



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ANTONIA LIVÂNIA LINHARES DE AGUIAR

BIORREFINARIA DA MACROALGA VERMELHA *GRACILARIA BIRDIAE*
(PLASTINO E OLIVEIRA) VISANDO A OBTENÇÃO DE R-FICOERITRINA E ÁGAR
PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

FORTALEZA

2022

ANTONIA LIVÂNIA LINHARES DE AGUIAR

BIORREFINARIA DA MACROALGA VERMELHA *GRACILARIA BIRDIAE*
(PLASTINO E OLIVEIRA) VISANDO A OBTENÇÃO DE R-FICOERITRINA E ÁGAR
PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Mary Cunha da Silva.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marjory Lima Holanda Araújo.

FORTALEZA

2022

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

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

A227b Aguiar, Antonia Livânia Linhares de.

Biorrefinaria da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira) visando a obtenção de R-ficoeritrina e ágar para aplicação em alimentos / Antonia Livânia Linhares de Aguiar. – 2022.

83 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva.

Coorientação: Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo.

1. Ficobiliproteína. 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Extração. 4. Caracterização. 5. Estabilidade. I. Título.

CDD 664

ANTONIA LIVÂNIA LINHARES DE AGUIAR

BIORREFINARIA DA MACROALGA VERMELHA *GRACILARIA BIRDIAE*
(PLASTINO E OLIVEIRA) VISANDO A OBTENÇÃO DE R-FICOERITRINA E ÁGAR
PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 03/06/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisabeth Mary Cunha da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Marjory Lima Holanda Araújo (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Fernandes Pereira
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^a. Dr^a. Stella Regina Arcanjo Medeiros
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena de Mesquita Pinheiro
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

A Deus, pelo guia e proteção em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Raimundo e Fátima, pelo apoio incondicional. Agradeço a paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

À Ducimar Freire (*In memoriam*), pelo carinho e apoio oferecido durante a minha trajetória acadêmica; sempre torcendo pelas minhas conquistas, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal inigualável. Aos professores, pelos ensinamentos, e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos, sempre gentis e dispostos a ajudar.

À minha orientadora, Professora Elisabeth Mary Cunha da Silva, obrigada pelo apoio, dedicação e conhecimentos compartilhados.

À minha co-orientadora Professora Marjory Lima Holanda Araújo pelos ensinamentos, suporte e oportunidade de desenvolver o projeto de tese em seu grupo de pesquisa, através do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP).

À Professora Norma Maria Barros Benevides, agradeço o auxílio a parte experimental da pesquisa através do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Central Analítica-UFC e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que viabilizaram a realização de algumas análises laboratoriais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, que propiciou o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos conquistados durante os anos de pós-graduação, pelo carinho, conversas e momentos de convivência compartilhados fora do ambiente acadêmico.

Por fim, gostaria de expressar o meu reconhecimento a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram de alguma forma para a concretização deste projeto, mas que não foram explicitamente mencionados aqui.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Muito obrigada!

“Não morre aquele que deixou na terra a melodia de seu cântico na música de seus versos”.

Cora Coralina

RESUMO

O conceito de biorrefinaria surgiu a partir da busca pelo aproveitamento completo da biomassa para a obtenção de uma ampla gama de produtos. As macroalgas marinhas são organismos fotossintetizantes que biossintetizam uma série de compostos de importância comercial. A R-ficoeritrina, um complexo pigmento-proteína vermelho fluorescente classificado como ficobiliproteína, está presente nas algas vermelhas e apresenta potencial aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos, saúde e biotecnológica. Já o ágar, outra biomolécula extraída desses organismos, é um polissacarídeo com ampla aplicação em produtos industrializados, análises e métodos diagnósticos. Este é o primeiro estudo que relata a obtenção da R-ficoeritrina (R-FE) e do ágar da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* sob o conceito de biorrefinaria. No primeiro capítulo, uma estratégia e duas otimizações de extração e purificação parcial da R-FE foram avaliadas e as frações pigmentadas mais promissoras foram a F25/35, F25/35 e a F25/45 com índices de pureza/rendimentos 1,64/0,17, 0,71/0,44 e 0,56/1,20 mg.g⁻¹, respectivamente. Os parâmetros colorimétricos mostraram a manutenção da cor após as etapas de obtenção e secagem do pigmento. O ágar obtido a partir do resíduo da extração da R-FE (ARES-Gb) apresentou rendimento de 31,64%, superior aos relatados na literatura quando extraídos da macroalga úmida ou seca e com propriedades físico-químicas e reológicas similares ao ágar comercial. Já no segundo capítulo, o estudo foi focado na caracterização físico-química e atividade antioxidante (ABTS^{•+} e DPPH) da R-FE. A estabilidade do pigmento frente a diferentes aditivos (ácido ascórbico-AA; benzoato de sódio; EDTA dissódico e glicose) foi maior na presença de AA, reduzindo as perdas de coloração do pigmento durante os 30 dias de armazenamento a 25°C. Portanto, a biorrefinaria da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* permitiu um aproveitamento maior da biomassa algácea, uma vez que possibilitou a obtenção de dois compostos de interesse comercial, sendo a R-FE de índice de pureza adequado para aplicação em alimentos, atividade antioxidante e estável sob armazenamento e o ágar com rendimento e propriedades físico-químicas similares ao comercial.

Palavras-chave: ficobiliproteína; polissacarídeos sulfatados; extração; caracterização; estabilidade.

ABSTRACT

The concept of biorefinery emerged from the search for the complete use of biomass to obtain a wide range of products. Marine macroalgae are photosynthetic organisms that biosynthesize a series of compounds of commercial importance. R-phycoerythrin, a red fluorescent pigment-protein complex classified as phycobiliprotein, is present in red algae and has potential application in the food, cosmetics, health and biotechnology industries. Agar, another biomolecule extracted from these organisms, is a polysaccharide with wide application in industrialized products, analyzes and diagnostic methods. This is the first study that reports the production of R-phycoerythrin (R-FE) and agar from the red macroalgae *Gracilaria birdiae* under the biorefinery concept. In the first chapter, a strategy and two optimizations of extraction and partial purification of R-FE were evaluated and the most promising pigmented fractions were F25/35, F25/35 and F25/45 with indices of purity/yields 1.64/0.17, 0.71/0.44 and 0.56/1.20 mg.g⁻¹, respectively. The colorimetric parameters showed the maintenance of color after the steps of obtaining and drying the pigment. The agar obtained from the residue from the extraction of R-FE (ARES-Gb) showed a yield of 31.64%, higher than those reported in the literature when extracted from wet or dry macroalgae and with physicochemical and rheological properties similar to commercial agar. In the second chapter, the study focused on the physicochemical characterization and antioxidant activity (ABTS^{•+} and DPPH) of R-FE. The pigment stability against different additives (ascorbic acid-AA; sodium benzoate; disodium EDTA and glucose) was higher in the presence of AA, reducing pigment color losses during the 30 days of storage at 25°C. Therefore, the biorefinery of the red macroalgae *Gracilaria birdiae* allowed a better use of algal biomass, since it made it possible to obtain two compounds of commercial interest, with R-FE with an adequate purity index for application in food, antioxidant activity and stable under storage and agar with yield and physicochemical properties similar to the commercial one.

Keywords: phycobiliprotein; sulfated polysaccharides; extraction; characterization, stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Macroalga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	19
Figura 2 –	Estrutura do ficobilissomo.....	22
Figura 3 –	Espectro de absorbância da R-ficoeritrina de <i>Gracilaria birdiae</i> em CE-Gb e frações proteicas obtidas por fracionamento com sulfato de amônio. (A) Primeira estratégia (B) Otimização 1 (C) Otimização 2.....	41
Figura 4 –	Módulos G' e G'' do ARES-Gb durante as rampas de resfriamento e aquecimento. As setas indicam a direção das rampas de temperatura. (A) ARES-Gb (B) Commercial agar.....	47
Figura 5 –	Espectro FTIR de ARES-Gb e RES-Gb.....	49
Figura 6 –	Biorrefinaria da macroalga <i>Gracilaria birdiae</i> para obtenção de R-ficoeritrina e ágar.....	51
Figura 7 –	Espectro de absorção da R-ficoeritrina presente no CE-Gb obtido a partir da macroalga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	60
Figura 8 –	Efeito de adição de diferentes aditivos sobre a estabilidade da R-ficoeritrina presente no CE-Gb obtido a partir de <i>Gracilaria birdiae</i> (A) 30 dias a 25 ± 1 °C; (B) 90 dias a 5 ± 1 °C; (C) Controle; (AA) ácido ascórbico; (SB) benzoato de sódio; (EDTA) EDTA dissódico e (G) glicose.....	62
Figura 9 –	Potencial de eliminação de ABTS do CE-Gb contendo R-ficoeritrina de <i>Gracilaria birdiae</i>	63
Figura 10 –	Potencial de eliminação de DPPH do CE-Gb contendo a R-ficoeritrina de <i>Gracilaria birdiae</i>	64
Figura 11 –	Espectros de FTIR do CE-Gb contendo a R-ficoeritrina obtida a partir da macroalga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	65
Figura 12 –	SEM images da biomassa algácea e dos produtos da extração da R-FE da macroalga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> . (A) Talo: (1) zoomed 100X; (2) zoomed 500X; (B) R-FE Extraction Residue: (1) zoomed 100X; (2) zoomed 500X; (C) CE-Gb liofilizado: (1) zoomed 100X; (2) zoomed 500X.....	67

Figura 13 – Composição elementar da biomassa algácea e dos produtos da extração da R-FE da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*. (A) Taló, (B) RES-Gb e (C) CE-Gb liofilizado..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais pigmentos presentes em macroalgas marinhas.....	20
Tabela 2 – Concentrações de proteínas e R-ficoeritrina, rendimento, recuperação e índice de pureza do CE-Gb e das diferentes frações obtidas da biomassa de <i>Gracilaria birdiae</i>	38
Tabela 3 – Recuperação e índice de pureza do R-ficoeritrina obtida por processos de extração e purificação parcial de algas vermelhas.....	40
Tabela 4 – Cor e parâmetros de cor do CE-Gb e das frações proteicas obtidas por fracionamento com sulfato de amônio contendo a R-ficoeritrina da <i>Gracilaria birdiae</i>	43
Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do ágar extraído do resíduo da extração de R-FE de <i>Gracilaria birdiae</i>	44
Tabela 6 – Teores de proteínas totais e R-ficoeritrina, rendimentos e índice de pureza do pigmento do CE-Gb obtido a partir da macroalga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	59
Tabela 7 – Valores dos parâmetros de cor da macroalga úmida, do RES-Gb e do CE-Gb obtido a partir da macroalga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama
%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
μL	Microlitro
λ_{max}	Comprimento de onda de máxima absorção
A_{280}	Absorbância a 280 nm
A_{564}	Absorbância a 564 nm
A_{618}	Absorbância a 618 nm
A_{730}	Absorbância a 730 nm
HCl	Ácido Clorídrico
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
ANOVA	Análise de variância
b-FE	b-ficoeritrina
B-FE	B-ficoeritrina
BSA	Albumina sérica bovina
C-FE	C-ficoeritrina
Cm	Centímetro
F0/25	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio a 25% de saturação
F25/35	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio a 35% de saturação
F35/45	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio a 45% de saturação
F45/55	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio a 55% de saturação
F25/45	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio a 45% de saturação
F50/100	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio a 100% de saturação
R-FE	R-ficoeritrina
G	Gramas
NaOH	Hidróxido de Sódio
IP	Índice de pureza
M	Molar
Mg	Miligrama

mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
n°	Número
PB	Tampão fosfato de potássio 0,025 M, pH 6,5
PCB	Ficocianobilina
PEB	Ficoeritrobilina
PXB	Ficoviolobilina
pH	Potencial hidrogeniônico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Algas marinhas.....	17
2.2	Macroalgas marinhas vermelhas (Rhodophytas).....	18
2.2.1	<i>Gracilaria birdiae</i>	18
2.3	Pigmentos em macroalgas vermelhas.....	20
2.3.1	<i>Ficobiliproteínas</i>	21
2.3.1.1	<i>R-ficoeritrina (R-FE)</i>	22
2.4	Métodos de extração e purificação da Ficoeritrina.....	23
2.5	Polissacarídeos de macroalgas marinhas.....	24
2.5.1	<i>Ágar</i>	25
2.6	Biorrefinaria e importância econômica das macroalgas vermelhas.....	27
3	BIORREFINARIA DA MACROALGA VERMELHA GRACILARIA BIRDIAE PARA OBTENÇÃO DA R-FICOERITRINA E DO ÁGAR.....	28
3.1	Introdução.....	28
3.2	Material e métodos.....	31
3.2.1	<i>Macroalga</i>	31
3.2.2	<i>Extração e purificação parcial de R-ficoeritrina de Gracilaria birdiae</i>	31
3.2.3	<i>Caracterização da R-ficoeritrina de Gracilaria birdiae</i>	32
3.2.3.1	<i>Teor de proteína solúvel</i>	32
3.2.3.2	<i>Teor de R-ficoeritrina</i>	32
3.2.3.3	<i>Rendimento, Recuperação e Índice de pureza</i>	32
3.2.4	<i>Análise espectrofotométrica</i>	33
3.2.5	<i>Análise de cor</i>	33
3.2.6	<i>Extração de ágar a partir de RES-Gb e caracterização físico-química</i>	34
3.2.6.1	<i>Teor de 3,6- anidrogactose</i>	34
3.2.6.2	<i>Teor de sulfato</i>	35
3.2.6.3	<i>Força de gel</i>	35

3.2.6.4	<i>Temperaturas de gelificação e fusão.....</i>	36
3.2.6.5	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....</i>	36
3.2.7	<i>Análise estatística.....</i>	36
3.3	<i>Resultados e discussão.....</i>	37
3.3.1	<i>Extração e purificação parcial da R-ficoeritrina de Gracilaria birdiae.....</i>	37
3.3.2	<i>Caracterização da R-ficoeritrina de Gracilaria birdiae.....</i>	40
3.3.3	<i>Extração de ágar a partir de RES-Gb e caracterização físico-química.....</i>	43
3.3.3.1	<i>Temperaturas de gelificação e fusão.....</i>	46
3.3.3.2	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....</i>	48
3.3.4	<i>Esquema de biorrefinaria.....</i>	50
3.4	<i>Conclusões.....</i>	51
4	ESTABILIDADE E POTENCIAL BIOATIVO DA R-FICOERITRINA DA MACROALGA VERMELHA GRACILARIA BIRDIAE (Plastino e Oliveira).....	53
4.1	<i>Introdução.....</i>	53
4.2	<i>Material e Métodos.....</i>	54
4.2.1	<i>Macroalga.....</i>	54
4.2.2	<i>Extração da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	54
4.2.3	<i>Caracterização das proteínas solúveis totais e da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	55
4.2.3.1	<i>Teor de proteína solúvel.....</i>	55
4.2.3.2	<i>Teor de R-ficoeritrina.....</i>	55
4.2.3.3	<i>Rendimento e Índice de pureza.....</i>	55
4.2.3.4	<i>Análise espectrofotométrica.....</i>	56
4.2.4	<i>Efeito de aditivos conservantes sobre a estabilidade da cor da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	56
4.2.5	<i>Atividade antioxidante da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	57
4.2.5.1	<i>Atividade antioxidante- ABTS.....</i>	57
4.2.5.2	<i>Atividade antioxidante- DPPH.....</i>	57
4.2.6	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier....</i>	58
4.2.7	<i>Análise de cor.....</i>	58

4.2.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	58
4.3	Resultados e discussão.....	59
4.3.1	<i>Caracterização da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	59
4.3.2	<i>Efeito de aditivos conservantes sobre a estabilidade da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	61
4.3.3	<i>Atividade antioxidante da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	63
4.3.4	<i>Característica espectral da R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	65
4.3.5	<i>Parâmetros de cor da macroalga, RES-Gb e R-FE de Gracilaria birdiae.....</i>	65
4.3.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	66
4.4	Conclusão.....	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72