



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ACRÍSIO JOSÉ UCHÔA BASTOS FILHO**

**Purificação e caracterização do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga  
marinha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson**

**FORTALEZA  
2016**

ACRÍSIO JOSÉ UCHÔA BASTOS FILHO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PIGMENTO VERMELHO  
R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W.  
Gabrielson.

Dissertação 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Norma Maria Barros Benevides

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Márjory Lima Holanda Araújo

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)

---

B326p Bastos Filho, Acrísio José Uchôa.  
Purificação e caracterização do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga marinha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson / Acrísio José Uchôa Bastos Filho. – 2016.  
90 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. R-Ficoeritrina. 2. Pigmento Fluorescente. 3. Corante Natural. 4. *Solieria filiformis*. I. Título.

CDD 572

---

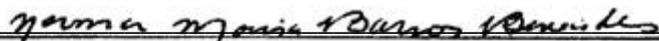
ACRÍSIO JOSÉ UCHÔA BASTOS FILHO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PIGMENTO VERMELHO  
R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W.  
Gabrielson.

Dissertação 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: 15 / 06 / 2016.

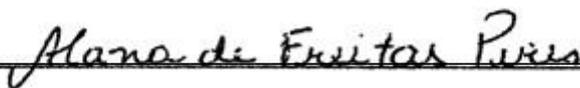
BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Maria Barros Benevides  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Ponte Freitas  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alana de Freitas Pires  
Centro Universitário Estácio do Ceará

A Deus,

Aos meus pais, Acrísio e Rosângela.

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, **Acrísio Bastos** e **Rosângela Bastos**, a quem dedico todas as minhas conquistas, por me apoiarem de todas as formas possíveis durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos **Stélio Bastos** e **Átila Bastos**, por me propiciarem muitos dos meus melhores momentos de alegrias.

À Professora Dr<sup>a</sup>. **Norma Maria Barros Benevides**, por me aceitar e me acolher no seu laboratório, e por toda disponibilidade, ajuda e orientação durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. **Márjory Lima Holanda Araújo**, pela excelente orientação e ensinamento durante todo o desenvolvimento do trabalho, e por todo apoio, amizade, paciência e disponibilidade, mesmo “altas horas da noite” e fora do ambiente de trabalho.

As professoras participantes da banca examinadora a Professora Dr<sup>a</sup>. **Ana Lúcia Ponte Freitas** e a Professora Dr<sup>a</sup>. **Alana de Freitas Pires** pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao professor Dr. **Hermógenes David de Oliveira**, por todo acolhimento, apoio durante a realização deste trabalho e ajuda nos experimentos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. **Maria Raquel Alcântara de Miranda**, por sempre deixar às portas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos (LABFRUTOS) a disposição quando fosse solicitado.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos (LABFRUTOS), em especial a **Mônica Lopes**, **Marcela Rabelo**, **Thais Andrade**, **Kellina Oliveira** e **Jadilson Macedo** por todos os momentos de apoio e descontração vividos no laboratório.

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 **Adson Ávila**, **Caroline Landim**, **Éwerton Lima**, **George Meredith**, **Ingrid Queiroz**, **Márjory Sousa**, **Vilmara Farias** e todos os membros do BioAP pela amizade incondicional e valiosa contribuição nesta conquista.

A todos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC), por todo apoio, em especial aos amigos **Annyta Frota, Renata Rivanor, Natássia Ribeiro e Vitória Virgínia** pelo apoio durante os experimentos e pelos momentos de descontração.

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

A amiga **Rayra Melo Viana**, por todo o apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e alunos de iniciação científica **Áurea Brito, Augusto Filho e James Banner**, por toda ajuda nos experimentos realizados neste trabalho e por toda confiança e apoio durante todo esse período convivendo juntos.

Aos amigos **Antônio Neto, Ticiane Abreu e Ticiane Lima** por todos os ensinamentos e apoio à pesquisa, além de todos os momentos de descontração e companheirismo vividos fora do laboratório.

A **Marina Gabrielle Guimarães de Almeida e Camila Tauane Monteiro do Nascimento** pela convivência diária, por todos os conselhos, pela amizade nos momentos felizes e tristes nesta vida acadêmica e na vida pessoal, e por todas as convivências e momentos de descontração vividos fora da Universidade Federal do Ceará.

A **Roberta Laiz Bezerra Santos Albano (RLBSAlbano)** e a **Roberta Cristiane Cavalcante Costa (RCCCOSTA)**, por todos esses anos convividos juntos e ajudando nos momentos mais difíceis da pesquisa, dando apoio e dizendo que ia dar tudo certo quando tudo parecia perdido, e virando noite no laboratório fazendo experimento se fosse preciso.

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

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

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

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.” (São Francisco de Assis).

## RESUMO

A R-Ficoeritrina (R-FE), um pigmento fotossintético vermelho (ficobiliproteína) presente em macroalgas rodofíceas, tem ampla aplicação em biotecnologia como sonda fluorescente em imunologia, biologia celular, além de corante natural em alimentos e cosméticos. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo purificar e caracterizar parcialmente o pigmento fotossintético fluorescente R-FE da *Solieria filiformis*, macroalga marinha vermelha abundante no litoral nordestino brasileiro e com alto potencial para cultivo no mar. Um esquema de purificação com precipitação proteica (sulfato de amônio 90% de saturação), seguido por cromatografias em matrizes de DEAE-Sephacel e Sephacryl S-300, gerou um pigmento purificado apresentando três picos de absorção (495, 540 e 564 nm), um pico de emissão de fluorescência (575 nm, quando excitada a 495 nm), e um índice de pureza de 4,5, possibilitando sua aplicação como marcador fluorescente na biotecnologia. O processo de purificação da R-FE apresentou uma recuperação de 12,78% e um rendimento de 0,17 mg/g de alga seca. Por eletroforese (PAGE-SDS) a R-FE apresentou uma banda proteica na ausência do agente redutor e três bandas proteicas com massas moleculares de 18, 20 e 37 kDa, referentes as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , na presença do agente redutor. A R-FE apresentou 60% de  $\alpha$ -hélice em sua estrutura secundária, mantendo estabilidade dessa estrutura até 70 °C. As propriedades espectroscópicas da R-FE demonstraram estabilidade até 70 °C, porém, foi observada uma redução de 72,1 % e 98,5 % nos seus espectros de absorção e emissão de fluorescência, respectivamente, somente a 80 °C por 1 hora. A capacidade de absorção da R-FE pura, ao ser armazenada por 30 dias, se manteve estável nas temperaturas de -20 °C e 4 °C, porém, a 25 °C, foi observada uma redução significativa dos picos de absorção com 5 dias (81,6%, 90,6% e 92,7%, em relação aos picos de 495, 540 e 564, respectivamente). Quanto a sua capacidade de fluorescência, foi observada uma redução de 42,5 %, 33,3 % e 100 %, ao ser armazenada por apenas 5 dias nas temperaturas de -20 °C, 4 °C e 25 °C, respectivamente. Diante dos resultados, foi estabelecido um protocolo de purificação para R-ficoeritrina de *S. filiformis*, apresentando um elevado índice de pureza e uma alta massa molecular constituída de três subunidades monoméricas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), apresentando predominância de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice termoestável, propriedades espectroscópicas (absorbância e fluorescência) de elevada estabilidade, e, sobretudo em condições adequadas de armazenamento.

**Palavras-chave:** R-Ficoeritrina; Pigmento Fluorescente; Corante Natural; *Solieria filiformis*.

## ABSTRACT

R-Phycoerythrin (R-PE) is a red photosynthetic pigment (phycobiliprotein) present in Rhodophyta and it has wide application in biotechnology as a fluorescent probe in immunology, cell biology, and natural colorant in foods and cosmetics. Therefore, this study aimed to purify and to characterize partially the fluorescent photosynthetic pigment R-PE from red marine macroalgae *Solieria filiformis*, abundant in the Brazilian northeastern coast with high potential for cultivation in the sea. A purification scheme with protein precipitation (ammonium sulfate 90% saturation) followed by chromatography on matrices DEAE-Sephacel and Sephacryl S-300, produced a purified pigment that have three absorption peaks (495, 540 and 564 nm), one fluorescence emission peak (575 nm when excited at 495 nm) and a purity index of 4.5, enabling it's application as a fluorescent marker in biotechnology. The purification process of the R-PE was a recovery of 12.78% and a yield of 0.17 mg/g of dry seaweed. Electrophoresis (SDS-PAGE) of R-PE showed one protein band in the absence of reducing agent and three protein bands with molecular weight of 18, 20, 37 kDa, regarding the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits, in the presence of a reducing agent. R-PE showed 60% of  $\alpha$ -helix in their secondary structure, while maintaining stability of the structure up to 80 °C. The spectroscopic properties of the R-PE showed stability up to 70 °C, however, a reduction of 72.1% and 98.5% in their absorption and fluorescence emission spectra were observed, respectively, only at 80 °C for 1 hour . The absorption capacity of R-PE, stored for 30 days, remained stable at temperatures of -20 °C and 4 °C, but at 25 °C, a significant reduction of the absorption peak was observed at 5 days (81.6%, 90.6% and 92.7% compared to the peaks 495, 540 and 564, respectively). It was observed reduction of fluorescence capability of 42.5%, 33.3% and 100% when stored for 5 days at 20 °C, 4 °C and 25 °C, respectively. In accord with these results was established a purification protocol for R-phycoerythrin from *S. filiformis*, with a high purity index and a high molecular weight made up of monomeric subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), with predominance of secondary structure in  $\alpha$ -helix thermostable, spectroscopic properties (absorption and fluorescence) of high stability, and especially in appropriate storage conditions.

**Keywords:** R-Phycoerythrin; Fluorescent pigment; Natural dye; *Solieria filiformis*.

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1</b> Diversidade Natural de Coloração de Extratos de Diferentes Espécies de Microalgas Marinhas ( <i>Synechococcus</i> Spp.) devido a Diferenças no Teor de Ficobiliproteínas.....	21
<b>Figura 2</b> Radiação Eletromagnética.....	23
<b>Figura 3</b> Espectro de Absorção dos Pigmentos Fotossintetizantes Ficoeritrina, Ficocianina e Clorofila <i>a</i> presentes em Macroalgas Vermelhas.....	25
<b>Figura 4</b> Representação da Membrana do Tilacóide e dos Ficobilissomos.....	26
<b>Figura 5</b> Representação da Estrutura do Ficobilissomo.....	27
<b>Figura 6</b> Organização das Subunidades das Ficobiliproteínas em Trímeros e Hexâmeros.....	28
<b>Figura 7</b> Estruturas Químicas das Ficobilinas.....	29
<b>Figura 8</b> Representação das Estruturas das Ficoeritrinas contendo as Ficobilinas.....	31
<b>Figura 9</b> Estruturas Parciais da R-Ficoeritrina.....	32
<b>Figura 10</b> Macroalga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae).....	39
<b>Figura 11</b> Fluxograma de Extração e Purificação de R-Ficoeritrina da Macroalga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> .....	43
<b>Figura 12</b> Extratos Brutos Proteicos de <i>Solieria filiformis</i> obtidos após Diferentes Tempos de Contato da Macroalga com Tampão PB.....	50
<b>Figura 13</b> Frações proteicas de <i>Solieria filiformis</i> obtidas por Precipitação com Sulfato de Amônio em Diferentes Faixas de Saturação.....	52
<b>Figura 14</b> Perfil Cromatográfico da F0/90 de <i>Solieria filiformis</i> submetida à Cromatografia de Troca Iônica em matriz de DEAE-Sephacel.....	53
<b>Figura 15</b> Perfil Cromatográfico do PIII-DEAE submetido à Cromatografia de Exclusão Molecular em matriz de Sephacryl S-300.....	54
<b>Figura 16</b> Espectro de Absorção das Soluções Pigmentadas resultantes de cada etapa do Processo de Purificação da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> .....	56
<b>Figura 17</b> Coloração e Fluorescência da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> .....	57

<b>Figura 18</b>	Eletroforese da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na ausência do agente redutor.....	<b>57</b>
<b>Figura 19</b>	Eletroforese da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença do agente redutor.....	<b>58</b>
<b>Figura 20</b>	Características espectroscópicas da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 21</b>	Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 22</b>	Efeito da Temperatura sobre o Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 23</b>	Espectros de Absorção da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> submetida a Diferentes Temperaturas por um período de 1 h.....	<b>63</b>
<b>Figura 24</b>	Efeito da Temperatura sobre a Concentração de R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 25</b>	Espectros de Emissão de Fluorescência da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> submetidas a Diferentes Temperaturas por um período de 1 h.....	<b>65</b>
<b>Figura 26</b>	Efeito da Temperatura sobre o Pico de Emissão de Fluorescência (575 nm) da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> .....	<b>66</b>
<b>Figura 27</b>	Capacidade Fluorescente da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> submetida a 30 dias de Armazenamento em vidro âmbar, sob as Temperaturas -20, 4 e 25 °C.....	<b>67</b>
<b>Figura 28</b>	Estabilidade dos Picos de Absorção da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> Armazenada em vidro âmbar, a Temperatura de -20 °C por 30 dias.....	<b>68</b>
<b>Figura 29</b>	Estabilidade dos Picos de Absorção da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> Armazenada em vidro âmbar, a Temperatura de 4 °C por 30 dias.....	<b>69</b>
<b>Figura 30</b>	Estabilidade dos Picos de Absorção da R-Ficoeritrina pura de <i>Solieria filiformis</i> Armazenada em vidro âmbar, a Temperatura de 25 °C por 30 dias.....	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabela 1</b> Pigmentos e Componentes da Parede Celular de Macroalgas Marinhas Verdes, Pardas e Vermelhas.....	<b>19</b>
<b>Tabela 2</b> Valor Comercial de Ficobiliproteínas.....	<b>22</b>
<b>Tabela 3</b> Distribuição, Procedimentos Propostos para Purificação e Rendimentos de R-Ficoeritrina de Macroalgas Vermelhas.....	<b>35</b>
<b>Tabela 4</b> Tabela de Purificação da R-Ficoeritrina da Macroalga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> .....	<b>56</b>
<b>Tabela 5</b> Elementos de Estrutura Secundária, estimados a partir do Espectro de Dicroísmo Circular, da R-Ficoeritrina pura em Diferentes Temperaturas.....	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
Mg	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
Mm	Micrometro
$\lambda_{\text{max}}$	Comprimento de onda de máxima absorção
$A_{280}$	Absorbância a 280 nm
$A_{562}$	Absorbância a 562 nm
$A_{564}$	Absorbância a 564 nm
$A_{618}$	Absorbância a 618 nm
$A_{730}$	Absorbância a 730 nm
AFC	Aloficocianina
ANOVA	Análise de variância
b-FE	b-ficoeritrina
B-FE	B-ficoeritrina
BSA	Albumina sérica bovina
C-FE	C-ficoeritrina
CU-FE	CU-ficoeritrina
CD	Dicroísmo Circular
Cm	Centímetro
DEAE	Dietilaminoetil
DIC	Dainippon Ink & Chemicals
EBP-Sf	Extrato Bruto Protéico de <i>Solieria filiformis</i>
F0/20	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio a 20% de saturação
F20/40	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio de 20 a 40% de saturação
F40/60	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio de 40 a 60% de saturação
F60/80	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio de 60 a 80% de saturação
F80/90	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio de 80 a 90% de saturação
F90/100	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio de 90 a 100% de saturação
F0/90	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio a 90% de saturação
FE	Ficoeritrina
FEC	Ficoeritrocianina

FC	Ficocianina
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
g	Grama
HCl	Ácido Clorídrico
IF	Intensidade de Fluorescência
IP	Índice de Pureza
kDA	Quilodaltons
M	Metro
M	Molar
mA	Miliampère
mdeg	Miligradu
mg	Miligrama
mgP	Miligrama de Proteína
min	Minuto
mL	Mililitro
n°	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amônio
Nm	Nanômetro
PI	Pico I
PII	Pico II
PIII	Pico III
PIV	Pico IV
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	Tampão fosfato de potássio 0,025 M, pH 6,5
PCB	Ficocianobilina
PEB	Ficoeritrobilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PUB	Ficourobilina
PXB	Ficoviolobilina
R-FE	R-Ficoeritrina
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Hidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta
US\$	Dólar dos Estados Unidos
V	Volt

## SUMÁRIO

	PÁGINA
1	INTRODUÇÃO..... 18
1.1	Classificação e Importância Ecológica das Algas..... 18
1.2	Importância Econômica das Macroalgas Marinhas..... 19
1.3	Pigmentos Fotossintéticos de Macroalgas Vermelhas..... 23
1.3.1	<i>Ficobiliproteínas</i> ..... 23
1.3.1.1	<i>Ficoeritrinas</i> ..... 30
1.4	Extração, Purificação e Aplicação de R-Ficoeritrinas..... 33
1.5	Hipótese/Justificativa..... 36
2	OBJETIVOS..... 37
2.1	Geral..... 37
2.2	Específicos..... 37
3	MATERIAIS..... 38
3.1	Macroalga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> ..... 38
3.2	Reagentes Químicos..... 38
4	MÉTODOS..... 40
4.1	Efeito do Tempo sobre o Rendimento e a Produtividade dos Processos de Extração da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> ..... 40
4.2	Purificação do Pigmento R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> ..... 41
4.2.1	<i>Fracionamento Proteico do Extrato Total por Sulfato de Amônio</i> .... 41
4.2.2	<i>Cromatografia de Troca Iônica em matriz de DEAE-Sephacel</i> ..... 41
4.2.3	<i>Cromatografia de Exclusão Molecular em matriz de Sephacryl S-300</i> ..... 41
4.3	Rendimentos, Índices de Pureza e Espectros de Absorção das Etapas de Extração e Purificação..... 44
4.3.1	<i>Rendimento de Proteínas</i> ..... 44
4.3.2	<i>Rendimento de Pigmentos e Índice de Pureza</i> ..... 44
4.3.3	<i>Espectros de Absorção</i> ..... 45
4.4	Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida..... 45
4.5	Caracterizações Espectroscópicas da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> ..... 46

4.5.1	<i>Absorbância e Fluorescência</i> .....	46
4.5.2	<i>Dicroísmo circular da R-ficoeritrina de Solieria filiformis</i> .....	46
4.5.2.1	<i>Composição Estrutural do Pigmento R-Ficoeritrina em Condições Nativas</i> .....	46
4.5.2.2	<i>Efeito da Temperatura sobre o Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina</i> .....	47
4.6	<b>Efeito da Temperatura e do Armazenamento sobre a Estabilidade Espectroscópica da R-Ficoeritrina de Solieria filiformis</b> .....	47
4.6.1	<i>Termoestabilidade Espectroscópica</i> .....	47
4.6.2	<i>Estabilidade Espectroscópica da R-ficoeritrina no Armazenamento</i> .....	47
4.7	<b>Análises Estatísticas</b> .....	48
5	<b>RESULTADOS</b> .....	49
5.1	<b>Efeito do Tempo sobre o Rendimento e a Produtividade dos Processos de Extração da R-Ficoeritrina de Solieria filiformis</b> .....	49
5.2	<b>Purificação do Pigmento R-Ficoeritrina de Solieria filiformis</b> .....	51
5.2.1	<i>Fracionamento Proteico do Extrato Total por Sulfato de Amônio</i> ....	51
5.2.2	<i>Cromatografia de Troca Iônica em matriz de DEAE-Sephacel</i> .....	53
5.2.3	<i>Cromatografia de Exclusão Molecular em matriz de Sephacryl S-300</i> .....	54
5.3	<b>Rendimentos, Índices de Pureza e Espectros de Absorção das Etapas de Extração e Purificação</b> .....	55
5.4	<b>Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida</b> .....	57
5.5	<b>Caracterizações Espectroscópicas da R-Ficoeritrina de Solieria filiformis</b> .....	59
5.5.1	<i>Absorbância e Fluorescência</i> .....	59
5.5.2	<i>Dicroísmo circular da R-ficoeritrina de Solieria filiformis</i> .....	59
5.5.2.1	<i>Composição Estrutural do Pigmento R-Ficoeritrina em Condições Nativas</i> .....	60
5.5.2.2	<i>Efeito da Temperatura sobre o Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina</i> .....	61

<b>5.6</b>	<b>Efeito da Temperatura e do Armazenamento sobre a Estabilidade Espectroscópica da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>5.6.1</b>	<b><i>Termoestabilidade Espectroscópica</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>5.6.2</b>	<b><i>Estabilidade Espectroscópica da R-ficoeritrina no Armazenamento.</i></b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Classificação e Importância Ecológica das Algas

De uma forma geral, as algas podem ser conceituadas como sendo organismos fotossintéticos, variando de uni a pluricelulares, que possuem funções biológicas e ecológicas semelhantes às plantas, mas não possuem raízes, caules, folhas e estruturas vasculares definidas, bem como, não compartilham uma história evolutiva comum, com exceção de algumas espécies de algas verdes (KAISER *et al.*, 2005; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011). Elas são ubíquas e estão presentes nos mais diversos tipos de *hábitats*, ocorrendo mais comumente na água, seja doce ou salgada, e, também, podem ser encontradas em ambientes de temperaturas extremas, como as que vivem em neve, desertos e fontes termais, e as que vivem sobre troncos de árvores e rochas (LEE, 2008).

O termo “alga” não tem valor taxonômico, pois ele é designado a diversos organismos que são diferentes em relação à origem e composição química, por exemplo (LOURENÇO, 2006). Isso torna a classificação desses organismos um tanto complexa, pois eles possuem representantes em dois dos três domínios da vida, Bacteria e Eukarya. De acordo Adl *et al.* (2005), as algas no domínio Bacteria são representadas pelas cianobactérias, e as no domínio Eukarya estão divididas em três grupos Chromalveolata, Archaeplastida e Excavata.

As algas possuem uma grande importância ecológica, como por exemplo, responsáveis pela maior parte do oxigênio disponível na atmosfera terrestre, pela produção de carbono orgânico, que servem como alimento para outros organismos marinhos, pela deposição dos componentes orgânicos das algas que viveram há milhões de anos, originando os combustíveis fósseis, e pela capacidade desses organismos de remover os poluentes de efluentes agrícolas e de esgoto (BOLD; WYNNE, 1985; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009).

As algas são didaticamente divididas em microalgas e macroalgas, onde possuem uma grande variedade de tamanho, desde fitoplânctons, medindo de 0,2-2,0 µm de diâmetro, até as gigantes *kelps*, que podem medir de 30-80 metros e dão origem a grandes florestas de algas do tipo *Laminaria* (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; RAVEN; EICHHORN, 2014).

As macroalgas marinhas podem ser classificadas em verdes, pardas e vermelhas, onde diferem entre si de acordo com seus pigmentos fotossintéticos e componentes da parede celular, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Pigmentos e Componentes da Parede Celular de Macroalgas Marinhas Verdes, Pardas e Vermelhas.

Grupo	Pigmentos Fotossintéticos	Principais componentes da parede celular
<b>Chlorophyta</b> (Algas Verdes)	Clorofila a, b	Celulose, carbonato de cálcio em algas calcárias
<b>Phaeophyta</b> (Algas Pardas)	Clorofila a, c, xantofilas	Celulose, alginatos
<b>Rhodophyta</b> (Algas Vermelhas)	Clorofila a, ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina)	Ágar, carragenana, carbonato de cálcio em algas coralinas

Fonte: Modificado de CASTRO; HUBER, 2012.

## 1.2 Importância Econômica das Macroalgas Marinhas

As macroalgas marinhas, por biossintetizarem compostos fenólicos, polissacarídeos, proteínas, peptídeos e pigmentos, têm sido utilizadas como alimento e como fontes de compostos bioativos e com propriedades físico-químicas em diferentes áreas industriais. Além disso, as macroalgas têm sido apontadas como importantes biomassas para a produção de biocombustíveis e para a alimentação animal (KADAM *et al.*, 2015).

Diante disso, o cultivo de macroalgas marinhas no mar tem crescido exponencialmente nas últimas décadas, atingindo 24 milhões de toneladas anuais, em 2012, para atender a demanda alimentícia e industrial. No entanto, apenas oito nações asiáticas produziram juntas 99% da produção mundial, enquanto a maioria dos 150 países e territórios litorâneos do mundo ainda estavam começando esse tipo de atividade (RADULOVICH *et al.*, 2015). Logo, algumas espécies de macroalgas já vêm sendo estudadas quanto ao seu potencial econômico e de cultivo no mar, contribuindo para um dos novos segmentos da maricultura, e amparando as indústrias de extração de compostos naturais das macroalgas marinhas com alto potencial biotecnológico (HAFTING *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm relatado o potencial biofertilizante do extrato aquoso da macroalga marinha verde *Enteromorpha intestinalis* na agricultura como uma possível alternativa aos fertilizantes químicos (MATHUR *et al.*, 2015). Do ponto de vista farmacológico, foram relatados efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina isolada da macroalga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (DA CONCEIÇÃO RIVANOR *et al.*, 2014) e de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde *Caulerpa racemosa*

(RIBEIRO *et al.*, 2014) e o efeito ansiolítico de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (MONTEIRO *et al.*, 2015).

No setor alimentício, a importância das macroalgas é indiscutível visto que já são utilizadas como alimento por diversos povos, principalmente os orientais. O exemplo mais difundido de gênero de macroalga consumida é a *Porphyra*, mais conhecida como nori, que é utilizada no preparo do sushi, um prato da culinária japonesa (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). As propriedades nutracêuticas das macroalgas também têm sido relatadas, recentemente, por Charoensiddhi *et al.* (2015). Nesse estudo, os autores concluíram que o extrato aquoso da macroalga parda *Ecklonia radiata* apresentou um elevado potencial para ser utilizado como antioxidante natural. Já do ponto de vista industrial, as macroalgas têm sido fontes de compostos que se configuram como insumos industriais agindo como gelificantes, emulsificantes, umidificantes e estabilizantes. Os hidrocoloides presentes nas macroalgas marinhas, principalmente as carragenanas, agaranas e alginatos, são utilizados na fabricação de geleias, pudins, iogurtes, sorvetes, embutidos cárneos, dentre outros. (CASTRO; HUBER, 2012).

Os pigmentos fotossintéticos das macroalgas, principalmente das vermelhas, como ficocianinas e ficoeritrinas, também têm sido relacionados a diferentes aplicações biotecnológicas. Esses pigmentos das macroalgas vermelhas são denominados de ficobiliproteínas, sendo pigmentos naturais com possibilidade de diversas colorações (Figura 1), e apresentando alta fluorescência, tornando-se moléculas com uma grande perspectiva para uso na indústria, visto a carência de pigmentos naturais e compostos fluorescentes.

Visando a aplicação de pigmentos naturais em alimentos, a Dainippon Ink & Chemicals (DIC) já comercializa a ficocianina extraída a partir da microalga *Spirulina* (*Arthrospira plantensis*), sendo vendida pelo nome de Linablue, bem como também comercializa produtos alimentícios como sobremesas, picolés, balas, entre outros, produzidos com essa ficobiliproteína (DIC, 2016).

Visando a aplicação na indústria farmacêutica, diversas atividades biológicas utilizando ficobiliproteínas já foram relatadas na literatura, como antioxidante, imunomodulatória, anticâncer, sonda fluorescente de células cancerígenas, demonstrando o vasto campo de utilização dessas ficobiliproteínas (PAN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2015; PALIWAL *et al.*, 2015; THANGAM *et al.*, 2015).

Figura 1. Diversidade Natural de Coloração de Extratos de Diferentes Espécies de Microalgas Marinhas (*Synechococcus* Spp.) devido a diferenças no Teor de Ficobiliproteínas.



**Fonte:** SIX *et al.*, 2007

O valor de mercado para produtos gerados com ficobiliproteínas (incluindo agentes fluorescentes), a partir de microalgas, é estimado em mais de 60 milhões de dólares (BOROWITZKA, 2013). Atualmente, diversos tipos de ficobiliproteínas são vendidos por empresas especializadas, onde o preço varia de acordo com a pureza do pigmento (Tabela 2).

Tabela 2. Valor Comercial de Ficobiliproteínas.

Molécula	Prefixo	Marca	Valor (em US\$.mg <sup>-1</sup> )	Referência
Ficoeritrina (FE)	B	Columbia Biosciences	25,00	(BIOSCIENCES, 2016a)
	R	Columbia Biosciences	10,00	(BIOSCIENCES, 2016b)
	R	ProZyme	25,00	(PROZYME, 2016a)
	B	Sigma-Aldrich	356,00	(ALDRICH, 2016a)
	R	Sigma-Aldrich	146,50	(ALDRICH, 2016b)
Ficocianina (FC)	C	ProZyme	25,00	(PROZYME, 2016b)
	C	Sigma-Aldrich	148,00	(ALDRICH, 2016c)
Aloficocianina (AFC)	-	Columbia Biosciences	50,00	(BIOSCIENCES, 2016c)
	-	ProZyme	25,00	(PROZYME, 2016c)
	-	Sigma-Aldrich	340,50	(ALDRICH, 2016d)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de utilizar os resíduos gerados da extração de ficobiliproteínas, surge o conceito de biorrefinaria que pode ser definido como uma instalação que integra processos de conversão da biomassa em diversos produtos, sendo usado para garantir a extração de outros componentes de valor comercial agregado a partir da mesma biomassa de alga, maximizando os benefícios e lucros (EMBRAPA, 2011; JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014).

Já é descrito na literatura esquemas de biorrefinaria para macroalgas vermelhas, como é o caso de Baghel *et al.* (2015) onde utiliza as macroalgas *Gelidiella acerosa* e *Gracilaria dura* para extração de ficobiliproteínas, fertilizante líquido, lipídio, ágar e celulose, que a partir de hidrólise enzimática e fermentação, é produzido bioetanol.

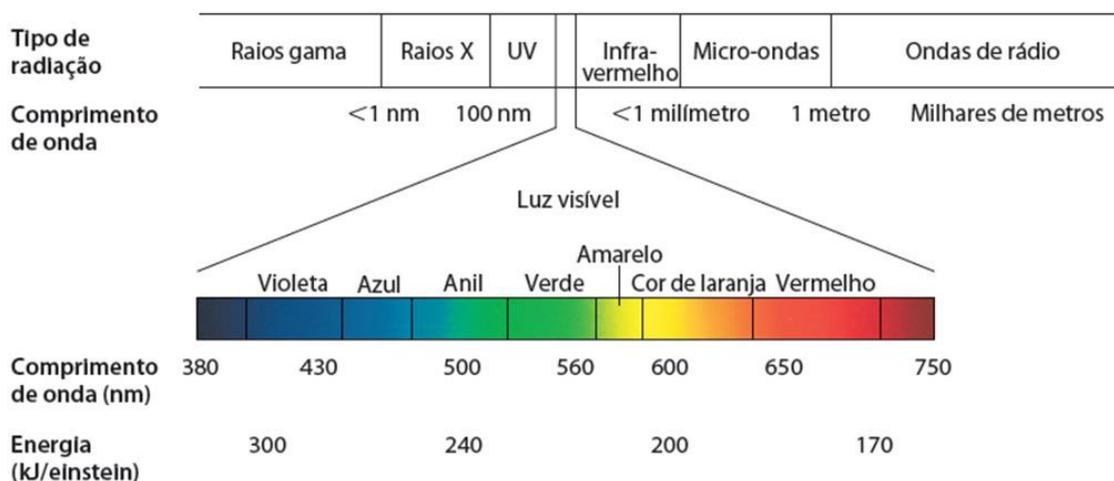
### 1.3 Pigmentos Fotossintéticos de Macroalgas Vermelhas

#### 1.3.1 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são proteínas pigmentadas solúveis em água, onde sua cor característica e as suas propriedades espectrais são devido à presença de grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadeia aberta (bilinas ou ficobilinas) covalentemente ligados, por ligações do tipo tioéter, a resíduos de cisteína (GLAZER *et al.*, 1976; GLAZER, 1984; FICNER; HUBER, 1993; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999). A ficobilina é o pigmento fotossintético em si, porém ela só possui um papel funcional se tiver uma proteína acoplada (LOURENÇO, 2006).

Essas proteínas são capazes de absorver a radiação eletromagnética (Figura 2) do espectro de luz visível numa região onde a clorofila é ineficiente (450-670 nm) e transmitir para o centro reativo do fotossistema II (GLAZER, 1989; NELSON; COX, 2014; CHALOUB *et al.*, 2015), desempenhando um papel importante para a fotossíntese. Devido as suas propriedades espectroscópicas (absorbância e fluorescência) as ficobiliproteínas têm sido usadas como sondas fluorescentes, entretanto, sua produção através de expressão heteróloga é limitada diante da complexidade da sua estrutura química (GLAZER; STRYER, 1984; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004).

Figura 2. Radiação Eletromagnética.



Fonte: NELSON; COX, 2014

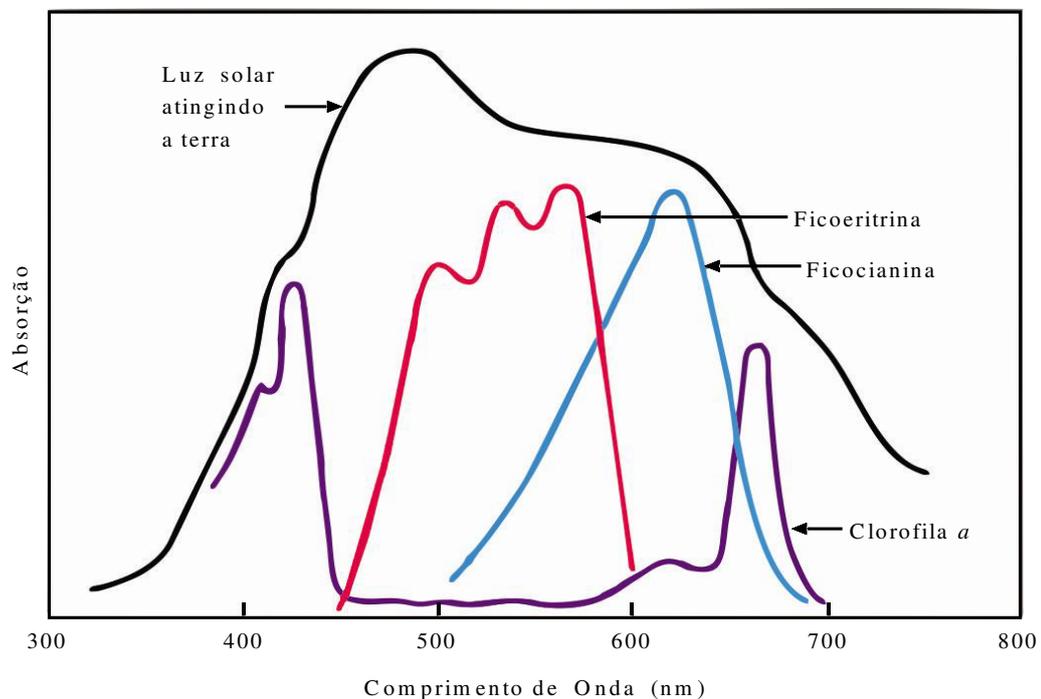
O espectro de luz visível compreende a luz com comprimentos de onda na faixa de 400 a 700 nm, variando do violeta ao vermelho, e é chamado de radiação fotossintética ativa. Os organismos fotossintetizantes ajustam sua estrutura de captação de luz para absorver os vários comprimentos de onda de luz desse espectro, que varia com a profundidade da água. Esse processo é chamado de aclimatação cromática complementar (KAISER *et al.*, 2005; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009).

De acordo com suas características espectrais de absorbância (Figura 3), 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) (BRYANT; GLAZER; EISERLING, 1976; GLAZER, 1984, 1985; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995). Já de acordo com a sua coloração, as ficobiliproteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos: a ficoeritrina (vermelho) e a ficocianina (azul) (O’CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980).

Organismos que crescem em águas rasas tendem a conter ficobiliproteínas especializadas em absorver a luz amarela / vermelha (ficocianina), enquanto que os que estão em maior profundidade, tendem a conter ficobiliproteínas especializadas em absorver a luz verde / azul (ficoeritrina), que é, relativamente, a luz mais abundante em altas profundidades (SAGERT; SCHUBERT, 1995; KEHOE; GUTU, 2006; KEHOE, 2010).

A característica que faz as algas vermelhas serem capazes de se desenvolver e crescer abundantemente em águas profundas está diretamente ligado ao alto teor de ficoeritrina presente em seus tilacóides, pois essa ficobiliproteína tem uma absorção eficiente da luz na faixa espectral de 450 a 570 nm (WANG *et al.*, 2015).

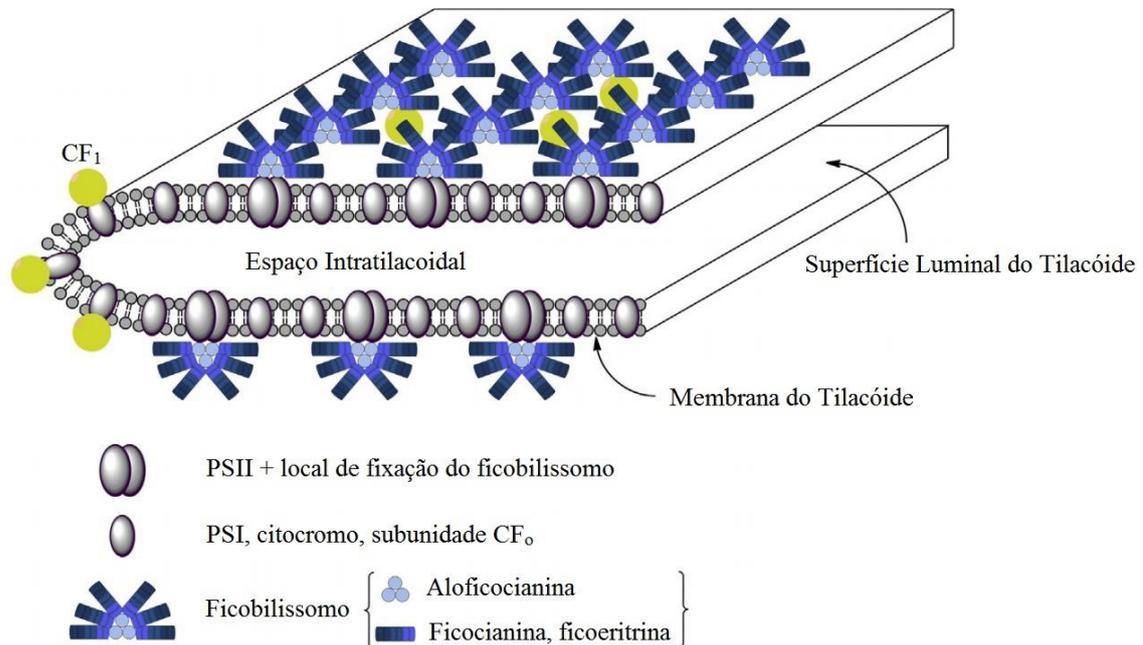
Figura 3. Espectro de Absorção dos Pigmentos Fotossintetizantes Ficoeritrina, Ficocianina e Clorofila *a* presentes em Macroalgas Vermelhas.



**Fonte:** Adaptado de NELSON; COX, 2014

As ficobiliproteínas estão agregadas em complexos proteicos supramoleculares que estão dispostos na forma de antena e são denominados ficobilissomos, onde, *in vivo*, estão situados na superfície externa da membrana do tilacóide, no estroma, e são constituídos, basicamente, por duas proteínas, as ficobiliproteínas e os peptídeos de ligação (Figura 4) (GANTT, 1980; LUNDELL; WILLIAMS; GLAZER, 1981; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995).

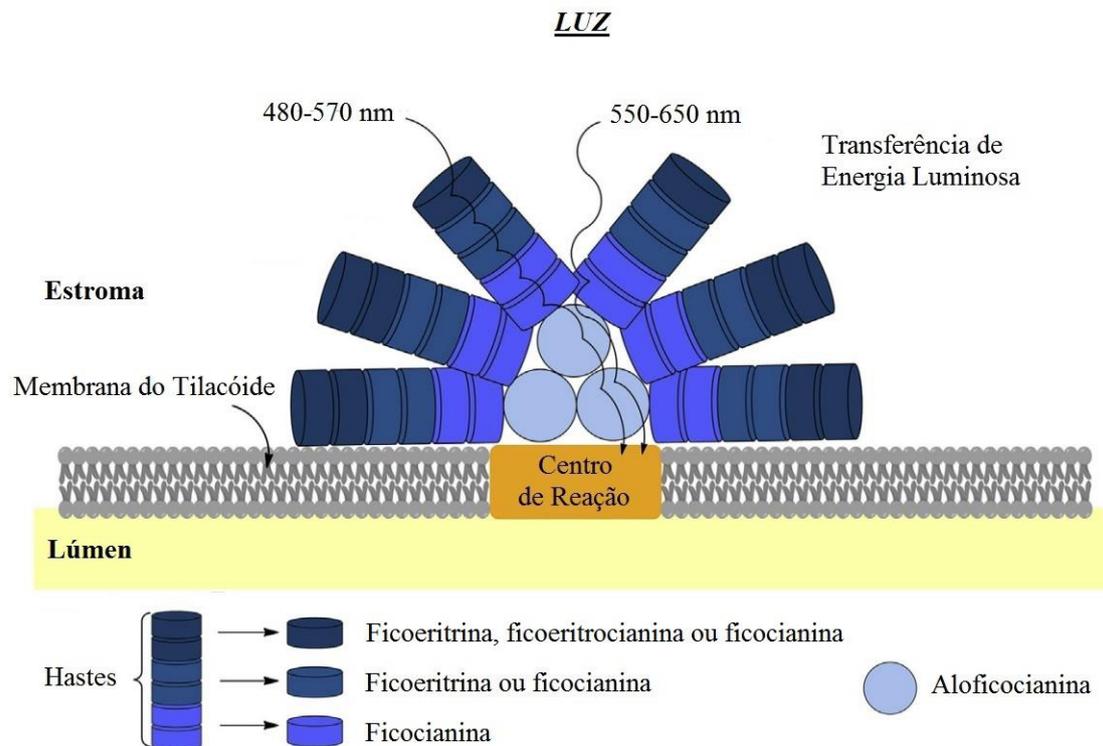
Figura 4. Representação da Membrana do Tilacóide e dos Ficobilissomos.



**Fonte:** Adaptado de DUMAY *et al.*, 2014. **Legenda:** CF – Fator de acoplamento; PS – Fotossistema.

A estrutura do ficobilissomo (Figura 5) permite qualquer um dos pigmentos absorver a luz solar e transferir para o centro de reação fotossintético II com uma eficiência de captação e transferência de energia de aproximadamente 100% *in vivo* (GLAZER, 1984, 1989). Estudos de medições de energia demonstraram que a energia da luz absorvida pela ficoeritrina é transmitida para ficocianina, em seguida, para a aloficocianina, e, finalmente, para a clorofila *a* do centro de reação, por transferência de éxcitons (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; BERMEJO ROMÁN *et al.*, 2002; NELSON; COX, 2014).

Figura 5. Representação da Estrutura do Ficobilissomo.



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, e por consequência, realizando menos fotossíntese. Entretanto, quando o nitrogênio disponível estiver em concentração suficiente para a sobrevivência das algas, as ficobiliproteínas podem ser ressintetizadas e os ficobilissomos reconstituídos (LOURENÇO, 2006; JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014).

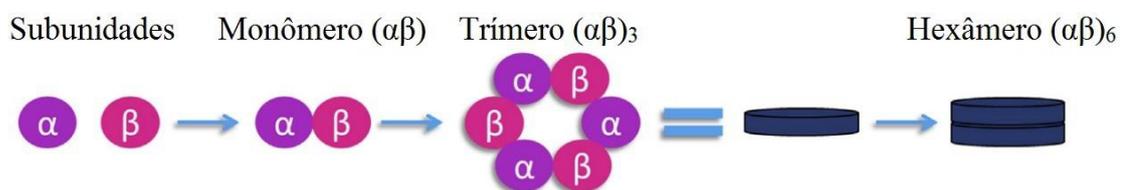
O ficobilissomo é composto por duas estruturas distintas chamadas de hastes e núcleo. As hastes são compostas pelos pigmentos fotossintéticos ficoeritrina e ficocianina, onde o pigmento que apresenta maior energia fica alojado na ponta das hastes (ficoeritrina), enquanto o pigmento que apresenta menor energia fica localizado na base das hastes (ficocianina), e o núcleo é composto pela aloficocianina.

A conexão entre as hastes, o núcleo e a membrana do tilacóide se dá pelos peptídeos de ligação, onde, dependendo da espécie, representam em torno de 15 % do total de proteínas do ficobilissomo (DE MARSAC; COHEN-BAZIRE, 1977). Suas principais funções

são fixar a estrutura do ficobilissomo no tilacóide e dar estabilidade a essa estrutura (DUMAY *et al.*, 2014). São eles: o peptídeo de ligação do núcleo a membrana ( $L_{CM}$ ) com massa molecular que varia de 70 a 120 kDa e tem por função ligar o núcleo do ficobilissomo a membrana do tilacóide, e, também, atuar como receptor final de éxcitons contribuindo para a transferência dessa energia para o centro de reação; o peptídeo de ligação  $L_C$  (9-12 kDa) que tem por finalidade montar e fixar o núcleo do ficobilissomo; e, por fim, o peptídeo de ligação  $L_{RC}$  (25-35 kDa) que tem por função estabilizar a estrutura da ficobiliproteína e fazer a conexão da haste do ficobilissomo ao seu núcleo (GLAZER, 1984; DUCRET *et al.*, 1998; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

As ficobiliproteínas são constituídas de duas subunidades diferentes ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e uma terceira subunidade diferente ( $\gamma$ ), que é encontrada nas ficoeritrinas (FE) e atua como peptídeo de ligação. (GLAZER; HIXSON, 1975; SIDLER, 1994; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; NIU; WANG; TSENG, 2006). As subunidades estão dispostas na forma de disco segundo a Figura 6.

Figura 6. Organização das Subunidades das Ficobiliproteínas em Trímeros e Hexâmeros.



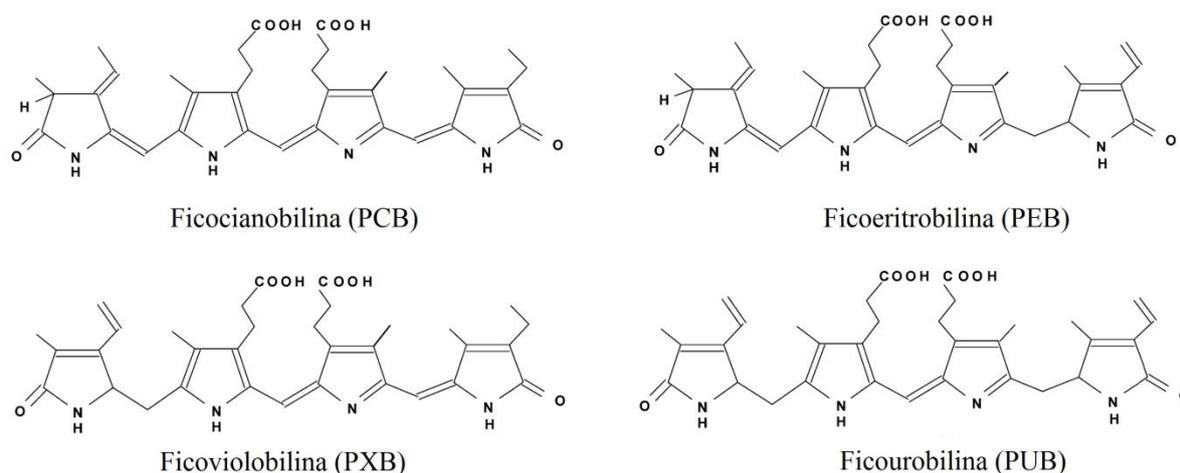
**Fonte:** Adaptado de DUMAY *et al.*, 2014.

A ficoeritrina é encontrada tanto na forma hexamérica com as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e  $\gamma$   $[(\alpha\beta)_6\gamma]$ , assim como sem a subunidade gama  $\gamma$   $[(\alpha\beta)_6]$ , variando de acordo com o tipo de ficoeritrina isolada; a ficoeritrocianina pode ser encontrada tanto na forma trimérica  $[(\alpha\beta)_3]$ , como na forma hexamérica  $[(\alpha\beta)_6]$ ; a ficocianina é encontrada, no pH 5-6, na forma hexamérica  $[(\alpha\beta)_6]$  e, no pH 7, na forma trimerica  $[(\alpha\beta)_3]$  e a aloficocianina é comumente encontrada na forma trimérica  $[(\alpha\beta)_3]$  (GLAZER, 1984; CHANG *et al.*, 1996; ROSSANO *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2009; SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011; DUMAY *et al.*, 2014; SUDHAKAR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Existe uma ou mais ficobilinas ligadas em cada subunidade, podendo ser encontradas quatro tipos diferente: ficoeritrobilina (PEB,  $\lambda_{max} = 560$  nm), ficourobilina (PUB,

$\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$ ), ficocianobilina (PCB,  $\lambda_{\max} = 620\text{-}650 \text{ nm}$ ) e ficoviolobilina (PXB,  $\lambda_{\max} = 575 \text{ nm}$ ) (GLAZER, 1984, 1989; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; NIU; WANG; TSENG, 2006; ZHAO *et al.*, 2013, 2015), onde suas estruturas químicas estão representadas na Figura 7.

Figura 7. Estruturas Químicas das Ficobilinas.



**Fonte:** Adaptado de ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004.

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

As ficobiliproteínas, quando estão compondo os ficobilissomas, são fracamente fluorescentes, no entanto, quando essas estruturas são extraídas em tampão ocorre a desintegração desses ficobilissomas, liberando as ficobiliproteínas que, por sua vez, impedidas de transferir elétrons no processo fotossintético, passam a exibir propriedade fluorescente (ERIKSEN, 2008; SUN *et al.*, 2009; CIAN *et al.*, 2015).

### 1.3.1.1 Ficoeritrinas

As ficoeritrinas são os principais pigmentos encontrados nas macroalgas vermelhas, onde são amplamente distribuídas entre os grupos taxonômicos. Em relação às características espectroscópicas, constituem o grupo mais variável das ficobiliproteínas (HOFFMANN; TALARICO; WILMOTTE, 1990; GLAZER, 1994). Elas também são conhecidas por representarem a classe das ficobiliproteínas mais dinâmicas, devido aos seus picos de absorção e a sua emissão de fluorescência (em torno de 575 nm) (SUN *et al.*, 2003), facilitando a adaptação das macroalgas vermelhas frente às alterações ambientais (RODRÍGUEZ *et al.*, 1991).

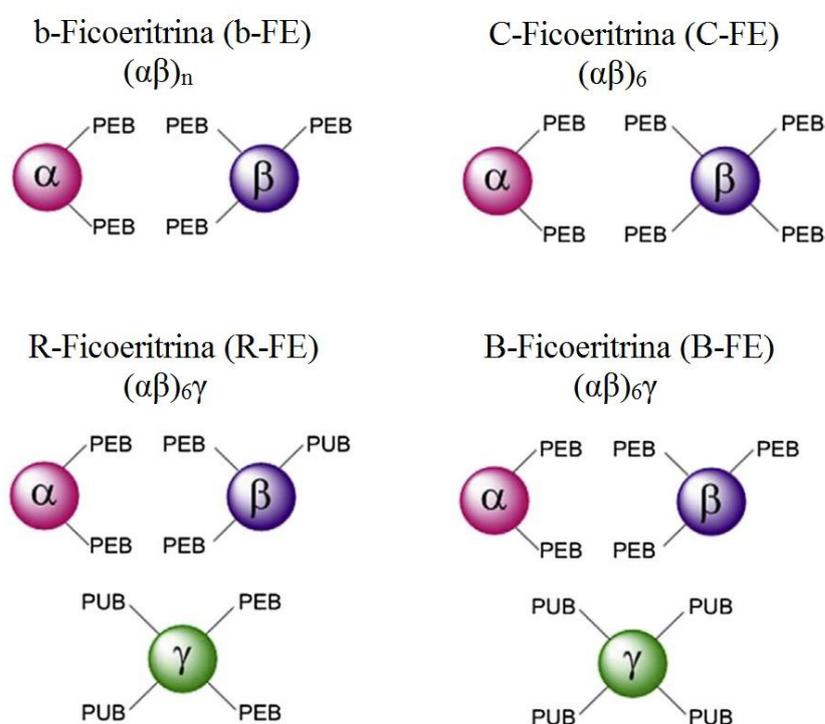
De acordo com suas características espectrais de absorbância, elas são divididas em cinco grupos: B-Ficoeritrina (B-FE) [ $\lambda_{\text{max}}$  = 565 nm, 545 nm, e um ombro a 499 nm)], b-Ficoeritrina (b-FE) [ $\lambda_{\text{max}}$  = 545 nm, e um ombro a 565 nm)], C-Ficoeritrina (C-FE) [ $\lambda_{\text{max}}$  = 560 nm)], CU-Ficoeritrina (CU-FE) [ $\lambda_{\text{max}}$  = 498 nm, 540 nm e/ou 565 nm)] e R-Ficoeritrina (R-FE) [ $\lambda_{\text{max}}$  = 565 nm, 498 nm e um ombro/pico a 545 nm)] (BOGORAD, 1975; GLAZER *et al.*, 1976; BRYANT, 1982; SIDLER, 1994). R-FE e B-FE são encontradas nas algas vermelhas (R-FE é encontrada na maioria das macroalgas vermelhas e B-FE em algumas microalgas vermelhas como *Porphyridium e Rhodella violacea*), enquanto b-FE, C-FE e CU-FE são encontradas em cianobactérias (KOLLER; WEHRMEYER, 1975; BERMEJO; TALAVERA; ALVAREZ-PEZ, 2001; SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015).

Essa diferença espectral de absorbância entre as ficoeritrinas se deve a quantidade de ficobilinas totais presentes na sua estrutura. B-FE e R-FE são compostas por três subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e suas estruturas são descritas como complexos hexaméricos  $(\alpha\beta)_6\gamma$  ou  $(\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3$ , enquanto que b-FE e C-FE também são formadas por complexo  $(\alpha\beta)$ , porém não possuem a subunidade  $\gamma$  (Figura 8) (LUNDELL *et al.*, 1984; CHANG *et al.*, 1996; SUN *et al.*, 2003, 2004; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004). CU-FE tem propriedades de absorção e ficobilinas, semelhantes à R-FE, sendo usualmente classificada como R-FE (STADNICHUK, 1995).

As subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que compõem a R-FE possuem em torno de 18, 20 e 35 kDa, respectivamente, e formam complexos hexaméricos  $(\alpha\beta)_6\gamma$ , de 240 kDa, onde dois trímeros  $(\alpha\beta)_3$  estão dispostos na forma de disco, ligados pela subunidade  $\gamma$ , que está localizada no centro da cavidade formada por esses trímeros, conferindo maior 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, ficoeritobilinas (PEB) e ficourobilinas (PUB), onde a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) da PUB para PEB resulta no pico de emissão máximo de fluorescência a 575 nm (Jiang *et al.*, 1999), que exibe uma intensidade 20 vezes maior do que o relatado para outros pigmentos, como a fluoresceína. (FLEURENCE, 2004).

Figura 8. Representação das Estruturas das Ficoeritrinas contendo as Ficobilinas.



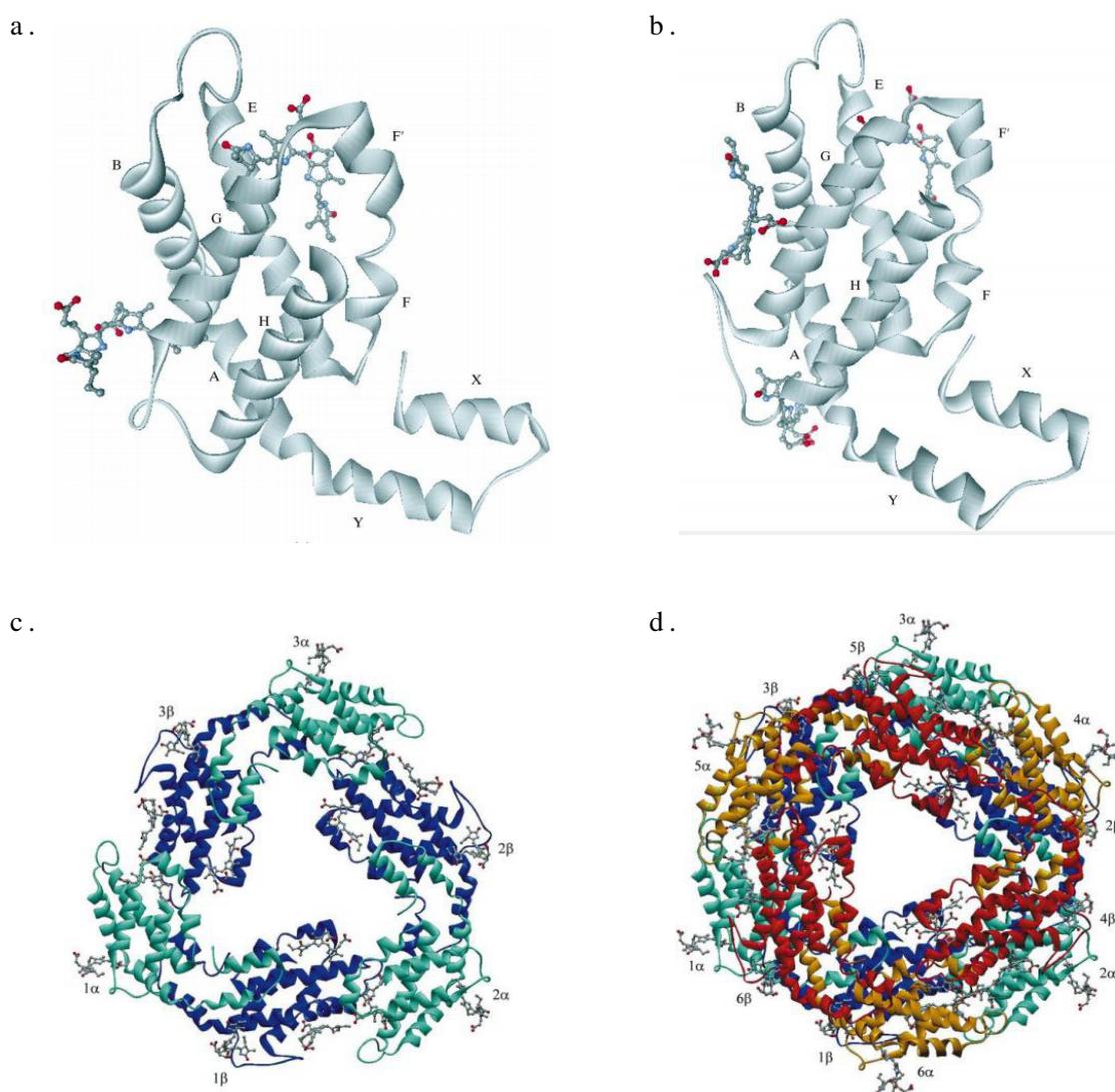
**Fonte:** Adaptado de DUMAY *et al.*, 2014.

Como esquematizado na Figura 8, a subunidade  $\alpha$  da R-FE possui duas ficobilinas do tipo PEB que estão ligados por resíduos de cisteína específicos (C82 -  $\alpha_{82}^{PEB}$  e C139 -  $\alpha_{139}^{PEB}$ ) por uma ligação tioéter; a subunidade  $\beta$  possui três ficobilinas na sua estrutura, duas do tipo PEB ligadas por resíduos de cisteína específicos (C82 -  $\beta_{82}^{PEB}$  e C158 -  $\beta_{158}^{PEB}$ ) por uma ligação tioéter e uma do tipo PUB por resíduos de cisteína específicos (C50/61 -  $\beta_{50/61}^{PUB}$ ) por duas ligações tioéter; por fim, a subunidade  $\gamma$  apresenta duas ficobilinas do tipo PEB e duas do tipo PUB, porém existem relatos na literatura de uma subunidade  $\gamma$  da R-FE de *Polysiphonia urceolata* que possui três ficobilinas do tipo PUB e uma do tipo PEB (KLOTZ; GLAZER,

1985; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; CHANG *et al.*, 1996; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999; GAIGALAS *et al.*, 2006; SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015).

A estrutura tridimensional da R-Ficoeritrina foi determinada por estudos cristalográficos (CHANG *et al.*, 1996; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999; CONTRERAS-MARTEL *et al.*, 2001), como por exemplo, ao estudar R-FE de *Gracilaria chilensis*, foi possível observar os cromóforos ligados às subunidades  $\alpha$  (Figura 9a) e  $\beta$  (Figura 9b), onde os cromóforos estão representados por bolas e bastões. Os trímeros (Figura 9c) e hexâmeros (Figura 9d), formados pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , também foram determinados.

Figura 9. Estruturas Parciais da R-Ficoeritrina.



Fonte: Adaptado de CONTRERAS-MARTEL *et al.*, 2001.

#### 1.4 Extração, Purificação e Aplicação de R-Ficoeritrinas

Geralmente, as técnicas de extração de ficobiliproteínas são baseadas na tentativa de romper a parede celular das macroalgas, liberando os pigmentos para o meio aquoso. Portanto, são utilizadas: maceração em nitrogênio líquido e/ou moinhos (MUNIER *et al.*, 2014; SUDHAKAR *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015); ultrassom (SUN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015; LE GUILLARD *et al.*, 2015); enzimas (DUMAY *et al.*, 2013); e, mais recentemente, a combinação das duas últimas técnicas descritas acima, com a finalidade de melhorar o rendimento de ficobiliproteína e a eficiência dos processos de extração (LE GUILLARD *et al.*, 2015). A presença de grandes concentrações de polissacarídeos nas paredes celulares das rodófitas dificulta a eficiência das extrações, visto que várias operações unitárias são necessárias para se alcançar a pureza desejada do pigmento e principalmente as metodologias que são menos invasivas, como por exemplo, maceração por nitrogênio líquido (DUMAY *et al.*, 2014).

Por serem solúveis em água, usualmente as ficoeritrinas são extraídas em soluções aquosas ou tampão fosfato a partir de diferentes estados da matéria-prima utilizada, podendo ser alga úmida (SUN *et al.*, 2009; DENIS *et al.*, 2009; KAWSAR *et al.*, 2011; 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; CAI *et al.*, 2012) e alga liofilizada (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; ROSSANO *et al.*, 2003; DENIS *et al.*, 2009; MUNIER *et al.*, 2014).

As R-FE são extraídas ainda por imersão do organismo em água (NIU; WANG; TSENG, 2006) ou tampão fosfato (CAI *et al.*, 2012) por um ou mais dias, porém esse tipo de extração demanda muito tempo, sendo essa a principal desvantagem desse método, visto que ocorre a degradação das ficobiliproteínas por proteases.

Já as etapas de purificação da R-ficoeritrina são semelhantes às das proteínas, onde métodos tradicionais envolvem precipitação por sulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e procedimentos cromatográficos, onde os procedimentos mais empregados são as cromatografias de troca-iônica, exclusão molecular, interação hidrofóbica, interação hidrofóbica com leito-expandido e hidroxiapatita (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; WANG, 2002; NIU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015).

O fracionamento proteico do extrato bruto de macroalgas, com sulfato de amônio, é geralmente utilizado como primeiro passo do processo de purificação (SUN *et al.*, 2009; KAWSAR *et al.*, 2011; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; WU *et*

*al.*, 2015). Com essa técnica e utilizando as faixas de fracionamento de 25-45%, 35-50% e 35-55% de saturação de sulfato de amônio, os índices de pureza (IP) de R-FE de *Polysiphonia urceolata* (LIU *et al.*, 2005), *Bangia fusco-purpurea* (WU *et al.*, 2015) e *Portieria hornemannii* (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013) chegaram a 1,4, 1,8 e 2,38, respectivamente.

Com a finalidade de aumentar o IP da R-FE presente nas frações proteicas, são realizadas cromatografias de troca-iônica, exclusão molecular, interação hidrofóbica e hidroxiapatita, as quais se baseiam na separação das moléculas por carga, tamanho, hidrofobicidade e afinidade, respectivamente. Wu *et al.* (2015) e Senthilkumar *et al.* (2013) purificaram a R-FE a partir de extratos totais das macroalgas *Bangia fusco-purpurea* e *Portieria hornemannii* utilizando o procedimento de cromatografia de troca iônica, onde alcançaram altos índices de pureza de 5,1 e 5,2, respectivamente. A R-FE isolada de *Corallina elongata*, por cromatografia de hidroxiapatita, alcançou um índice de pureza de 6,67 (ROSSANO *et al.*, 2003). A combinação de vários procedimentos cromatográficos em sequência também já foi utilizada para aumentar a pureza do pigmento, como no caso da R-ficoeritrina isolada de *Heterosiphonia japonica*, que alcançou um índice de pureza de 4,89, por meio dos procedimentos sequenciais de exclusão molecular e de troca iônica (SUN *et al.*, 2009).

Eletroforese também já foi utilizada com a finalidade de purificar ficobiliproteínas de macroalgas através da carga, como descrito por Galland-Irmouli *et al.* (2000), onde a R-FE de *Palmaria palmata* foi purificada com um índice de pureza de 3,2.

Durante o período de 2000 até 2016, conforme relatos na literatura, das 7095 espécies de macroalgas vermelhas taxonomicamente classificadas, somente 10 espécies de macroalgas foram avaliadas quanto aos seus rendimentos de purificação de R-FE, que variaram de 0,14 mg de ficoeritrina/g a 1,53 mg/g de alga (Tabela 3) (GUIRY; GUIRY, 2016).

Tabela 3. Distribuição, Procedimentos Propostos para Purificação e Rendimentos de R-Ficoeritrina de Macroalgas Vermelhas.

Espécie	Distribuição	Protocolo	Rendimento	IP	Referência
<i>Palmaria palmata</i>	A; AA; AN; AF; AS; EU; IOA	Eletroforese	0,56 <sup>a</sup>	3,20	(GALLAND-IRMOULI <i>et al.</i> , 2000)
<i>Gracilaria verrucosa</i>	A; AA; AC; AF; AN; AS; EU; IC; IOA; IOI; IOP; OC	PSA + IHLE	0,14 <sup>b</sup>	4,40	(WANG, 2002)
<i>Corallina elongata</i>	AA; AS; EU; IOA; IOP	HA + EM	0,60 <sup>a</sup>	6,67	(ROSSANO <i>et al.</i> , 2003)
<i>Polysiphonia urceolata</i>	EU	PSA + TI	1,53 <sup>b</sup>	5,60	(LIU <i>et al.</i> , 2005)
<i>Polysiphonia urceolata</i>	EU	PSA + IF + HA	0,34 <sup>a</sup>	3,90	(NIU; WANG; TSENG, 2006)
<i>Heterosiphonia japonica</i>	AA; AN; EU	PSA + EM + EM + TI	-	4,89	(SUN <i>et al.</i> , 2009)
<i>Porphyra yezoensis</i>	AA, AN, EU, OA	EM + HA	0,32 <sup>b</sup>	3,20	(CAI <i>et al.</i> , 2012)
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	AA; AN; AS; IOP	PSA + IF + TI	0,36 <sup>c</sup>	4,20	(NIU <i>et al.</i> , 2013)
<i>Portieria hornemannii</i>	AA; AF; IOP	PSA + TI	0,80 <sup>c</sup>	5,21	(SENTHILKUMAR <i>et al.</i> , 2013)
<i>Polysiphonia urceolata</i>	EU	PSA + EM + TI	-	5,26	(WANG <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bangia fusco-purpurea</i>	A; AA; AC; AF; AN; AS; EU; IOA; IOP; OC	PSA + TI	-	5,10	(WU <i>et al.</i> , 2015)
<i>Grateloupia turuturu</i>	AA; AF; AN; AS; EU; IOP; OC	TI	1,41 <sup>a</sup>	2,89	(MUNIER <i>et al.</i> , 2015)

**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Índice de Pureza (IP). Dados de distribuição das macroalgas encontrado no AlgaeBase (GUIRY; GUIRY, 2016), sendo: Antártida (A); Ásia (AA); América Central (AC); África (AF); América do Norte (AN); América do Sul (AS); Europa (EU); Ilhas do Caribe (IC); Ilhas do Oceano Atlântico (IOA); Ilhas do Oceano Índico (IOI); Ilhas do Oceano Pacífico (IOP); Oceano Atlântico (OA); Oceania (OC). Protocolo: não fornecido (-); Precipitação por Sulfato de Amônio (PSA); Interação Hidrofóbica (IF); Troca Iônica (TI); Exclusão Molecular (EM); Hidroxiapatita (HA); Interação Hidrofóbica com Leito Expandido (IHLE). Rendimento: a – mg de R-ficoeritrina / g de alga seca; b – mg de R-ficoeritrina / g de alga congelada; c – mg de R-ficoeritrina / g de alga úmida.

Dessa forma, os baixos rendimentos obtidos pelos processos de purificação da R-FE e a escassez de estudos para outras espécies de macroalgas como fonte dessa molécula, tem limitado a aplicação da R-FE na indústria alimentícia, que vem sendo pressionada pelos consumidores quanto ao uso de pigmentos naturais menos alergênicos. Assim, a busca por novas espécies de macroalgas vermelhas, com potencial de cultivo no mar, poderia suprir a demanda das indústrias por pigmentos vermelhos (D'AGNOLO *et al.*, 1994; DUFOSSÉ *et al.*, 2005; NIU; WANG; TSENG, 2006; SUDHAKAR *et al.*, 2015).

Com relação à utilização do pigmento R-FE na medicina e biologia celular, sua propriedade fluorescente é essencial para utilização como marcador fluorescente (KRONICK, 1986; GLAZER, 1994; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; SUDHAKAR *et al.*, 2015), mostrando ainda as propriedades antioxidantes (WU *et al.*, 2015), anticâncer (GUANWU *et al.*, 2000) e antitumoral (PAN *et al.*, 2013).

### **1.5 Hipótese/Justificativa**

Diante da importância biotecnológica e econômica dos pigmentos vermelhos de macroalgas marinhas e da escassez de relatos sobre espécies de macroalgas vermelhas como fonte desses pigmentos naturais, sobretudo de espécies tropicais, a macroalga vermelha *Solieria filiformis*, abundante no litoral cearense, é uma fonte sustentável de ficobiliproteínas, mais especificamente em R-FE, sendo purificada por procedimentos cromatográficos sequenciais de troca iônica e exclusão molecular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivo purificar e caracterizar parcialmente o pigmento fotossintético fluorescente R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *S. filiformis*.

### 2.2 Específicos

- Avaliar o efeito do tempo de extração sobre o rendimento de R-FE da macroalga marinha vermelha *S. filiformis*;
- Fracionar as ficobiliproteínas presentes no extrato bruto e determinar as concentrações de proteínas e de R-FE nas frações obtidas;
- Purificar a R-FE de *S. filiformis* visando alcançar um índice de pureza comercial do pigmento;
- Avaliar a pureza e a massa molecular da R-Ficoeritrina de *S. filiformis*;
- Determinar a estrutura secundária da R-FE de *S. filiformis*;
- Avaliar o efeito da temperatura sobre a estrutura secundária e sobre as propriedades espectroscópicas da R-FE de *S. filiformis*;

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Macroalga Marinha Vermelha *Solieria filiformis*

A macroalga marinha vermelha *S. filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson foi coletada em cordas de cultivo localizadas aproximadamente 200 metros da costa, na praia de Flecheiras (03°13'06" S – 39°16'47" W), município de Trairi, a 130 Km de Fortaleza, no litoral Oeste do Estado do Ceará, Brasil, onde são mantidas pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) em parceria com o Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP) e o Laboratório de Lectinas e Carboidratos (CARBOLEC), ambos localizados na Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus do Pici, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM). A exsiccata dessa espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob o nº 35682 (Figura 10).

A macroalga foi levada em sacos plásticos pretos para o laboratório, onde foram lavadas exaustivamente com água corrente para retirada de epífitas, incrustantes, sal e grãos de areia, e, posteriormente, com água destilada. Em seguida, foram armazenadas a -20 °C até sua utilização.

#### 3.2 Reagentes Químicos

Acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina (TEMED), Coomassie Brilliant Blue G-250, β-mercaptoetanol, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), marcadores moleculares e albumina sérica bovina foram obtidos da Sigma-Aldrich. As matrizes cromatográficas foram obtidas da GE Healthcare. Todos os demais reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

Figura 10. Macroalga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae).



Fonte: HOLANDA-ARAÚJO, 2007

**Filo:** Rhodophyta

**Classe:** Florideophyceae

**Ordem:** Gigartinales

**Família:** Solieriaceae

**Gênero:** Solieria

**Espécie:** *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Efeito do Tempo sobre o Rendimento e a Produtividade dos Processos de Extração da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

Com a finalidade de avaliar o efeito do tempo de extração sobre o rendimento e a produtividade de R-FE de *S. filiformis* no extrato bruto proteico, a macroalga úmida (100 g/cada extração), lavada e triturada em moinho elétrico foi colocada em contato com tampão fosfato de potássio 0,025 M, pH 6,5 (PB), na proporção de 1:3 (m/v). Os homogenatos obtidos a partir de diferentes tempos de extração (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas) foram mantidos sob agitação constante a 4 °C e protegidos da luz. Posteriormente, foram filtrados em tecido de trama fina, os resíduos descartados e os filtrados centrifugados a 17.000 x g, 4 °C por 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos, denominados extratos brutos, foram avaliados quanto aos teores de proteínas e rendimento de R-FE que foi calculado segundo a Equação 1:

$$R_{R-FE} = \frac{R-FE}{Sf} \quad (1)$$

Onde:

$R_{R-FE}$  = Rendimento de R-FE ( $\mu\text{g/g}$ );

R-FE = Teor total de R-FE no extrato bruto ( $\mu\text{g}$ );

Sf = Massa de alga úmida (g).

A produtividade dos processos de extração (P) foi calculada segundo a Equação 2:

$$P = \frac{R-FE}{t} \quad (2)$$

Onde:

P = Produtividade de R-FE ( $\mu\text{g/mL.h}$ )

R-FE = Rendimento de R-Ficoeritrina do extrato bruto proteico ( $\mu\text{g/mL}$ );

t = Tempo de extração (h).

O extrato bruto com maior produtividade foi utilizado para dar prosseguimento ao

processo de purificação e foi denominado extrato bruto proteico de *S. filiformis* (EBP-Sf).

## **4.2 Purificação do Pigmento R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis***

### **4.2.1 Fracionamento Proteico do Extrato Total por Sulfato de Amônio**

O EBP-Sf foi submetido a uma precipitação proteica em diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (F0/20, F20/40, F40/60, F60/80, F80/90, F90/100 e F0/90), durante 12 horas, à temperatura de 4 °C. Após centrifugação a 17.000 x g, 4 °C por 30 minutos, os precipitados proteicos de cada faixa foram solubilizados em PB e submetidos à dialise (cutoff 12 kDa) contra água destilada e PB. Em seguida, os teores de proteína e R-ficoeritrina das frações proteicas foram determinados e a fração com maior teor de pigmento foi escolhida para continuar o processo de purificação.

### **4.2.2 Cromatografia de Troca Iônica em matriz de DEAE-Sephacel**

A fração proteica que apresentou maior teor de R-ficoeritrina foi submetida à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, previamente equilibrada com PB. Após a eluição completa da fração não retida na coluna, foi realizado um *stepwise* com o mesmo tampão de equilíbrio, contendo NaCl nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 M, para a eluição das frações proteicas adsorvidas na matriz. A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 1,4 mL/min, coletando frações de 3 mL/tubo, as quais foram avaliadas quanto às absorvâncias a 280 nm e 564 nm (espectrofotômetro Armsersham Biosciences Ultrospec 2100 pro). As frações cromatográficas que apresentaram maiores absorvâncias a 564 nm foram reunidas e posteriormente dialisadas exaustivamente (cutoff 12 kDa) contra água destilada, por 24 horas e liofilizada.

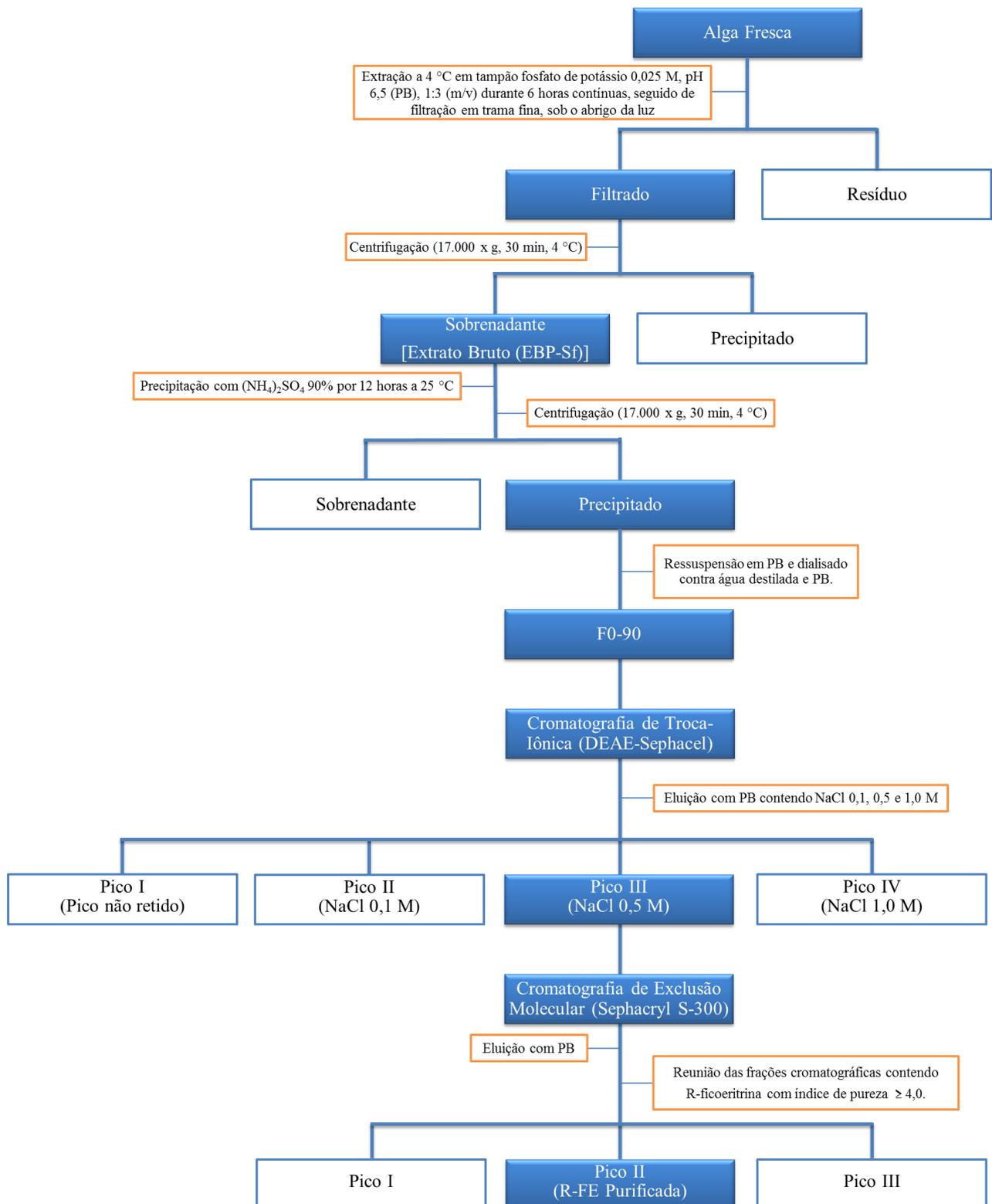
### **4.2.3 Cromatografia de Exclusão Molecular em matriz de Sephacryl S-300**

O pico pigmentado com R-FE, proveniente da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, foi aplicado em cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300, previamente equilibrada com PB. As frações foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio. Durante o procedimento cromatográfico foi mantido um fluxo constante

de 1 mL/minuto, coletando frações de 2 mL/tubo, as quais foram avaliadas quanto às absorvâncias a 280 nm e 564 nm (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro) e o índice de pureza da R-FE. Os tubos contendo o pigmento com índice de pureza maior que 4,0 foram reunidos e a fração resultante foi denominada R-FE pura.

As etapas de extração e purificação da R-ficoeritrina da macroalga vermelha *S. filiformis* estão esquematizadas na Figura 11.

Figura 11. Fluxograma de Extração e Purificação de R-Ficoeritrina da Macroalga Marinha Vermelha *Solieria filiformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Rendimentos, Índices de Pureza e Espectros de Absorção das Etapas de Extração e Purificação

#### 4.3.1 Rendimento de Proteínas

A determinação da concentração de proteína solúvel no extrato bruto proteico e nas frações de todas as etapas de purificação do pigmento foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para o ensaio, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 100 µL das soluções proteicas e agitadas. Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

#### 4.3.2 Rendimento de Pigmentos e Índice de Pureza

A determinação das concentrações de R-FE do EBP-Sf e das frações de cada etapa de purificação foi realizada conforme a Equação 3 proposta por Sampath-Wiley e Neefus (2007):

$$R - FE = 0,1247[(A_{564} - A_{730}) - 0,4583(A_{618} - A_{730})] \quad (3)$$

Onde:

R-FE = Concentração de R-ficoeritrina (mg/mL);

$A_{564}$  = Absorbância a 564 nm;

$A_{618}$  = Absorbância a 618 nm;

$A_{730}$  = Absorbância a 730 nm.

Para calcular o índice de pureza do pigmento seguiu-se a Equação 4 proposta por Senthilkumar *et al.* (2013):

$$IP = \frac{A_{564}}{A_{280}} \quad (4)$$

Onde:

IP = Índice de pureza;

$A_{280}$  = Absorbância a 280 nm;

$A_{564}$  = Absorbância a 564 nm.

#### 4.3.3 Espectros de Absorção

Foram feitas análises espectrofotométricas de absorção (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro) na faixa de 300 nm a 700 nm em intervalos de 15 nm nas etapas de extração e purificação.

#### 4.4 Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida

Eletroforeses unidimensionais em condições desnaturantes (PAGE-SDS) foram utilizadas nesse estudo para avaliar a pureza do pigmento R-FE. As eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida 7,5% e 15%, na ausência e na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente, de acordo com os métodos descritos por Laemmli (1970) e adaptadas para o uso de géis de separação em placas de 10 x 8 cm.

Para a eletroforese na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, foi utilizado um gel de separação (7,5% de acrilamida e 1% de SDS, solubilizados em tampão tris-HCl 1,5 M, pH 8,8) e um gel de concentração (3,5% de poliacrilamida e 1% de SDS, dissolvido em tampão tris-HCl 0,5 M pH 6,8), onde foram feitos poços para aplicação das amostras proteicas, com o auxílio de um pente para eletroforese. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 1,0% de SDS, 20% de glicerol e 0,02% de Azul de Bromofenol) em uma proporção de 2:1.

Para a eletroforese na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, foi utilizado um gel de separação (15% de acrilamida e 1% de SDS, solubilizados em tampão tris-HCl 1,5 M, pH 8,8) e um gel de concentração (3,5% de poliacrilamida e 1% de SDS, dissolvido em tampão tris-HCl 0,5 M pH 6,8), onde foram feitos poços para aplicação das amostras proteicas, com o auxílio de um pente para eletroforese. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 1,0% de SDS, 20% de glicerol e 0,02% de Azul de Bromofenol e  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) em uma proporção de 2:1 e, após aquecimento a 100 °C por 5 minutos, foi centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos a 25 °C. Para a estimativa da

massa molecular da ficobiliproteína em análise, foram utilizados, como padrão, proteínas com massas moleculares conhecidas: 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 do tipo Kunitz (20,1 kDa) e a  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa).

A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical e submetidos a uma diferença de potencial de 200 V e corrente de 20 mA., por um período de aproximadamente 2 horas, a 25 °C, utilizando a solução de Tris 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. Após o término da eletroforese, foi utilizada a solução corante 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada para a revelação das bandas proteicas. Para evidenciar as bandas proteicas e decorar o gel de separação foi utilizada uma solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada). As massas moleculares aparentes das bandas proteicas foram mensuradas utilizando-se o software GelAnalyzer 2010a (LAZAR, 2010).

#### **4.5 Caracterizações Espectroscópicas da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis***

##### **4.5.1 Absorbância e Fluorescência**

Os espectros de absorbância e fluorescência foram determinados em cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis* por meio de um espectrofotômetro de multi-deteção de microplaca Synergy Mx (BioTek, EUA). O espectro de absorbância da R-FE pura (correspondendo a 0,05 mg de proteína/mL) 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 foi determinado a  $25 \pm 0,5$  °C, onde a R-FE pura (correspondendo a 0,001 mg de proteína/mL) foi excitada no comprimento de onda de 495 nm e seu espectro de emissão foi medido na faixa de 500 a 700 nm com intervalos de 5 nm.

##### **4.5.2 Dicroísmo circular da R-ficoeritrina de *Solieria filiformis***

###### **4.5.2.1 Composição Estrutural do Pigmento R-Ficoeritrina em Condições Nativas**

O espectro de dicroísmo circular (CD) foi determinado no espectropolarímetro Jasco (modelo J-815), na faixa de 190 a 260 nm sob atmosfera de nitrogênio, com largura de

banda de 1 nm, sendo utilizada uma cubeta de quartzo cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico. A R-FE pura (correspondendo a 0,1 mg de proteína/mL) dissolvida em tampão PB foi analisada através de 3 scans sucessivos, com velocidade de varredura de 100 nm/min e tempo de resposta de quatro segundos. O espectro de CD foi obtido pela média das três varreduras. Para determinação dos componentes de estrutura secundária foi utilizado o servidor online K2D3, segundo metodologia descrita por Louis-Jeune; Andrade-Navarro; Perez-Iratxeta, 2012.

#### *4.5.2.2 Efeito da Temperatura sobre o Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina*

O espectro de dicroísmo circular foi determinado seguindo a mesma metodologia descrita no item (4.5.2.1). A R-FE pura (correspondendo a 0,05 mg de proteína/mL) dissolvida em tampão PB foi pré-incubada a diferentes temperaturas (4, 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por uma hora, onde, posteriormente, foi analisada seu espectro de CD. Foi usado a temperatura de 4 °C como padrão para comparar com as demais temperaturas.

### **4.6 Efeito da Temperatura e do Armazenamento sobre a Estabilidade Espectroscópica da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis***

#### *4.6.1 Termoestabilidade Espectroscópica*

A R-FE pura foi distribuída em tubos de ensaio contendo 5 mL cada, e transferidos para banho-maria, onde permaneceram incubadas por 1 hora nas temperaturas de 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C. As amostras foram transferidas para o banho de gelo ao término de cada período de incubação, com a finalidade de interromper o efeito da temperatura sobre as propriedades espectroscópicas do pigmento. Em seguida as amostras foram armazenadas a 4 °C para posteriores determinações dos seus espectros de absorção e emissão.

#### *4.6.2 Estabilidade Espectroscópica da R-ficoeritrina no Armazenamento*

Alíquotas de 2 mL da R-FE pura foram distribuídas em três grupos de 12 tubos de microcentrifuga (6 tubos para analisar absorbância e 6 tubos para analisar fluorescência),

totalizando 36 tubos, os quais foram submetidos a três diferentes condições de armazenamento (-20, 4 e 25 °C) por um período de 30 dias. A cada cinco dias foram retirados, de cada grupo, um tubo para determinação dos espectros de absorção e um tubo para determinação dos espectros de emissão de fluorescência, sendo, em seguida, analisados seguindo a metodologia descrita no item 4.6.1. Os resultados foram expressos baseados na perda da intensidade de fluorescência e na variação de absorção dos três picos máximos existentes na R-FE.

#### **4.7 Análises Estatísticas**

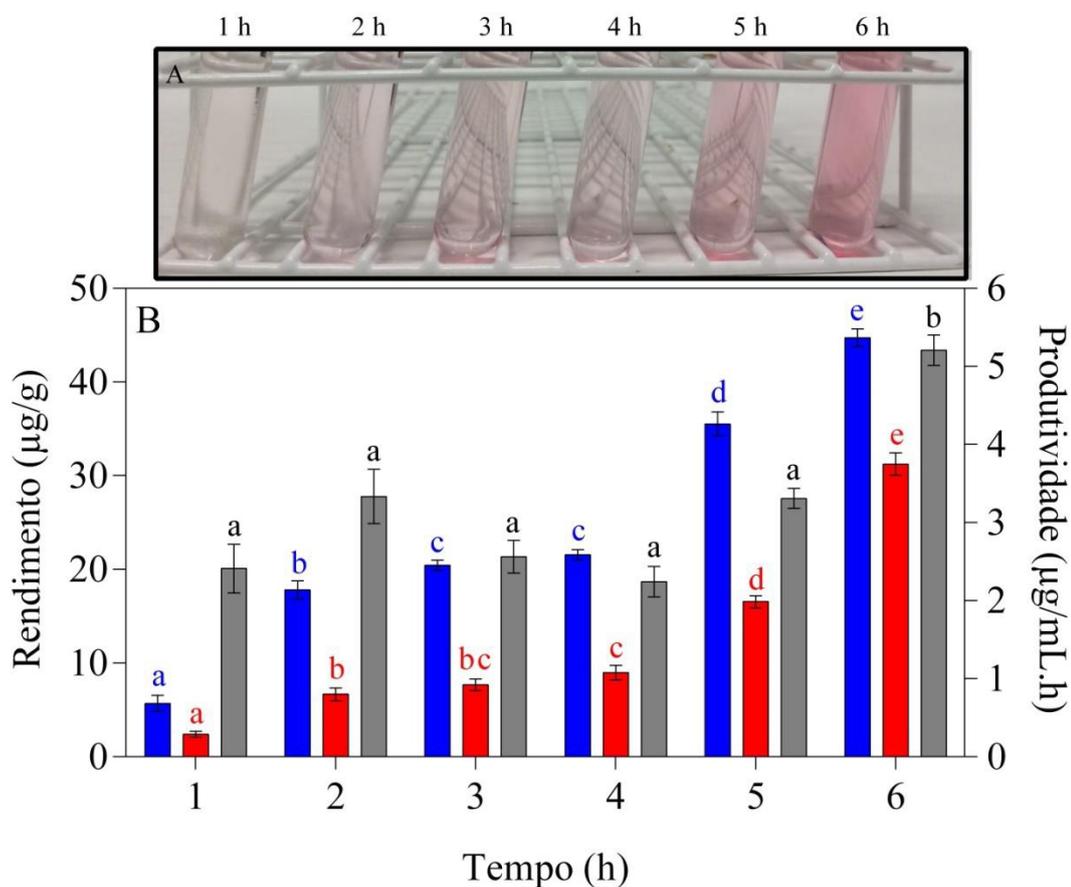
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  D.P. (Desvio Padrão). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos, foi utilizado o método de análise de variância (*one-way* ANOVA e *two-way* ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Turkey. Considerou-se significativo 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

### 5.1 Efeito do Tempo sobre o Rendimento e a Produtividade dos Processos de Extração da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

A coloração dos extratos proteicos totais de *S. filiformis*, obtidos em diferentes tempos de extração, pode ser observada na Figura 12A, na qual o extrato obtido após 6 horas de contato apresentou nitidamente coloração rosa mais intensa. Tal fato foi confirmado pelos rendimentos e produtividades dos processos de extração de R-FE de *S. filiformis* observados, os quais apresentaram valores crescentes e significativos ( $p < 0,05$ ) no decorrer do tempo (Figura 12B). No extrato obtido com 1 h de contato, o rendimento de R-FE foi de 2,41  $\mu\text{g/g}$ . Porém, foram observados aumentos significativos nos rendimentos do pigmento nos extratos obtidos com 2, 4, 5 e 6 h de contato, alcançando um valor máximo de 31,24  $\mu\text{g/g}$  de alga úmida com o tempo de seis horas de contato, levando a um aumento de rendimento de R-FE de treze vezes em relação ao tempo de uma hora de contato. Tal rendimento gerou a produtividade máxima observada de 5,21  $\mu\text{g/mL.h}$  dentre os processos de extração testados e foi cerca de duas vezes maior que a produtividade do processo de extração da R-FE com o tempo de contato de uma hora. Os rendimentos de proteínas nos extratos totais mostraram comportamentos semelhantes aos da R-FE, com aumentos sucessivos no decorrer do tempo, chegando a um aumento no rendimento de proteínas de oito vezes do tempo de contato de seis horas em relação ao tempo de contato de uma hora, porém, os valores quantitativos de R-FE se mostraram inferiores aos obtidos para as proteínas totais. No extrato total obtido após 6 horas de contato, o rendimento de proteínas foi 69,82% superior ao teor da R-FE. Diante do exposto, o extrato obtido com 6 horas de contato foi denominado EBP-Sf e passou a ser utilizado para dar prosseguimento ao processo de purificação da R-FE de *S. filiformis*.

Figura 12. Extratos Brutos Proteicos de *Solieria filiformis* obtidos após Diferentes Tempos de Contato da Macroalga com Tampão PB.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** A - Intensidade da coloração rosa; B - Rendimento de R-FE (■), proteínas (■) e produtividade dos processos de extração (■). Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey, onde letras iguais indicam inexistência de diferença significativa a um nível de 5% em grupos de mesma cor.

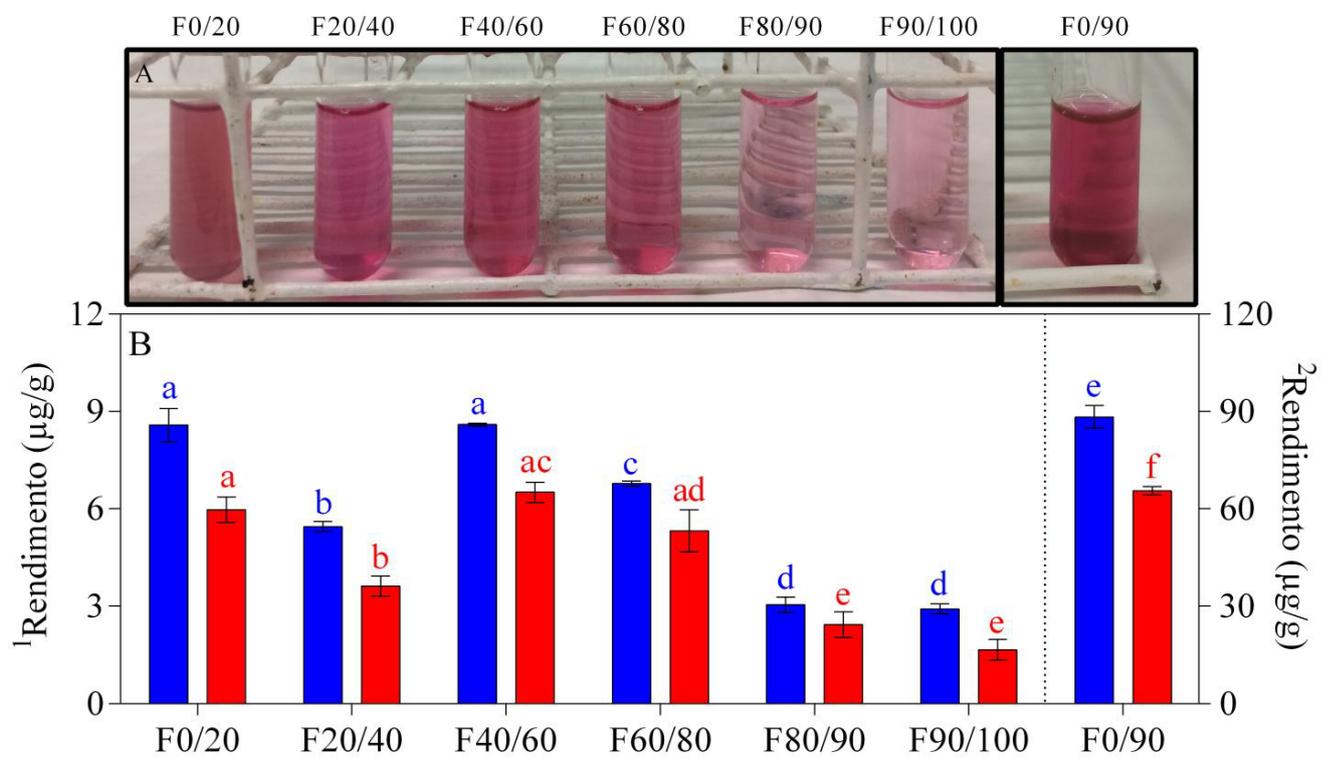
## 5.2 Purificação do Pigmento R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

### 5.2.1 Fracionamento Proteico do Extrato Total por Sulfato de Amônio

As proteínas presentes no EBP-Sf foram fracionadas através da precipitação por sulfato de amônio em diferentes graus de saturação, com a finalidade de avaliar a contribuição do método como uma etapa de purificação da R-FE de *S. filiformis*. A Figura 13A mostra os aspectos visuais das diferentes frações obtidas, ficando evidente a presença de R-FE em todas as frações, porém mostrando mais intensidade nas frações F0/20, F20/40, F40/60 e F60/80.

Os rendimentos de proteínas e R-FE das frações estão mostrados na Figura 13B. Os rendimentos de R-FE nas frações variaram de 1,66 a 6,51  $\mu\text{g/g}$  de alga úmida para F90/100 e F40/60, respectivamente. O mesmo ocorreu com os rendimentos de proteínas, que variaram de 2,92  $\mu\text{g/g}$  a 8,60  $\mu\text{g/g}$  para as frações F90/100 e F40/60, respectivamente. De acordo com esses resultados, ficou decidido concentrar a R-FE com 90% de saturação de sulfato de amônio (F0/90) que apresentou um rendimento de 65,70  $\mu\text{g/g}$  de alga úmida. Os índices de pureza obtidos para as frações F0/20, F20/40, F40/60, F60/80, F80/90, F90/100 e F0/90 são 0,31, 0,76, 1,13, 1,06, 0,91, 0,57 e 0,54, respectivamente. Diante desses resultados, e, com o objetivo de aumentar a recuperação do pigmento ao final do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis*, a F0/90 foi selecionada.

Figura 13. Frações proteicas de *Solieria filiformis* obtidas por Precipitação com Sulfato de Amônio em Diferentes Faixas de Saturação.

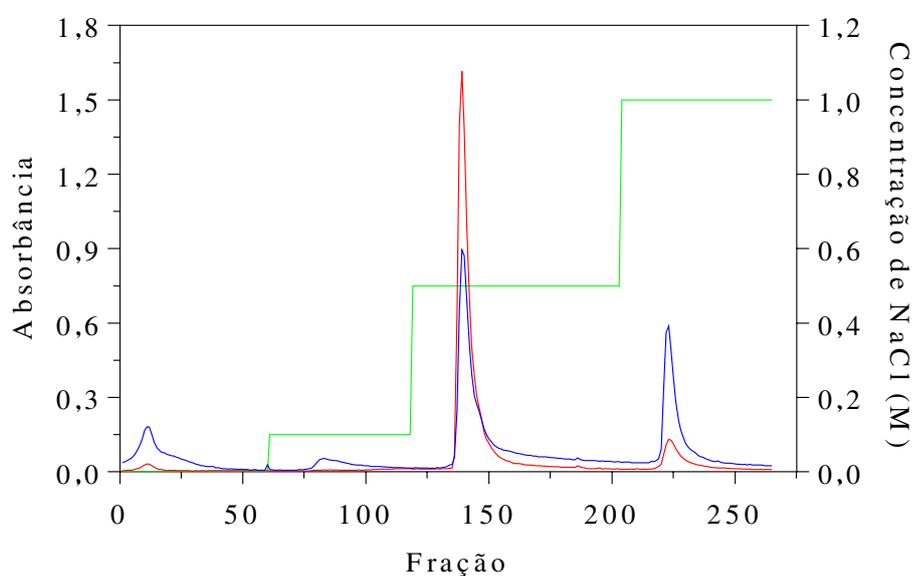


**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** A – Aspecto visual das frações; B- Rendimento de proteínas (■) e R-FE (■). Eixo de rendimento <sup>1</sup> refere-se as F0/20 a F90/100, eixo de rendimento <sup>2</sup> refere-se a F0/90. Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey, onde letras iguais indicam inexistência de diferença significativa a um nível de 5% em grupos de mesma cor.

### 5.2.2 Cromatografia de Troca Iônica em matriz de DEAE-Sephacel

A F0/90, ao ser submetida à cromatografia de troca-iônica em matriz de DEAE-Sephacel, mostrou a presença de quatro picos proteicos (Figura 14). O primeiro pico (PI-DEAE), eluído com tampão PB, e o segundo pico (PII-DEAE), eluído com tampão PB contendo NaCl 0,1 M, mostraram-se isentos de coloração; o terceiro pico (PIII-DEAE), eluído com tampão PB contendo 0,5 M de NaCl, apresentou coloração rosa intensa e alta absorvância a 564 nm, característico da presença de R-FE e teores de proteína e R-FE de 3,71 e 2,97 mg, respectivamente. O quarto e último pico (PIV-DEAE) apresentou coloração rosa, porém de baixa intensidade. Com o objetivo de aumentar o índice de pureza do pigmento para níveis comerciais, o PIII-DEAE foi selecionado para aplicação em cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300.

Figura 14. Perfil Cromatográfico da F0/90 de *Solieria filiformis* submetida à Cromatografia de Troca Iônica em matriz de DEAE-Sephacel.

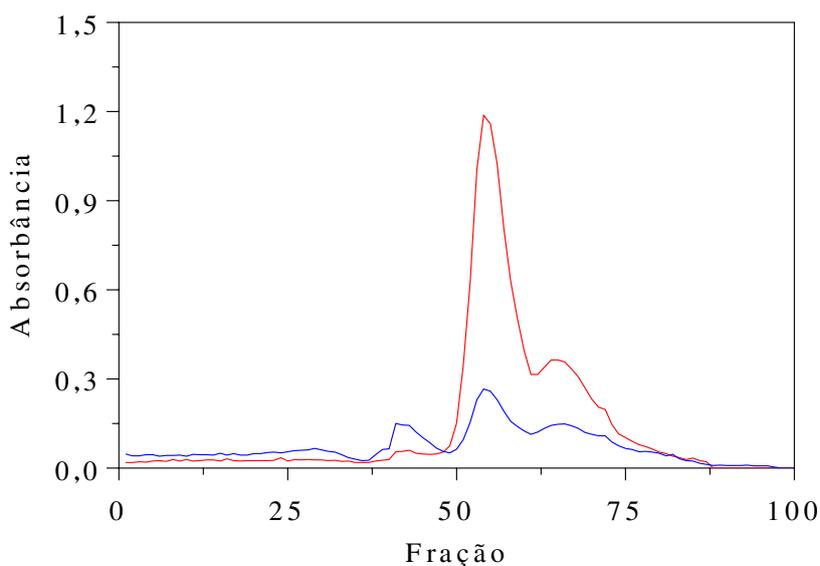


**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Cerca de 8 mg de proteína da F0-90 foi aplicada na cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel. A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,025M, pH 6,5 (PB), o qual também foi utilizado para remoção do pico não retido (PI-DEAE). Para remoção do material retido, foi utilizado PB com NaCl 0,1 M (PII-DEAE), 0,5 M (PIII-DEAE) e 1 M (PIV-DEAE). Fluxo: 1,4 mL/min; Fração: 3 mL por tubo. (—) Absorbância a 280 nm; (—) Absorbância a 564 nm; (—) Concentração de NaCl.

### 5.2.3 Cromatografia de Exclusão Molecular em matriz de Sephacryl S-300

O PIII-DEAE, aplicado em uma matriz de Sephacryl S-300 para realização da cromatografia de exclusão molecular, apresentou três picos proteicos com massas moleculares distintas, mostrados na Figura 15. No entanto, as frações cromatográficas referentes ao pico II (PII-Sephacryl) foram as que apresentaram maiores absorbâncias a 564 nm e os maiores índices de pureza do pigmento. As frações cromatográficas eluídas que apresentaram a R-FE com índices de pureza superiores ou igual a 4,0 foram reunidas e a solução resultante foi denominada R-FE pura.

Figura 15. Perfil Cromatográfico do PIII-DEAE submetido à Cromatografia de Exclusão Molecular em matriz de Sephacryl S-300.

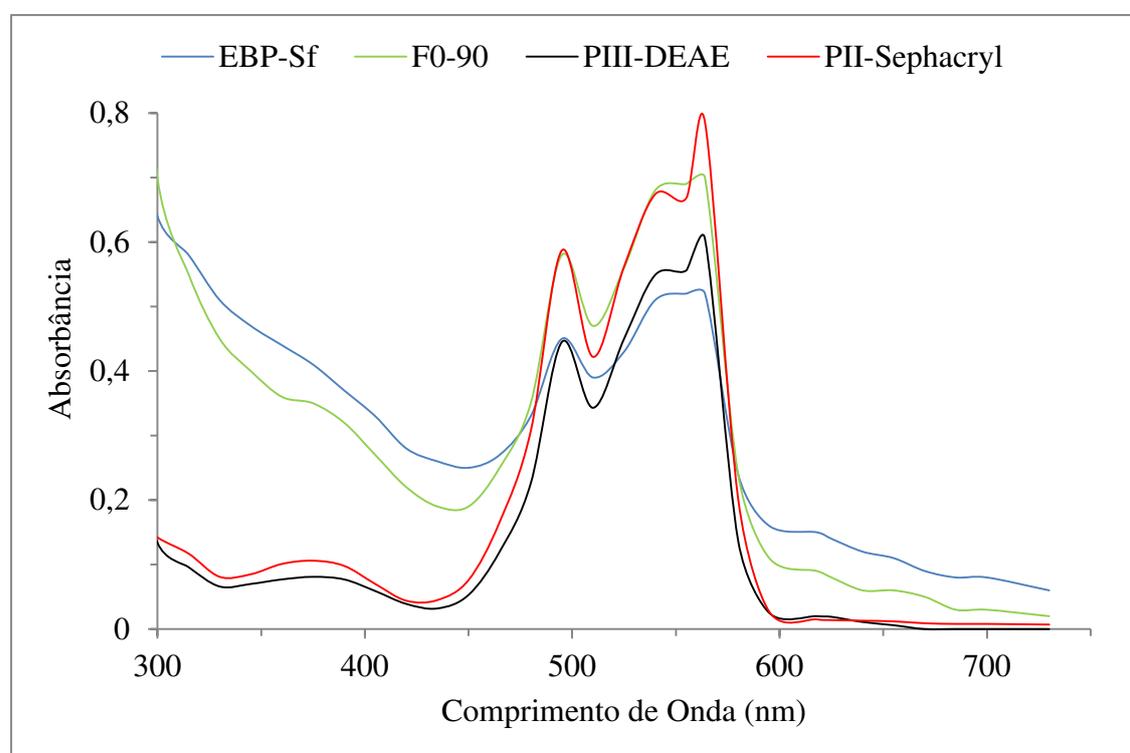


**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Cerca de 3 mg de proteína do PIII-DEAE foi aplicado na cromatografia de exclusão molecular em matriz de Sephacryl S-300. A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,025M, pH 6,5 (PB), o qual também foi utilizado para eluição dos picos. Fluxo: 1 mL/min; Fração: 2 mL por tubo. (—) Absorbância a 280 nm; (—) Absorbância a 564 nm.

### 5.3 Rendimentos, Índices de Pureza e Espectros de Absorção das Etapas de Extração e Purificação

A Figura 16 mostra os espectros de absorção do EBP-Sf e de todas as etapas de purificação da R-FE. O EBP-Sf apresentou picos de absorção em 495 nm e entre 540 a 564 nm, característicos de R-FE, porém pouco definidos, evidenciando a presença de compostos contaminantes capazes de absorver a luz em outros comprimentos de onda, sendo possível perceber a contaminação, também, pelo baixo índice de pureza do extrato (0,42). Com o avanço das etapas de purificação, precipitação por sulfato de amônio (F0/90), cromatografia de troca iônica (PIII-DEAE) e cromatografia de exclusão molecular (PII-Sephacryl), notou-se um aumento gradativo dos índices de pureza, 0,54, 1,63 e 4,50, respectivamente, bem como, uma definição dos três picos máximos de absorção em 495, 540 e 564 nm, característicos da R-FE, evidenciando uma redução na presença de compostos contaminantes e corroborando com o processo de purificação do pigmento. Entretanto, com o aumento do índice de pureza da R-FE, observa-se, também, uma diminuição do seu rendimento e da sua recuperação, 17,40  $\mu\text{g}$  de pigmento/g de alga úmida e 12,78%, respectivamente. Ao atingir esse patamar de purificação, a R-FE purificada apresenta sua coloração característica, rosa/avermelhado e alta fluorescência (Figura 17). Na Tabela 4 é mostrado o rendimento de proteínas totais ( $\mu\text{g/g}$ ) e o rendimento (demonstrados em  $\mu\text{g/g}$  e  $\text{mg/g}$ ), recuperação e índice de pureza da R-FE em cada etapa do processo de purificação.

Figura 16. Espectro de Absorção das Soluções Pigmentadas resultantes de cada etapa do Processo de Purificação da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*



Fonte: Elaborado pelo autor.

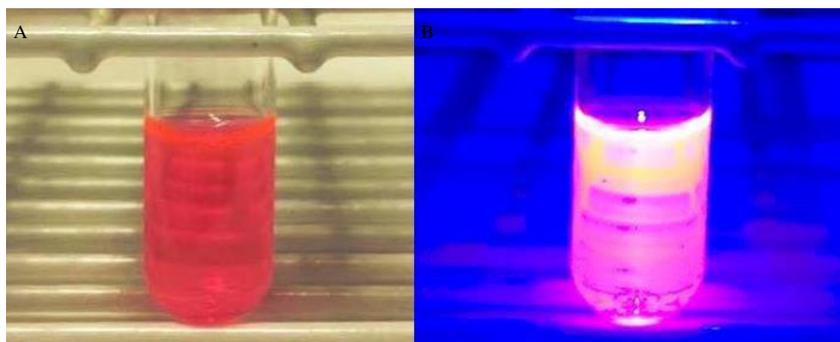
Tabela 4. Tabela de Purificação da R-Ficoeritrina da Macroalga Marinha Vermelha *Solieria filiformis*

Etapa de Purificação	Rendimento <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )		Rendimento <sup>b</sup> ( $\text{mg/g}$ )	Recuperação <sup>c</sup> (%)	Índice de Pureza
	Proteína	R-FE			
EBP-Sf	145,00	136,10	1,36	100,00	0,42
F0-90	88,00	65,70	0,65	48,27	0,54
PIII-DEAE	37,10	29,70	0,29	21,82	1,63
PII-Sephacryl	18,00	17,40	0,17	12,78	4,50

Fonte: Elaborado pelo autor. **Legenda:** <sup>a</sup> Calculado com base na massa úmida da macroalga *S. filiformis* (100 g);

<sup>b</sup> Calculado com base na massa seca da macroalga *S. filiformis* (liofilizada com 10% de umidade); <sup>c</sup> Recuperação foi expressa como a quantidade de R-FE obtida para a quantidade de R-FE presente no EBP-Sf.

Figura 17. Coloração e Fluorescência da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*.

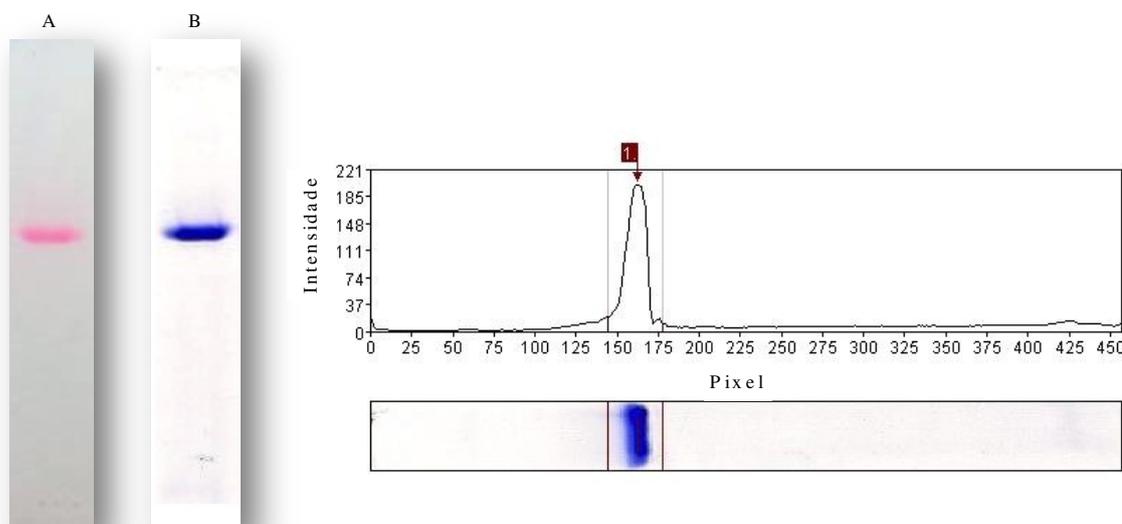


**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** A – Coloração da R-FE sob luz branca; B – Fluorescência da R-FE sob luz azul.

#### 5.4 Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida

Para confirmar a pureza da R-Ficoeritrina, o PII-Sephacryl foi submetido a duas análises eletroforéticas em condições desnaturantes na ausência e na presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, onde foram avaliadas antes e depois de colocar a solução corante no gel. A R-FE, ao ser submetida ao procedimento de eletroforese na ausência do agente redutor (Figura 18), apresentou uma única banda, referente à proteína íntegra, antes e depois do processo de coloração por coomassie, confirmando, assim, sua pureza.

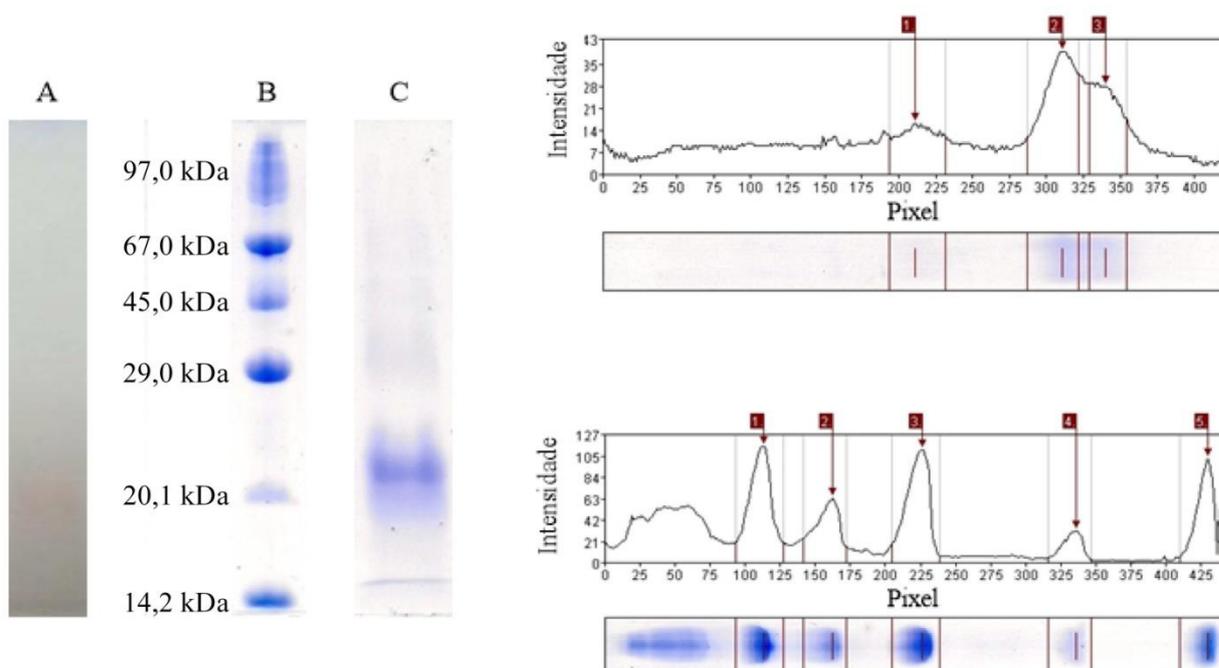
Figura 18. Eletroforese da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na ausência do agente redutor.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Eletroforese antes (A) e após (B) coloração por coomassie.

A R-FE, ao ser submetida à eletroforese na presença do agente redutor (Figura 19), apresentou, antes da coloração por coomassie, perda da sua coloração característica, podendo ser percebido, apenas, uma banda clara na altura de 20 kDa, correspondendo as subunidades alfa e beta; após realizar o procedimento de coloração por coomassie, ela apresentou três bandas proteicas, duas bandas de massas moleculares aproximadas e mais intensas na faixa de 18 e 20 kDa, correspondendo as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente, e, uma banda na faixa de 37 kDa, correspondendo a subunidade  $\gamma$ , mostrando-se menos intensa. A partir desses resultados, e do elevado grau de pureza obtido no PII-Sephacryl, sugere-se que o pigmento está puro e que possui três subunidades na sua composição.

Figura 19. Eletroforese da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença do agente redutor.



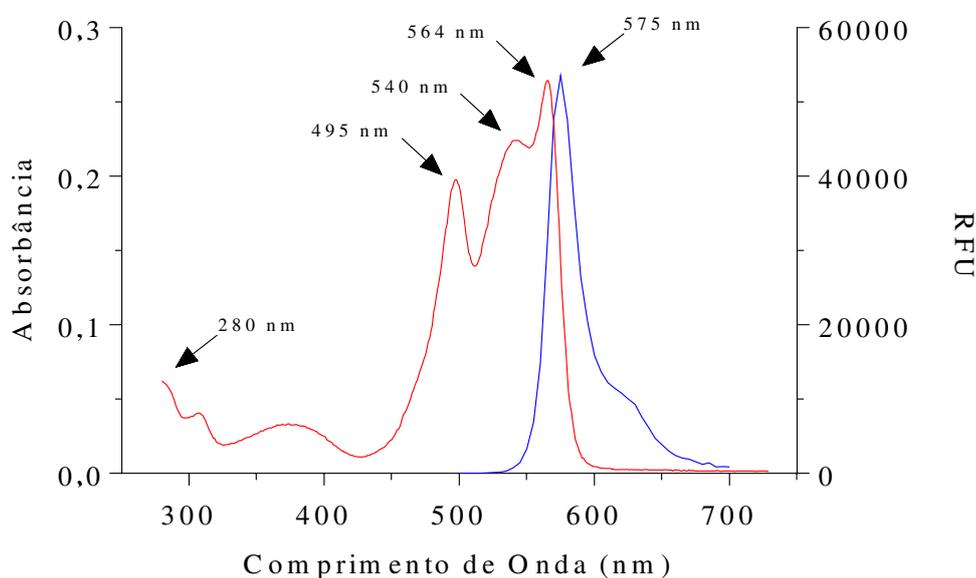
**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** A – Eletroforese antes da coloração por coomassie; B – Marcador de massa molecular; C – Eletroforese após coloração por coomassie.

## 5.5 Caracterizações Espectroscópicas da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

### 5.5.1 Absorbância e Fluorescência

O espectro de absorbância da R-FE de *S. filiformis* apresentou dois picos a 495 e 564 nm e um ombro a 540 nm, já a emissão de fluorescência, quando excitado a 495 nm, apresentou um único pico a 575 nm (Figura 20).

Figura 20. Características espectroscópicas da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Para absorbância (—) foi utilizada uma solução de R-FE de 0,05 mg/mL. Já para a emissão de fluorescência (—) foi utilizada uma solução de R-FE pura de 0,001 mg/mL. RFU = Unidade relativa de fluorescência.

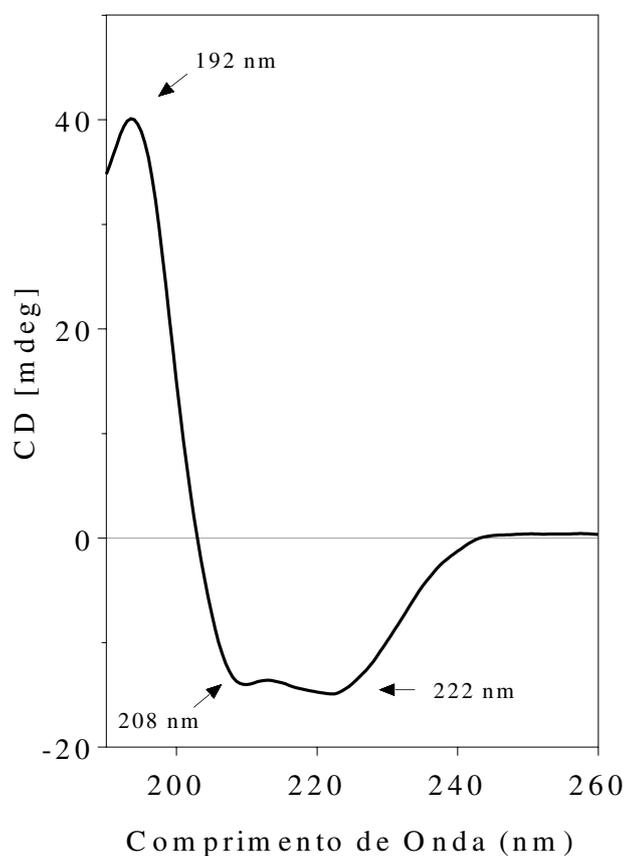
### 5.5.2 Dicroísmo circular da R-ficoeritrina de *Solieria filiformis*

O espectro de dicroísmo circular (CD) da estrutura secundária do pigmento R-FE de *S. filiformis* foi realizado com a finalidade de caracterizar sua composição estrutural quanto a presença de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  e estruturas não ordenadas, sendo utilizado o servidor online K2D3 para analisar os espectros de CD.

### 5.5.2.1 Composição Estrutural do Pigmento R-Ficoeritrina em Condições Nativas

O espectro de dicroísmo circular (CD) da R-FE purificada, em condições nativas, realizado na faixa do UV-distante (190-260 nm) apresentou duas intensas bandas negativas a 222 e 208 nm e uma intensa banda positiva a 192 nm (Figura 21). De acordo com esses dados, a R-FE de *S. filiformis* apresentou 60,19% de alfa hélice, 2,42% de folhas betas e 37,39% de estruturas não ordenadas, quando analisados pelo servidor online K2D3.

Figura 21. Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis*

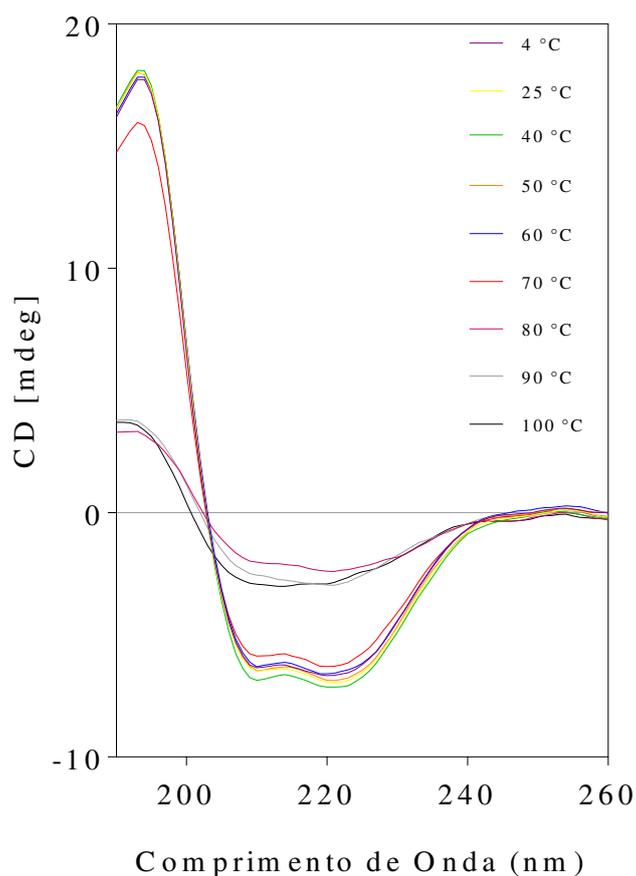


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 5.5.2.2 Efeito da Temperatura sobre o Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina

Os espectros de dicroísmo circular da R-FE de *S. filiformis*, quando submetida a diferentes temperaturas por um período de 1 h, mostraram que a estrutura secundária do pigmento começou a sofrer alterações a partir de 70 °C, sofrendo uma pequena variação do seu espectro de CD, porém ao atingir 80 °C, já ocorreu uma mudança drástica no seu espectro (Figura 22). Ao analisar os dados de CD no servidor online K2D3 podemos de fato confirmar essa mudança na sua conformação secundária, onde, a partir de 80 °C, a R-FE perde toda sua conformação característica de  $\alpha$ -hélice (Tabela 5).

Figura 22. Efeito da Temperatura sobre o Espectro de Dicroísmo Circular da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,05 mg/mL.

Tabela 5. Elementos de Estrutura Secundária, estimados a partir do Espectro de Dicroísmo Circular, da R-Ficoeritrina pura em Diferentes Temperaturas.

Amostra	Estrutura Secundária (%)		Estruturas não ordenadas (%)
	$\alpha$ -hélice	folhas- $\beta$	
R-FE (4 °C)	60,19	2,42	37,39
R-FE (25 °C)	60,97	2,26	36,77
R-FE (40 °C)	62,38	1,87	35,75
R-FE (50 °C)	61,75	2,17	36,08
R-FE (60 °C)	60,21	2,39	37,40
R-FE (70 °C)	55,33	5,30	39,37
R-FE (80 °C)	3,36	32,91	63,73
R-FE (90 °C)	5,22	31,07	63,71
R-FE (100 °C)	10,51	26,71	62,78

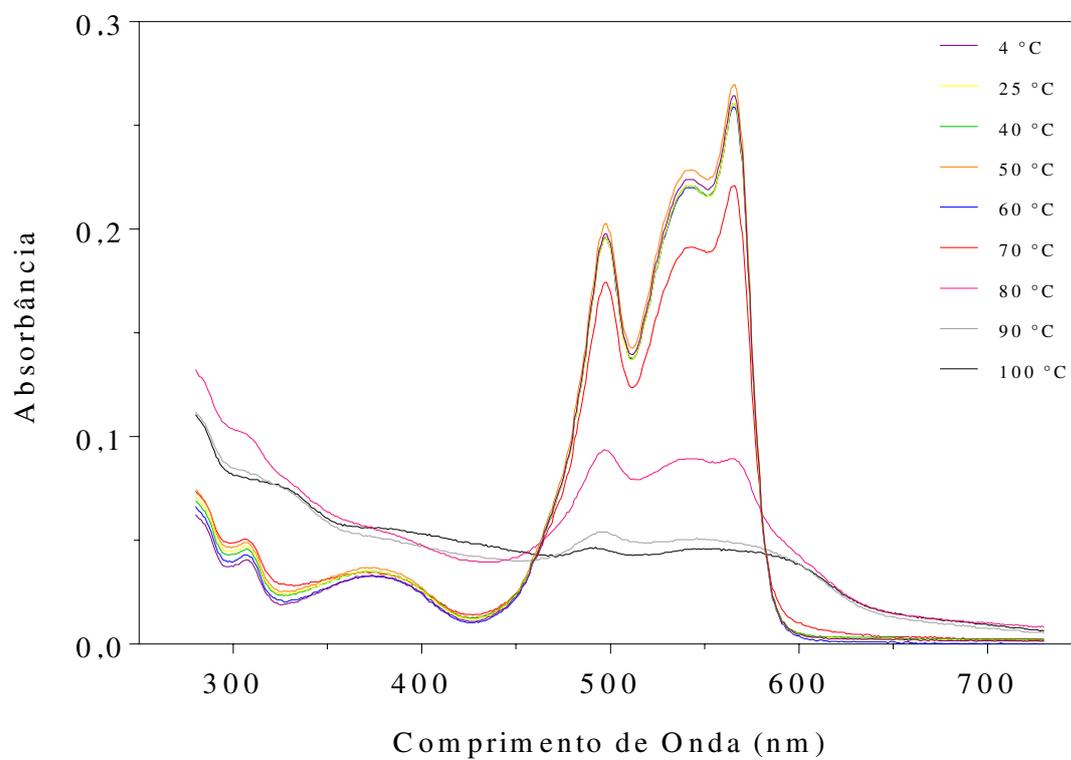
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.6 Efeito da Temperatura e do Armazenamento sobre a Estabilidade Espectroscópica da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

### 5.6.1 Termoestabilidade Espectroscópica

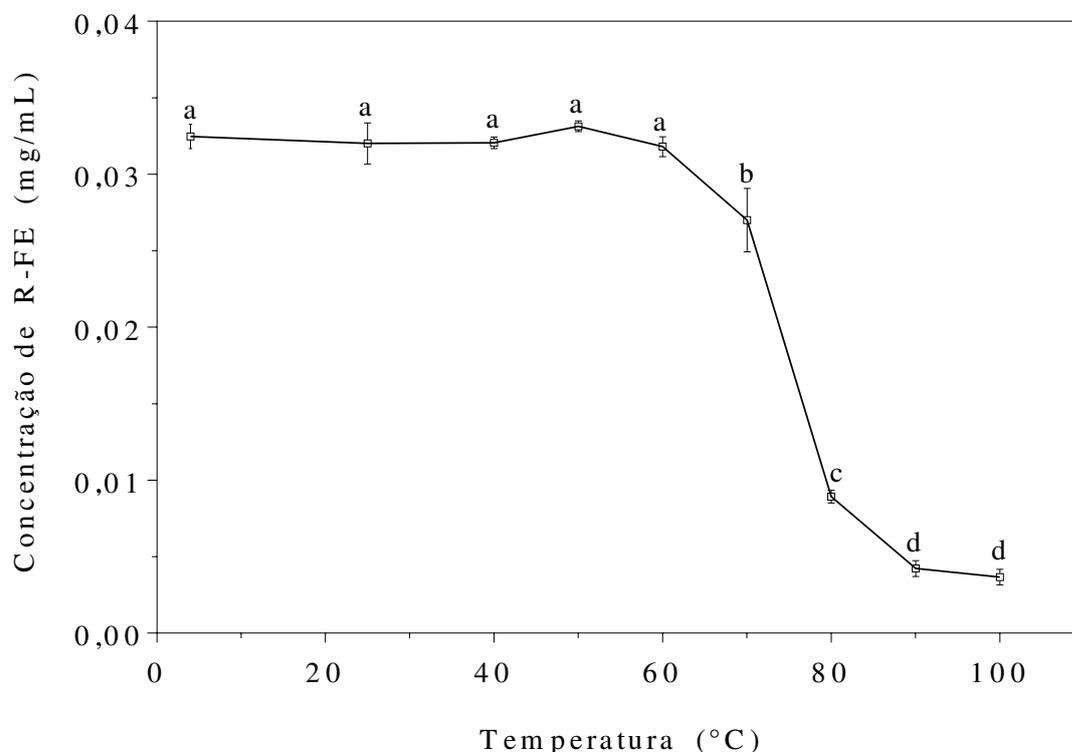
Os espectros de absorção da R-FE de *S. filiformis* submetida a diferentes temperaturas por 1 h (Figura 23) mostraram que o pigmento mantém sua capacidade máxima de absorção até 60 °C. A partir de 70 °C pode-se perceber uma leve alteração do seu perfil espectroscópico de absorção e uma alteração brusca ao atingir a temperatura de 80 °C, corroborando com os dados obtidos a partir do espectro de CD. Ao analisar estatisticamente a concentração de pigmento presente em cada temperatura, percebeu-se que a R-FE possui uma mudança significativa ( $p < 0,05$ ) na sua concentração ao atingir 70 °C ocorrendo uma redução de 15,6%, e é observada uma redução maior de 72,1% e 86,8% ao atingir 80 °C e 90 °C, respectivamente (figura 24).

Figura 23. Espectros de Absorção da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* submetida a Diferentes Temperaturas por um período de 1 h.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,05 mg/mL

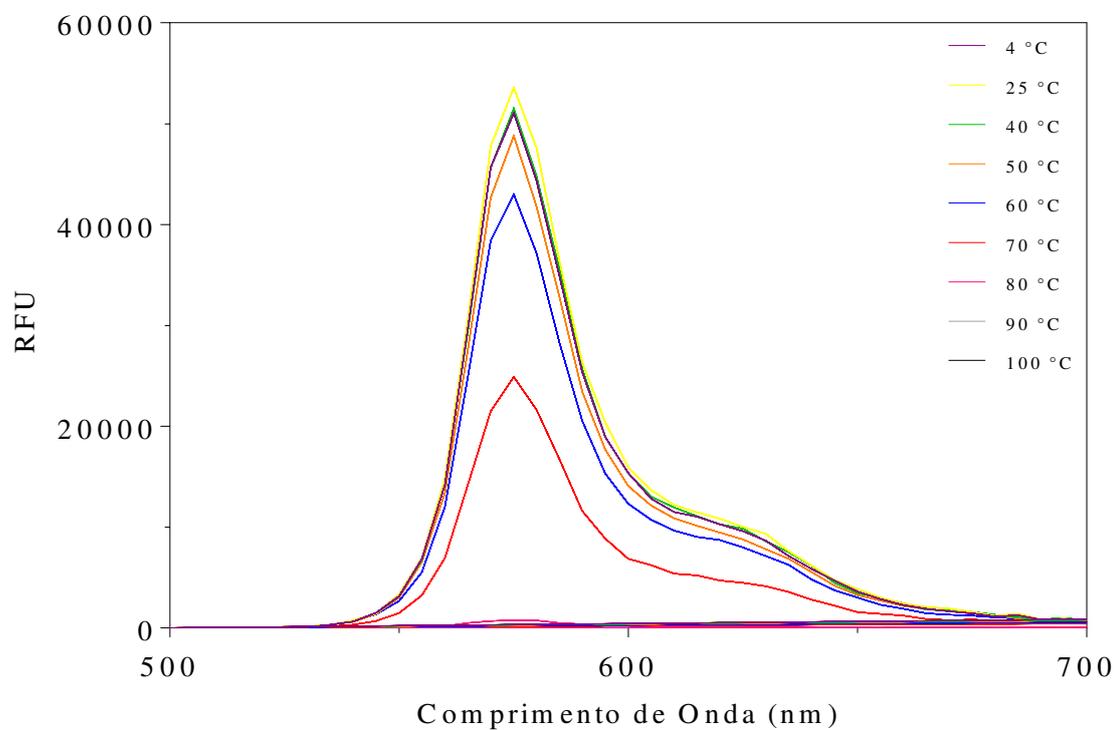
Figura 24. Efeito da Temperatura sobre a Concentração de R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis*



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

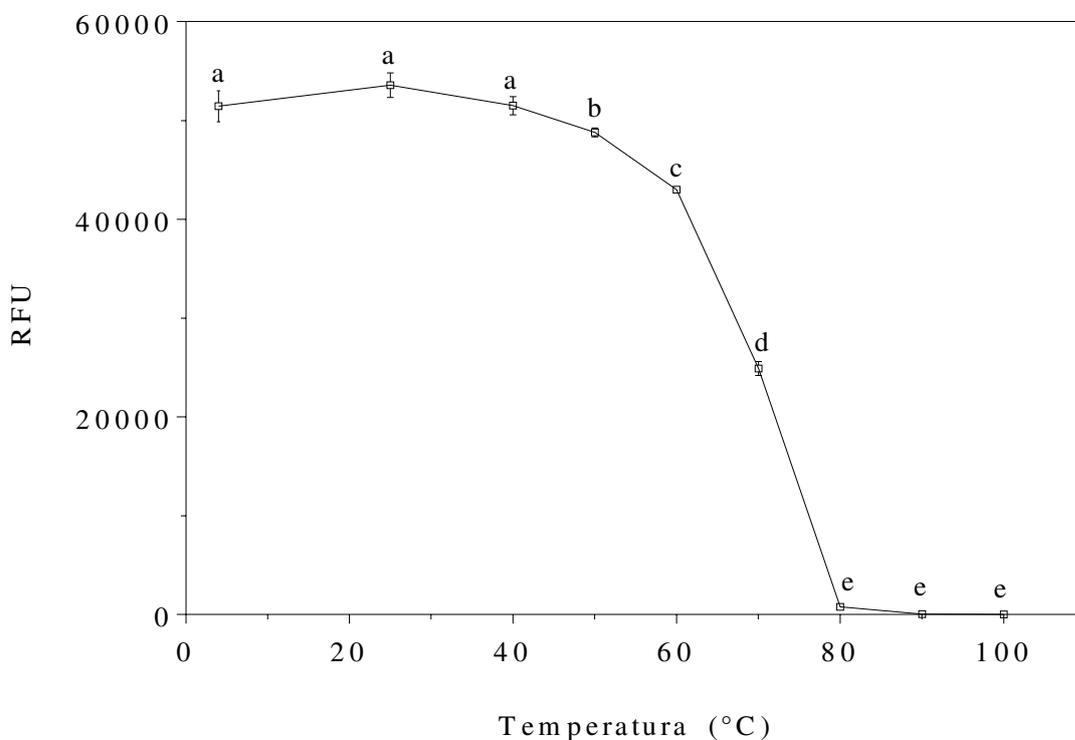
Já os espectros de emissão de fluorescência em diferentes temperaturas, apresentados na Figura 25, mostraram que a capacidade de emissão de fluorescência da R-FE de *S. filiformis* foi mais sensível que a capacidade de absorção. Ao analisarmos a unidade relativa de fluorescência da R-FE, percebemos que ela é estável até 40 °C, ocorrendo mudanças significativas ( $p < 0,05$ ) a partir de 50 °C, entretanto, a mudança maior ocorre quando se chega à temperatura de 70 °C ocorrendo uma redução na emissão de fluorescência de 53,5% e aumentando para 98,5% e 99,9% ao atingir a temperatura de 80 °C e 90 °C, respectivamente (figura 26).

Figura 25. Espectros de Emissão de Fluorescência da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis* submetidas a Diferentes Temperaturas por um período de 1 h.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,001 mg/mL. RFU = Unidade Relativa de Fluorescência.

Figura 26. Efeito da Temperatura sobre o Pico de Emissão de Fluorescência (575 nm) da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*



**Fonte:** Elaborado pelo autor. Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,001 mg/mL. Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ), onde letras iguais indicam que não diferem estatisticamente. RFU = Unidade Relativa de Fluorescência.

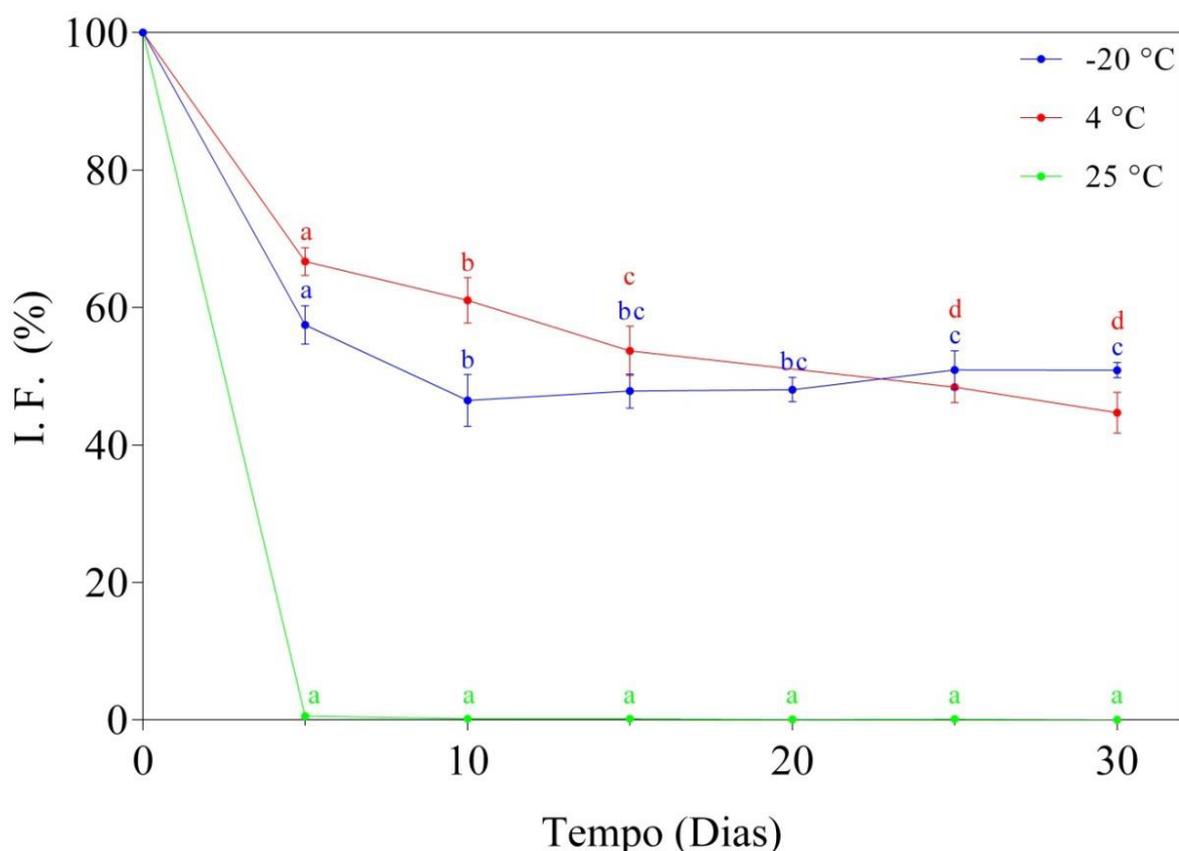
### 5.6.2 Estabilidade Espectroscópica no Armazenamento

A temperatura convencional recomendada de armazenamento de R-FE pura (Sigma) e outros pigmentos é de 4 e  $-20^{\circ}\text{C}$ , logo, o presente trabalho optou por usar essas temperaturas recomendadas para as análises, e a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

Ao analisarmos a capacidade de emissão de fluorescência da R-FE durante 30 dias em 3 condições diferentes de temperatura (figura 27), podemos perceber que ao armazenar o pigmento a  $-20^{\circ}\text{C}$  ocorre uma perda de fluorescência de 42,5% nos 5 primeiros dias, porém essa perda se mantém constante, fato não observado para a R-FE armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$  que tem uma perda menor durante os 5 primeiros dias (33,3%), porém vai perdendo gradualmente com o passar dos dias, chegando a não ter diferença estatística entre as intensidades de fluorescência entre as condições de armazenamento de  $-20$  e  $4^{\circ}\text{C}$  no vigésimo quinto dia.

Entretanto, ao chegar ao trigésimo dia a perda da intensidade de fluorescência da R-FE armazenada a 4 °C já é maior que a perda relatada no armazenamento a -20 °C. O pigmento armazenado a 25 °C tem sua fluorescência perdida durante os 5 primeiros dias de armazenamento.

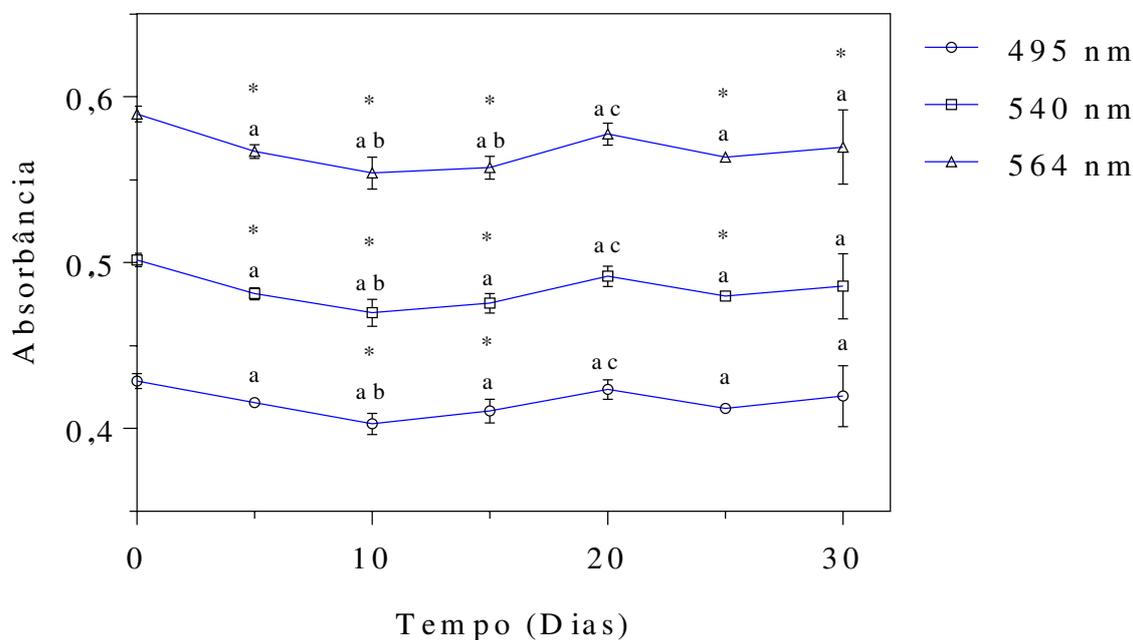
Figura 27. Capacidade Fluorescente da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* submetida a 30 dias de Armazenamento em vidro âmbar, sob as Temperaturas -20, 4 e 25 °C.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ), onde letras e cores iguais indicam que não diferem estatisticamente. I.F. – Intensidade de Fluorescência. Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,001 mg/mL

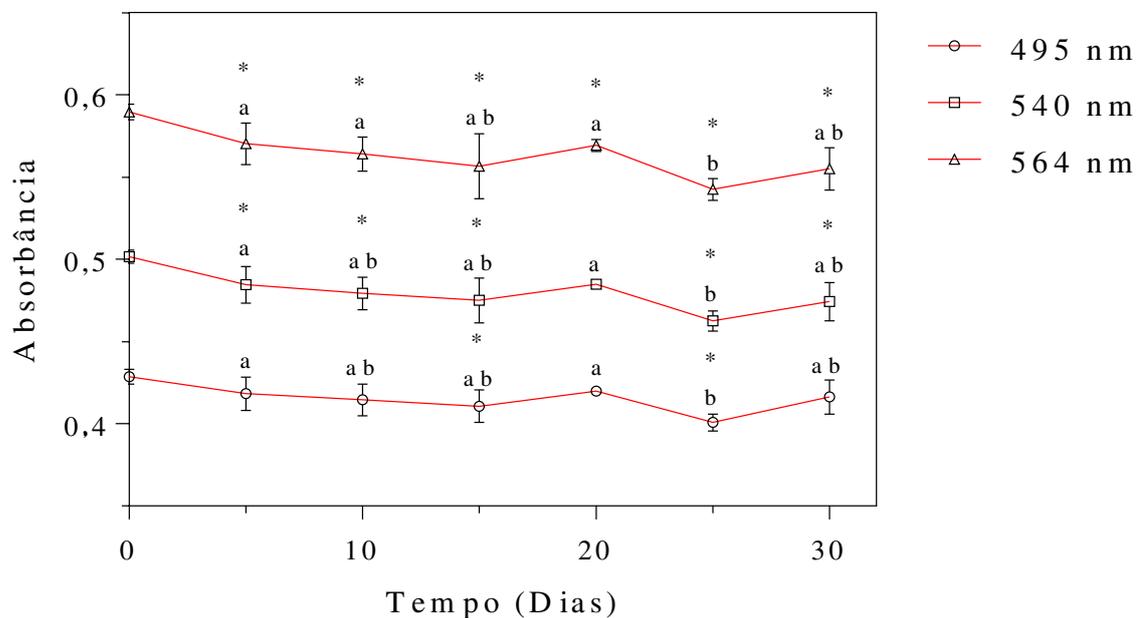
Com relação aos picos máximos de absorvância (495, 540 e 564 nm), podemos perceber que eles permaneceram relativamente constantes com relação às condições de armazenamento nas temperaturas de -20 °C (figura 28) e 4 °C (figura 29), fato não observado para as condições de armazenamento a 25 °C (figura 30), onde, ao término dos 30 dias, são relatadas decréscimo dos picos de absorção 495, 540 e 564 nm em 81,6% 90,6% e 92,7 %, respectivamente.

Figura 28. Estabilidade dos Picos de Absorção da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* Armazenada em vidro âmbar, a Temperatura de -20 °C por 30 dias.



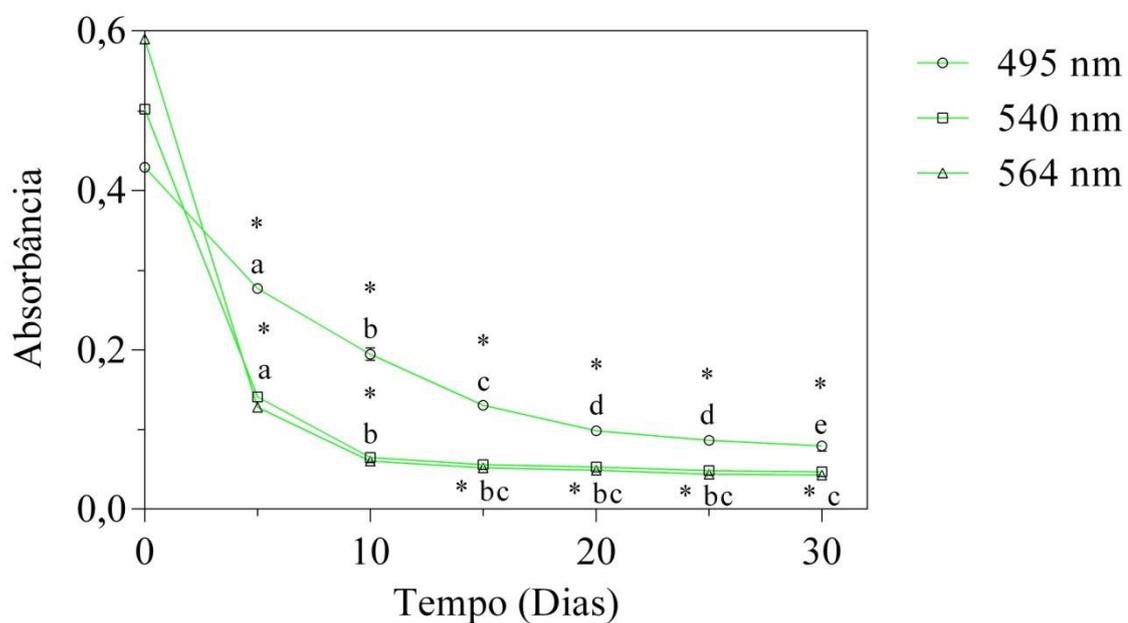
**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ), onde os comprimentos de onda são analisados separadamente, letras iguais indicam que não diferem estatisticamente, e \* significa que difere estatisticamente da absorbância inicial (0 dias). Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,05 mg/mL.

Figura 29. Estabilidade dos Picos de Absorção da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* Armazenada em vidro âmbar, a Temperatura de 4 °C por 30 dias.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ), onde os comprimentos de onda são analisados separadamente, letras iguais indicam que não diferem estatisticamente, e \* significa que difere estatisticamente da absorbância inicial (0 dias). Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,05 mg/mL.

Figura 30. Estabilidade dos Picos de Absorção da R-Ficoeritrina pura de *Solieria filiformis* Armazenada em vidro âmbar, a Temperatura de 25 °C por 30 dias.



**Fonte:** Elaborado pelo autor. **Legenda:** Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ), onde os comprimentos de onda são analisados separadamente, letras iguais indicam que não diferem estatisticamente, e \* significa que difere estatisticamente da absorbância inicial (0 dias) Concentração de proteína de R-ficoeritrina de 0,05 mg/mL.

## 6 DISCUSSÃO

A extração de R-FE de macroalgas vermelhas vem sendo realizada através do contato da alga triturada com soluções aquosas compostas por água destilada, água do mar e tampões visando estabelecer métodos que proporcionem altos rendimentos de extração.

Ao avaliar diferentes solventes para a extração das ficobiliproteínas a partir de *Gracilaria crassa*, Sudhakar *et al.* (2015) relataram que o tampão fosfato e água destilada foram as soluções aquosas mais eficientes alcançando rendimentos, ao extrair com tampão fosfato, de 0,25, 0,27 e 0,37 mg/grama de alga úmida para FC, AFC e FE, respectivamente, e, ao extrair com água destilada, 0,28, 0,34, 0,50 mg/grama de alga úmida para FC, AFC e FE, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Denis *et al.* (2009) quando avaliaram a extração de R-FE a partir da macroalga úmida *Grateloupia turuturu* e alcançaram um rendimento de 1,07 mg/g de alga seca para extrações com tampão fosfato e 1,00 mg/g de alga seca para extrações com água destilada. Ao avaliar esses rendimentos de extração das R-FE com os valores obtidos a partir de *S. filiformis*, percebe-se que a eficiência de extração em tampão fosfato da *G. crassa* é maior do que a obtida por esse trabalho (0,136 mg/g de alga úmida), porém, ao compararmos com a eficiência de extração da *G. turuturu*, observamos que a extração de R-FE de *S. filiformis* é maior, chegando a um rendimento de 1,36 mg de R-FE por grama de alga seca. Entretanto, a produtividade dos processos de extração de R-FE da *G. turuturu* e *G. crassa* não pôde ser comparada pelo fato dos referidos autores não terem relatados a produtividade do processo. Sugere-se que essa diferença dos rendimentos entre esses três tipos de macroalgas se deve ao fato delas possuírem composições diferentes.

Pelo fato da escassez de dados sobre o método de extração escolhido pelos autores, como tempo de contato e tamanho da macroalga utilizada para extração, o presente trabalho detalha a metodologia de extração, bem como expõe os resultados de rendimento e produtividade obtidos da extração de R-FE em diferentes tempos de contato, variando de 1 até 6 horas, para definição do melhor protocolo de extração de R-FE a partir de *S. filiformis*, possibilitando, dessa forma, uma comparação mais eficiente com relação ao tempo de contato e produtividade obtidos na extração de R-FE com outros tipos de macroalgas, onde foi demonstrado que ao deixar o tampão fosfato em contato por 6 horas, a produtividade tornou-se duas vezes maior do que no tempo de contato de 1 hora. Em virtude da ocorrência de uma possível degradação da R-FE por ação de proteases, a extração proteica realizada, nesse estudo, foi avaliada durante um período de no máximo 6 horas de contato.

A R-FE é um pigmento fotossintetizante hidrofílico, com uma parte proteica na sua estrutura. Diante do exposto, foi utilizada uma técnica rápida e econômica para separar a R-FE de outras proteínas e polissacarídeos presentes no extrato total, cujo princípio se baseia no aumento da força iônica da solução por adição sulfato de amônio, onde as proteínas presentes na solução sofrem um processo chamado *salting-out* e precipitam de acordo com o nível de saturação do sal, permitindo, assim, a separação de misturas complexas de proteínas, visto que cada proteína tem sua carga, tamanho e solubilidade diferenciadas, necessitando de concentrações de sal diferentes para ocorrer à precipitação. Essa técnica de precipitação por sulfato de amônio vem sendo relatada para purificação de ficobiliproteínas (NIU *et al.*, 2013; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015).

O EBP-Sf foi submetido a sete faixas diferentes de concentração de sulfato de amônio com a finalidade de determinar a melhor faixa de precipitação de proteínas para conseguir a maior quantidade de R-FE em solução a partir da macroalga *S. filiformis*, onde foi possível observar que a R-FE se distribuiu em todas as faixas de precipitação testadas. O fato da R-FE de *S. filiformis* estar presente em todas as faixas de precipitação por sulfato de amônio sugere que exista diferença nas composições proteicas do pigmento.

Na literatura são relatadas diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio utilizadas no processo de fracionamento da R-Ficoeritrina de macroalgas. O extrato proteico da espécie *Bangia fusco-purpurea*, após ser submetido ao fracionamento proteico nas faixas F0/20, F20/25, F25/30, F30/35, F35/40, F40/45, F45/50, F50/55, F55/60, F60/70 e F70/100, teve seu conteúdo de pigmento concentrado na fração F35/50 (WU *et al.*, 2015), demandando uma menor quantidade de sulfato de amônio para precipitar as proteínas presente no extrato total. Resultado diferente foi observado no fracionamento proteico do EBP-Sf, bem como no extrato de *Amphiroa anceps*, nos quais os pigmentos se distribuíram em todas as frações. A escolha de uma das frações para dar prosseguimento ao processo de purificação da R-FE de *S. filiformis*, prejudicaria significativamente o rendimento final da R-FE pura. Portanto, a precipitação proteica com níveis de saturação mais elevados de sulfato de amônio (80% para *A. anceps* e 90% para *S. filiformis*), foi necessária como etapa de concentração do pigmento e descarte de outras biomoléculas presentes no sobrenadante (KAWSAR *et al.*, 2011). Assim sendo, o índice de pureza da R-FE de *S. filiformis* obtido após precipitação proteica foi de 0,54, resultado com índice de pureza semelhante foi observado com a macroalga *Heterosiphonia japonica* que, após precipitação proteica com sulfato de amônio a 85%, foi obtido um índice de pureza de 0,78 (SUN *et al.*, 2009). Esses índices de purezas obtidos são

considerados baixos para aplicações comerciais, uma vez que as indústrias de alimentos e da área de saúde e pesquisa (diagnóstico) sugerem índices de 2,5 e 4,5, respectivamente, sendo necessário dar prosseguimento ao processo de purificação.

Com o objetivo de explorar as diferenças no sinal da carga elétrica das proteínas presente na solução proteica bruta (F0-90), e, de acordo com a literatura, onde a R-ficoeritrina é uma proteína com ponto isoelétrico em torno de 5, foi utilizado o tampão fosfato de potássio com pH 6,5 para ressuspender a F0/90 e assim aplicar em cromatografia de troca iônica, onde a matriz utilizada foi de troca aniônica, retendo, assim, o pigmento de interesse, e, posteriormente, separando as proteínas retidas, com concentrações definidas de NaCl, em frações cromatográficas, almejando alcançar índices de pureza mais elevados da R-FE. Nessa etapa do processo de purificação, o índice de pureza da R-FE mudou de 0,54 na F0/90 para 1,63 na fração eluída por cromatografia de troca iônica.

Para purificação da R-FE de *Portieria hornemannii* e *B. fusco-purpurea*, foram utilizadas uma sequência de etapas similares ao do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis* (precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica) onde alcançaram elevados índices de pureza de 5,21 e 5,10, respectivamente, conseguindo purificar a R-FE com uma única etapa cromatográfica e com índice de pureza cerca de 3,5 pontos maior do que o obtido para *S. filiformis* (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2015). Entretanto, existem autores que preferem usar a cromatografia de troca iônica após a utilização de outros procedimentos cromatográficos, como é o caso das R-FE purificadas das macroalgas *Polysiphonia urceolata* por Wang *et al.* (2015), que, após cromatografia de exclusão molecular, conseguiu um índice de pureza de 0,9, e, quando realizou a troca iônica, o índice de pureza aumentou para 5,26. De maneira semelhante a R-FE da *Gracilaria lemaneiformis* foi purificada por Niu *et al.* (2013), que utilizaram o procedimento de cromatografia de interação hidrofóbica antes da cromatografia de troca iônica que apresentou um aumento do índice de pureza de 1,2 para 4,2. Ressalta-se ainda, que para a obtenção da R-FE de *H. japonica* por Sun *et al.* (2009), foi utilizado precipitação com sulfato de amônio, seguida de dois procedimentos de exclusão molecular com matrizes diferentes e um procedimento final de troca iônica, alcançando um índice de pureza de 4,89. Diferentemente, para a obtenção da R-FE da macroalga *G. turuturu* foi utilizado somente a cromatografia de troca iônica, que apresentou um índice de pureza de 2,89, no entanto, esse índice de pureza pode ser considerado bom, dependendo da aplicação almejada.

Como já descrito na literatura, a R-FE é uma molécula de peso molecular em

torno de 240 kDa. Diante de tal informação e com a finalidade de separar possíveis contaminações por FC e AFC, nesse trabalho foi utilizado cromatografia de exclusão molecular, onde as moléculas de massas moleculares menores que a R-FE foram eluídas após a eluição da R-FE. Após essa etapa, a R-FE alcançou um elevado índice de pureza de 4,5, aumentando em aproximadamente 3 pontos, sendo, portanto, a R-FE considerada pura, visto que seu índice de pureza foi superior a 3,2 (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). Vale ressaltar que, com essa etapa, a R-FE de *S. filiformis* alcançou um índice de pureza que permite aplicá-la, por exemplo, em pesquisas de diagnóstico contra o câncer, atuando como sondas fluorescentes (THANGAM *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Além das metodologias descritas anteriormente, foi relatada a purificação da R-FE de *Corallina elongata* onde foram utilizados procedimentos de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão molecular, onde foi alcançado um índice e pureza de 6,67 (ROSSANO *et al.*, 2003). Por outro lado, para a purificação da R-FE de *Porphyra yezoensis* foram utilizados os procedimentos cromatográficos de exclusão molecular e interação hidrofóbica, onde foi obtido um índice de pureza de 3,20 (CAI *et al.*, 2014).

Índices de pureza de R-FE inferiores ao obtido nesse estudo são relatados na literatura, como, por exemplo, para as macroalgas *Palmaria palmata* (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000), *P. urceolata* (NIU; WANG; TSENG, 2006) e *Porphyra yezoensis* (CAI *et al.*, 2012), que alcançaram índices de pureza de 3,20, 3,90 e 3,20, respectivamente. Portanto, pode ser sugerido que essas diferenças entre índices de pureza possam estar relacionadas com os interesses das indústrias para a aplicação da R-FE. No caso da sua utilização como corante alimentício, pode ser utilizado R-FE com índices de pureza mais baixos do que em relação à utilizada para ensaios biológicos, demonstrando, assim, sua vasta utilização nas indústrias. Além da aplicação em alimentos (DUFOSSÉ *et al.*, 2005; SUDHAKAR *et al.*, 2015) a R-FE já foi utilizada em pesquisas contra o câncer (THANGAM *et al.*, 2015), sendo utilizado como sondas fluorescentes. Vale ressaltar que a ampla aplicação desse pigmento natural se deve as suas características espectroscópicas.

Com relação ao rendimento da R-FE de *S. filiformis* obtido nesse trabalho foi possível observar que se mostrou similar ao relatado por Wang (2002) na purificação da R-FE da macroalga *Gracilaria verrucosa* (0,14 mg/g). Além disso, o índice de purificação obtido nesse trabalho foi maior do que o demonstrado para a R-FE de *G. verrucosa* (4,40). Outros processos de purificação também foram relatados, apresentando rendimentos maiores do que o obtido nesse trabalho, como no caso da R-FE purificada de *G. turuturu*, alcançando um

rendimento de 1,41 mg/g (MUNIER *et al.*, 2015), e a R-FE de *P. urceolata* com rendimento de 1,53 mg/g (LIU *et al.*, 2005), ambas purificadas com somente uma etapa de cromatografia. No entanto, existe uma dificuldade na comparação desses rendimentos, visto que os procedimentos de purificação são bem diversificados.

Ao analisarmos o perfil eletroforético obtido da R-FE pura de *S. filiformis*, constatamos a presença de três bandas proteicas presentes no gel em condições desnaturantes, mesmo fato ocorrido com R-FE de outras macroalgas vermelhas, como o caso da macroalga *P. urceolata* (ZHAO *et al.*, 2013), onde foram encontradas proteínas com peso molecular de 17,5, 20 e 36,6 kDa, referentes as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, apresentando, portanto, massas aproximadamente semelhantes as encontradas nesse trabalho. A R-FE da macroalga vermelha *P. hornemannii* também apresentou massas moleculares aproximadas, 16, 21 e 39 kDa, para as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013). Entretanto, alguns autores obtiveram uma massa molecular diferente para a subunidade  $\gamma$  ou encontraram mais de uma subunidade  $\gamma$  na estrutura da R-FE, como o caso da R-FE da macroalga *H. japonica*, onde foram encontradas massas moleculares de 17,1, 19,7, 30,2 e 31,3 kDa, referentes as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_1$ , respectivamente (SUN *et al.*, 2009). Com relação a R-FE de *P. palmata*, foram encontradas bandas de 20, 21 e 30 kDa, referentes as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). A existência de duas subunidades  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  pode estar relacionado ao tipo de ficobilinas encontradas na estrutura da subunidade  $\gamma$ , onde a subunidade  $\gamma_1$  possui uma massa molecular maior que a subunidade  $\gamma_2$ . Na subunidade  $\gamma_1$  são encontradas três ficobilinas do tipo PUB e uma do tipo PEB, enquanto que na subunidade  $\gamma_2$  são encontradas duas subunidades do tipo PUB e duas do tipo PEB, onde, além da massa molecular, a subunidade  $\gamma_1$  emite mais fluorescência verde, comprovando a existência de uma maior quantidade de ficobilinas do tipo PUB (ZHAO *et al.*, 2013, 2015; WANG *et al.*, 2015). Em todas as análises eletroforéticas das espécies de macroalgas acima descritas, inclusive a da *S. filiformis*, a subunidade de maior peso molecular mostrou-se com uma coloração menos intensa. Este fato foi comprovado por meio da análise da estrutura da R-FE que é composta por  $(\alpha\beta)_6\gamma$ , onde as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em maior número que a subunidade  $\gamma$ , explicando assim a diferença de intensidade das bandas. Essa subunidade  $\gamma$ , embora apareça em menor quantidade, é importante para a R-FE, pois atua como um peptídeo de ligação entre os trimeros de subunidade  $(\alpha\beta)$ , conferindo maior estabilidade a R-FE, fazendo com que ela seja uma ficobiliproteína mais resistente que a ficocianina e a aloficocianina.

O espectro de absorção da R-FE pura de *S. filiformis* apresentou absorção máxima em 495, 540 e 564 nm, corroborando com os espectros de absorção de R-FE de *P. urceolata* (498, 538 e 566 nm), relatado por Wang *et al.* (2015); de *G. turuturu* (498, 540 e 565 nm), descrito por Munier *et al.* (2015), e de *P. hornemannii* (499, 545 e 565 nm), obtidos por Senthilkumar *et al.* (2013). O perfil de absorção apresentado pela R-FE de *S. filiformis* é típico das ficoeritrinas que possuem as ficobilinas: ficourobilina (PUB) e ficoeritrobilina (PEB) presentes na estrutura, onde o pico de 495 nm se refere à PUB e os picos de 540 e 564 nm se referem à PEB (GAIGALAS *et al.*, 2006; MUNIER *et al.*, 2014).

O pigmento R-FE pura de *S. filiformis* apresentou um único pico de emissão em 575 nm, ao ser excitado em 495 nm. Esse resultado corrobora com os já publicados que mostram o espectro de emissão de fluorescência, quando excitado a 495 ou 498 nm, de R-FE purificadas das espécies de macroalgas vermelhas *A. anceps* (KAWSAR *et al.*, 2011), *G. lemaneiformis* (NIU *et al.*, 2013), *G. turuturu* (MUNIER *et al.*, 2014) e *P. urceolata* (WANG *et al.*, 2015) com emissão máxima em 580 nm, 579 nm, 575 nm e 577 nm, respectivamente, onde, a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) da PUB para PEB resulta nesse pico de emissão máximo de fluorescência (JIANG; ZHANG; LIANG, 1999), exibindo uma intensidade 20 vezes maior do que o relatado para outros pigmentos, como a fluoresceína (FLEURENCE, 2004). Outra vantagem da R-FE sobre outros pigmentos fluorescentes seria a capacidade de ser excitado em qualquer um dos seus picos de absorção (495, 540 ou 564 nm), conferindo, assim, uma maior faixa espectral de excitação.

A estrutura  $\alpha$ -hélice dominante apresentada pelo espectro de CD da R-FE de *S. filiformis*, corroborou com as características espectrais de dicroísmo circular de R-FE de outras espécies de macroalgas. A R-FE isolada a partir de *B. fusco-purpurea* apresentou as mesmas características espectrais com picos em 192, 208 e 222 nm (WU *et al.*, 2015), semelhante ao observado para a R-FE de *P. urceolata*.

Alterações significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas na estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice predominante, bem como nas capacidades de absorver e emitir luz da R-FE de *S. filiformis*, apenas a 80 °C, sugerindo um pigmento natural altamente estável, quando comparada às R-FE extraídas de outras espécies de macroalgas. É possível notar, a partir dos dados de CD, que em condições extremas de temperatura (80 °C) a estrutura de  $\alpha$ -hélice da R-FE de *S. filiformis* é totalmente perdida e transformada em folhas- $\beta$ , resultando numa perda irreversível da estrutura, onde, esse fato foi observado, também, para R-FE de *P. urceolata* (LIU *et al.*, 2009), no qual o teor de  $\alpha$ -hélice mudou de 90% em condições nativas para quase

zero, e as folhas- $\beta$  aumentaram, chegando a mais de 40%. As mudanças observadas no perfil de absorção e emissão de luz da R-FE de *S. filiformis* foram provavelmente ocasionados pela mudança da sua conformação estrutural da proteína, cuja mudança foi provocada pelo aumento da temperatura, afetando a capacidade de absorção de luz e transferência de energia da R-FE em estudo, onde foi possível notar que a capacidade de transferência de energia é mais afetada do que a capacidade de absorção de luz.

Outras R-FE, purificadas de diferentes espécies de macroalgas vermelhas, também se mostraram termo lábeis, como a de *G. turuturu*, estável até 40 °C (Munier *et al.*, 2014), *B. fusco-purpurea*, mantendo estabilidade até 55 °C, onde começa a mostrar uma alteração na sua estrutura secundária (Wu *et al.*, 2015) e *P. palmata*, estável até 60 °C (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000).

O presente trabalho avaliou, ainda, os perfis espectroscópicos da R-FE de *S. filiformis* frente a diferentes condições de armazenamento e foi observado que a absorbância e fluorescência se mantiveram relativamente estáveis a temperatura de 4 e -20°C durante 30 dias. Vale ressaltar, que o pico de absorção a 495 nm sofreu uma menor alteração comparado aos picos a 540 e a 564 nm, sugerindo que isso decorre do fato da ficobilina PUB, a qual é a responsável por esse pico de absorção, se ligar covalentemente por dois resíduos de cisteína na porção proteica do pigmento, enquanto que a PEB se liga somente a um resíduo de cisteína (LIU *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2013, 2015).

É demonstrado na literatura que R-FE purificada a partir de *G. turuturu* (MUNIER *et al.*, 2014) foi avaliada quanto à estabilidade no armazenamento em temperaturas de -20 °C e 4 °C durante um período de duas semanas. Os picos de absorção (498, 540 e 565 nm) da R-FE de *G. turuturu* a 4 °C foi estável somente durante 48 horas, enquanto que, a -20 °C, foi observado estabilidade do perfil de absorção durante todo o experimento, se repetindo o mesmo perfil de estabilidade para a análise de emissão de fluorescência. Contudo, a R-FE purificada de *C. elongata* (ROSSANO *et al.*, 2003), ao ser avaliada quanto à estabilidade no armazenamento em temperaturas de -20 °C e 4 °C, durante 35 dias, demonstrou resultado diferente ao obtido da R-FE de *G. turuturu*, onde a estabilidade no armazenamento testada a 4 °C foi mais eficiente que a -20 °C. Não foi possível comparar as porcentagens de perdas de absorbância e fluorescência por falta de dados dos autores. Entretanto, é possível perceber que o pigmento obtido da *S. filiformis* demonstrou mais estabilidade no perfil de absorção em relação as duas macroalgas citadas, contudo, resultados semelhantes ao da R-FE de *G.*

*turuturu* foram encontrados para o gráfico de emissão de fluorescência da R-FE de *S. filiformis*, onde o armazenamento a -20 °C foi melhor do que a 4 °C.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi possível concluir que a macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* se mostrou uma fonte do pigmento R-Ficoeritrina. Além disso, foi definida a melhor condição de extração desse pigmento, e proposto um esquema de purificação, onde contempla as etapas de precipitação com sulfato de amônio seguido por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) e cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-300), que foi eficaz na purificação da R-Ficoeritrina, equiparando-se aos índices de pureza comercial.

O pigmento vermelho R-Ficoeritrina apresentou uma única banda proteica quando submetida à eletroforese em condições desnaturantes na ausência do agente redutor, confirmando sua purificação, e três bandas proteicas quando submetido à eletroforese em condições desnaturantes na presença do agente redutor, com massa molecular aparente de 18, 20 e 37 kDa, correspondendo as suas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente.

Ao ser analisada suas características espectroscópicas, foram encontrados três picos de absorção em 495, 540 e 564 nm, um pico de emissão de fluorescência a 575 nm quando excitada a 495 nm e uma porcentagem em torno de 60 % de alfa-hélice na sua estrutura secundária nativa. Tais características espectroscópicas foram resistentes até 70 °C, quando incubadas por uma hora, demonstrando uma alta resistência térmica, e estabilidade no armazenamento a -20 °C e 4 °C, durante 30 dias, em relação aos seus picos de absorção, porém reduzindo sua intensidade de fluorescência em torno de 50%. O pigmento perdeu sua capacidade de absorver e emitir fluorescência quando armazenado a 25 °C.

## 8 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível concluir que a macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*, abundante no litoral cearense e com alto potencial de cultivo no mar, se mostrou uma fonte de R-Ficoeritrina, um pigmento vermelho fluorescente, comercialmente importante, purificado através de métodos cromatográficos sequenciais, apresentando um elevado índice de pureza, sugerido para aplicações biotecnológicas. Exibiu uma estrutura proteica constituída de subunidades monoméricas de massas moleculares distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), apresentando predominância de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice termoestável, propriedades espectroscópicas (absorbância e fluorescência) de elevada estabilidade, e, sobretudo em condições adequadas de armazenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. J. R. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399–451, 2005.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (B-FE)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/75166?lang=en&region=US>>. Acesso em: 9 abr. 2016a.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (R-FE)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52412?lang=en&region=US>>. Acesso em: 9 abr. 2016b.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (C-FC)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52468?lang=en&region=US>>. Acesso em: 9 abr. 2016c.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (AFC)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a7472?lang=en&region=US>>. Acesso em: 9 abr. 2016d.

APT, K. E.; COLLIER, J. L.; GROSSMAN, A. R. Evolution of the Phycobiliproteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 248, p. 79–96, 1995.

BAGHEL, R. S.; TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; NEORI, A.; REDDY, C. R. K.; LALI, A.; JHA, B. Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. **Green Chem.**, v. 17, p. 2436–2443, 2015.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis, 2006.

BERMEJO ROMÁN, R.; ALVÁREZ-PEZ, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002.

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.

- BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (B-FE)**. Disponível em: <<http://stores.columbiabiosciences.com/surelight-b-phycoerythrin-b-pe-1mg/>>. Acesso em: 9 abr. 2016a.
- BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (R-FE)**. Disponível em: <<http://stores.columbiabiosciences.com/surelight-r-phycoerythrin-r-pe-1mg/>>. Acesso em: 9 abr. 2016b.
- BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (AFC)**. Disponível em: <<http://stores.columbiabiosciences.com/surelight-allophycocyanin-apc-1mg/>>. Acesso em: 9 abr. 2016c.
- BOGORAD, L. Phycobiliprotein: Complementary Chromatic Adaptation. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 26, p. 369–401, 1975.
- BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae: structure and reproduction**. 2. ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 1985.
- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.
- 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.
- BRYANT, D. A. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 835–844, 1982.
- BRYANT, D. A.; GLAZER, A. N.; EISERLING, F. A. Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. **Archives of Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 61–75, 1976.
- CAI, C.; LI, C.; WU, S.; WANG, Q.; GUO, Z.; HE, P. Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. **Natural Science**, v. 04, n. 08, p. 536–543, 2012.
- CAI, C.; WANG, Y.; LI, C.; GUO, Z.; JIA, R.; WU, W.; HU, Y.; HE, P. Purification and photodynamic bioactivity of phycoerythrin and phycocyanin from *Porphyra yezoensis* Ueda. **Journal of Ocean University of China**, v. 13, n. 3, p. 479–484, 2014.
- CASTRO, P.; HUBER, M. E. **Biologia marinha**. 8. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CHALOUB, R. M.; MOTTA, N. M. S.; DE ARAUJO, S. P.; DE AGUIAR, P. F.; DA SILVA, A. F. Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). **Algal Research**, v. 8, p. 89–94, 2015.

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.

CHAROENSIDDHI, S.; FRANCO, C.; SU, P.; ZHANG, W. Improved antioxidant activities of brown seaweed *Ecklonia radiata* extracts prepared by microwave-assisted enzymatic extraction. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 2049–2058, 2015.

CHEN, H. W.; YANG, T. S.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C.; WANG, E. I. C.; HO, C. L.; LAI, Y. J.; YU, C. C.; CHOU, J. C.; CHAO, L. K. P.; LIAO, P. C. Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1337–1344, 2014.

CIAN, R. E.; DRAGO, S. R.; DE MEDINA, F. S.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5358–5383, 2015.

CONTRERAS-MARTEL, C.; MARTINEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M.; LEGRAND, P.; PIRAS, C.; VERNEDE, X.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. A resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: A case of perfect hemihedral twinning. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 57, n. 1, p. 52–60, 2001.

D'AGNOLO, E.; RIZZO, R.; PAOLETTI, S.; MURANO, E. R-Phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 693–696, 1994.

DA CONCEIÇÃO RIVANOR, R. L., CHAVES, H. V.; DO VAL, D. R.; FREITAS, A. R.; LEMOS, J. C.; RODRIGUES, J. A. G.; PEREIRA, K. M. A.; ARAÚJO, I. W. F.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 34–43, 2014.

DE MARSAC, N. T.; COHEN-BAZIRE, G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 4, p. 1635–1639, 1977.

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.

DIC. **Dainippon Ink & Chemicals**. Disponível em: < <http://www.dic-global.com/en/>>. Acesso em: 9 abr. 2016.

DUCRET, A.; MÜLLER, S. A.; GOLDIE, K. N.; HEFTI, A.; SIDLER, W. A.; ZUBER, H.; ENGEL, A. Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycoerythrin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **Journal of molecular biology**, v. 278, n. 2, p. 369–388, 1998.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, 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.

EMBRAPA, A. **Biorrefinarias**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48750/1/biorrefinaria-modificado-web.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2008.

FICNER, R.; HUBER, R. Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the  $\gamma$  subunit. **European Journal of Biochemistry**, v. 218, p. 103–106, 1993.

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.

GAIGALAS, A.; GALLAGHER, T.; COLE, K. D.; SINGH, T.; WANG, L.; ZHANG, Y. A Multistate Model for the Fluorescence Response of R-Phycoerythrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 635–644, 2006.

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.

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

GAO, Y.; PALLISTER, J.; LAPIERRE, F.; CRAMERI, G.; WANG, L. F.; ZHU, Y. A rapid assay for Hendra virus IgG antibody detection and its titre estimation using magnetic nanoparticles and phycoerythrin. **Journal of Virological Methods**, v. 222, p. 170–177, 2015.

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. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics**, v. 768, n. 1, p. 29–51, 1984.

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. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105–112, 1994.

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

GLAZER, N.; HIXSON, C. S. Characterization of R-Phycocyanin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 14, p. 5487–5495, 1975.

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.; GRAHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. San Francisco [California, Estados Unidos]: Pearson/Benjamin Cummings, 2009.

GUANWU, L.; GUANGCE, W.; ZHENGANG, L.; CHENGKUI, Z. Biological effect of R-phycoerythrin-mediated photosensitization on DNA. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, v. 27, p. 621–624, 2000.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway**. Disponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

HAFTING, J. T.; CRAIGIE, J. S.; STENGEL, D. B.; LOUREIRO, R. R.; BUSCHMANN, A. H.; YARISH, C.; EDWARDS, M. D.; CRITCHLEY, A. T. Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives. **Journal of Phycology**, v. 51, n. 5, p. 821–837, 2015.

HOFFMANN, L.; TALARICO, L.; WILMOTTE, A. Presence of CU-phycoerythrin in marine benthic blue-green alga *Oscillatoria* cf. *corallinae*. **Phycologia**, v. 29, p. 19–26, 1990.

HOLANDA-ARAÚJO, M. L. Iota-Carragenana da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* versus iota-Carragenana Comercial: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas. **Tese** (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, 2007.

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

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

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.

KADAM, S. U.; ÁLVAREZ, C.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Chapter 9 - Extraction of biomolecules from seaweeds. In: TIWARI, B. K.; TROY, D. J. (Eds.). **Seaweed Sustainability**. San Diego: Academic Press, p. 243–269, 2015.

KAISER, M. J.; ATTRILL, M. J.; JENNINGS, S.; THOMAS, D. N.; BARNES, D. K.; BRIERLEY, A. S.; POLUNIN, N. V. C.; RAFFAELLI, D. G.; WILLIAMS, P. J. B. **Marine ecology: processes, systems, and impacts**. Oxford: Oxford University Press, 2005.

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.

KEHOE, D. M.; GUTU, A. Responding to Color: The Regulation of Complementary Chromatic Adaptation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 127–150, 2006.

KLOTZ, A. V.; GLAZER, A. N. Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 8, p. 4856–4863, 1985.

KOLLER, K. P.; WEHRMEYER, W. B-Phycoerythrin from *Rhodella violacea* - Characterization of two isoproteins. **Archives of Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 255–261, 1975.

KRONICK, M. N. The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. **Journal of immunological methods**, v. 92, n. 1, p. 1–13, 1986.

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.

LAZAR, I. **Gel Analyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software**. Disponível em: <<http://www.gelanalyzer.com/>>. Acesso em: 4 maio. 2016.

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.

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

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.

LIU, L. N.; SU, H. N.; YAN, S. G.; SHAO, S. M.; XIE, B. B.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: Investigations of active conformational and functional variation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1787, n. 7, p. 939–946, 2009.

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.

LUNDELL, D. J.; GLAZER, A. N.; DELANGE, R. J.; BROWN, D. M. Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Amino acid sequence studies. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5472–80, 1984.

LUNDELL, D. J.; WILLIAMS, R. C.; GLAZER, A. N. Molecular architecture of a light-harvesting antenna. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. April 10, p. 3580–3592, 1981.

MATHUR, C.; RAI, S.; SASE, N.; KRISH, S.; JAYASRI, M.A. *Enteromorpha intestinalis* derived seaweed liquid fertilizers as prospective biostimulant for Glycine max. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 813–820, 2015.

MONTEIRO, V. S.; TELES, F. B.; COURA, C. O.; SOUZA, R. B.; LIMA, C. N. C.; COSTA, D. V. S.; HONÓRIO-JUNIOR, E. R.; ESCUDEIRO, S. S.; CHAVES, E. M. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Journal of Applied Phycology**, 2015.

MUNIER, M.; JUBEAU, S.; WIJAYA, A.; MORANÇAIS, 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.

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

NIU, J.; XU, M.; WANG, G.; ZHANG, K.; PENG, G. Comprehensive extraction of agar and R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* (Bangiales, Rhodophyta). **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 42, n. 1, p. 21–28, 2013.

NIU, J. F.; WANG, G. C.; TSENG, C. K. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. **Protein Expression and Purification**, v. 49, n. 1, p. 23–31, 2006.

O’CARRA, P.; MURPHY, R. F.; KILLILEA, S. D. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. **Biochemical Journal**, v. 187, n. 2, p. 303–309, 1980.

PALIWAL, C.; BHAYANI, K.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Antioxidant, anti-nephrolithic activities and in vitro digestibility studies of three different cyanobacterial pigment extracts. **Marine Drugs**, p. 5384–5401, 2015.

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.

PROZYME. **ProZyme (R-FE)**. Disponível em: <<http://prozyme.com/products/pb32?variant=10220895363>>. Acesso em: 9 abr. 2016a.

PROZYME. **ProZyme (C-FC)**. Disponível em: <<http://prozyme.com/products/pb11>>. Acesso em: 9 abr. 2016b.

PROZYME. **ProZyme (AFC)**. Disponível em: <<http://prozyme.com/products/pb20?variant=7900805955>>. Acesso em: 9 abr. 2016c.

RADULOVICH, R.; NEORI, A.; VALDERRAMA, D.; REDDY, C. R. K.; CRONIN, H.; FORSTER, J. Chapter 3 - Farming of seaweeds. In: TIWARI, B. K.; TROY, D. J. (Eds.). **Seaweed Sustainability**. San Diego: Academic Press, 2015. p. 27–59.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2014.

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; JORGE, R. J. B.; BENEVIDES, N. M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, v. 63, n. 7, p. 569–580, 2014.

RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G.; LOSADA, M. Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 263–270, 1991.

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.

SAGERT, S.; SCHUBERT, H. Acclimation of the Photosynthetic Apparatus of *Palmaria Palmata* ( Rhodophyta ) To Light Qualities That Preferentially Excite Photosystem I or Photosystem II. **Journal of Phycology**, v. 31, p. 547–554, 1995.

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.

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

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*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 150–160, 2013.

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.

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

SIX, C.; THOMAS, J. C.; GARCZAREK, L.; OSTROWSKI, M.; DUFRESNE, A.; BLOT, N.; SCANLAN, D. J.; PARTENSKY, F. Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. **Genome biology**, v. 8, n. 12, p. R259, 2007.

STADNICHUK, I. N. Phycobiliproteins: Determination of chromophore composition and content. **Phytochemical Analysis**, v. 6, n. November 1994, p. 281–288, 1995.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483–501, 2011.

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.; CHEN, L.; GONG, X. Promising fluorescent probes from phycobiliproteins. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 9, n. 2, p. 177–188, 2003.

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.

THANGAM, R.; SUNDARRAJ, S.; VIVEK, R.; SURESH, V.; SIVASUBRAMANIAN, S.; PAULPANDI, M.; KARTHICK, S. V.; RAGAVI, A. S.; KANNAN, S. Theranostic potentials of multifunctional chitosan–silver–phycoerythrin nanocomposites against triple negative breast cancer cells. **RSC Adv.**, v. 5, n. 16, p. 12209–12223, 2015.

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, 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, L.; WANG, S.; FU, X.; SUN, L. Characteristics of an R-Phycoerythrin with Two  $\gamma$  Subunits Prepared from Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0120333, 2015.

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.

ZHAO, M.; SUN, L.; SUN, S.; GONG, X.; FU, X.; CHEN, M. The 42.1 and 53.7kDa bands in SDS-PAGE of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 405–411, 2013.

ZHAO, M.; SUN, L.; SUN, S.; GONG, X.; FU, X.; CHEN, M. Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, n. 1, p. 58–64, 2015.