-Ficoeritrina de *H. musciformis* (R-FEHm);
- Avaliar os espectros de absorção das ficobiliproteínas presentes no extrato total e frações proteicas da macroalga *H. musciformis*;
- Determinar a massa molecular aparente da R-FEHm;
- Analisar a estrutura secundária da R-FEHm;
- Analisar o efeito da temperatura sobre as propriedades espectroscópicas da R-FEHm;
- Avaliar o efeito da temperatura sobre a estrutura secundária da R-FEHm e calcular sua temperatura de *melting*;
- Avaliar as condições ideais de armazenamento da R-FEHm;

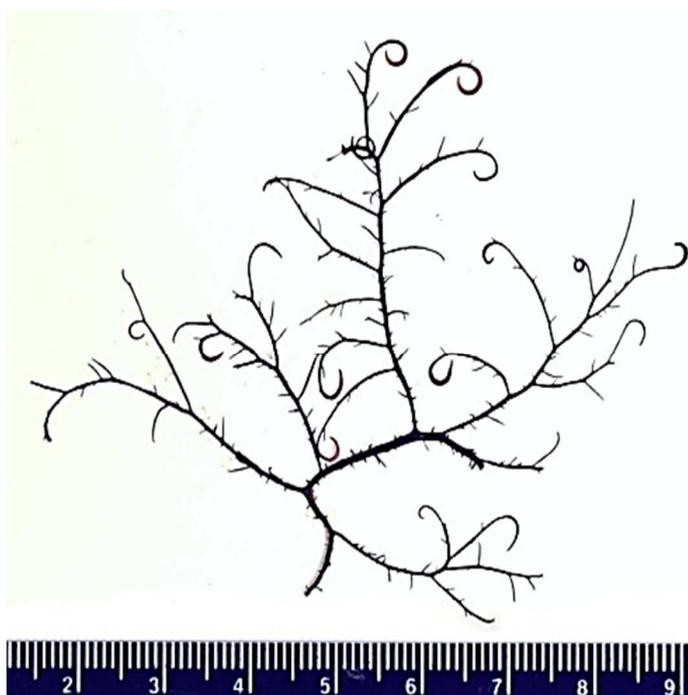
3 MATERIAIS

3.1 Macroalga vermelha *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta).

A alga fresca *Hypnea musciformis* (Figura 7), uma espécie epífita, foi coletada em estruturas de cultivo de *Solieria filiformis* mantidas pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) na praia de Flecheiras (03°13'06" S – 39°16'47" W) a 200 m da costa município de Trairi, litoral Oeste do Estado do Ceará, Brasil. Em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP) onde foram lavadas com água corrente e água destilada para a retirada de incrustantes, sal e grãos de areia, congeladas e mantidas a -10 °C, até a utilização.

Figura 7 – Macroalga Vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta).

Classificação



Reino:	<u>Plantae</u>
Filo:	<u>Rhodophyta</u>
Subfilo:	<u>Eurhodophytina</u>
Classe:	<u>Florideophyceae</u>
Subclasse:	<u>Rhodymeniophycidae</u>
Ordem:	<u>Gigartinales</u>
Família:	<u>Cystocloniaceae</u>
Gênero:	<u>Hypnea</u>

Fonte: Adaptada de Aumack, 2009.

3.2 Reagentes e outros materiais

Fosfato de sódio monobásico, dibásico e sulfato de amônio foram obtidos da empresa Vetec; Matriz cromatográfica DEAE-Sephacel (celulose - Dietilaminoetil), matriz cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl[®] S-300 HR da empresa GE Healthcare, Dodecil sulfato de sódio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) e Coomassie Brilliant Blue G-250 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

4 MÉTODOS

4.1 Extração dos pigmentos da macroalga vermelha *H. musciformis*

A macroalga foi triturada em moinho elétrico na presença de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,5 (10°C) na proporção de 1:3 (m/v) e mantida sob agitação constante em agitador mecânico por 6 horas à temperatura ambiente (20°C) no escuro. Posteriormente, o homogenato foi filtrado em tecido de trama fina e a fase líquida foi centrifugada a 10.000 x g, 4°C por 30 minutos. O sobrenadante, denominado extrato bruto pigmentado de *H. musciformis* (EB-Hm) foi utilizado para quantificação de proteínas e determinação da produtividade do processo de extração de R-FE (P), segundo a Equação 1:

$$P = \frac{R-FE_{total}}{t} \quad \text{Eq (1)}$$

Onde: R-FE_{total} = teor de R-FE total;

t= tempo de extração.

O EB-Hm foi utilizado ainda para posterior fracionamento proteico com sulfato de amônio nas faixas de 0-30% e 30-45% de saturação.

4.2 Fracionamento proteico com sulfato de amônio

O EB-Hm foi submetido a fracionamento proteico com sulfato de amônio nas faixas de 0-30 e 30-45% de saturação, seguindo Green & Hughens (1955). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 10.000 x g, 4 °C por 30 minutos e os precipitados foram solubilizados em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,5. Em seguida, as frações F0/30 e F30/45, respectivamente, foram dialisadas (*cut-off* 12 kDa) exaustivamente à temperatura ambiente utilizando água destilada seguido de tampão de extração.

4.3 Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel

As frações F0/30 e F30/45 foram submetidas à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel previamente equilibrada com tampão de extração. Após a eluição completa da fração não retida na matriz, foi realizado um *stepwise* com o tampão de equilíbrio contendo NaCl nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 M, para a eluição das frações proteicas adsorvidas na matriz. O fluxo cromatográfico foi mantido constante (1,4 mL/min) e eluatos de 3 mL/tubo foram coletados, os quais foram avaliados quanto às absorvâncias a 280 nm para detecção de proteínas, a 564 nm para detecção de R-FE e a 618 nm para detecção de ficocianina (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro). As frações eluídas que apresentaram maior pigmentação foram reunidas e denominadas Picos Cromatográficos. Em seguida foram submetidas à diálise (*cut-off* 12 kDa) exaustiva utilizando água destilada e tampão de extração para remoção do sal. Posteriormente, foram armazenados a 4 °C em frascos protegidos da luz.

4.4 Cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300

O pico mais pigmentado, proveniente da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel foi submetido ao processo de cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300, previamente equilibrada com tampão de extração. A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 1 mL/minuto, com frações de 2 mL/tubo, as quais foram avaliadas quanto às absorvâncias a 280 nm e a 564 nm (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

4.5 Quantificações de proteínas e pigmentos das etapas de extração e purificação

4.5.1 Rendimento de proteínas

A determinação de proteínas solúveis do EB-Hm, frações F0/30 e F30/45 e picos cromatográficos, foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976) e utilizando um espectrofotômetro Biochrom Libra S12 UV/Vis. As concentrações proteicas foram estimadas através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). As determinações dos teores de proteína recuperada, a cada passo de purificação foram realizadas em triplicata.

4.5.2 Rendimento e índice de pureza da R-FE de *H. musciformis*

O rendimento do pigmento R-FE em cada etapa de purificação foi calculado com base na concentração de pigmento obtido/g de alga fresca. As concentrações de pigmentos foram determinadas em todas as etapas de purificação segundo a Equação 2 proposta por Sampath-Wiley e Neefus (2007):

$$R - FE = 0,1247((A_{564} - A_{730}) - 0,4583(A_{618} - A_{730})) \quad \text{Eq (2)}$$

Onde:

R-FE = concentração de R-FE (mg/mL);

A_{564} = absorvância a 564 nm.

A_{730} = absorvância a 730 nm

A_{618} = absorvância a 618 nm

Já o índice de pureza (IP) do pigmento foi determinado segundo a Equação 3 proposta por MUNIER *et al.* (2014):

$$IP = \frac{A_{564}}{A_{280}} \quad \text{Eq (3)}$$

Onde:

IP = Índice de pureza

A_{564} = absorvância a 564 nm

A_{280} = absorvância a 280 nm

4.5.3 Determinação da concentração de ficocianina

As concentrações de ficocianina foram determinadas em todas as etapas de purificação, conforme a Equação 4 (ABALDE *et al.*, 1998):

$$C_F = \frac{[A_{615} - 0,474 \times A_{652}]}{5,34} \quad \text{Eq (4)}$$

Onde:

C_F = concentração de Ficocianina (mg/mL);

A_{615} = absorvância a 615 nm.

A_{652} = absorvância a 652 nm

Já o índice de pureza da Ficocianina foi calculado segundo a Equação 5, proposta por ABALDE *et al.*, (1998):

$$IP = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad \text{Eq (5)}$$

Onde:

IP = Índice de pureza

A_{620} = absorvância a 620 nm

A_{280} = absorvância a 280 nm

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Eletroforeses unidimensionais na presença e ausência de agente redutor e foram utilizadas nesse estudo para avaliar a pureza e determinação da massa aparente da R-FE, segundo Laemmli (1970). As eletroforeses foram conduzidas em placas paralelas de 10,0 x 8,0 cm contendo gel de concentração de poliacrilamida 3,5%, SDS 1,0%, em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, seguido por géis de separação a 8 e 12,5% de acrilamida e 1% de SDS, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. As alíquotas encerrando 25 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contendo 4,0% de SDS, 20% de glicerol, 0,02% de Azul de Bromofenol), 3:1 v/v, com e sem agente redutor (β-mercaptoetanol 5%). Em seguida, as amostras que continham o agente redutor foram aquecidas a 100 °C, por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, por 5 minutos a temperatura ambiente. Um sistema vertical foi utilizado para corrida eletroforética ajustando-se os parâmetros de voltagem e amperagem para 200 V e 20 mA, respectivamente

Proteínas com massas moleculares conhecidas foram utilizadas como padrão: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e a α-lactalbumina (14,2 kDa). Os géis foram corados por um período de 2 horas com Comassie Brilliant Blue R-250 0,25% dissolvido em uma solução de etanol, ácido acético e água (5,7:14,2:1). Uma solução contendo ácido acético e água (14:1) foi utilizada para descoramento do gel.

4.7 Espectros de absorção e fluorescência

Os espectros de absorbância e fluorescência do EB-Hm, frações F0/30 e F30/45 e picos cromatográficos de *H. musciformis* foram determinados por meio do espectrofotômetro de multi-deteção Synergy Mx (BioTek, EUA). O espectro de absorbância foi determinado a $25 \pm 0,5$ °C na faixa de 280 a 730 nm com intervalos de 1 nm. O espectro de emissão de fluorescência da R-FE foi determinado a $25 \pm 0,5$ °C, onde a R-FE foi excitada no comprimento de onda a 495 nm e seu espectro de emissão foi medido na faixa de 500 a 700 nm com intervalos de 5 nm.

4.8 Espectro de dicroísmo circular da R-ficoeritrina de *H. musciformis*

O espectro de dicroísmo circular da R-FE foi obtido em espectropolarímetro JASCO J-815 na faixa de comprimento de onda de 190 a 260 nm, com largura de banda de 1 nm, sendo utilizada uma cubeta de quartzo cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico. A R-FE dissolvida em tampão de amostra na concentração de 64 µg de proteína/mL foi analisada através de 3 scans sucessivos, com velocidade de varredura de 100 nm/min e tempo de resposta de 4 segundos. O espectro de CD foi obtido pela média das 3 varreduras. No intuito de quantificar os elementos de estrutura secundária do pigmento foi utilizado o software K2D3 (LOUIS-JEUNE, 2012).

4.9 Estabilidade térmica das propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de *H. musciformis*

Tubos de ensaio contendo 4 mL da solução de R-FE, 31 µg/mL, foram incubados nas temperaturas de 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C, em banho maria, por uma hora. Em seguida, os espectros de absorbância e fluorescência foram determinados como descrito no item 4.7.

4.10 Estabilidade térmica das propriedades estruturais da R-ficoeritrina de *H. musciformis*

A estabilidade térmica das estruturas secundárias da R-FE foi avaliada utilizando-se espectroscopia de dicroísmo circular, CD, frente a diferentes temperaturas. Uma amostra de R-FE liofilizada (64 µg de proteína/mL) foi solubilizada em tampão de extração, pH 6,5 e analisada quanto ao seu espectro de dicroísmo circular (185 a 280 nm) em uma rampa de temperatura que variou de 25 a 100 °C, com uma taxa de 1°C/min. A análise foi feita em triplicata e o monitoramento da termoestabilidade e determinação da temperatura de *melting* da R-FE foi realizado através do sinal do CD a 222 nm.

4.11 Estabilidade das propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de *H. musciformis* no armazenamento

Alíquotas de 2 mL da R-FE, 41 µg/mL, foram submetidas a três diferentes temperaturas de armazenamento (-20, 4 e 25 °C) por um período de 20 dias. A cada cinco dias, três amostras foram centrifugadas e analisadas quanto ao seu espectro de absorção e fluorescência, seguindo a metodologia já descrita no item 4.7. Os resultados foram expressos como média ± D.P. (Desvio Padrão) para perdas de concentração de R-FE, de fluorescência e absorbância. Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado o método de análise de variância (*one-way ANOVA* e *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).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração dos pigmentos da macroalga vermelha *H. musciformis*

O extrato bruto de *Hypnea musciformis* (EB-Hm) apresentou coloração rósea e 0,06 mg/mL de proteínas, 0,02 mg/mL de R-FEs e 3,55 µg/mL de ficocianinas, apresentando rendimentos de 162,64, 54,38 e 9,83 µg/g de alga fresca, respectivamente. Já as produtividades do processo de extração foram 24,66 mg/h de proteína, 8,25 mg/h de R-FE e 1,49 mg/h de ficocianina.

De acordo com a literatura, as técnicas de extração de R-FEs incluem: maceração da macroalga em presença de nitrogênio líquido e/ou utilização de moinhos para posterior contato com soluções aquosas (MUNIER *et al.*, 2014; SUDHAKAR *et al.*, 2015); extrações assistidas por ultrassom (SUN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015; LE GUILLARD *et al.*, 2015); extrações enzimáticas (DUMAY *et al.*, 2013); e, mais recentemente, as junções dessas técnicas com a finalidade de otimizar o processo aumentando o rendimento de extração. (LE GUILLARD *et al.*, 2015). O uso de solventes, tais como água destilada, água do mar ou tampões em processos de extrações de pigmentos também é relatado, principalmente quando se visa uma aplicação comercial destas ficobiliproteínas (FLEURENCE, 2003; COSTA, 2013; SUDHAKAR *et al.*, 2015). Porém, é sabido que o acréscimo de operações unitárias no fluxograma de extração desses pigmentos de macroalgas pode onerar o processo (DUMAY *et al.*, 2014).

Dentre os solventes utilizados por Sudhakar *et al.* (2015), o tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8 mostrou ser o mais eficiente para extrair ficobiliproteínas a partir da macroalga marinha vermelha *Gracilaria crassa*, onde foi obtido rendimento de 0,37 e 0,25 mg/g de alga fresca de R-FE e ficocianina, respectivamente. Denis *et al.* (2009) alcançaram para a macroalga vermelha *Grateloupia turuturu* um rendimento de R-FE de 10,7 µg/g de alga seca, resultado considerado semelhante ao obtido por Bastos-Filho (2016) para a alga vermelha *S. filiformis* que apresentou um rendimento de 13,6 µg/g de alga seca de R-FE. Ambos os autores utilizaram tampão fosfato como solvente de extração e os resultados mostram-se inferiores ao obtido neste estudo, no qual foi obtido um rendimento de 0,54 mg/g de alga seca de R-FE.

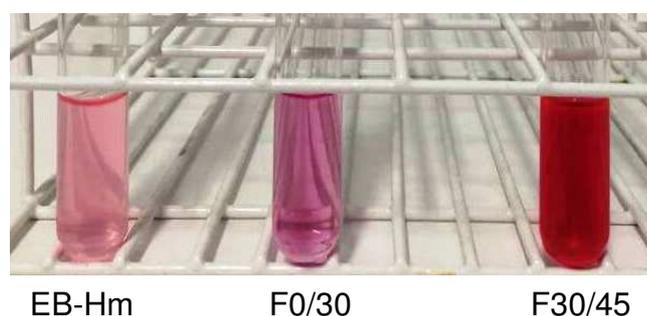
A escassez de dados e trabalhos que relatem a extração de pigmentos a partir de macroalgas dificulta a comparação de resultados, sugerindo que a diferença nos rendimentos observados se deve a diferentes fatores, entre eles, o fato das espécies

de algas divergirem em suas composições bioquímicas. Apesar disso, os resultados mostrados neste trabalho demonstram a viabilidade do processo de extração de ficobiliproteínas, usando também as mesmas condições de extração em tampão fosfato de potássio.

5.2 Fracionamento dos pigmentos extraídos de *H. musciformis*

O fracionamento das proteínas presentes no EB-Hm por sulfato de amônio nas faixas de 0-30% e 30-45% de saturação resultou em frações com colorações diferentes (Figura 8), sendo a F0/30 violeta com concentrações de proteínas de 0,18 mg/mL, R-FE de 0,12 mg/mL e ficocianina de 0,035 mg/mL, e a F30/45 com coloração avermelhada intensa e concentrações de proteínas de 0,97 mg/mL e R-FE de 0,66 mg/mL. Os índices de pureza da R-FE presente nas referidas frações aumentaram 1,65 vezes em F0/30 (0,26) e 8 vezes em F30/45 (1,29) quando comparados aos obtidos no EB-Hm. Quanto à ficocianina, esse aumento foi de 3,5 vezes em F0/30 (0,7).

Figura 8 – Colorações do EB-Hm e das F0/30 e F30/45 contendo os pigmentos da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*



Fonte: Elaborado pela autora

Uma vez que a solubilidade das proteínas varia de acordo com a força iônica na solução, a precipitação proteica por sulfato de amônio com diferentes porcentagens de saturação é comumente empregada como uma etapa de purificação de ficobiliproteínas (BERMEJO; TALAVERA; ALAVAREZ, 2001; LIU *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2009). Em diferentes concentrações, o sal causa a precipitação seletiva de proteínas, enquanto outras permanecem em solução (NELSON & COX, 2011). Somente com essa técnica, os índices de pureza das R-FEs das macroalgas *Portieria hornemannii* (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013) e *Heterosiphonia japônica* (SUN *et al.*, 2009) alcançaram valores comerciais de 3,5 e 4,5, respectivamente.

Com relação ao pigmento ficocianina, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura científica versa sobre a extração e purificação deste pigmento azul a partir de microalgas, principalmente da cianobactéria *Spirulina platensis*. Patel *et al.* (2005) e Moraes (2006), por meio de técnicas de precipitação por sulfato de amônio, extraíram e purificaram ficocianinas com índices de pureza de 0,82 e 0,88, respectivamente. Dos poucos relatos científicos sobre extrações de ficocianinas oriundas de macroalgas, pode-se citar Francavilha *et al.* (2015) que realizaram a extração de ficobiliproteínas com tampão acetato de potássio durante 30 minutos no escuro a partir da macroalga marinha vermelha *Gracilaria gracilis*, obtendo 2 mg/g de alga seca de ficocianina, rendimento superior ao obtido nesse trabalho (0,09 mg/g).

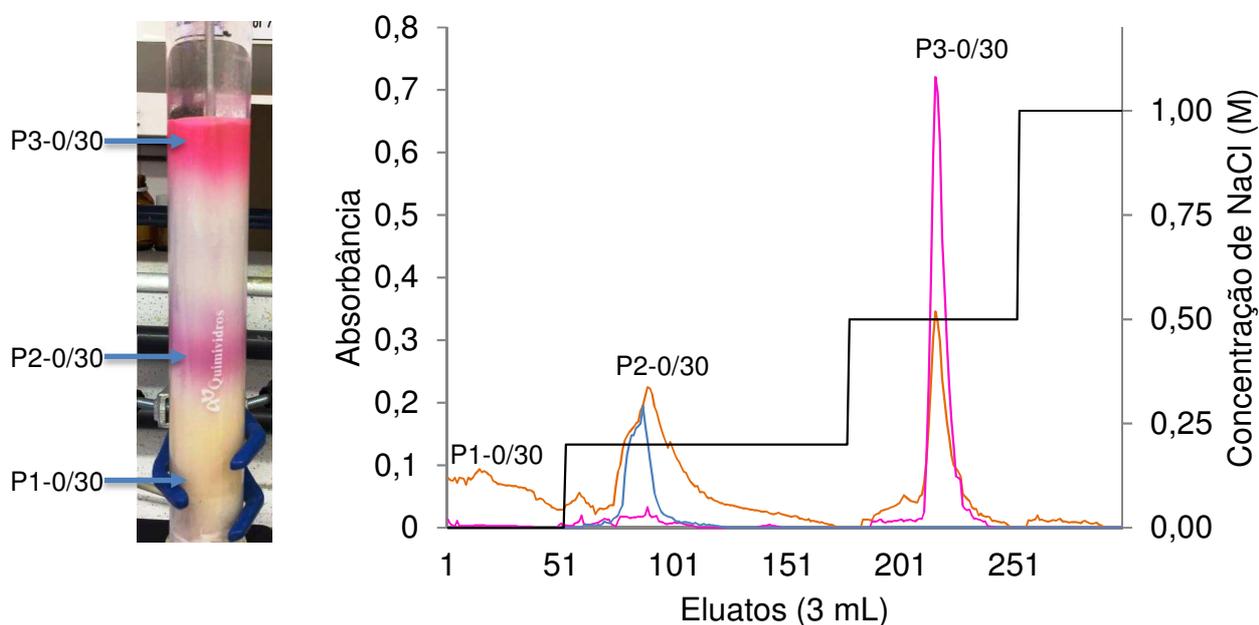
Vale ressaltar que as condições de cultivo e crescimento da alga implicam diretamente no teor e na composição química dos pigmentos, pois a alta intensidade da luz inibe a síntese de pigmentos azul e vermelho. A diminuição da concentração de pigmentos geralmente ocorre por volta do meio-dia em dias claros. A luz ultravioleta pode inativar o fotossistema II, quebrar o transporte de elétrons e causar danos aos pigmentos e membranas, sendo as ficocianinas mais sensíveis a tais mudanças (WETZEL, 2001; TUNDISI E TUNDISI, 2008), dificultando assim a comparação de concentrações de ficocianinas entre espécies que crescem em climas temperados e tropicais (*H. musciformis*).

5.3 Purificação dos pigmentos de *H. musciformis*

5.3.1 Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da F0/30.

A F0/30, de coloração violeta, foi submetida à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel e o perfil cromatográfico mostrou três picos proteicos evidenciados pela absorvância a 280 nm, sendo o primeiro não retido (P1-0/30), eluído com tampão de equilíbrio e os demais (P2-0/30 e P3-03/0) eluídos com tampão de extração contendo NaCl nas concentrações 0,2 e 0,5 M, respectivamente (Gráfico 1). Porém, apenas os picos P2-0/30 e P3-0/30 apresentaram colorações azul e vermelha para as leituras de absorção em 620 e 564 nm, respectivamente.

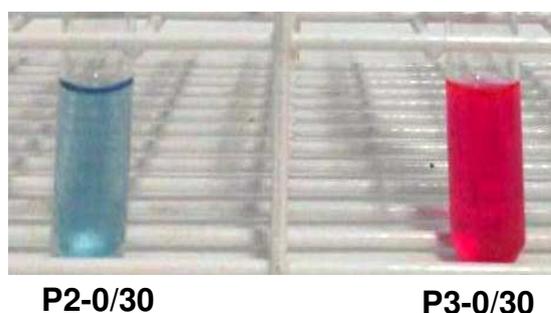
Gráfico 1 – Aspecto visual da coluna e cromatograma de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da F0/30 de *H. musciformis*.



Legenda: Proteínas da F0/30 (20 mg) foram aplicadas na cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel; Fluxo: 1,4 mL/min; (—) Absorvância a 280 nm; (—) Absorvância a 620 nm; (—) Absorvância a 564 nm; (—) Concentração de NaCl. **Fonte:** Elaborado pela autora.

O P2-0/30, com coloração azul apresentou 0,063 mg/mL de ficocianina com índice de pureza de 0,43, representando um aumento de mais de seis vezes quando comparado ao índice de pureza obtido para a F0/30. O P2-0/30 apresentou ainda 0,09 mg/mL de proteínas e contaminação por R-FE correspondente a 0,005 mg/mL. Com relação ao P3-0/30 mostrou coloração rosa e concentração de proteínas de 0,14 mg/mL, R-FE de 0,15 mg/mL com índice de pureza 1,61 e contaminação por ficocianina correspondente a 0,012 mg/mL (Figura 9).

Figura 9 – Aspectos visuais dos picos cromatográficos da F0/30 de *H.musciformis* em matriz de DEAE-Sephacel.



Fonte: Elaborado pela autora

Liu *et al.* (2015) conseguiram purificar uma R-FC com índice de pureza maior que 7,0 da macroalga vermelha *Porphyra haitanensis* a partir do uso de técnicas sequenciais de precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200) e cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose). A comparação desses resultados com os obtidos neste trabalho é dificultada devido às diferenças nas composições bioquímicas das macroalgas promovidas por diferentes condições de cultivo/coleta desses organismos. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem estudos posteriores no intuito de otimizar o protocolo de purificação da R-FC de *H. musciformis* visando aumentar sua pureza, rendimento e recuperação, através do uso de diferentes faixas de fracionamento proteico ou a utilização de outros procedimentos de purificação, como cromatografia de exclusão molecular ou ainda inversões na ordem dos métodos cromatográficos.

Diante do exposto, a purificação parcial da R-FC de *H. musciformis* foi capaz de gerar um rendimento de 3,91 µg/g de alga fresca, recuperação de 39,77% e índice de pureza final de 0,43 (Tabela 4). Além disso, o presente estudo tem caráter inovador por apresentar, dentre os poucos encontrados na literatura que mostram ficocianinas provenientes de macroalgas, parâmetros que são considerados importantes para posteriores aplicações biotecnológicas.

Ainda de acordo com a Tabela 4, foi também possível observar o rendimento da purificação da R-FE. Os índices de pureza deste pigmento vermelho, presentes nas etapas de purificação, foram aumentados até alcançar um índice de purificação de 1,61. O rendimento e a recuperação obtidos para R-FE foram de 13,09 µg/g de alga fresca e 24,08%, respectivamente. De acordo com o valor do índice de pureza obtido, não podemos considerar ainda a R-FE para ser aplicada na indústria alimentícia, uma vez que o valor de índice de pureza sugerido por Nobre (2015) é de 2,82.

Tabela 4 – Purificação dos pigmentos presentes na F0/30 macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.

Frações pigmentadas	R-FC				R-FE			
	Pigmento total (mg)	Rendimento* (µg/g)	Recuperação** (%)	IP	Pigmento total (mg)	Rendimento* (µg/g)	Recuperação** (%)	IP
EB-Hm	8,95	9,83	100,00	0,02	49,49	54,38	100,00	0,16
F0/30	3,95	4,34	44,13	0,09	17,77	19,53	35,90	0,26
P2-0/30	3,56	3,91	39,77	0,43	0,26	0,28	0,56	0,27
P3-0/30	0,95	1,04	10,60	0,09	11,92	13,09	24,08	1,61

Legenda: * Rendimento calculado com base na alga fresca; ** Expressa em relação a quantidade de R-FC presente no EB-Hm.

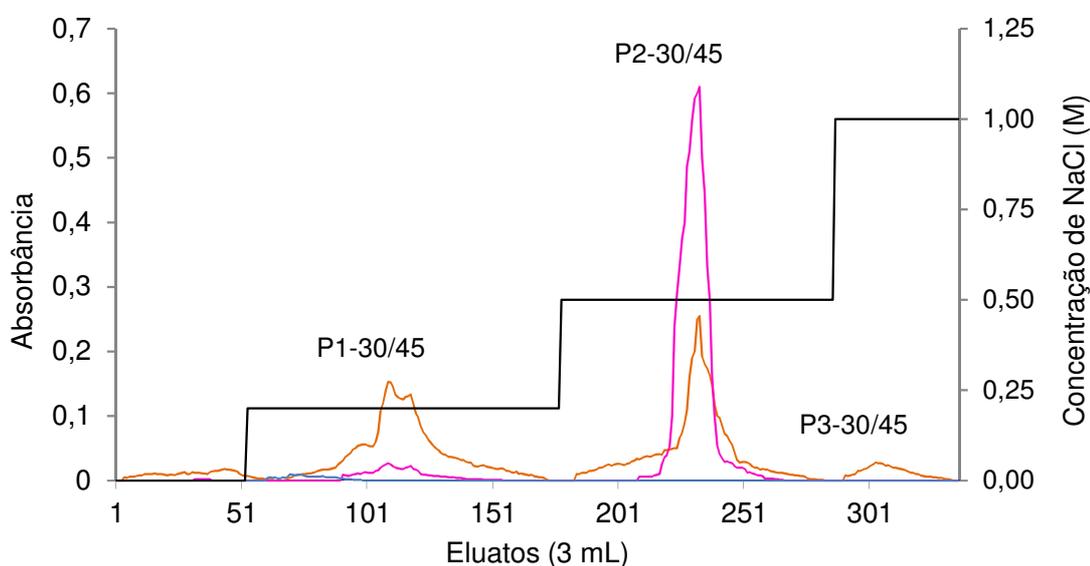
Fonte: Elaborado pela autora.

De fato, as cores observadas nos eluatos cromatográficos deste trabalho mostraram a eficiência do procedimento cromatográfico em separar os dois pigmentos (R-FE e R-FC). O emprego de procedimentos cromatográficos, utilizando uma matriz cujo princípio é a troca de íons, tem sido eficiente na separação de compostos carregados presentes em várias espécies de macroalgas marinhas (PEREIRA *et al.*, 2005; BEZERRA-NETO *et al.*, 2008). Segundo Wang *et al.* (2002) foi possível alcançar um índice de pureza de 3,6 para a R-FE de *Palmaria palmata* quando propuseram um esquema de purificação constituído de extração com tampão fosfato seguido de precipitação com sulfato de amônio 0,5 mol/L e cromatografia de troca iônica em matriz de Q-Sepharose. Enquanto Liu *et al.* (2005) ao purificarem o pigmento R-FE, obtiveram índice de pureza de 5,6 e recuperação de 67,3% da macroalga vermelha *Polysiphonia urceolata* ao utilizarem uma extração com tampão fosfato de sódio 0,02 M seguida por precipitação com sulfato de amônio a 45% de saturação e cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sepharose “Fast Flow”.

5.3.2 Cromatografia de troca iônica da F30/45

O perfil cromatográfico da F30/45 (Gráfico 2) mostrou três picos proteicos retidos, eluídos com o mesmo tampão de equilíbrio da coluna contendo NaCl 0,2, 0,5 e 1,0 M, no entanto, somente o segundo pico (P2-30/45) apresentou coloração rosa intensa e absorvância máxima a 564 nm, caracterizando a presença de R-FE. Não foi observada absorvância a 620 nm, uma característica da R-FC. A concentração de proteínas solúveis, obtidas pelo método de Bradford, foi de 0,10 mg/mL e a de R-FE foi de 0,07 mg/mL, com relação ao índice de pureza, foi obtido um valor de 2,44, representando um aumento de 1,5 vezes, quando comparado ao obtido na F30/45 (1,29).

Gráfico 2 - Cromatograma de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da F30/45 de *H. musciformis*.



Legenda: Proteínas da (42,68 mg) foram aplicados na cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel; Fluxo: 1,4 mL/min; (—) Absorvância a 280 nm; (—) Absorvância a 620 nm; (—) Absorvância a 564 nm; (—) Concentração de NaCl.

Fonte: Elaborado pela autora.

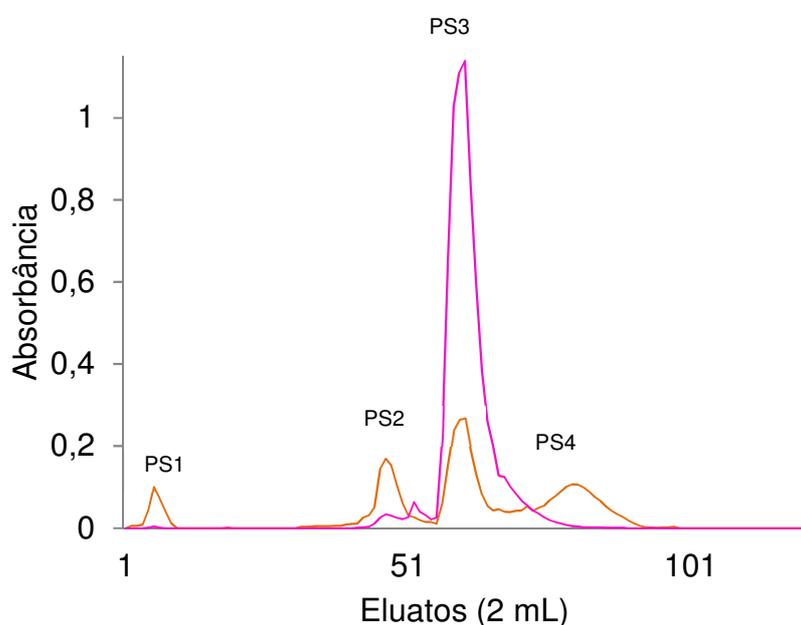
Bastos-Filho (2016) ao purificar a R-FE da alga *S. filiformis*, utilizando a mesma sequência de purificação utilizada neste trabalho, obteve um índice de pureza de 1,63. Senthilkumar *et al.* (2013) ao purificarem a R-FE da alga *Portieria hornemannii*, chegaram a um índice de pureza de 5,2, utilizando somente as etapas de extração proteica seguida por cromatografia de troca iônica. Kaixan, Franklin e Borowitz (1993) purificaram a R-FE da alga *Ceramium isogonum*, usando a mesma sequência de purificação deste trabalho, utilizaram também a técnica de ultrafiltração, obtendo um índice de pureza de 2,02 após a utilização da cromatografia de troca iônica, e índice de pureza de 2,10 após o procedimento de ultrafiltração. Como demonstrado, foram mostrados para diferentes espécies de algas índices de pureza que variaram de 2,02 a 5,2, sugestivo que a pureza da R-FE não está correlacionada com o valor dos índices de pureza, e sim com a metodologia de purificação aplicada e com a espécie de alga que está sendo estudada.

No entanto, com o intuito de aumentar o índice de pureza da R-FE obtido nesse trabalho, o P2-30/45 foi submetido ao procedimento cromatográfico de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300.

5.4 Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S-30

O P2-30/45 proveniente da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel da F30/45 foi submetido ao processo de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-300, previamente equilibrada com tampão de extração. O cromatograma resultante (Gráfico 3) mostrou quatro picos proteicos evidentes, dentre os quais, dois foram pigmentados, PS2 e PS3. Porém, apenas os eluatos referentes ao PS3 mostraram índices de pureza maior que 4,0 e, conseqüentemente, foram reunidos. A solução resultante foi denominada R-FEHm e apresentou 0,31 mg/mL de proteínas solúveis e 0,32 mg/mL de R-FE. Tais resultados mostraram um rendimento de 8,56 µg/g de alga fresca e índice de pureza 4,17 (Tabela 5). Esses resultados sugerem que mudanças no protocolo de fracionamento por sulfato de amônio poderiam contribuir para o aumento do rendimento para a R-FE, já que parte da referida ficobiliproteína permaneceu na F0/30.

Gráfico 3 – Cromatograma de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300 do P2-30/45 de *H. musciformis*.



Legenda: Cerca de 13,20 mg de proteína do P2-3045 foram aplicado na cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300; Fluxo: 1 mL/min; . (—) Absorbância a 280 nm;; (—) Absorbância a 564 nm; **Fonte:** Elaborado pela autora.

Tabela 5 –Purificação da R-FE da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.

Frações Pigmentadas	Pigmento total (mg)	Rendimento* (µg/g)	Recuperação** (%)	IP
EB-Hm	49,49	54,38	100,00	0,16
F30/45	28,92	31,78	58,44	1,29
P2-30/45	9,29	10,21	18,77	2,44
PS3	7,79	8,56	15,74	4,17

Legenda: * Rendimento calculado com base na alga fresca; ** Expressa em relação a quantidade de R-FC presente no EB-Hm. **Fonte:** Elaborado pela autora.

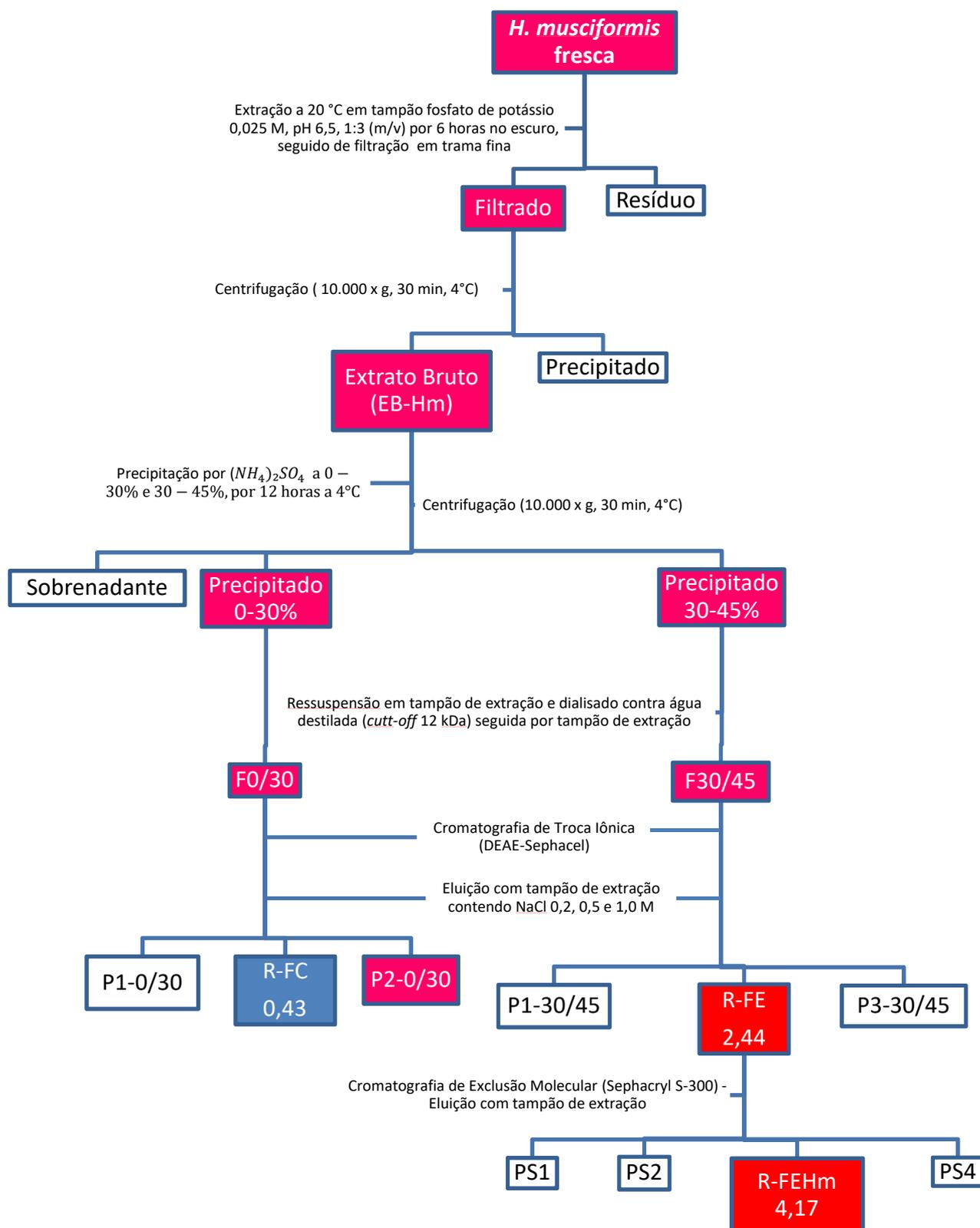
Diante do exposto, os resultados obtidos nos procedimentos de purificação deste trabalho são sugestivos para aplicação na maioria dos fins dedicados para a aplicação do pigmento R-FE, desde o uso na indústria de alimentos a aplicações biotecnológicas (THANGAM *et al.*, 2015; SUDHAKAR *et al.*, 2015).

Esses resultados também mostraram vantagem econômica sobre outros protocolos usados para purificação de R-FEs como, por exemplo, na purificação da R-FE da macroalga vermelha *H. japônica*, onde foram necessárias três etapas cromatográficas, duas de exclusão molecular e uma de troca iônica, após a precipitação por sulfato de amônio para obtenção do índice de purificação final de 4,89 (SUN *et al.*, 2009). Hilditch *et al.* (1991) obtiveram uma R-FE a partir da macroalga *Corallina officinalis* com índice de pureza de 4,7, porém somente após cinco etapas de purificação. Niu, Wang e Tseng (2006) purificaram a R-FE da macroalga *Polysiphonia urceolata* com índice de 3,9, inferior ao obtido neste trabalho, através do uso de técnicas de precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica. Wang *et al.* (2015) também usaram métodos semelhantes aos deste trabalho quando purificaram a R-FE da macroalga vermelha *Polysiphonia urceolata* com índice de pureza de 5,6.

É sabido que a maior parte do custo das R-FEs comercializadas é proveniente das etapas de purificação e recuperação, cujos gastos representam cerca de 60% do custo total de produção (MUKHERJEE *et al.*, 2006). Por esse motivo, a análise desses parâmetros é de vital importância em estudos que objetivam purificar esse tipo de pigmento.

Apesar do rendimento alcançado neste trabalho ser considerado baixo em relação aos trabalhos aqui apresentados, vale ressaltar que o fluxograma de purificação proposto (Figura 10) foi capaz de gerar 3 produtos a partir da macroalga vermelha *H. musciformis*: 1) Uma ficobiliproteína de coloração azul (R-FC), 2) Uma ficobiliproteína de coloração vermelha (R-FE para fins alimentícios) e 3) Uma ficobiliproteína fluorescente de coloração vermelha com pureza adequada para fins biotecnológicos (R-FEHm).

Figura 10 – Fluxograma de extração de pigmentos da macroalga marinha vermelha *H. musciformis*



Fonte: Elaborado pela autora.

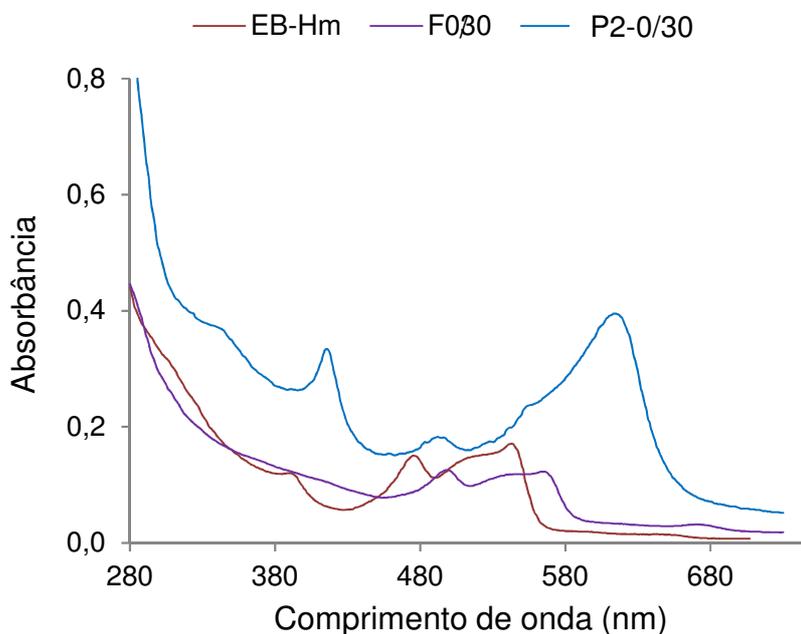
5.5 Espectros de absorção da R-FE durante as etapas de purificação

O emprego de técnicas que avaliem o espectro de absorção de amostras contendo essas ficobiliproteínas permite a caracterização dos picos de absorção e a identificação dos pigmentos presentes nas frações obtidas em cada etapa de purificação (FLEURENCE, 2004). Sendo assim, o extrato proteico total (EB-Hm), e as frações proteicas F0/30 e P1-030 foram analisadas quanto aos seus espectros de absorção.

O EB-Hm e a F0/30 mostraram picos de absorção pouco definidos a 495 nm e entre os comprimentos de onda de 540 a 565 nm, característicos do pigmento R-FE e uma leitura de absorbância a 280 nm considerada elevada evidenciando altos teores de proteínas (Gráfico 4). Além disso, foi observado um pico discreto entre as leituras de absorção de 600 a 700 nm, sugerindo a presença de ficocianinas, tanto para EB-Hm quanto para F0/30.

Com relação ao espectro de absorção do P2-030 foi evidenciado um pico de absorção a 610 nm, indicando a presença de R-Ficocianina (R-FC) que, de acordo com a literatura, apresenta um pico de absorção a 610 nm e outro a 550 nm (GLAZER & HIXON, 1975; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; DUMAY *et al.*, 2014). Além do demonstrado, foi também observado que a R-FC também apresentou dois picos de absorção em 413 e em 490 nm, respectivamente, evidenciando a presença de compostos contaminantes capazes de absorver luz nesses comprimentos de ondas, tais como os carotenos e ficoeritrinas (COSTA, 2013).

Gráfico 4 – Espectros de absorção do EB-Hm e frações pigmentadas resultantes das etapas do processo de purificação da Ficocianina de *H. musciformis*.



Fonte: Elaborado pela autora

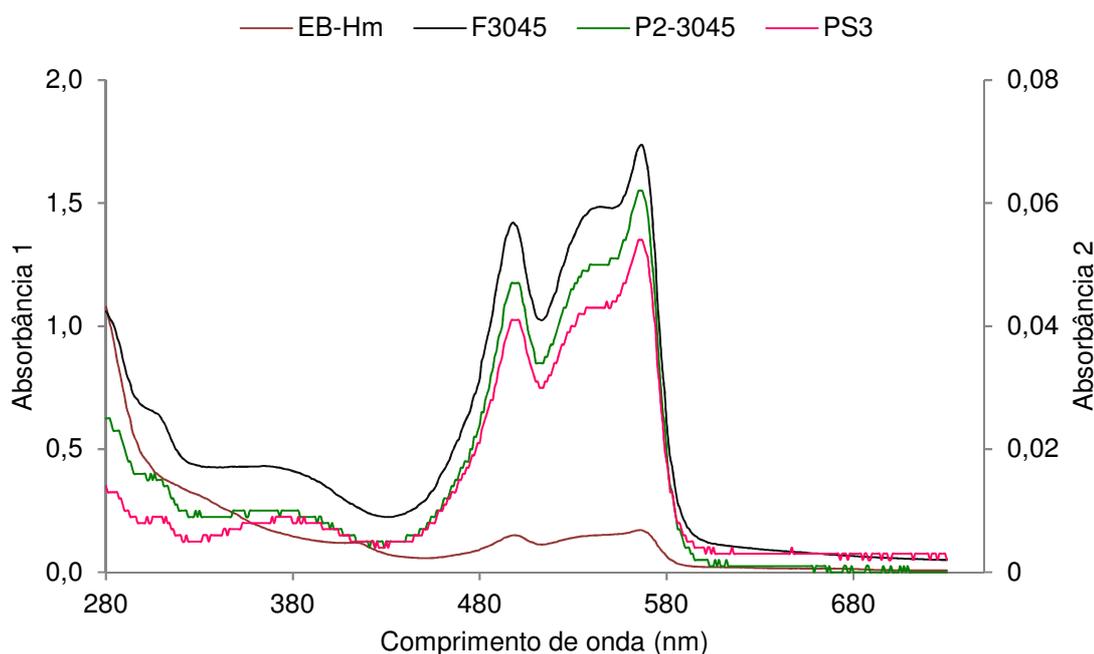
Os espectros de absorção das etapas de purificação também corroboram com o aumento do índice de pureza da R-FC de 0,09 para 0,43. Este aumento é considerado importante, uma vez que as diferentes aplicações da ficocianina são determinadas pela sua pureza, em que a pureza de 0,7 é levada em consideração pela indústria alimentícia como índice ideal para utilização em alimentos, sendo o índice de pureza 3,9 utilizado para grau reativo e os superiores a 4,0 para grau analítico (PATIL *et al.*, 2006).

O Gráfico 5 mostra os espectros de absorção do EB-Hm, da F30/45 e dos picos cromatográficos obtidos no processo de purificação da R-FEHm. Os picos de absorção em 495, 540 e 564 nm, característicos das R-FEs foram evidentes, mostrando a predominância do pigmento em todas as etapas de purificação, além disso, a diminuição do pico de absorção a 280 nm (proteínas) corrobora com o aumento da pureza do pigmento no decorrer do processo de purificação. De fato, a relação de absorbância 564/280 é considerada uma boa indicação do nível de

purificação de ficobiliproteínas e o aumento desta razão foi observado no decorrer dos passos de purificação. Porém o rendimento do processo tende a diminuir com o aumento do índice de pureza.

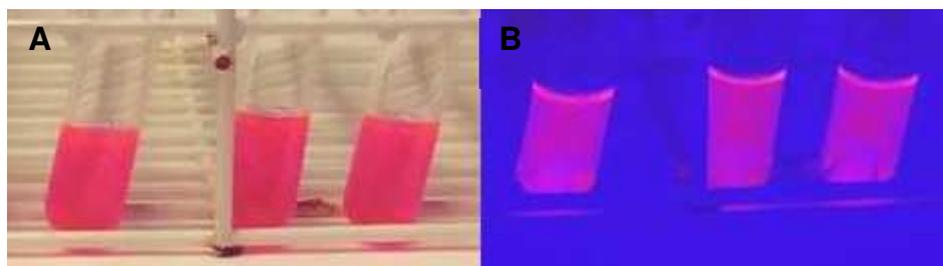
A R-FE de *Palmaria palmata* apresentou um índice de pureza de 3,2 e rendimento de 0,56 mg/g de alga seca após sua purificação por eletroforese em gel de poliacrilamida (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). Niu *et al.* (2013) purificaram a R-FE da macroalga *G. lemaneiformis* com rendimento de 0,36 mg/g de alga fresca e pureza de 4,20 e Bastos-filho (2016) alcançou o rendimento de 17,40 $\mu\text{g/g}$ de alga fresca com pureza 4,5, quando purificou a R-FE da alga *S. filiformis*. A R-FEHm apresentou coloração rosa intensa (Figura 11) e fluorescência de coloração laranja quando excitada sob a luz azul.

Gráfico 5 – Espectros de absorção das frações pigmentadas resultantes das etapas de purificação da R-FE (F30/45) de *H. musicformis*



Legenda: Absorbância 1: referente às amostras F035 e EB-Hm; Absorbância 2: referente às amostras P3-3045 e PS3. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Figura 11 – Coloração e Fluorescência da R-FEHm.



Legenda: **A** – Coloração de amostras de R-FEHm sob luz branca; **B** – Fluorescência de amostras de R-FEHm sob luz azul. **Fonte:** Elaborado pela autora

Picos de absorvância a 495, 540 e 564 nm foram observados em ficobiliproteínas pertencentes à classe de R-FEs das macroalgas *Heterosiphonia japônica*, *Gracilaria verrucosa*, *Palmaria palmata* e *Polysiphonia urceolata* (SUN *et al.*, 2009; WANG, 2002; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; NIU, WANG, TSENG, 2006). Esses picos são extremamente importantes, pois são capazes de absorver fortemente a luz em três diferentes comprimentos de onda, emitindo fluorescência em 575 nm, diferente da FITC, composto orgânico sintético largamente utilizado como corante, que tem apenas um comprimento de onda de absorção (495 nm) e emissão a 521 nm.

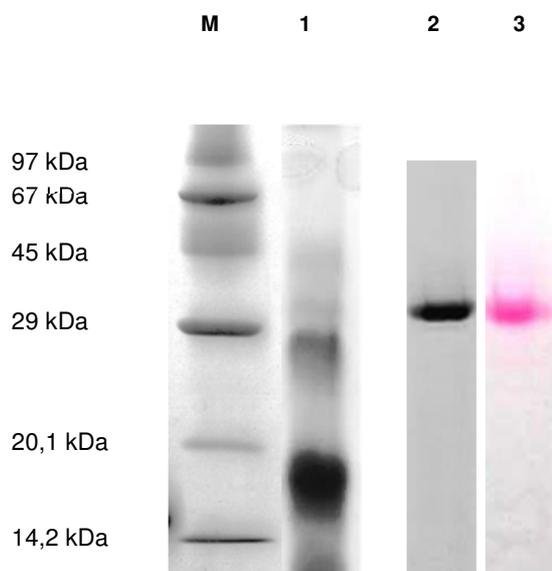
5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

No intuito de confirmar a pureza do pico PS3 (R-FEHm) foram realizadas duas eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), na presença e na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol.

A eletroforese em gel de poliacrilamida da R-FEHm em condições desnaturantes na presença de agentes redutores mostrou bandas proteicas referentes às cadeias α e β com massas moleculares aparentes de 20 e 22 kDa, respectivamente (Figura 12). A cadeia gama também pôde ser identificada nesta eletroforese com massa aparente de 31 kDa. Esta terceira subunidade possibilita a conexão das duas formas triméricas $(\alpha\beta)_3$ - γ - $(\alpha\beta)_3$, permanecendo na cavidade central do hexâmero (CHANG *et al.*, 1996). De acordo com a literatura, a cadeia α pode variar entre 16 a

20 kDa, enquanto a β varia entre 18 a 22 kDa, aproximadamente (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; ROMAN *et al.*, 2002; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013). Como já relatado anteriormente, essas cadeias podem se oligomerizar nas formas $(\alpha\beta)_3$ e na forma $(\alpha_2\beta_2)_3\gamma$ quando a terceira cadeia, denominada gama, está presente.

Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE) da R-FEHm na presença e ausência de agente redutor.



Fonte: Elaborado pela autora. **Legenda:** SDS-PAGE 12,5% (presença de agente redutor) e 8% (ausência de agente redutor). Foram aplicados 25 μ g de proteína em cada raia. Raia M: marcador de massa molecular conhecida, fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa); Raia 1: R-FEHm na presença de agente redutor; Raia 2: R-FEHm na ausência de agente redutor (β -mercaptoetanol); Raia 3: R-FEHm na ausência de agente redutor antes do processo de coloração com Comassie.

No gel em condições não desnaturantes foi possível observar a presença de uma única banda proteica, sugestivo da pureza da R-FEHm. Ficobiliproteínas, em especial R-FEs de macroalgas vermelhas, apresentam massa molecular em torno de 240 kDa, devido a forma hexamérica em que as cadeias se encontram (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). Um fato importante que deve ser ressaltado é que tais moléculas podem apresentar formas diméricas, triméricas e hexaméricas

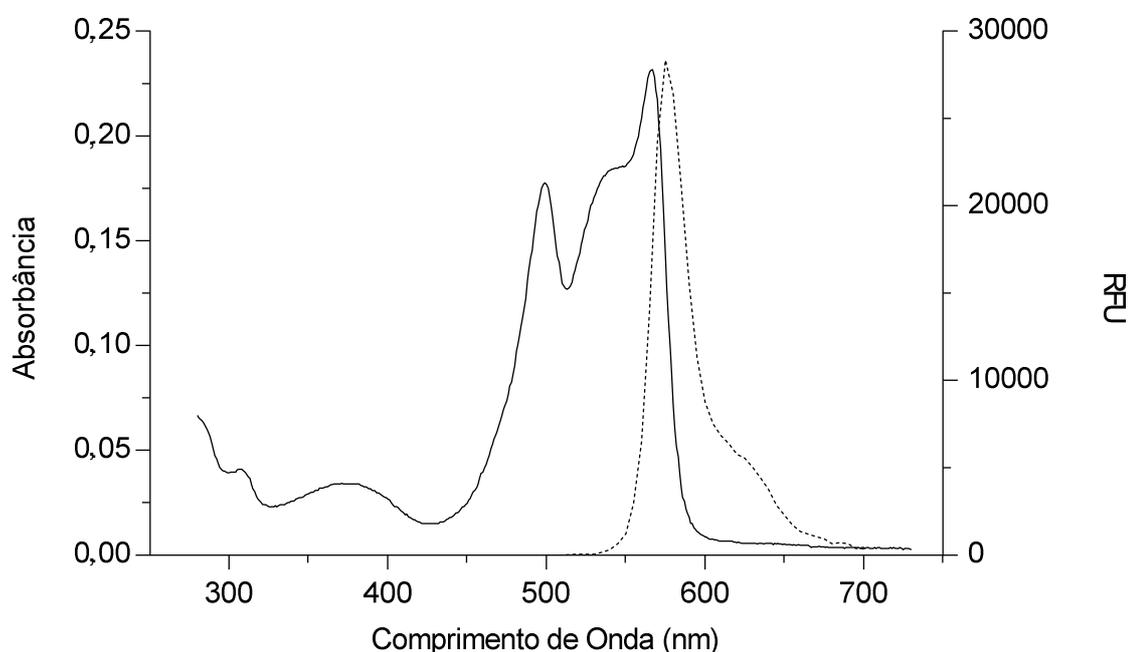
(DUERRING; SCHMIDT; HUBER, 1991; PATEL *et al.*, 2005). Ficobiliproteínas ainda podem formar heterodímeros, como a R-FE purificada da alga vermelha *Corallina elongata*, onde os autores verificaram a presença de uma banda de 55 kDa correspondente a α/β (ROSSANO *et al.*, 2003).

5.7 Caracterizações espectroscópicas da R-FEHm.

5.7.1 Espectros de absorvância e fluorescência

O espectro de absorvância da R-FEHm apresentou dois picos a 495 e 564 nm e um ressalto a 540 nm, já a emissão de fluorescência, quando excitado a 495 nm, apresentou um pico a 575 nm (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Espectros de absorção e emissão de fluorescência da R-FEHm



Legenda: Para absorvância (—) foi utilizada um solução de R-FEHm de 43 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Já para a emissão de fluorescência (-----) foi utilizado uma solução de R-FEHm de 4,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. RFU = Unidade Realitica de Fluorescência. **Fonte:** Elaborado pela autora

Os picos de absorção máxima mostrados no espectro de absorção da R-FEHm corroboraram com os encontrados por Kawsar *et al.* (2011), 498, 539 e 565 nm, com a macroalga *A. anceps*, por Munier *et al.* (2015), 498, 540 e 565 nm, com a macroalga vermelha *G. turuturu*, por Bastos-filho (2016), 495, 540 e 564 nm, com a macroalga *S. fliformis*. Esse espectro é característico de R-FEs, pois esses pigmentos apresentam as ficobilinas: ficourobilina (PUB) e ficoeritrobilina (PEB) em sua estrutura, onde o pico de absorção a 495 nm refere-se à PUB e os picos de absorção a 540 e 564 nm referem-se à PEB (FLEURENCE, 2003).

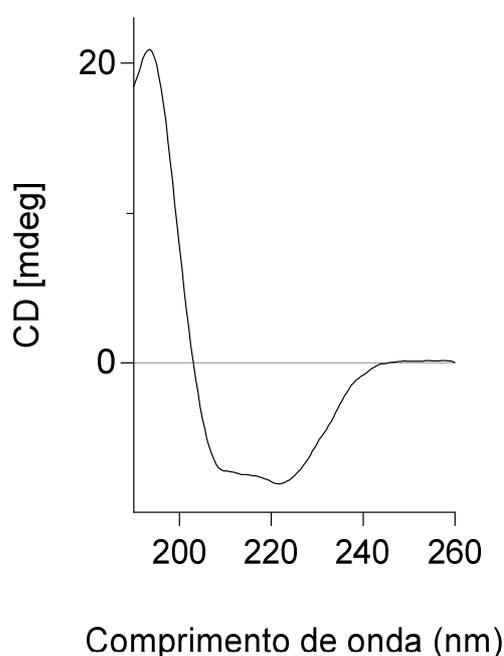
O espectro de fluorescência gerado pela R-FEHm apresentou um único pico de emissão máxima em 575 nm, ao ser excitado em 495 nm. Esses resultados corroboram com os trabalhos que apresentam o espectro de emissão de fluorescência de R-FEs (MUNIER *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; BASTOS-FILHO, 2016), com emissão máxima entre 575 a 580 nm. É importante destacar que, diferentes dos pigmentos sintéticos, a R-FEHm possui não apenas um pico de absorção para excitação de fluorescência, mas três picos de absorção, mostrando um amplo espectro de absorção e forte fluorescência, devido à transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) entre as ficobilinas PUB e PEB (FLEURENCE, 2004; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999).

5.7.2 Espectro de dicroísmo circular de R-FE de *H. musciformis*.

A composição de dicroísmo circular (CD) da R-FEHm, em condições nativas, apresentou duas intensas bandas negativas a 222 e 208 nm e uma intensa banda positiva a 192 nm (Gráfico 7). De acordo com esses dados, a R-FEHm mostrou que 95,35% de sua estrutura secundária está em forma de α -hélix, 0,02% em folhas- β e 4,63% em estruturas não ordenadas, corroborando com Wu *et al.* 2015, os quais já haviam relatado características espectrais de dicroísmo circular similares para a R-FE de *Bangia fusco-purpurea* com predominância de 81,7% em estruturas α -hélix.

É sabido que a estrutura tridimensional da R-FE relatada na literatura, mostra que a posição dos cromóforos (bilinas) ligados às subunidades α e β está diretamente ligada às propriedades espectroscópicas deste pigmento, dado a transferência de energia na forma de elétrons entre eles (CHANG *et al.*, 1996; JIANG, ZHANG; LIANG, 1999; CONTREAS-MARTEL *et al.*, 2001), por isso, a manutenção da estrutura secundária desta ficobiliproteína, é de vital importância para a manutenção de suas características espectroscópicas, por essa razão, este tipo de análise também se torna outro ponto de controle para as seguintes etapas.

Gráfico 7 – Espectro de dicroísmo circular de R-FEHm



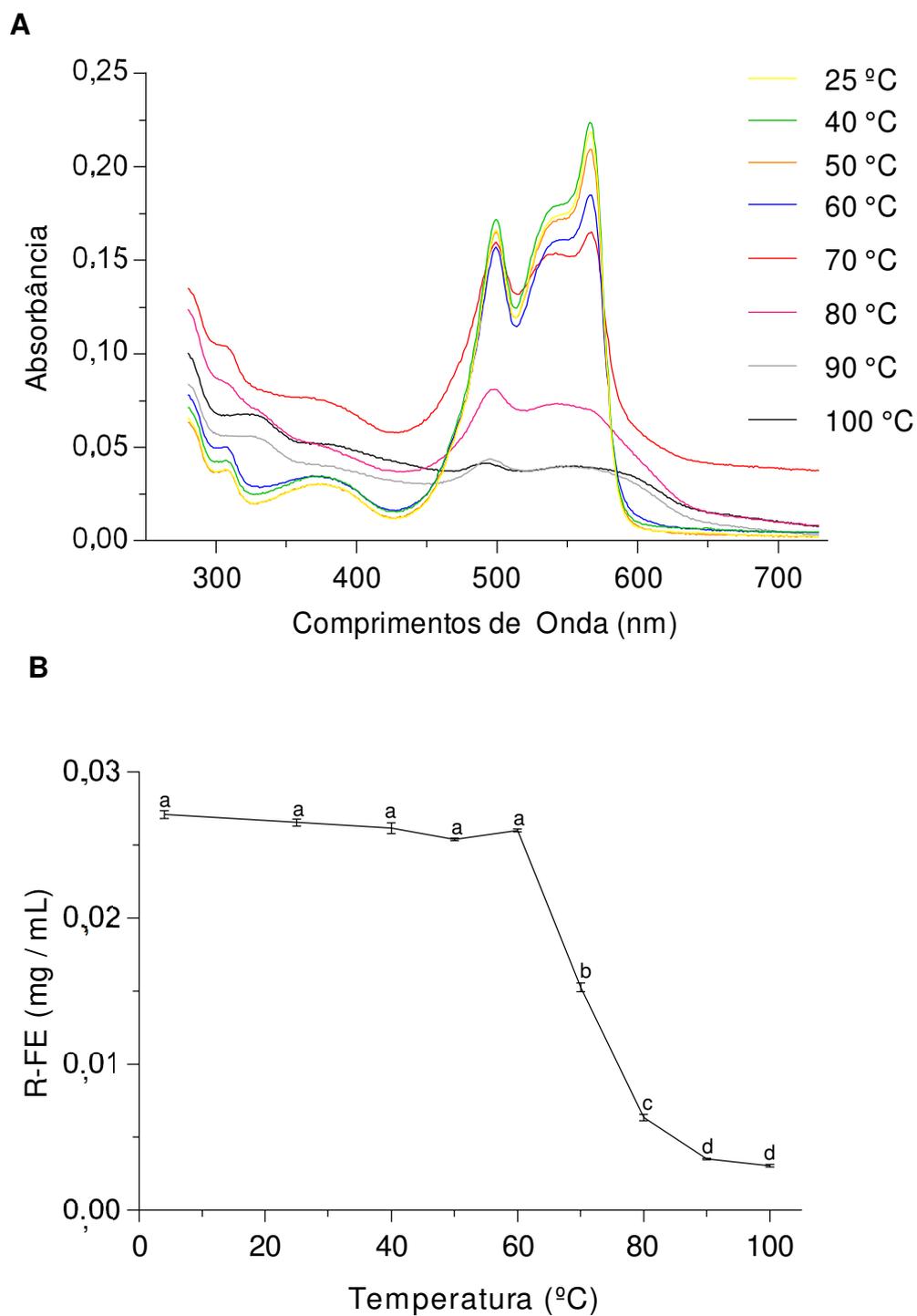
Legenda: CD = dicroísmo circular; mdeg = milidregrés; **Fonte:** Elaborado pela autora.

5.8 Efeitos da temperatura e do armazenamento sobre a estabilidade espectroscópica da R-FE de *H. musciformis*.

5.8.1 Termoestabilidade espectroscópica

A R-FEHm mostrou alta estabilidade da absorbância até 60 °C após 1 hora de manutenção da temperatura (Figura 13a), não apresentando diferenças estatísticas na concentração da amostra. No entanto, a partir de 70 °C foram observadas alterações significativas ($p < 0,05$) no seu espectro de absorção característico, ocorrendo reduções do pico a 564 nm de 28,2, 69,2 e 83,0% nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C, respectivamente, com consequentes reduções nas concentrações do pigmento (Figura 13b). Reduções menores (7,7, 52,1 e 74,2%) foram observadas para o pico de absorção a 495 nm nas mesmas temperaturas, sugerindo que a absorbância relacionada ao PUB é mais estável que as absorbâncias relacionadas ao PEB. A maior estabilidade do cromóforo PUB tem sido atribuída às duas ligações de seus anéis aos resíduos $\beta 50$ e $\beta 6$ de cisteína da apoproteína da R-FEHm, enquanto que o PEB está ligado à proteína através de um único resíduo de cisteína (FLEURENCE, 2003; LIU *et al.*, 2009).

Figura 13 - Efeito da temperatura sobre os espectros de absorção (A) e concentração (B) da R-FEHm



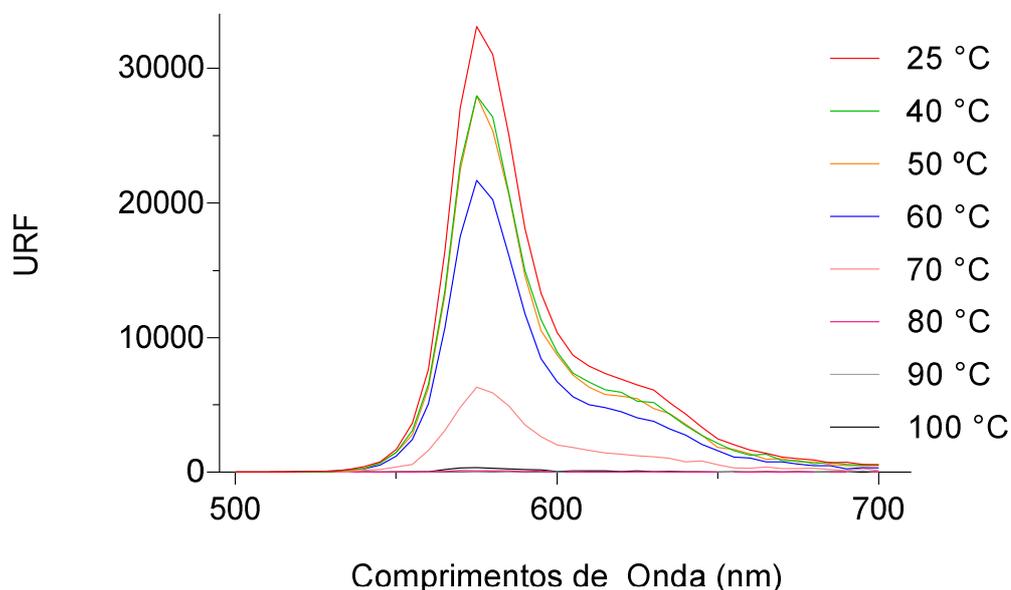
Legenda: Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$), onde letras iguais indicam que não diferem estatisticamente. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Os espectros de absorção e fluorescência das R-FEs são os principais parâmetros a serem avaliados quando se objetiva a aplicação biotecnológica destas ficobiliproteínas (MISHRA *et al.*, 2010; MUNIER *et al.*, 2014; RASTOGI; SONANI; MADAMWAR, 2015). Assim sendo, estudos de estabilidade espectroscópica em diferentes condições de armazenamento, pH, temperatura e conservantes são essenciais para avaliar o decaimento desses parâmetros, os quais implicam diretamente na perda das propriedades espectrais destes pigmentos e, conseqüentemente, determinam as condições ideais de manutenção da sua forma ativa (MUNIER *et al.*, 2014).

A estabilidade térmica da R-FRHm demonstrada neste trabalho é considerada alta quando comparada a R-FEs purificadas de outras espécies de macroalgas vermelhas, como as de *Grateloupia turuturu* e *Gracilaria longa*, ambas estáveis até 40 °C (D'AGNOLO *et al.*, 1993; MUNIER *et al.*, 2014). Sepulveda-Ugarte *et al.*, (2011) sugeriram que as condições ambientais nas quais a macroalga se desenvolve influenciam na geometria dos cromóforos e nas propriedades espectroscópicas dos ficobilissomos. Deste modo, a alta estabilidade espectroscópica da R-FEHm pode ser atribuída às condições ambientais da zona intermaré da costa cearense, onde as espécies de macroalgas foram cultivadas, diferindo assim das macroalgas vermelhas já estudadas, as quais se desenvolvem em regiões de climas temperados (D'AGNOLO *et al.*, 1993; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; MUNIER *et al.*, 2014). Tais resultados são similares aos obtidos por Bastos-Filho (2016) quando avaliou a termoestabilidade da R-FE (60 °C) extraída e purificada da macroalga vermelha *S. filiformis*, típica do litoral cearense.

Quanto à emissão de fluorescência, a R-FEHm também se mostrou estável até 60 °C, porém apresentando maiores reduções de emissão de fluorescência (49,1, 85,2 e 99,8%) nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C, respectivamente (Gráfico 8). No entanto, vale ressaltar que a R-FEHm ainda exibiu fluorescência até 90 °C. Resultados similares também foram mostrados por Rastogi, Sonani e Madamwar (2015) quando analisaram a perda da propriedade fluorescente da R-FE de *Phormidium rubidum*, apresentando decréscimo de 97,34% a 80 °C. Já Bastos-Filho (2016) mostrou que a R-FE da macroalga *S. filiformis* ainda apresentou fluorescência até 80 °C.

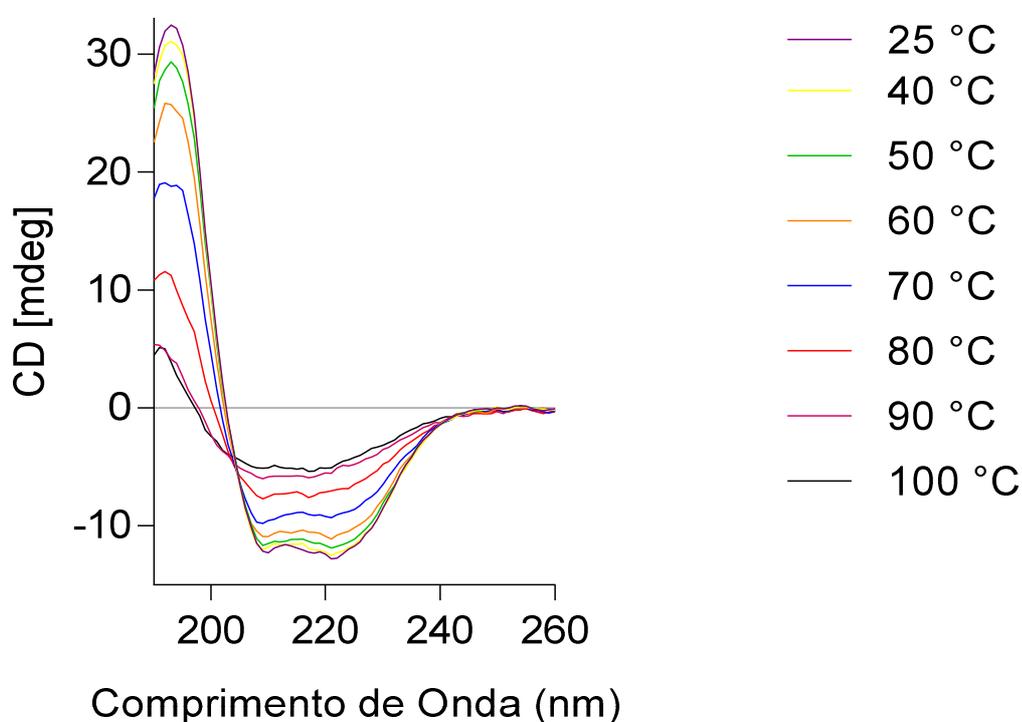
Gráfico 8 – Efeito da temperatura sobre os espectros de emissão a 575 nm da R-FEHm



Legenda: RFU = Unidade Relativa de Fluorescência **Fonte:** Elaborado pela autora

A perda das propriedades espectroscópicas de R-FEs paralela ao aumento gradual da temperatura está diretamente relacionada com a perda da estrutura secundária da apoproteína (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). O espectro de CD da R-FEHm, em diferentes temperaturas, (Gráfico 9) e a Tabela 6 corroboraram com os dados apresentados na Figura 13 e Gráfico 8, onde a R-FEHm começa a perder sua conformação secundária a partir de 70 °C, não havendo mudanças significativas até 60 °C. Diante do exposto, é sugestivo que a perda gradual da conformação proteica do pigmento em α -hélix dificulta a transferência de energia entre as cadeias de anéis tetrapirrólicos, já que o espaço entre eles estaria cada vez mais modificado com o aumento da temperatura, culminando em alterações significativas nas suas propriedades espectrofotométricas.

Gráfico 9 - Termodesnaturação da R-FEHm durante o aquecimento de 25 a 100 °C por dicroísmo circular.



Legenda: CD = dicroísmo circular; mdeg = *milidregrees*; **Fonte:** Elaborado pela autora.

Tabela 6 – Elementos de estrutura secundária estimados a partir do espectro de dicroísmo circular da R-FEHm em diferentes temperaturas.

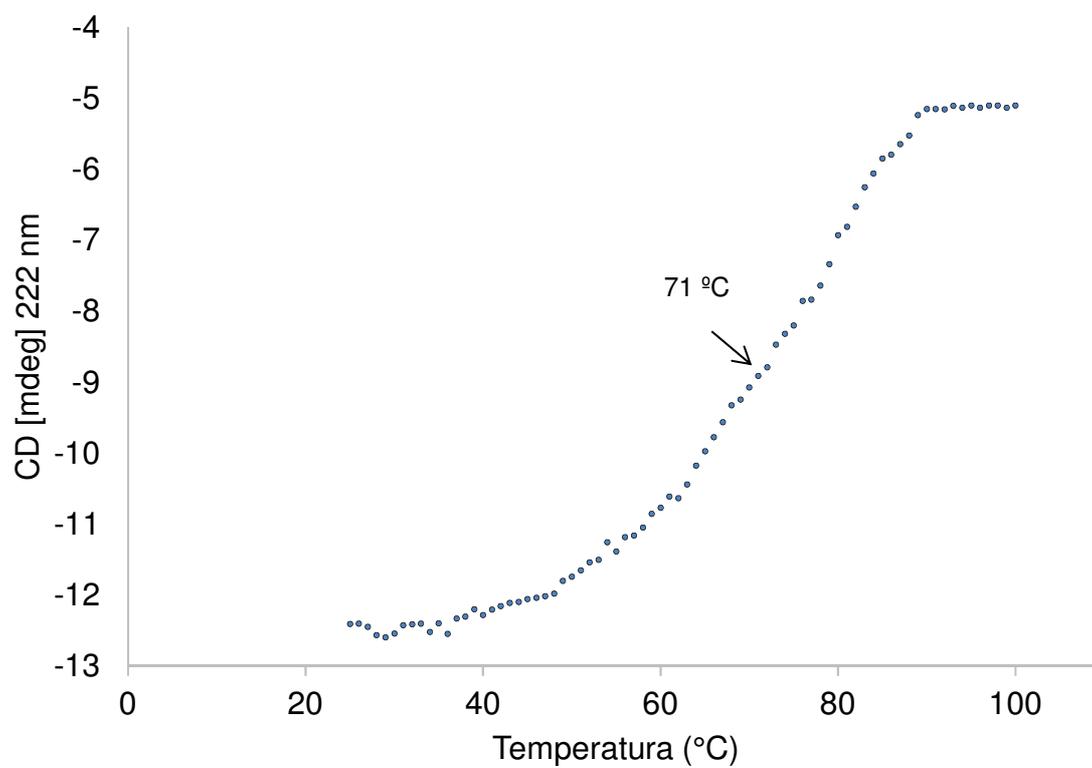
Temperatura (°C)	α -hélix (%)	β -folha (%)	Estrutura não ordenada
25	95,35	0,02	4,63
40	95,11	0,02	4,87
50	95,02	0,02	4,96
60	91,90	0,02	8,08
70	77,12	0,21	22,67
80	64,48	1,25	34,27
90	34,96	7,78	57,26
100	27,80	9,41	62,79

Fonte: Elaborado pela autora.

A estabilidade térmica de uma dada proteína pode ser avaliada por mudanças no espectro de CD através do estudo de varreduras no espectro por inteiro ou varredura em comprimentos de onda específicos, sendo comprimento de onda frequentemente empregado neste sentido de 222 nm (ALLIANCE PROTEIN LABORATORIES, 2016). Sendo assim, um espectro de dicroísmo circular (CD) da R-FEHm foi obtido para cada 1 °C de variação da temperatura, na faixa de 25°C a 100°C. A termoestabilidade da R-FEHm foi monitorada pelo sinal do CD a 222 nm em mili *degrees* para obtenção do perfil de transição da estrutura nativa e desnaturada da ficobiliproteína.

A temperatura que representa o ponto médio de transição entre as estruturas nativa e desnaturada da R-FEHm (Temperatura de *melting* - T_m) foi de 71,5 °C (Gráfico 10). Não foi observado o desdobramento completo da estrutura de R-FEHm a 100 °C, similar ao observado para algumas proteínas que ainda apresentam estruturas secundárias a altas temperaturas, fato que ainda não foi bem esclarecido.

Gráfico 10 –Termoestabilidade da R-FEHm durante o aquecimento de 25 a 100 °C por dicroísmo circular a 222 nm.

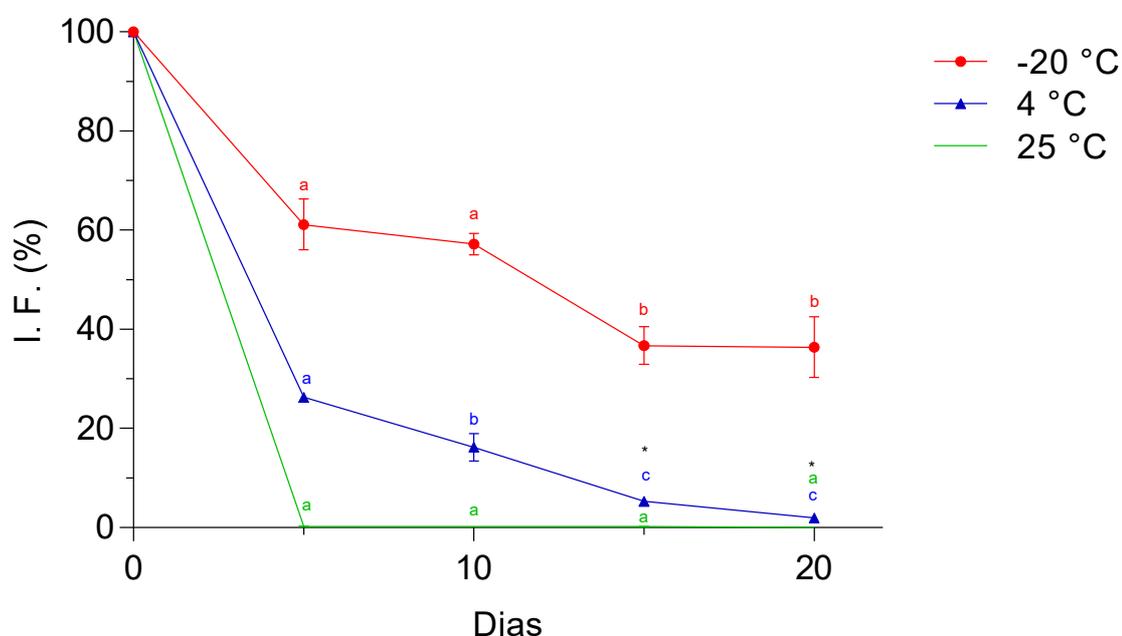


Legenda: CD = dicroísmo circular; mdeg = *milidregrées* **Fonte:** Elaborado pela autora.

5.8.2 Estabilidade no armazenamento

A R-FEHm foi analisada quanto as suas características espectroscópicas, fluorescência e absorbância, durante vinte dias de armazenamento sob as temperaturas de -20, 4 e 25 °C. O gráfico 11 mostra o decaimento da intensidade de fluorescência (I.F.) da R-FEHm.

Gráfico 11 – Intensidade de Fluorescência (I.F.) da R-FEHm durante vinte dias de armazenamento sob diferentes temperaturas.



Legenda: Os resultados foram analisado por *two-away* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$), onde letras e cores iguais indicam que não diferem estatisticamente, e * significa que as letras abaixo deste símbolo não diferem estatisticamente. **Fonte:** Elaborado pela autora

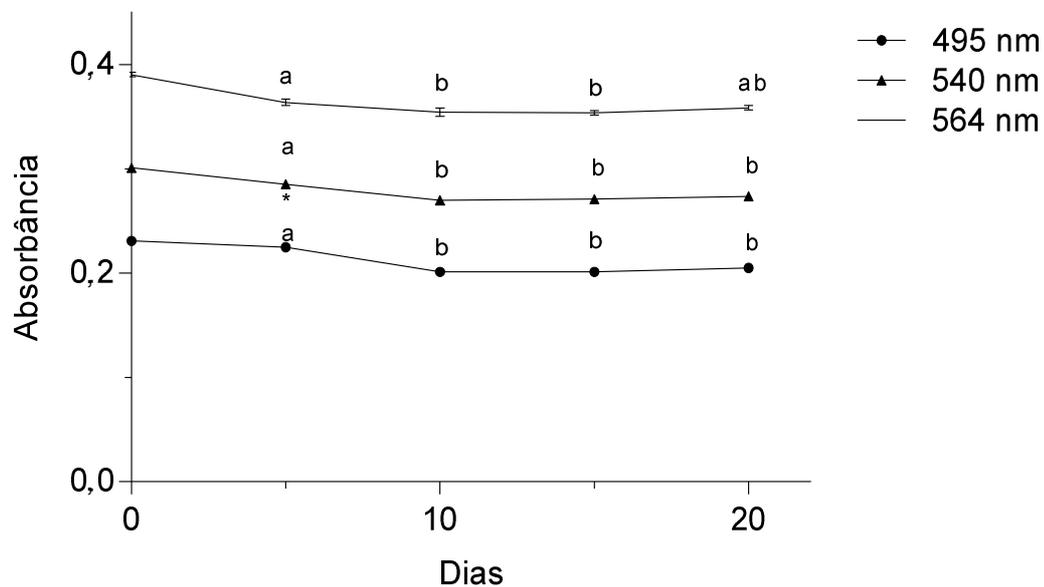
Já a partir de cinco dias de armazenamento é visível a perda da intensidade de fluorescência em 38,8, 73,7 e 100% sob as temperaturas de - 20, 4 e 25 °C, respectivamente. Após o período de 20 dias, somente a R-FEHm mantida a -20 °C mostrou fluorescência, apresentando ainda 36,4% da intensidade de fluorescência inicial. O rápido decaimento da fluorescência sob as temperaturas de 4 e 25 °C mostra a inviabilidade deste tipo de estocagem para este pigmento. Munier *et al.* 2014

avaliaram o armazenamento de R-FEs extraídas da macroalga marinha vermelha *Grateloupia turuturu*, em condições semelhantes às apresentadas neste trabalho, sob as temperaturas de 4 e -20 °C durante 14 dias, a condição de -20 °C foi a mais indicada para a manutenção espectroscópica do pigmento, porém nenhum dado estatístico ou gráfico foi fornecido por nenhum dos autores para melhor comparação com este trabalho. Bastos-filho (2016) concluiu que a estabilidade espectroscópica da R-FE da alga *S. filiformis* é mantida por até 30 dias sob as temperaturas de -20 e 4°C. O uso de conservantes e agentes que inibem a degradação das proteínas também é relatado para a manutenção das características espectroscópicas das ficobiliproteínas (SUN *et al.*, 2009; KAWSAR *et al.*, 2011; SUDHAKAR *et al.*, 2015).

Quando a R-FEHm foi mantida a 25 °C por vinte dias, seus picos máximos de absorção a 495, 540 e 564 nm apresentaram um decréscimo de 89,7, 89,7 e 92,8% respectivamente (Gráfico 14), concluindo assim que a melhor condição de armazenamento da R-FEHm é sob temperaturas de refrigeração.

O pico de absorbância a 495 nm, gráficos 12 e 13, mostrou maior estabilidade frente às temperaturas de armazenamento, semelhante aos resultados obtidos no ensaio de termoestabilidade. Ainda de acordo com esses gráficos foi possível observar que os picos máximos de absorbância (PUB e PEB) permaneceram constantes durante os 20 dias do experimento sob as temperaturas de -20 e 4 °C.

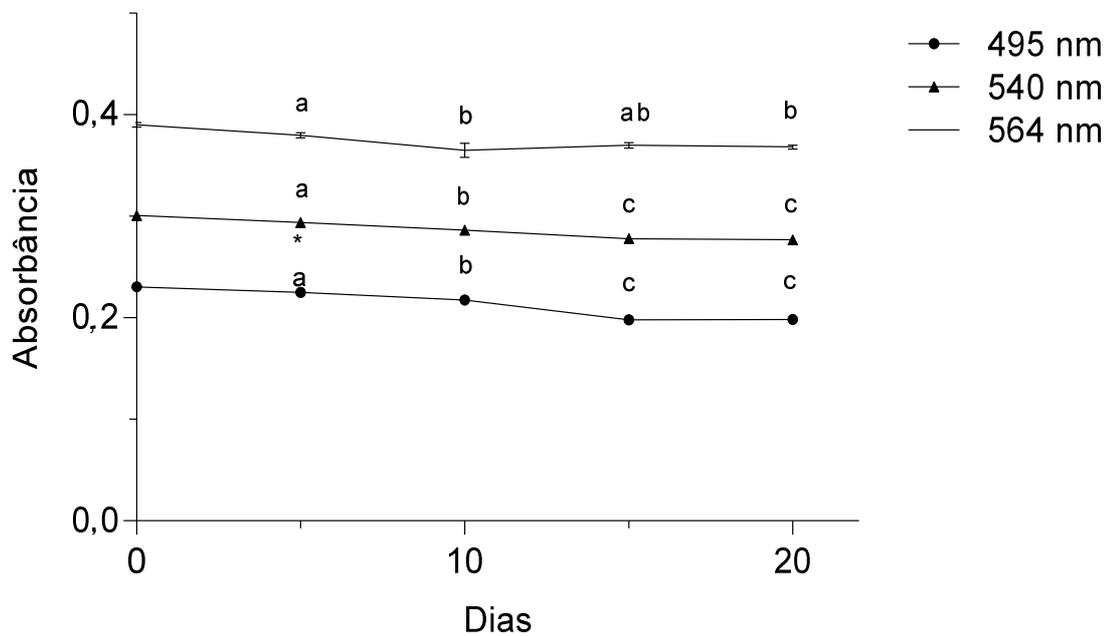
Gráfico 12 – Estabilidade dos picos de absorção da R-FEHm armazenada no escuro e sob a temperatura de -20°C durante vinte dias.



Legenda: Os comprimentos de onda foram analisados separadamente, letras iguais indicam que não diferem estatisticamente, e * significa que não difere estatisticamente na absorbância inicial (0 dias).

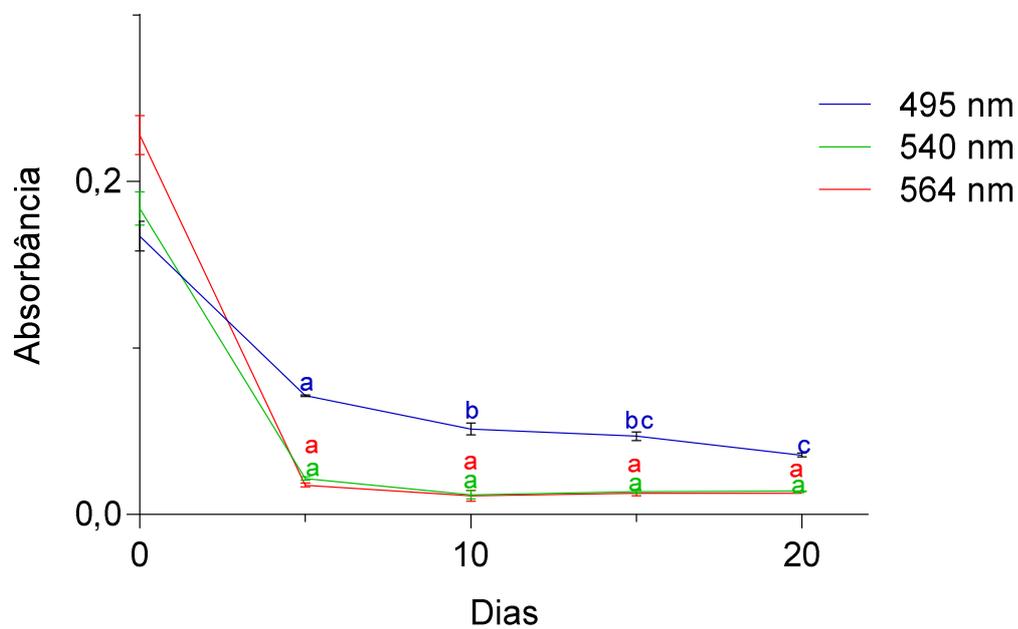
Fonte: Elaborado pela autora

Gráfico 13 – Estabilidade dos picos de absorção da R-FEHm armazenada no escuro e sob a temperatura de 4°C durante vinte dias.



Legenda: Os comprimentos de onda foram analisados separadamente, letras iguais indicam que não diferem estaticamente, e * significa que não difere estaticamente na absorbância inicial (0 dias).
Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 14 – Estabilidade dos picos de absorção da R-FEHm armazenada no escuro e sob a temperatura de 25°C durante vinte dias.



Legenda: Os comprimentos de onda foram analisados separadamente, letras e cores iguais indicam que não diferem estaticamente. **Fonte:** Elaborado pela autora.

5.9 Considerações finais

O desenvolvimento do presente trabalho resultou na purificação de dois pigmentos fluorescentes (ficobiliproteínas) extraídos da macroalga marinha *H. musciformis* com diferentes características e aplicações biotecnológicas, como mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Ficobiliproteínas da macroalga *H. musciformis*, purificação e caracterização espectroscópica.

Características	Ficobiliproteínas		
	R-FC	R-FE	R-FEHm
Coloração	Azul	Vermelho	Vermelho
IP	0,43	2,44	4,17
Rendimento ($\mu\text{g/g}$)	3,91	10,21	8,56
Massa molecular das subunidades (kDa)	-	20, 22 e 31	
Picos de absorção (nm)	550 e 610	495, 540 e 564	
Pico de emissão de fluorescência (nm)	-	575	
Estrutura secundária (% α -helice)	-	95,35	
Termoestabilidade espectrofotométrica ($^{\circ}\text{C}$)	-	60,0	
Temperatura de armazenamento ($^{\circ}\text{C}$)	-	- 20	
Tempo de armazenamento (dias)	-	20	
Aplicação	Alimentos	Alimentos	Biotecnologia

Legenda: IP = Índice de Pureza; Rendimentos calculados com base no peso fresco da alga (-) Não determinado. **Fonte:** Elaborado pela autora

6 CONCLUSÃO

A macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*, coletada no litoral cearense, é fonte dos pigmentos R-ficocianina e R-ficoeritrina, os quais possuem um grande potencial de aplicação biotecnológica. A R-ficocianina, parcialmente purificada, apresentou índice de pureza de 0,43 e menor rendimento do que a R-ficoeritrina, a qual apresentou índices de pureza de 2,44 e 4,17 compatíveis com aplicações em diferentes áreas da indústria e da ciência (alimentos e biotecnologia, respectivamente). A R-ficoeritrina de *H. musciformis* (R-FEHm) apresentou os três picos característicos de absorvância (495, 540 e 564 nm) e emissão de fluorescência (575 nm), alta termoestabilidade, estrutura secundária em α -hélice predominante constituída de três subunidades monoméricas (α , β e γ) com massas moleculares distintas e propriedades espectroscópicas estáveis por até 20 dias em condições de armazenamento sob refrigeração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.
- ALLIANCE PROTEIN LABORATORIES. Em: <http://www.ap-lab.com/CD_services.htm>; Acesso em julho de 2016.
- APT, K. E.; COLLIER, J. L.; GROSSMAN, A. R. Evolution of the Phycobiliproteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 248, p. 79–96, 1995.
- AUMACK, C. *Hypnea musciformis* branching, 2009 Em<<http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/31028>> Acesso em: maio/2016.
- AROAZ, R., LEBERT, M., HÄDER, DP. Electrophoretic applications of phycobiliproteins. **Electrophoresis**, v.19, p.215–19, 1998.
- ARASAKI, S. & ARASAKI, T. **Vegetables from the Sea**. Japan Publications, Inc. Tokyo, 1983.
- BASTOS-FILHO, A. J. U. Purificação e caracterização do pigmento fotossintético R-FE da macroalga marinha vermelha *S. filiformis* (Kützinger) P. W. Gabrielson. **Dissertação**. (Pós-graduação em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, p.88, Fortaleza, 2016.
- BHAT, V. B. AND MADYASTHA, K. M., Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 285, No. 2, 262, 2001.
- BECKER, E. W. **Microalgae — Biotechnology and Microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 429-512, 1994
- BERCHEZ, F.A.S., OLIVEIRA FILHO, E.C. Mariculturalessays with the carragenophyte *Hypnea musciformis* in São Paulo, Brazil. In: E.C.F. Oliveira & N.Kautsky (eds.). **Cultivation of seaweeds in Latin América**. São Paulo, Universidade de São Paulo, Pp. 89-94, 1990.
- BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. **Journal of chromatography. A**, v. 917, n. 1-2, p. 135–45, 2001.
- BERNARD, C.; ETIENNE, A. L.; THOMAS, J. C. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (rhodophyta) **Journal of phycology**, v. 32, p. 265-272, 1996.

BEZERRA-NETO, J.T.B.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C. & FARIAS, W.R.L. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, 3(2): 50-62, 2008.

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

BRAVIN, ISOLDA C.; YONESHIGUE-VALENTIN, YOCIE. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento in vitro de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 469-474, 2002.

BRITTON, G. UV/ visible spectroscopy. In: BRITTON, G. et al. (Eds). **Carotenoids, spectroscopy**. Birkhauser, v.1, p.13-62, 1995.

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

BRYANT, D. A. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 835–844, 1982.

CASTILHO. **A importância das cores nos alimentos**. 2010. Disponível em: <<http://www.bbel.com.br/qualidade-de-vida/post/a-importancia-das-cores-nos-alimentos.aspx>>. Acesso em: 01 de março de 2016.

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. **Biology**. 6th ed., Benjamin Cummings, p.220 - 315, 2001.

CARVALHO, L. R. de; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química nova**, v. 23, n.6, 2000.

CHANG, W. R.; JIANG, T.; WAN, Z. L.; ZHANG, J. P.; YANG, Z. X.; LIANG, D. C. Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 262, p. 721–731, 1996.

CHEN, M., BLANKENSHIP, R. Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. **Trends in Plant Science**, v.16, n.8, p.427-431, 2011.

CHEN, F.; ZHANG, Y; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters, Kew**, v. 18, n.5, p. 603-608, 1996.

CHEW, Y. L., LIM, Y. Y., OMAR, M., KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in south East Asia. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, p.1067 -1072, 2008.

CHUNER, C., CHUNXIA, L., SHUXIAN, W., QING, W., ZIYE, G., & PEIMIN, H. Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. **Natural Science**, v.4(8), p.536–543, 2012.

CIAN, R. E., MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O., & DRAGO, S. R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. **Food Research International**, 49(1), 364–372, 2012.

CONTRERAS-MARTEL, C.; MARTINEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M.; LEGRAND, P.; PIRAS, C.; VERNEDE, X.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. **Acta Crystallogr.**, v. 57, p. 52-60, 2001.

CORDEIRO L. M., CARBONERO E. R., SASSAKI G. L., REIS R. A., STOCKER-WORGOTTER E., GORIN P. A. J., IACOMINI M. A fungus-like β -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. FEMS Microbiol. Lett. 244, 193–198, 2006.

COSTA, R. C.C. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS PIGMENTOS DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta), 61f. **Monografia** Universidade Federal do Ceará. Color., enc.; 30 cm, 2013.

CRAIG, K. R. Protecting international marine biodiversity: International treaties and national systems of marine protected areas. **Journal of Land Use**, v.20, n.2, p.337 - 373, 2005.

D'AGNOLO, E., MURANO, E., RIZZO, R., & PAOLETTI, S. A biliprotein from the red alga *Gracilaria longa*: Thermal stability of R-phycoerythrin. **Italian Journal of Biochemistry**, 42, 316-318, 1993.

DENIS, C.; LEDORZE, C.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Grateloupia turuturu*. **Botanica Marina**, v. 52, n. 3, p. 278–281, 2009.

DENNY M. W. AND S. D. GAINES, eds. *Encyclopedia of Tidepools and Rocky Shores*. University of California Press. 735 pp, 2007.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DÍAZ-RUBIO, M. E., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber and antioxidant capacity in fucus vesiculosus products. **International Journal of Food Science and Nutrition**, p.1-12, 2008.

DONIA, M., HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.338-348, 2003.

DUARTE, M. C. **The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and technological challenges**. Fundación BBVA. Bilbao, Spain, 2006.

DUERRING, M.; SCHMIDT, G. B.; HUBER, R. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoerythrin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 217 (3), p. 577–592, 1991.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technol. Biotechnol.**, v.44, p. 313-321, 2006.

- DUFOSSÉ, L.; GALAUPA, P.; YARONB, A.; ARADB, S. M., BLANCC, P.; RAVISHANKARD, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends Food Sci. Tech.** v.16: p.389–406, 2005.
- DUMAY, J.; CLÉMENT, N.; MORANÇAIS, M.; FLEURENCE, J. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 21–27, 2013.
- DUMAY, J.; MORANÇAIS, M.; MUNIER, M.; LE GUILLARD, C.; FLEURENCE, J. Chapter Eleven - Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. In: **Sea Plants**. [s.l: s.n.]. v. Volume 71p. 321–343, 2014.
- ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology. Lett.** 30: 1525 – 1536, 2008.
- ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 80:1–14, 2008-b.
- ESTRADA, J.E.P.; BESCÓS, P.B.; FRESNO, A.M.V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protein extract. **II Farmaco**, v.56, n.5/7, p.497-500, 2001.
- FACCINI, A.L., BERCHEZ, F. Management of natural beds and standing stock evaluation of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta) in south-eastern Brazil. **Journal of Applied Phycology** 12:101-103, 2000.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture**, Rome, 2014.
- FIGNER, R.; HUBER, R. Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the γ subunit. **European Journal of Biochemistry**, v. 218, p. 103–106, 1993.
- FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. **Trends in Food Science & Technology**, 10, 25–28, 1999.
- FLEURENCE, J. R-Phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in Biotechnology. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n. 1, p. 63–68, 2003.
- FLEURENCE, J. Chapter Nine - Seaweed proteins. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in Food Processing**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, p. 197–213, 2004.
- FLYNN, A. **Farmed Seaweed**. Monterey Bay Aquarium Research Institute, USA. 2014.
- FRANCAVILLA, M.; MANARA, P.; KAMATEROU, P.; MONTELEONE, P.; ZABANIOTOU, A. Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of phycobiliproteins and pyrolysis of residue. **Bioresource Technology**. v.184, Pages 305–313, 2015.

FRANCESCHINI, I. M. BURLIGA, L. A. REVIERES, B. PRADO, J. F. REZIG, S. H.
Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre:
Artmed, p.332, 2009.

FRESHWATER D.W., FREDERIC S., BUTLER B.S, HOMMERSAND M.H. & CHASE
M.W. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid rbcL.
**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America** 91: 7281-7285, 1994.

FITZGERALD, C.N., GALLAGHER, E., TASDEMIR, D., HAYES, M. Heart health
peptides from macroalgae and their potential use in functional foods. **J. Agric. Food
Chem.** v.59, p.6829-6836. 2011.

GALLAND-IRMOULI, A. V.; PONS, L.; LUÇON, M.; VILLAUME, C.; MRABET, N. T.;
GUÉANT, J. L.; FLEURENCE, J. 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**, v. 739, n. 1, p. 117–123, 2000.

GLAZER, A. N.; APELL, G. S.; HIXSON, C. S.; BRYANT, D. A; RIMON, S.;
BROWN, D. M. Biliproteins of cyanobacteria and Rhodophyta: Homologous family of
photosynthetic accessory pigments. **Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 2, p. 428–431, 1976.

GLAZER, A. N. Light harvesting by phycobilisomes. **Annual review of biophysics
and biophysical chemistry**, v. 43, n. 64, p. 47–77, 1985.

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

GLAZER A.N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **J
Appl Phycol**, p. 105–112, 1994.

GLAZER, A. N; HIXON, S. C.Characterization of R-phycoerythrin. Chromophore
content of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin.**The Journal of Biological
Chemistry** v.250, p.5487-5495, 1975

GERALDINO, P.J.L., RIOSMENA-RODRIGUEZ, R., LIAO, L.M & BOO, S.M.
Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta), with
a description of *H.caespitosa* sp. nov. **J. Phycology**. 46,336-345, 2010.

GERALDINO, P.J.L., YANG, E.C, KIM, M.S. & BOO, S.M. Systematics of *Hypnea*
asiatica sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) based on morphology and nrDNA SSU,
plastid rbcL, and mitochondrial cox1. **TAXON** 58(2). 606-616, 2009.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, E.; ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; ORTIZ-SALMERÓN, E.;
BACARIZO, J.; CUADRI, C.; MAZZUCA-SOBCZUK, T.; IBÁÑEZ, M. J.; CÁMARA-
ARTIGAS, A.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S. Thermal and pH Stability of the B-
Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. **Food Biophysics**, v. 9, n.
2, p. 184–192, 2014.

GRAHAM, L.E; WILCOX, L. W. **Algae**. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, 2000.

- GRANHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. São Francisco: Pearson Education. p.616, 2009.
- GRAY, J. S. Marine Biodiversity: patterns, threats and Conservation needs. **Biodiversity and conservation**, v.6, p.153 -175, 1997.
- GREEN, A. A; HUGHENS, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods Enzymol.*, v.1, p.67-90, 1955.
- GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiology**. Rev. 57(3): 725-749, 1993.
- HILDITCH, C. M.; BALDING, P.; KAKINS, R.; SMITH, A. J.; ROGERS, L. J. C-Phycocyanin from the cyanobacterium *Aphnothece halophytica*. **Journal of Applied Phycology**. v. 3, 345- 354, 1991.
- HU, G. P., YUAN, J., SUN, L., WU, Z. G., LAN, X. J., ZHU, X., LIN, Y.C., CHEN, S. P. Statistical Research on Marine Natural Products Based on data Obtained Between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v.9, n.4, p.514 –525, 2011.
- INDEGAARD, M., MINSAAS, J. Animal and human nutrition. In Guiry MD, Blunden G, eds. **Seaweed resources in Europe**. Uses and potential. Wiley. p 21–64, 1991.
- ISAILOVIC, D., SULTANA, I., PHILLIPS, G. J., & YEUNG, E. S. Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobilin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. **Analytical Biochemistry**, 358(1), 38–50., 2006.
- 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**, v. 34, n. 2, p. 224–231, 1999.
- JIMENEZ, J. T., ŠTURDÍKOVÁ, M., ŠTURDÍK, E. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. **Acta Chimica Slovaca**, v.2, n.2, p.63-74, 2009.
- JOHNSON, E. M.; KUMAR, K.; DAS, D. Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated Nostoc sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 541–547, 2014.
- KARLESKINT, G., TURNER, R., SMALL, W. J. **Introduction to Marine Biology**. Third Edition. Brooks/Cole, Cengage learning. Belmont, United States of America, 2010.
- KAWSAR, S. M. A.; FUJII, Y.; MATSUMOTO, R.; YASUMITSU, H.; OZEKI, Y. Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. **Phytologia Balcanica**, v. 17, n. 3, p. 347–354, 2011.
- KEHOE, D. M. Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9029–30, 2010.

KHANA VI , M., NABA VI, M., SADATI, N., ARDEKANI, M. S., SOHRABIPOUR, J., NABA VI, S. M. B., GHAE LI, P., OSTAD, S. N. Cytotoxic activity of some marine brown algae against Cancer cell lines. **Biological research**, 43:31 -37, 2010.

KAIXIAN, Q., FRANKLIN, M., & BOROWITZKA, M. A. The study for isolation and purification of R-phycoerythrin from a red alga. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 43, 133–139, 1993.

KNUTSEN, S.H., MURANO, E., D'AMATO, M., TOFFANIN, R., RIZZO, R., PAOLETTI, S., Modified procedures for extraction and analysis of carrageenan applied to the red alga *Hypnea musciformis*. **Appl. Phycol.** v.7, p.565-576, 1995.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological. Applications of C-Phycocyanin. **BioMed Research International**. Hindawi, p. 1-9, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LAMOUREUX, J.V. Essai sur les genres de la famille des thalassiphytes non articulées. **Annales du Muséum d'Histoire Naturelle**[Paris] 20:21-47, 115-1139, 267-293, pls. 7-13, 1813.

LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. New York, NY: Cambridge University Press, 2008.

LE GUILLARD, C.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BRUZAC, S.; RAGON, J.Y.; FLEURENCE, J.; BERGÉ, J.P. Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. **Algal Research**, v. 12, p. 522–528, 2015.

LIU, L. N.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 91–100, 2005.

LI SUN, SHUMEI WANG, XUEQIN GONG, MINGRI ZHAO, XUEJUN FU LU WANG. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica* **Protein Expression and Purification** v.64, p.146–154, 2009.

LIU, Q.; WANG, Y.; CAO, M.; PAN, T.; YANG ,Y.; MAO, H.; SUN, L.; LIU, G. Anti-allergic activity of R-phycocyanin from *Porphyra haitanensis* in antigen-sensitized mice and mast cells. **Int Immunopharmacol.** v.25(2):465-73, 2015.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374–381, 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. São Carlos, SP: RiMa, 2006.

LU-NING; CHEN. Xi-Ying. Z; ZHANG. Yu-Zhong; ZHOU. Bai-Cheng. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology** v. 116, p. 91–100, 2005.

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

MARTINS, Aline P.; YOKOYA, Nair S. Intraspecific variations in colour morphs of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) in relation to nitrogen availability. **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 601-615, 2010.

MAYER, A. M. S., RODRÍGUEZ, A. D., BERLINCK, R. G. S. HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antibuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1790: 283 -308, 2009.

McCOLL R, EISELE LE, WILLIAMS EC, BOWSER S. The discovery of a novel R phycoerythrin from Antarctic red alga. **J Biol Chem**, 271:17157–60, 1996.

MISHRA, S. Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. **Protein Expression and Purification**, v. 80, p. 234–238, 2010.

MORAES, C. C. Extração e purificação de Ficocianina de *Spirulina platensis*. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS, 2006.

MORGAN, K. C., WRIGHT, J. L. C., & SIMPSON, F. J. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (Dulse). **Economic Botany**, 34(1), 27–50, 1980.

MSHIGNEI, K.E. The Biology and ecology of benthic marine algae with special reference to *Hypnea Lamouroux* (Rhodophyta). **Nova Hedwigia** v. 29, p. 859-894, 1978.

MUNIER, M.; JUBEAU, S.; WIJAYA, A.; MORANÇAS, M.; DUMAY, J.; MARCHAL, L.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 150, p. 400–407, 2014.

MUNIER, M.; MORANÇAS, M.; DUMAY, J.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. **Journal of Chromatography B**, v. 992, p. 23–29, 2015.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R.. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v.24 (11): p.509-515, 2006.

NAGANO, C. S., DEBRAY, H., NASCIMENTO, K. S., PINTO, V. P. T., CAVADA, B. S., SAKER-SAMPAIO, S., FARIAS, W. R. L., SAMPAIO, A. H. & CALVETE, J. J.

HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin Family. **Protein Sci.** v.14, p.2167–2176, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOBRE, C. A. V. Isolamento, purificação e caracterização parcial da estrutura primária de uma ficobiliproteína da alga marinha vermelha *hypnea musciformis* (wulfen) lamouroux. **Dissertação**. UFC, 55P, 2015.

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**, v. 49, n. 1, p. 23–31, 2006.

OLIVEIRA, S.R.C. Implatação de cultivo experimental de algas marinhas da espécie *Gracilaria cornea* (Rodophyta, Gracilariales) nas comunidades de Galeão e Garapuá, Cairu – Ba. **Monografia** (Bacharel em Ciências Biológicas) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

PAN, Q.; CHEN, M.; LI, J.; WU, Y.; ZHEN, C.; LIANG, B. Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. **Biological research**, v. 46, n. 1, p. 87–95, 2013.

PAULA, E. J.; PEREIRA, R.T. L.; OHNO, M. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, v. 50, p. 1-9, 2002.

PATEL, A.; PAWAR R.; MISHRA S.; SONAWANE, S.; GHOSH, P. K. Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycoerythrin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 254-257, 2004.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GOSH, K. P Purification and characterization of Cphycoerythrin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat, **Protein Expres. Purif.** v.40, p.248–255, 2005.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of Cphycoerythrin. *Biochemical Engineering Journal*, on-line, 2006. <http://www.sciencedirect.com> [accessado em 29 junho 2016].

PEREIRA, M.G., BENEVIDES, N.M.B., MELO, M.R.S., VALENTE, A.P., MELO, F.R. & MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action. **Carbohydrate Research**, 340(12): 2015-2023, 2005.

POMPONI, S. A. The Roger Revelle Commemorative Lecture. The Oceans and Human Health: The Discovery and Development of Marine-Derived Drugs. **Oceanography**. v.14, n.1, p 78 –87, 2001.

PROZYME. C-Phycoerythrin (Specifications). Disponível em: <<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Mar. 2016-a.

PROZYME. Allophycoerythrin (Specifications). Disponível em: <<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Mar. 2016-b

PROZYME. R-Phycoerythrin (Specifications). Disponível em:
<<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Mar. 2016-c.

RAMOS et al.; Protein content and amino acid composition in some Brazilian marine algae species. **Physiol.Mol. Biol. Plants**, v. 4, p.165, 1998.

RASTOGI, R. P; SONANI, R. R.; MADAMWAR, D. Physico-chemical factors affecting the in vitro stability of phycobiliproteins from *Phormidium rubidum* A09DM. **Bioresource Technology** v.190, p.219–226, 2015.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2007.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7ª edição. Guanabara/Koogan. Rio de Janeiro, p. 248-259, 1996.

REDDY, M. C., SUBHASHINI, J., MAHIPAL, S. V. K., BHAT, V. B., REDDY, P. S., KIRANMAI, G., MADYASTHA, K. M. AND REDDANNA, P., C-Phycocyanin, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Apoptosis in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 304, No. 2, 385, 2003.

REIS, R.P.; BARROS-BARRETO, M.B.; CALDEIRA, A.Q. & MIRANDA, A.P.S. Cultivo de algas vermelha de interesse comercial na Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: **Anais da X Reunião Brasileira de Ficologia**. Salvador 2004. Rio de Janeiro, Museu Nacional.Série Livros10. Pp. 287-300, 2005.

REIS, R.P.; BARROS-BARRETO, M.B.; CALDEIRA, A.Q. & MIRANDA, A.P.S. Potencial para maricultura da carragenófito *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales - Rhodophyta) na Ilha da Marambaia, Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Acta Botânico Brasileiro**. V.20, n.4, p.763-769, 2006.

RIBEIRO, E. P. & SERAVALLI, E. A. G.. Química de Alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia. **Editora Edgard Blücher Ltda**, 1ª edição, São Paulo, p.155-157, 2004.

RICHARDSON, L.L.; Remote Sensing of algal bloom dynamics;New research fuses remote sensing of aquatic ecosystems with algal accessory pigment analysis. **BioScience**, v. 46, n. 7, p. 492-501, 1996.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(4), p. 631-639, 2007.

ROMAN, R.B.; ALVAREZ-PEZ J. M.; FERNANDEZ F.G. A.; GRIMA E. M. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 73-85, 2002.

ROSSANO, R.; UNGARO, N.; D'AMBROSIO, A.; LIUZZI, G.; RICCIO, P. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 289–293, 2003.

ROSS J., SULEV M. Sources of errors in measurements of PAR. - **Agric. and Forest Meteorology**, v.100, n.2-3, p.103-125, 2000.

SAÁ, C.F. **ALGAS DO ATLÂNTICO, Alimento e Saúde. Propriedades, receitas e descrição.** Algamar, Redondela - Pontevedra, 272 pp, 2002.

SALA, E., KNOWLTON, N. **Global Marine Biodiversity Trends.** Annual Review of Environment and Resources, 31: 93 -122, 2006.

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

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

SARKAR M. A. K; YUKI, F; RYO, M.; HIDETARO, Y. & YASUHIRO, O. Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. **Phytologia balcanica** 17(3): 347–354, Sofia, 2011

SAUNDERS G.W., CHIOVITTI, A. & KRAFT, G.T. Small-subunit rDNA sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 3.Delineating the Gigartinales sensu stricto. **Can. J. Bot.** 82:43-74, 2004.

SEKAR, S., CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, 20(2), 113–136, 2008.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.361-371, 2002.

SEPÚLVEDA-UGARTE, J.; BRUNET, J. E.; MATAMALA, A. R.; MARTÍNEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M. Spectroscopic parameters of phycoerythrobilin and phycourobilin on phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 219, n. 2-3, p. 211–216, 2011.

SENTHILKUMAR, N.; SURESH, V.; THANGAM, R.; KURINJIMALAR, C.; KAVITHA, G.; MURUGAN, P.; KANNAN, S.; RENGASAMY, R. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **Int J Biol Macromol.** v. 55, p. 150-160, 2013.

SIDLER, W. A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. In: BRYANT, D. A. (Ed.). . Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 139–216.

SIERRA, J. M. S. Estudio de la estabilidad de la B-ficoeritrina procedente del alga roja *Porphyridium cruentum* em funcion de la temperatura, para su utilización como colorante natural. **Monografía** – Universidad de Almería – Departamento de química y física, pg 8, 2014.

- SILVA, L. A. Estudo do Processo Biotecnológico de Produção, Extração e Recuperação do Pigmento Ficocianina da *Spirulina platensis*. **Dissertação**. UFPR. Curitiba, 90 p., 2008
- SIMMONS, T. L., ANDRIANASOLO, E., MCPHAIL, K., FLATT, P., GERWICH, W.H. Marine Natural Products as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutic**, v.4, n.2, p.333–42, 2005.
- SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **J. Biosci. Bioeng.** Vol. 101, No 2: 87-96, 2006.
- STEELE, J. H., THORPE, S. A., TUREKIAN, K. K. **Marine Biology: A Derivative of the Encyclopedia of Ocean Sciences**. Second Edition. Elsevier. Oxford, United Kingdom, 2009.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H.; As clorofilas. **Ciência Rural. Santa Maria**. v.35, n.3, p. 748-755, 2005.
- SETYANINGSIH, I. BINTANG, M. MADINA, N. Potentially Antihyperglycemic from Biomass and Phycocyanin of *Spirulina Fusiformis* Voronikhin by in Vivo Test. **Procedia Chemistry**, v: 14 pp: 211-215, 2015.
- SUDHAKAR, M. P.; JAGATHEESAN, A.; PERUMAL, K.; ARUNKUMAR, K. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. **Algal Research**, v. 8, p. 115–120, 2015.
- SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; CHEN, L. A rod-linker-contained R-phycoerythrin complex from the intact phycobilisome of the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 76, n. 1-3, p. 1–11, 2004.
- SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; ZHAO, M.; FU, X.; WANG, L. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 2, p. 146–154, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, P.819, 2009.
- TARGETT, N., BAIER, R., GERWICK, W., GRIMES, W., POMPONI, S., PRINCE, R. **Marine Biotechnology in the Twent –First Century Problems, Promise, and Products**. National Academy Press. Washington, United States of America, 2002.
- THANGAM, R.; SURESH V.; PRINCY W. A.; RAJKUMAR M.; KUMAR N. S.; GUNASEKARAN P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN C.; KAVERI K.; KANNAN S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. **Food Chemistry**. v. 1402, p. 62–272, 2013.
- THORNE –MILLER, B. **The living Ocean: Understanding and Protecting the Marine Diversity**. Sixth Edition. Foreword By Sylvia Earle. Washington, United States of America, 1999.
- TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M.. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de textos, 2008.

UEVORA, Em < <http://materiais.dbio.uevora.pt/Micro/slides/08/11.jpg>> Acesso em: abril/2016.

VALLE, M. G. O sistema nacional de inovação em biotecnologia no Brasil: possíveis cenários. 249 p., **Tese** (Doutorado em Política Científica e Tecnologia) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. Maringá-PR, **Química Nova**, vol.27, n.1, 2004.

WALLNER, M.; LOBO, S.; BOCCANERA, N. & SILVA, E.M. Biomass, carrageenan yield and reproductive state of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta : Gigartinales) under natural and experimental cultivated conditions. **Aquaculture Fisheries Manage** v.23: p.443-451, 1992.

WANG, G.; ZHOU, B.; ZENG, C. Isolation, properties and spatial site analysis of gamma subunits of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 41, n. 1, p. 9–17, 1998.

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

WANG, L.; WANG, S.; FU, X.; SUN, L. Characteristics of an R-Phycoerythrin with Two γ Subunits Prepared from Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 120-333, 2015.

WARNER, R. **Protecting the oceans beyond national jurisdiction**. Martinusnijhoff Publishers. Leiden, Netherlands, 2009.

WETZEL, R. G. **Limnology**. Academic press, v. 3,p. 1006, 2201.

WELINGER, C. **Biología y Oceanografía: Conceptos e procesos**. Consejo Nacional d Libro Y La Lectura – Universidad de Concepcion. Trama Impresores S.A. Chile. P.700, (ED) 2004.

WEAVER, E.C. WRIGLEY, R. **Factors affecting the identification of phytoplankton groups by means of remote sensing**. Moffet Field: NASA, p. 121, 1994.

WOMERSERLEY, H.B.S. The marine bethic flora of Southern Australia, Rhodophyta. Part IIIA. Bangiophyceae and Florideophyceae (Acrochaetiales, Nemaliales, Gelidiales, Hildenbrandiales and Gigartinales sensu lato.) **Australian Biological Resources Study**, Canberra, 1994.

WU, Q.; FU, X. P.; SUN, L. C.; ZHANG, Q.; LIU, G. M.; CAO, M. J.; CAI, Q. F. 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 & Technology**, p. n/a–n/a, 2015.

YASUHARA-BELL,J., LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, v.86: 231 –240, 2010.

YOON, H.S., MÜLLER, K.M., SEAHT, R.G., OTT, F.D. & BHATTACHARYA, D. Defining the Major Lineages of Red Algae (Rhodophyta). **J. Phycology**. 42, 482-492, 2006.

ZHANG, Y.M., CHEN, F. A simple method for efficient separation and purification of c-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Biotechnology**. Tech. 13, 601–603, 1999.

ZHANG, Y.Z., CHEN, X.L., WANG, L.S., ZHOU, B.C., HE, J.A., SHI, D.X., PANG, S.J., 2002. In vitro assembly of R-phycoerythrin from marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *Sheng Wu Hua Xue. Yu Sheng Wu Wu Li Xue. Bao.* (Shanghai) 34, 99–103, 2002.