



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANA CAROLINA SALES PEREIRA DE SOUSA

**EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA DA MACROALGA *Solieria filiformis* PELO
MÉTODO DE PRESSURIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE
EM CÉLULAS CANCERÍGENAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

FORTALEZA

2024

ANA CAROLINA SALES PEREIRA DE SOUSA

EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA DA MACROALGA *Solieria filiformis* PELO
MÉTODO DE PRESSURIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE EM
CÉLULAS CANCERÍGENAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana.

FORTALEZA

2024

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)

- S696e Sousa, Ana Carolina Sales Pereira de.
Extração de R-Ficoeritrina da macroalga Solieria filiformis pelo método de pressurização e avaliação in vitro da citotoxicidade em células cancerígenas e atividade antioxidante / Ana Carolina Sales Pereira de Sousa. – 2024.
101 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 1, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.
Coorientação: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana.
1. Macroalgas vermelhas. 2. Extração pressurizada. 3. Célula de recombinação. 4. Rendimento de extração. 5. Atividade antioxidante. I. Título.

CDD

ANA CAROLINA SALES PEREIRA DE SOUSA

EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA DA MACROALGA *Solieria filiformis* PELO
MÉTODO DE PRESSURIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE EM
CÉLULAS CANCERÍGENAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 27/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivanildo José Da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Micael de Andrade Lima
University Of Greenwich (UOG)

Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus,

Aos meus pais, meu noivo e amigos distantes
que sempre estiveram presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o autor da minha vida e por estar cuidando de cada detalhe da minha história. Dele vem toda minha força, os meus sonhos, o sustento e o direcionamento para conquistá-los. “Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”.

Ao meu noivo, Luigi Gustavo, que dia e noite, me encoraja a prosseguir na conquista dos meus sonhos e por ser meu grande amigo e parceiro de vida. Obrigada por suportar minhas crises diárias.

Aos meus pais, Cristina Sales e José Ribamar, pois tudo o que eu sou e consigo construir nessa vida devo a vocês.

Ao Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior, por toda paciência, apoio, incentivo e pela excelente orientação deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e confiar a oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa e por todo conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana pela coorientação, disponibilidade, valiosa colaboração e sugestões para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por fazer parte dessa minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Filipe Xavier Feitosa, por sua disponibilidade, parceria e contribuições para este trabalho.

A todos do Laboratório de Processos de Separação e Cromatografia (LAPSEC), por todos os momentos de apoio e descontração vividos no laboratório. Agradeço especialmente à Jéssica Martins por todo conhecimento compartilhado e suporte nessa caminhada.

A todos do Laboratório de Alta Pressão (LAP), especialmente ao Alanderson Arthu Araújo Alves, que deu toda atenção e suporte no desenvolvimento dos experimentos.

À Central Analítica da UFC, especialmente a Nádia, pela contribuição na aprendizagem e local onde se desenvolveu grande parte das análises químicas.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pela parceria de projeto e análises de citotoxicidade realizados.

Aos amigos cearenses que me acolheram de forma calorosa e tornaram essa jornada mais leve. Todos os nossos surtos com certeza valeram a pena. Agradeço principalmente ao Allison Ruan e Francisco Simão pela amizade, reflexões, críticas, sugestões recebidas, fofocas e por aguentarem minhas crises diárias.

Aos amigos cariocas, que mesmo de longe me acompanham e vivem comigo minhas alegrias e tristezas. A vida é muito melhor com vocês.

À Instituição CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Micael de Andrade Lima e Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Todos aqui citados e aqueles que não foram citados, mas que fazem parte de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu".
(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

A *Solieria filiformis* é uma macroalga vermelha cultivada na costa brasileira que apresenta em sua constituição diversas biomoléculas de interesse industrial, entre elas a R-ficoeritrina (R-FE). A R-FE tem sido utilizada nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e nutracêutica com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênicas, entre outras. Devido à sua estrutura complexa, diversos métodos de extração podem não fornecer extratos com alto rendimento ou alta pureza, como maceração e congelamento e descongelamento. Além disso, alguns destes métodos podem utilizar solventes tóxicos, além do alto consumo de energia, como a extração assistida por ultrassom e extração por solvente. Por esta razão, a extração de biocompostos de alto valor agregado utilizando tecnologias ambientalmente amigável é particularmente interessante. Partindo dessa premissa, o presente estudo teve como objetivo analisar o rendimento de R-FE extraída da macroalga *Solieria filiformis* através do método de pressurização. O estudo foi desenvolvido em duas diferentes metodologias. A metodologia 1 avaliou duas amostras diferentes (macroalga úmida e liofilizada), com foco na avaliação do tempo de extração, biofuncionalidade da proteína, em pressão constante de 500 bar. O rendimento máximo de R-FE foi alcançado para estrutura de alga liofilizada após 360 min, obtendo 0,67 mg de R-FE por grama de biomassa seca. Além disso, os extratos apresentaram atividade anticancerígena em testes *in vitro* nas linhas celulares HL-60 (leucemia promieloblástica) e HCT-116 (câncer colorretal). A partir da alga liofilizada, a metodologia 2 analisou a ruptura celular ao longo do tempo em diferentes solventes (água ultrapura e tampão fosfato), tamanho de partículas de macroalgas e variação de pressão de 200, 500 e 800 bar com e sem agitação. Nessa metodologia analisou-se um novo equipamento determinado célula de recombinação. O rendimento máximo alcançou $22,53 \pm 0,60$ mg de R-FE por grama de biomassa seca. As condições de extração foram a estrutura macerada, combinação de pressão a 500 bar com agitação. Nessas condições, a R-ficocianina (R-FC) também foi extraída com rendimento de $3,70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. A biomolécula apresentou espectros característicos de R-FE, fluorescência e estrutura α -hélice como elemento predominante de sua estrutura secundária. Os extratos apresentaram capacidade antioxidante com 99,55% na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 13,94% na quelação de íons ferrosos. Desse modo, a utilização de um método de extração pressurizado mostrou-se eficaz para aumentar o rendimento de R-FE, podendo ser desenvolvido num processo industrial interessante para extração e formulação de produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: Macroalgas vermelhas, extração pressurizada, célula de recombinação, rendimento de extração, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Solieria filiformis is a red macroalgae cultivated on the Brazilian coast that present in its constitution several biomolecules of industrial interest, including R-phycoerythrin (R-PE). R-PE has been used in the food, pharmaceutical, cosmetic and nutraceutical industries with anti-inflammatory, antioxidant, anticarcinogenic properties, among others. Because of its complex structure, many extraction methods may not provide extracts with high yield or high purity, such as maceration and freezing and thawing. Furthermore, some of these methods may use toxic solvents, in addition to high energy consumption, such as ultrasound-assisted extraction and solvent extraction. For this reason, the extraction of high-value-added biocompounds using environmentally friendly technologies is particularly interesting. Based on this premise, the present study aimed to analyze the yield of R-PE extracted from the macroalgae *Solieria filiformis* through the pressurization method. The study was developed using two different methodologies. Methodology 1 evaluated two different samples (wet and freeze-dried macroalgae), focusing on evaluating the extraction time and biofunctionality of the protein, at a constant pressure of 500 bar. R-PE maximum yield was reached lyophilized seaweed structure after 360 min, obtaining 0.67 mg of R-PE per gram of dry biomass. Furthermore, the extracts showed anticancer activity in *in vitro* tests on the HL-60 (promyeloblastic leukemia) and HCT-116 (colorectal cancer) cell lines. Using freeze-dried algae, methodology 2 analyzed cell rupture over time in different solvents (ultrapure water and phosphate buffer), macroalgae particle size and pressure variation of 200, 500 and 800 bar with and without agitation. In this methodology, a new equipment determined by a recombination cell was analyzed. Maximum yield reached 22.53 ± 0.60 mg of R-PE per gram of dry biomass. The optimal extraction conditions were the macerated structure, combination of pressure at 500 bar with agitation. Under these conditions, R-phycoerythrin (R-PE) was also extracted with a yield of $3.70 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. The biomolecule presented characteristic spectra of R-PE, fluorescence and α -helical structure as the predominant element of its secondary structure. The extracts showed antioxidant capacity, with 99.55% in the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and 13.94% in the chelation of ferrous ions. Therefore, using a pressurized extraction method proved to be effective in increasing the yield of R-PE, being able to be an interesting industrial process for the extraction and formulation of biotechnological products.

Keywords: Red macroalgae, pressurized extraction, recombination cell, extraction yield, antioxidant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Macroalga marinha <i>Solieria filiformis</i> (Kützing) P.W. Gabrielson.....	24
Figura 2 - Estrutura do ficobilissoma (FBS). A cascata de transferência de energia começa com ficoeritrina (FE, vermelho) para ficocianina (FC, azul) e aloficocianina (AFC, verde) e finalmente para o centro de reação nos fotossistemas II (roxo) e I (laranja).	26
Figura 3 - Aplicação das ficobiliproteínas como aditivos alimentares, corantes naturais, sondas fluorescentes e os potenciais farmacêuticos.	27
Figura 4 - Organização das subunidades das ficobiliproteínas em trímeros e hexâmeros.	28
Figura 5 - Representação esquemática de um extrator de micro-ondas (EAM). A mistura de solventes e amostra estão dentro do béquer (a) Sistema fechado com condensador (b) Sistema fechado simples.	33
Figura 6 - Sistemas ultrassônicos: (A) Banho de ultrassom, (B) Reator de ultrassom com agitação, (C) Sonda de ultrassom e (D) Sonicação contínua com sonda de ultrassom.	34
Figura 7 - Diagrama de blocos do sistema de extração de fluido supercrítico.....	36
Figura 8 - Representação esquemática de uma extração líquida pressurizada (ELP).	38
Figura 9 - Equipamento de alta pressão utilizado na metodologia 1 denominado célula de extração.....	43
Figura 10 - Procedimento explicativo para extração de R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> com sistema pressurizado – Metodologia 1.....	44
Figura 11 - Equipamento de alta pressão e sistema de agitação utilizado na metodologia 2 denominado célula de recombinação.....	46
Figura 12 - Procedimento explicativo para extração de R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> com sistema pressurizado utilizando célula de extração e célula de recombinação – Metodologia 2.....	47
Figura 13 - Efeito do tempo na concentração de proteínas totais (a) e concentração de R-FE (b) obtidas por extração pressurizada de <i>S. filiformis</i> durante 360 min, sob pressão de 500 bar.	54
Figura 14 - Análise espectrofotométrica de absorção (a) e análise fluorimétrica (b) obtidas por extração pressurizada de <i>S. filiformis</i> em 360 min e sob pressão de 500 bar.	56
Figura 15 - O rendimento de R-FE foi obtido por extração pressurizada da <i>S. filiformis</i> durante 360 min sob pressão de 500 bar.	58
Figura 16 – Perfil eletroforético de R-FE obtido em 6 horas de extração pressurizada da	

	macroalga <i>S. filiformis</i> , em pressão de 500 bar, sob condições desnaturantes na presença do agente redutor. A – Marcador de peso molecular: fosforilase B (97,0 KDa); B – EBL; C –EPL; D –EBU; E –EPU.	61
Figura 17 - Perfil eletroforético de R-FE foi obtida em 6 horas de extração pressurizada da macroalga <i>S. filiformis</i> , obtido pela análise do software gelanalyser (LAZAR JR., 2023). (B) EPL; (C) EBL; (D) EPU; (E) EBU.		62
Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular (DC) de R-FE de extratos obtidos de <i>S. filiformis</i> . (A) Espectros de DC de R-FE dos extratos brutos e liofilizados; (B) Espectros de DC dos extratos após serem submetidos a diferentes temperaturas; (C) Espectro de DC de aquecimento do EBL; (D) Espectro de DC de aquecimento do EBU; (E) Espectros de DC de aquecimento EPL; (F) – Espectro de DC de aquecimento do EPU.....		63
Figura 19 - Espectro de FTIR de 4000-500 cm ⁻¹ dos extratos precipitados e liofilizados de <i>S. filiformis</i>		66
Figura 20 - Efeitos citotóxicos em linhas celulares de câncer. Resultados representados como porcentagem de inibição celular por média e desvio padrão.		68
Figura 21 - Efeito no rendimento de R-FE utilizando água ultrapura e tampão fosfato como solvente de extração sob pressão constante de 500 bar ao longo de 360 min.		71
Figura 22 - Concentração de proteínas totais (a) e Rendimento de R-FE (b) obtidos no sistema pressurizado, analisando o efeito de pressão sem processo de agitação ao longo do tempo.		72
Figura 23 - Análise espectrofotométrica de absorção (a) e análise fluorimétrica (b) obtidas por extração pressurizada de <i>S. filiformis</i> em 360 min obtidos em diferentes pressões.		75
Figura 24 - Concentração de proteínas totais (a) e Rendimento de R-FE (b) obtidos em célula de recombinação, analisando o efeito de pressão com processo de agitação ao longo do tempo.		76
Figura 25 - Comparação do rendimento de extração de R-FE do sistema pressurizado e em célula de recombinação ao longo de 360 min em 500 bar (a) e o efeito da pressão e inserção de agitação no tempo de 360 min de extração (b).....		77
Figura 26 – Coloração dos extratos brutos proteicos na extração de R-FE do sistema pressurizado e em célula de recombinação ao longo de 360 min em 500 bar (a) e o efeito da pressão e inserção de agitação no tempo de 360 min de extração (b). ...		78

Figura 27 - Rendimento de R-FC extraídos da macroalga <i>S. filiformis</i> pelo método de pressurização em célula de extração (a) e célula de recombinação (b) em diferentes pressões ao longo de 360 min.	79
Figura 28 – Rendimento de R-FE em diferentes tamanhos de partículas da macroalga <i>S. filiformis</i> , em 500 bar de pressão com agitação, ao longo de 360 min.	80
Figura 29 - Coloração dos extratos brutos proteicos na extração de R-FE em célula de recombinação ao longo de 360 min em 500 bar para macroalga inteira, triturada e macerada.	81
Figura 30 - Microscopia óptica 4x da macroalga <i>S. filiformis</i> avaliando o efeito do tamanho de partícula em pressão 1 bar: (a) inteira, (b) triturada, e (d) ruptura da parede celular após extração em 500 bar em 360 min.	82
Figura 31 - Espectro de DC do extrato bruto e precipitado de R-FE obtidos da macroalga <i>S. filiformis</i> pela célula de recombinação.	87
Figura 32 – Perfil eletroforético de R-FE obtida da macroalga <i>S. filiformis</i> em 6 horas de extração em célula de recombinação em 360 min de extração, sob pressão de 500 bar, em condições desnaturantes na presença do agente redutor.	88
Figura 33 - Espectro de FTIR de 4000-500 cm^{-1} dos extratos obtidos da <i>S. filiformis</i> em célula de recombinação, (a) R-FE purificada de Pereira Martins et al. (2023); (b) EB – extrato bruto; (c) EP – extrato precipitado.	89
Figura 34 - Atividade antioxidante dos EB e EP extraídos da <i>S. filiformis</i> em diferentes concentrações por diferentes técnicas de medição: (a) Sequestro dos radicais de DPPH e (b) quelação de íons ferrosos.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Elementos de estrutura secundária da R-FE estimados a partir do espectro de DC para diferentes temperaturas.	65
Tabela 2 - Potencial citotóxico da R-FE extraída da macroalga <i>S. filiformis</i> avaliado pelo método MTT para crescimento de células cancerígenas.	67
Tabela 3 – Valores da IC50 (µg/mL) dos extratos de R-FE extraídas de <i>S. filiformis</i> avaliadas pelo método MTT nas linhagens leucêmico (HL60), próstata (PC3), câncer de colorretal (HCT116) e glioblastoma (SNB19) com incubação de 72 horas. Maior concentração testada: 500 µg/mL.	69
Tabela 4 – Rendimento de extração de ficobiliproteínas de macroalgas vermelhas por diferentes métodos de extração.	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FBP	Ficobiliproteínas
FE	Ficoeritrina
FC	Ficocianina
AFC	Aloficocianina
R-FE	Ficoeritrina presente nas macroalgas vermelhas (<i>Rhodophytas</i>)
ELP	Extração por líquido pressurizado
EAS	Extração acelerada de solvente
ESAPAT	Extração de solvente de alta pressão e alta temperatura
FBS	Ficobilissomas
λ_{\max}	Comprimento de onda máximo
PEB	Ficoeritrobilina
PUB	Ficourobilina
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
NPs	Nanopartículas
PCL	Policaprolactona
PC-3	Câncer de próstata
4T1	Câncer de mama
rGO-Ag	Biomoléculas de nanocompósitos de nanopartículas de prata com óxido de grafeno reduzido
EAM	Extração Assistida por Micro-ondas
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
EAE	Extração assistida por enzimas
HAP	Homogeneização a Alta Pressão
EFS	Extração por Fluidos Supercríticos
ELP	Extração de Líquido Pressurizado
DME	Éter dimetílico
EBU	Extrato bruto de algas úmidas
EBL	Extrato bruto de algas liofilizadas
EB	Extrato bruto
R-FC	R-ficocianina
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio

EPU	Extrato precipitado de algas úmidas
EPL	Extrato precipitado de algas liofilizadas
EP	Extrato precipitado
Abs ₅₆₄	Absorbância medida em 564 nm
Abs ₆₁₈	Absorbância medida em 618 nm
Abs ₇₃₀	Absorbância medida em 730 nm
IP	Índice de pureza
Abs ₂₈₀	Absorbância medida em 280 nm
SDS	Dodecil sulfato de sódio
DC	Dicroísmo circular
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HCT116	Câncer de colorretal
SNB19	Câncer de glioblastoma
PC3	Câncer de próstata
HL60	Leucemia
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Etilenodiaminotetracético
BHT	Butilhidroxitolueno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Algas	22
3.1.1	<i>Macroalgas</i>	23
3.1.1.1	<i>Macroalga vermelha Solieria filiformis</i>	24
3.2	Ficobiliproteínas (FBP)	25
3.2.1	<i>R-ficoeritrina</i>	28
3.2.1.1	<i>Aplicações de R-ficoeritrinas</i>	29
3.3	Extração de R-ficoeritrinas	31
3.3.1	<i>Diferentes métodos de extração de R-FE</i>	32
3.3.2	<i>Extração de R-FE com utilização de pressão</i>	34
3.3.2.1	<i>Homogeneização a Alta Pressão</i>	35
3.3.2.2	<i>Fluidos Supercríticos</i>	36
3.3.2.3	<i>Extração de Líquido Pressurizado (ELP)</i>	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Pré-tratamento da macroalga <i>Solieria filiformis</i>	42
4.2	Metodologia	42
4.2.1	<i>Metodologia 1 – Extração de R-FE pelo método de água pressurizada em célula de extração</i>	43
4.2.2	<i>Metodologia 2 – Extração de R-FE pelo método de líquido pressurizado em célula de recombinação</i>	45
4.3	Precipitação proteica do Extrato Bruto por sulfato de amônio	47
4.4	Quantificação de proteínas totais e ficobiliproteínas extraídas da macroalga <i>S. filiformis</i>	47
4.4.1	<i>Determinação de proteínas totais</i>	47
4.4.2	<i>Quantificação de ficobiliproteínas extraída da macroalga <i>S. filiformis</i></i>	48
4.4.3	<i>Análise fluorimétrica</i>	49
4.5	Caracterização dos extratos obtidos de R-FE da macroalga <i>S. filiformis</i>	49
4.5.1	<i>Determinação de carboidratos totais</i>	49

4.5.2	<i>Eletofórese unidimensional em gel de poliacrilamida</i>	49
4.5.3	<i>Dicroísmo Circular (DC)</i>	50
4.5.4	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	51
4.5.5	<i>Ensaio de citotoxicidade dos extratos de R-FE obtidos na metodologia 1</i>	51
4.5.6	<i>Atividade antioxidante</i>	52
4.5.6.1	<i>Sequestro do radical de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil)</i>	52
4.5.6.2	<i>Método de quelação de íons ferrosos</i>	53
4.6	Análise Estatística	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Análise dos resultados obtidos na metodologia 1	54
5.1.1	<i>Análise do extrato bruto obtido na extração de água pressurizada</i>	54
5.1.2	<i>Análise de carboidratos totais</i>	60
5.1.3	<i>Eletofórese SDS-PAGE</i>	61
5.1.4	<i>Dicroísmo Circular (DC)</i>	63
5.1.5	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	65
5.1.6	<i>Citotoxicidade</i>	67
5.2	Análise dos resultados obtidos na Metodologia 2	70
5.2.1	<i>Análise de R-ficoeritrina obtido na extração de líquido pressurizado</i>	70
5.2.2	<i>Análise de Carboidratos Totais</i>	86
5.2.3	<i>Dicroísmo Circular (DC) da R-FE</i>	86
5.2.4	<i>Eletofórese SDS-PAGE</i>	87
5.2.5	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	89
5.2.6	<i>Atividade Antioxidante</i>	90
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Os recursos naturais marinhos, como por exemplo as algas, cada vez mais vêm ganhando atenção devido às possibilidades de obtenção de biocompostos de grande interesse industrial. As algas são consideradas potencialmente uma matéria-prima sustentável para a produção de compostos bioquimicamente ativos, tais como: enzimas, polissacarídeos sulfatados, metabólitos secundários e proteínas. De uma forma geral, podem ser divididas em microalgas e macroalgas (BURLLOT et al., 2023; KOVALESKI et al., 2022).

As macroalgas vermelhas (*Rhodophytas*), fontes de pigmento vermelho, geralmente contêm altos níveis de proteína. Elas têm despertado significativo interesse científico devido ao seu alto valor agregado como fonte de compostos bioativos com potencial biotecnológico como, por exemplo, as ficobiliproteínas (FBP) (BASTOS FILHOS, 2016; KOVALESKI et al., 2022). Essas podem ser divididas em ficoeritrinas (FE), ficocianinas (FC) e aloficocianinas (AFC), que são proteínas fluorescentes e com pigmentos hidrossolúveis. Nas *Rhodophytas*, a R-ficoeritrina (R-FE) é majoritária, amplamente utilizada em aplicações terapêuticas: anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais, hepatoprotetoras, anticarcinogênicas e imunomoduladoras (CASTRO-VARELA et al., 2022; RATHNASAMY et al., 2019; WANG et al., 2020a). Também é utilizado em alimentos e cosméticos como corante natural e não tóxico (MITTAL et al., 2017).

Por se tratar de uma proteína intracelular, a eficiente obtenção de R-FE ocorre a partir de técnicas de extração baseadas na tentativa de romper a parede celular das macroalgas. Vários métodos estão disponíveis para extração de ficobiliproteínas: choque osmótico (KAWSAR et al., 2011), maceração (MITTAL et al., 2017; MUNIER et al., 2015), liofilização (GALLAND-IRMOULI et al., 2000), congelamento e descongelamento (SENTHILKUMAR et al., 2013a), ultrassom (CASTRO-VARELA et al., 2022; LE GUILLARD et al., 2015; MITTAL et al., 2017), homogeneização (BASTOS FILHOS, 2016; PEREIRA MARTINS et al., 2023), entre outros. No entanto, devido à presença de polissacarídeos na parede celular e em função da estrutura química e propriedades dos compostos bioativos, comumente esses métodos podem não fornecer extratos de alto rendimento ou pureza. Além disso, métodos como extração por solventes e/ou ultrassom podem utilizar solventes tóxicos e possuem alto consumo de energia (CASTRO-VARELA et al., 2022; MARTINS et al., 2016; SARKARAT;

MOHAMADNIA; TAVAKOLI, 2022).

Diante deste cenário, a extração de biocompostos de alto valor utilizando tecnologias ambientalmente amigáveis é cada vez mais relevante. Aqui, as técnicas de “processos verdes” poderiam ser definidas como métodos de extração por água para obter ingredientes funcionais de recursos marinhos (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017; SARKARAT; MOHAMADNIA; TAVAKOLI, 2022). Essas técnicas, como a aplicação de pressão na parede celular, que emprega temperaturas amenas, são atrativos para a extração de compostos bioativos termossensíveis (ALEXANDRE et al., 2017), mantendo as características naturais dos produtos finais (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016; PEREIRA et al., 2020) e preservando nutrientes, cor e sabor (SIMOVIC et al., 2022). Além disso, podem aumentar a eficiência do processo de extração, reduzindo o tempo e volume de solvente necessários (KHAN; ASLAM; MAKROO, 2019). Contudo, há uma lista de princípios para extração verde de produtos naturais que devem ser adotadas tanto pela indústria quanto pelos pesquisadores para estabelecer um padrão inovador e ecologicamente correto (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

A extração por líquido pressurizado (ELP) é um método avançado de extração sólido-líquido que aumenta a difusividade e solubilidade de moléculas alvo em solventes, acelerando assim o processo de extração (SARKARAT; MOHAMADNIA; TAVAKOLI, 2022), tornando-o assim um processo alternativo às técnicas convencionais de extração (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016).

Na literatura, há numerosos estudos realizados para extração de FBP usando pressão, incluindo alta pressão hidrostática (TRAN et al., 2019), extração assistida de alta pressão (PEREIRA et al., 2020), homogeneização de alta pressão (CASTRO-VARELA et al., 2022; RUIZ-DOMÍNGUEZ et al., 2019; SIMOVIC et al., 2022) e líquido pressurizado (CARLOS, 2020; HERRERO et al., 2005). No entanto, há escassez de dados sobre a extração de R-FE de macroalgas. Portanto, neste trabalho abordaremos uma contribuição significativa para o avanço da análise da extração de R-FE de macroalgas vermelhas por meio do método de extração com líquido pressurizado. Além disso, é relevante salientar a introdução de um novo equipamento, a célula de recombinação, ainda não relatado na literatura para a extração de compostos bioativos de algas, o que destaca ainda mais a singularidade e o potencial impacto deste estudo na área científica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair a R-ficoeritrina da macroalga *Solieria filiformis* pelo método de pressurização, visando aumentar o rendimento de extração sem perda da biofuncionalidade do biocomposto, caracterizá-la e analisar sua atividade antioxidante e citotóxica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de pré-tratamento mecânico de trituração e maceração da biomassa para extração de R-FE pelo método pressurizado;
- Avaliar o método de extração em diferentes solventes (água ultrapura e tampão fosfato) e pressões (200, 500 e 800 bar) para aumentar o rendimento de R-FE;
- Caracterizar a biomolécula obtida pelas seguintes técnicas: carboidratos totais, eletroforese, dicroísmo circular e FTIR, visando analisar a pureza e a estrutura da biomolécula obtida;
- Analisar a atividade anticancerígena *in vitro* das biomoléculas extraídas nas células de câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de glioblastoma e leucemia;
- Determinar atividade antioxidante *in vitro* do extrato de R-FE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Algas

As algas são organismos aquáticos fotossintéticos, variando de unicelulares (microalgas) a pluricelulares (macroalgas), que estão presentes nos mais diversos tipos de habitats. Aparecem mais comumente na água doce ou salgada e podem ser encontradas em ambientes de temperaturas extremas, além de troncos de árvores e rochas. Elas possuem funções biológicas e ecológicas semelhantes às plantas (BASTOS FILHOS, 2016; CHEN; QI; XIONG, 2022).

Podem ser classificadas em grupos como Cianobactéria (*Cyanophyceae*), algas verdes (*Chlorophytas*), algas vermelhas (*Rhodophytas*) e algas pardas (*Ochophyta*), onde diferem entre si de acordo com seus pigmentos fotossintéticos e componentes da parede celular (BASTOS FILHOS, 2016; GORDALINA et al., 2021). As algas são consideradas uma matéria-prima sustentável para a produção de compostos valiosos com capacidade bioativa, tendo aplicações comerciais para alimentos, pesquisas médicas e outros usos (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). Elas são ricas em açúcares, proteínas, lipídios, minerais, carboidratos e vitaminas. Nos últimos anos, têm sido estudadas como fonte de metabólitos de alto valor, como polissacarídeos, esteróis, tocoferóis, terpenos, polifenóis e ficobiliproteínas (FBP) (BURLLOT et al., 2023; CHEN; QI; XIONG, 2022; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Sua sobrevivência e florescimento em diferentes habitats dependem em grande parte da radiação solar. A radiação fotossinteticamente ativa é capturada pelas FBP e convertida em energia química para apoiar o metabolismo celular. Para absorção de luz eficiente, vários tipos de FBP com espectros de absorção distintos evoluíram (CHEN; QI; XIONG, 2022). A química das algas está amplamente ligada à evolução e adaptação ao seu ambiente. Como muitas vezes experimentam condições estressantes e ambientes altamente flutuantes, a maioria das algas possui mecanismos para permitir a aclimação aos estressores (por exemplo, radiação UV, temperatura e salinidade) e são capazes de se defender contra pressões biológicas. Essa ampla faixa de tolerância combinada com sua estrutura celular específica os predispõe ao crescimento e desenvolvimento em condições laboratoriais e industriais (GORDALINA et al., 2021).

Por muitos anos, muitas algas têm sido usadas como alimentos ou aditivos alimentares, sendo utilizadas na culinária e na medicina, observando-se uma menor

incidência de doenças crônicas, como hiperlipidemia, doença coronariana, diabetes e câncer, comparando os países do leste asiático aos países ocidentais. Seus compostos bioativos demonstraram possuir atividades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, anti-hiperlipidemias, imunomoduladoras, neuroprotetoras, antivirais e antimicrobianas (CHEN; QI; XIONG, 2022).

3.1.1 Macroalgas

As macroalgas são algas multicelulares, fotoautótrofas, que se desenvolvem em superfícies subaquáticas sólidas ou flutuando livremente na água. Habitam ecossistemas com salinidades variadas, desde água doce até estuários salobras, em mar aberto e costas marítimas, distribuídas verticalmente desde a zona superior (superfície do mar) até a zona sublitoral inferior. Comparada com as microalgas, elas ocupam o espaço disponível mais lentamente, mas crescem mais rápido e são menos vulneráveis ao pastoreio e à turbulência da água (GORDALINA et al., 2021).

As algas vermelhas, classe das *Rhodophyceae*, apresentam cerca de 4.000 a 6.000 espécies em mais de 600 gêneros, onde a cor vermelha é atribuída aos pigmentos clorofila a, FE e FC. Desenvolvem-se em habitats mais profundos devido usar uma parte diferente do espectro de luz daquela usada por outras algas, ou seja, crescem onde outras não crescem (GORDALINA et al., 2021).

As macroalgas se diferenciam das plantas terrestres a partir da sua composição química, características fisiológicas e morfológicas. Apresentam na parede celular a celulose como um polissacarídeo estrutural. Possuem também polissacarídeos típicos, como carragenana, ágar e alginato e geralmente não possuem altos teores de amido e lipídios. As macroalgas vermelhas apresentam abundantes quantidades de carboidratos com teores variando entre 30-60% de seu peso seco (GORDALINA et al., 2021).

A composição das macroalgas, incluindo os níveis de metabólitos e os teores de compostos bioativos, pode diferir entre as espécies: variando de acordo com a luz, salinidade, nutrientes, temperatura, poluição, movimento da água, localização geográfica e estação do ano (MOURITSEN; RHATIGAN; PÉREZ-LLORENS, 2018; PEREIRA et al., 2020). O estado biológico das algas, como seu desenvolvimento e estrutura do talo, também pode ter impacto em sua composição bioquímica (GAO; MCKINLEY, 1994).

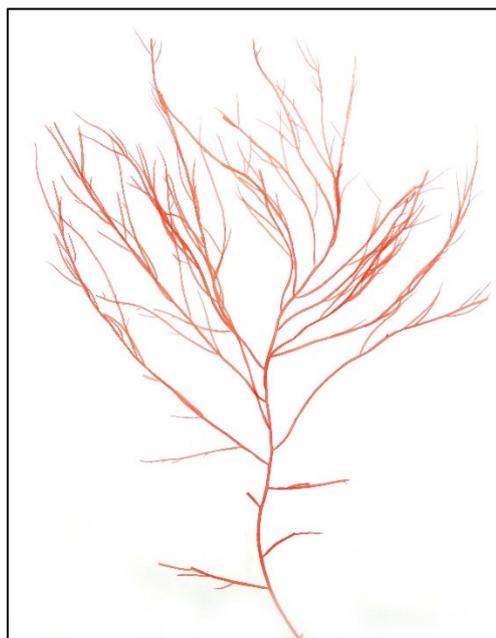
As macroalgas vermelhas possuem um potencial significativo como fonte de

proteínas essenciais, que são pigmentos fotossintéticos, como FC e FE, apresentando alta fluorescência e grande perspectiva para uso na indústria (BASTOS FILHOS, 2016). Uma extração eficiente de proteínas de macroalgas depende em grande parte de sua acessibilidade, pois a maioria delas é produzida de forma intracelular sendo o grande desafio para sua obtenção a ruptura da parede celular. Esta consiste em uma rede altamente integrada de biopolímeros, principalmente polissacarídeos, que interagem com moléculas como água e cátions metálicos (GORDALINA et al., 2021). A biomassa de algas deve ser preservada por secagem, congelamento ou usada fresca o mais rápido possível para evitar a degradação de proteínas. Um maior rendimento pode ser alcançado a partir da combinação de métodos de extração e técnicas de purificação (GORDALINA et al., 2021).

3.1.1.1 Macroalga vermelha *Solieria filiformis*

A macroalga vermelha *Solieria filiformis* (*S. filiformis*) é uma espécie nativa encontrada em toda costa litorânea brasileira (Figura 1). As condições climáticas ambientais favorecem o cultivo de algas na região e, devido ser fonte de vários compostos bioativos, incluindo FBP, agrega valores econômicos/sociais/ambientais (BASTOS FILHOS, 2016; BURLLOT et al., 2023; SOUSA et al., 2016).

Figura 1 - Macroalga marinha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson.



Fonte: elaborado pelo autor.

Vários estudos já realizados para *S. filiformis* mostram propriedades anti-inflamatória e anticoagulante (DE ARAÚJO et al., 2012; PEÑUELA et al., 2021a), antiprotzoário (CAAMAL-FUENTES; ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 2017), antiviral (PEÑUELA et al., 2021a; ZEPEDA; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2020) e teranóstico (PEREIRA MARTINS et al., 2023).

A macroalga *S. filiformis* apresenta grande importância como matéria-prima para desenvolver uma estratégia de valorização da espécie para obtenção de produtos com alto valor agregado. Além disso, apresenta uma abordagem inovadora no conceito de biorrefinaria (BURLLOT et al., 2023), pois além de apresentar em sua composição altos níveis de proteína, sintetiza altos níveis de polissacarídeos sulfatados, compostos principalmente por carragenanas (SOUSA et al., 2016). Nesse contexto, o conceito de biorrefinaria aborda extrações sequenciadas que são realizadas a fim de obter todos os compostos bioativos presentes na biomassa, com ou sem o uso de tecnologias verdes, além de reaproveitar os resíduos gerados (BURLLOT et al., 2023; PEÑUELA et al., 2018). Dessa forma, combina os processos de conversão de biomassa em diversos produtos e garante a recuperação de outros componentes com valor comercial agregado, maximizando assim os benefícios e lucros (BASTOS FILHOS, 2016).

3.2 Ficobiliproteínas (FBP)

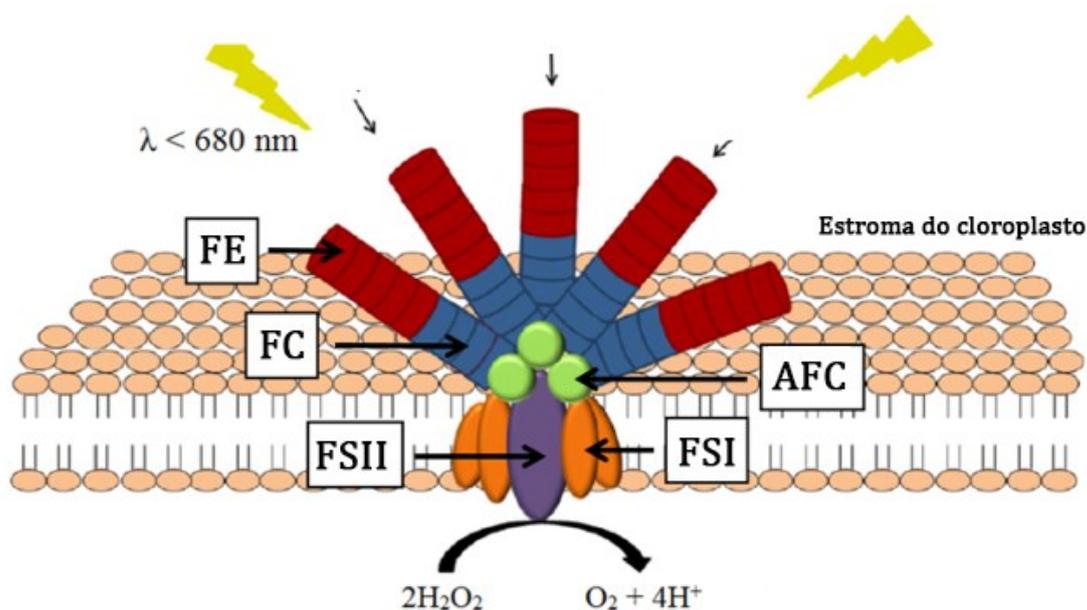
As ficobiliproteínas (FBP) são uma família de proteínas fluorescentes ligadas covalentemente a grupos prostéticos tetrapirrol, conhecidos como bilinas ou ficobilinas, que os dão cores características e propriedades espectrais. São solúveis em água e encontradas em cianobactérias, rodófitas, criptomonas e cianelas. Eles constituem uma estrutura ligada à superfície citoplasmática das membranas dos tilacóides denominada ficobilissomas (FBS). A ficobilina é o próprio pigmento fotossintético, mas só tem papel funcional se uma proteína estiver ligada a ela (BASTOS FILHOS, 2016; CHEN; QI; XIONG, 2022).

De acordo com suas características espectrais de absorvância, as FBP são agrupadas em três classes: FE ($\lambda_{\max} = 495-570$ nm), FC ($\lambda_{\max} = 610-620$ nm) e AFC ($\lambda_{\max} = 650-655$ nm). As FBP podem ser ainda classificadas em subtipos para distinguir suas propriedades espectrais e seus prefixos indicam sua origem taxonômica: C-, *Cyanobacteriana*; B-, *Bangiofícea*; e R-, *Rhodophyta*. Por exemplo, FE é dividido em C-FE, B-FE e R-FE; FC é dividido em C-FC e R-FC (CHEN; QI; XIONG, 2022). A FBP

mais comum em muitas algas vermelhas é a R-FE (GORDALINA et al., 2021; HSIEH-LO et al., 2019).

Essas proteínas servem como a principal antena concentradora de luz para absorver a energia em uma região em que a clorofila é ineficiente e, assim, desempenhar um papel importante para a fotossíntese. Sua sobrevivência e florescimento em diferentes habitats dependem em grande parte da radiação solar. As FBP capturam radiação fotossinteticamente ativa na faixa de 400 nm a 700 nm e a convertem em energia química para apoiar o metabolismo celular, representado na Figura 2. Para absorver eficientemente a luz, várias FBP com diferentes espectros de absorção foram desenvolvidas (CHEN; QI; XIONG, 2022).

Figura 2 - Estrutura do ficobilissoma (FBS). A cascata de transferência de energia começa com ficoeritrina (FE, vermelho) para ficocianina (FC, azul) e aloficocianina (AFC, verde) e finalmente para o centro de reação nos fotossistemas II (roxo) e I (laranja).



Fonte: Adaptado de HSIEH-LO et al. (2019).

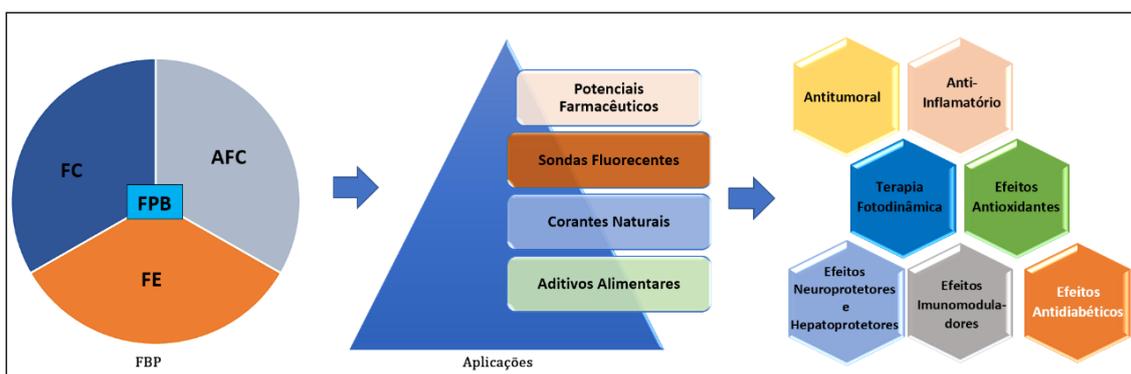
Estudos de medição de energia mostraram que a ordem de absorção se dá inicialmente pela FE que se encontra na parte mais externa do FBS até a AFC mais interna e finalmente para a clorofila a no centro de reação por transferência de éxciton. As FBP também atuam como uma reserva de nitrogênio onde, em situações de carência, as proteínas serão degradadas e, conseqüentemente, acarretará a alteração de cor das algas (BASTOS FILHOS, 2016; CARLOS, 2020).

As FBP, quando fixadas aos FBS, apresentam fraca fluorescência, contudo, após a sua extração, os FBS são degradados, liberando as FBP que, por sua vez, impedidas

de transferir elétrons no processo fotossintético, passam a exibir propriedade fluorescente (SUN et al., 2004).

Devido à sua alta solubilidade em água, estabilidade e bioatividade, as FBP ganharam especial importância em diversos setores, como alimentos, farmacêutica e cosmética (CHEN; QI; XIONG, 2022; KOVALESKI et al., 2022; LI et al., 2019). Com o seu alto coeficiente de extinção e rendimento de fluorescência, as FBP foram desenvolvidas como uma sonda fluorescente em ensaios de imunofluorescência (CHEN; QI; XIONG, 2022), marcação de biomoléculas para imunoenaios fluorescentes, ensaios imuno-histoquímicos e microscopia de fluorescência (GORDALINA et al., 2021). As FBP também são usadas como corantes naturais e aditivos alimentares (CHEN; QI; XIONG, 2022). Um resumo das aplicabilidades é representado na Figura 3.

Figura 3 - Aplicação das ficobiliproteínas como aditivos alimentares, corantes naturais, sondas fluorescentes e os potenciais farmacêuticos.



Fonte: Adaptado de (CHEN; QI; XIONG, 2022). Legenda: FE – Ficoeritrina; FC – Ficocianina; AFC – Alofococianina; FPB – Ficobiliproteínas.

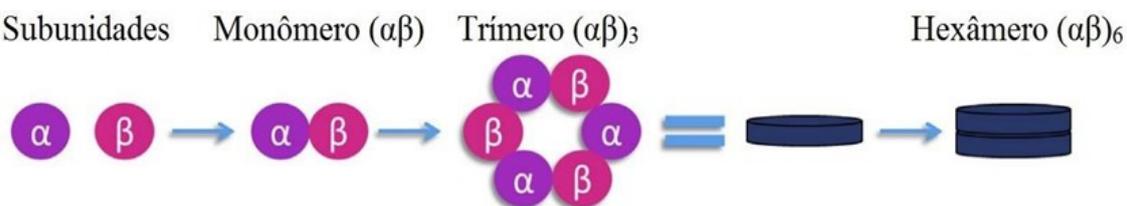
Há uma alta comercialização no mercado voltada para estes biocompostos (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). Atualmente, diversos tipos de FBP são vendidos por empresas especializadas sendo que o preço do mercado pode variar de acordo com a pureza e então determinar seu potencial de aplicação. O grau alimentício deve ser maior ou igual a 0,7, enquanto o grau reagente varia entre 0,7 e 3,9 e grau analítico maior ou igual a 4 (HSIEH-LO et al., 2019). De acordo com a *Future Market Insights*, as FE tiveram um valor de estimado em US\$ 4,2 milhões em 2022 e está projetado alcançar US\$ 7,6 milhões em 2032 (INSIGHTS, 2023).

3.2.1 R-ficoeritrinas

A R-ficoeritrina (R-FE) é o principal pigmento encontrado nas macroalgas vermelhas e em algumas cianobactérias unicelulares (GORDALINA et al., 2021; HSIEH-LO et al., 2019). Sua cor característica rosa-avermelhada resulta da presença de cromóforos tetrapirrólicos lineares ligados covalentemente (via ligação tioéter) a ficobilinas, como ficoeritrobilina (PEB) e ficourobilina (PUB) (SIMOVIC et al., 2022; SUN et al., 2004; WANG et al., 2020a). A R-FE é altamente solúvel em água e desempenha o papel de capturar a energia da luz e transferi-la para a clorofila no centro de reação fotossintética do Fotossistema II através de outras FBP como FC e AFC (CASTRO-VARELA et al., 2022).

A R-FE é uma proteína oligomérica de 240 kDa e consiste em monômeros compostos por dois tipos diferentes de polipeptídeos, α (12–19 kDa) e β (20–30 kDa), que estão presentes em quantidades equimolares e ligados de forma não covalente entre si, além da subunidade γ (~ 34-35 kDa) (BEKASOVA, 2024; SENTHILKUMAR et al., 2013a). As subunidades α e β da FE formam trímeros e hexâmeros em forma de disco através da agregação face a face com a ajuda de um peptídeo ligante especial (subunidade γ), dando maior estabilidade. A FE pode ser encontrada tanto na forma trimérica $[(\alpha\beta)_3]$ quanto na forma hexamérica $[(\alpha\beta)_6 \gamma]$ ou $[(\alpha\beta)_6]$, variando de acordo com o tipo de FE isolada e pode ser alterada em resposta à qualidade da luz (BASTOS FILHOS, 2016; LE GUILLARD et al., 2023; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019; SIDLER, 1994). As subunidades estão dispostas na forma de disco conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Organização das subunidades das ficobiliproteínas em trímeros e hexâmeros.



Fonte: (BASTOS FILHOS, 2016) mencionado de DUMAY et al., 2014.

Em relação às características espectroscópicas, constituem o grupo mais variável das FBP. Elas também são conhecidas por representarem a classe das FBP mais dinâmicas, devido aos seus picos de absorção, variando de 480 nm a 570 nm (picos de 498, 540, e 565 nm) e que emitem fluorescência de 575 a 580 nm facilitando a adaptação das macroalgas vermelhas frente às alterações ambientais. O máximo de absorção em 498 nm é devido à absorção de PUB. Os máximos de absorção em 540 e 565 nm são devidos

à absorção de PEB (BOGORAD, 2003; BRYANT, 1982; GLAZER et al., 1976; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999; SIDLER, 1994).

A extração de R-FE já foi relatado para diferentes espécies, por exemplo, *Gelidium pusillum* (MARTINS et al., 2016; MITTAL et al., 2017; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019), *Grateloupia turuturu* (LE GUILLARD et al., 2015, 2023; MUNIER et al., 2015), *Rhodymenia pseudopalmata* (PLIEGO-CORTÉS et al., 2017), *Portieria hornemanni* (SENTHILKUMAR et al., 2013a), *Callithamnion rubosum* (BEKASOVA, 2024) e *Solieria filiformis* (BURLLOT et al., 2023; PEÑUELA et al., 2018; PEREIRA MARTINS et al., 2023).

3.2.1.1 Aplicações de R-ficoeritrinas

A R-FE apresenta potencial farmacêutico, pois apresentam atividades antioxidantes (PEÑUELA et al., 2021b; SENTHILKUMAR et al., 2013a; SUDHAKAR; DHARANI; PARAMASIVAM, 2023a), anticancerígenas (PEREIRA MARTINS et al., 2023; SENTHILKUMAR et al., 2013b; SUDHAKAR; DHARANI; PARAMASIVAM, 2023a), antivirais, anti-inflamatórias, antimicrobiano (SUDHAKAR; DHARANI; PARAMASIVAM, 2023b) e neuroprotetoras (BOCCIA; PUNZO, 2020).

Como outros pigmentos de ficobilina, a R-FE é uma proteína natural e não tóxica, amplamente utilizada como corante nas indústrias alimentícia e cosmética. Há uma busca constante por pigmentos naturais na indústria de alimentos, como a R-FE, para a substituição de corantes sintéticos devido efeito tóxico que apresentam (PEREIRA et al., 2020; SIMOVIC et al., 2022).

Em atividades antioxidantes, a R-FE apresenta-se capaz de eliminar o excesso de espécies reativas de oxigênio e aumentar a quantidade de enzimas antioxidantes (LI et al., 2019). Neste processo, as reações de degradação oxidativa no organismo são retardadas, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (BLOIS, 1958; CHEW et al., 2008). Estudos realizados por Sudhakar et al. (2023b) extraíram a R-FE da macroalga *Gracilaria corticata* apresentando-se eficaz na atividade antioxidante total ($264,90 \pm 10,20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), efeito de eliminação de DPPH ($22,91 \pm 1,90\%$) e capacidade quelante de íons ferrosos ($26,06 \pm 1,60\%$). Senthilkumar et al. (2013b) alcançou atividade antioxidante máxima para a R-FE da alga *Portieria hornemanni* de 43,55% ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O pigmento de R-FE desempenha um papel importante por apresentar

propriedades de fluorescência para aplicação de citometria de fluxo (PEREIRA MARTINS et al., 2023) e também foi relatado na literatura por Mubarak et al. (2012) na aplicação como uma sonda fluorescente para detecção ultrasensível de DNA. Além disso, utilizadas como sondas fluorescentes para imagens celulares e detecção de molécula única (ULAGESAN; NAM; CHOI, 2021).

O câncer, juntamente com as doenças cardiovasculares, é a principal causa de morte em todo o mundo. Diversos tratamentos, como quimioterapia e radioterapia, acompanham efeitos secundários graves. O desenvolvimento de nanotecnologia, como a síntese de nanopartículas (NPs) utilizando extratos vegetais, permite o desenvolvimento de novas estratégias para terapia do câncer e administração de medicamentos, com grande importância para alcançar a atividade anticancerígena direcionada com efeitos colaterais mínimos (BEKASOVA, 2024).

De uma forma geral, a nanoencapsulação da R-FE oferece uma série de vantagens como: estabilidade da R-FE, protegendo-a da degradação causada por fatores ambientais; melhor solubilidade e biodisponibilidade, facilitando sua absorção pelo organismo e aumentando sua eficácia terapêutica; direcionamento e liberação controlada, que podem ser exploradas em diversas aplicações, como terapia medicamentosa, alimentos funcionais, cosméticos e produtos de cuidados pessoais.

A R-FE, como todas as FBP, desempenha um papel importante como agente anticâncer devido à sua alta eficiência e baixa toxicidade. As propriedades anticancerígenas da R-FE provém da sua capacidade de gerar oxigênio singlete citotóxico, mecanismo de ação da R-FE que promove a destruição seletiva das células tumorais e interrompe o suprimento de nutrientes para o tumor, inibindo seu crescimento e disseminação (PAN et al., 2013). Esse mecanismo de ação torna a R-FE uma molécula promissora para o desenvolvimento de terapias anticâncer e destaca seu potencial como agente terapêutico em oncologia. Pesquisadores têm se dedicado ao estudo de novas aplicações de R-FE como, por exemplo, marcador celular ou ainda no diagnóstico precoce de certas doenças (ULAGESAN; NAM; CHOI, 2021).

R-FE também é potencialmente útil na terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento do câncer, pois tem a capacidade de gerar oxigênio singlete quando excitado por radiação apropriada (BEI et al., 2004). Sua subunidade pode se acumular nas células tumorais devido à sua rápida proliferação em comparação com as células normais e pode ser ativada pela irradiação com luz de 496 nm. Isso permite sua destruição por reações

fotoquímicas, tornando-a uma opção promissora no tratamento do câncer (TAN et al., 2016).

Thangam et al. (2015) criaram nanocompósitos de quitosana-prata-ficoeritrina contra células de câncer de mama com potenciais teranósticos. Pereira Martins et al. (2023) realizou a encapsulação em NPs de policaprolactona (PCL) demonstrando o potencial para marcação fluorescente na detecção de células de câncer de próstata (PC-3) e câncer de mama (4T1). Choi et al. (2018) realizaram a síntese mediada por biomoléculas de nanocompósitos de nanopartículas de prata com óxido de grafeno reduzido (rGO-Ag) usando R-FE avaliando o potencial citotóxico em células de câncer de ovário humano e células-tronco de câncer de ovário.

3.3 Extração de R-ficoeritrinas

Para a eficiente obtenção de proteínas de macroalgas é necessário que ocorra a ruptura da parede celular, já que as proteínas são intracelulares, dificultando assim sua acessibilidade (GORDALINA et al., 2021). A complexidade da parede celular nas macroalgas vermelhas é um grande problema na extração de metabólitos. Elas são compostas de biopolímeros, principalmente polissacarídeos interconectados, as carragenanas, bem como proteínas e fenólicos poliméricos, que interagem com água e cátions metálicos, entre outras moléculas. Dessa forma é um obstáculo que reduz a eficiência dos métodos de extração (PEÑUELA et al., 2018).

Para garantir a extração intracelular das proteínas são realizados estresses adicionais que melhoram a eficiência da extração, liberando os pigmentos para o meio aquoso. Quanto maior o rompimento das células, maior o rendimento de extração. Contudo, visa-se preservar a estrutura da proteína e a capacidade de interações de afinidade, controlando condições de extração suaves em faixas de pH (GORDALINA et al., 2021).

As proteínas de algas são extraídas convencionalmente por meio de métodos baseados em solução aquosa, ácida e alcalina, seguido de centrifugação para clarificação do extrato e técnicas de fracionamento e enriquecimento, como ultrafiltração, precipitação e/ou cromatografia (GORDALINA et al., 2021; KADAM; TIWARI; O'DONNELL, 2013). Devido sua alta solubilidade em água, as R-FE podem ser extraídas em soluções aquosas ou tampão fosfato a partir de diferentes estados da matéria-prima utilizada, podendo ser alga úmida (LE GUILLARD et al., 2015; WANG et al., 2015), alga

congelada (NIU; WANG; TSENG, 2006) e alga liofilizada (MUNIER et al., 2014).

3.3.1 Diferentes métodos de extração de R-FE

Na literatura são relatados diferentes métodos físicos de ruptura celular, como choque osmótico (KAWSAR et al., 2011), congelamento/descongelamento (LI et al., 2019; SENTHILKUMAR et al., 2013a), maceração em nitrogênio líquido e/ou moinhos (MITTAL et al., 2017; MUNIER et al., 2014), homogeneização (BASTOS FILHOS, 2016; PEREIRA MARTINS et al., 2023), ultrassom (CASTRO-VARELA et al., 2022; LE GUILLARD et al., 2015, 2023; MITTAL et al., 2017) e enzimas (LE GUILLARD et al., 2023; UNTERLANDER; CHAMPAGNE; PLAXTON, 2017). Tais técnicas podem melhorar o rendimento de FBP e a eficiência dos processos de extração (BASTOS FILHOS, 2016; CASTRO-VARELA et al., 2022; GORDALINA et al., 2021).

Uma das maiores desvantagens dos métodos convencionais é a geração de poluição química pelo uso de grande quantidade de solventes no processamento como, por exemplo, maceração, extração por solvente, processo de lixiviação; como também maior tempo de extração e gerando alto consumo de energia, como a ultrassom (SARKARAT; MOHAMADNIA; TAVAKOLI, 2022). Recentemente, outras alternativas foram propostas para reduzir tempo e/ou desperdício por meio de tecnologias de extração ecologicamente corretas (PEÑUELA et al., 2018).

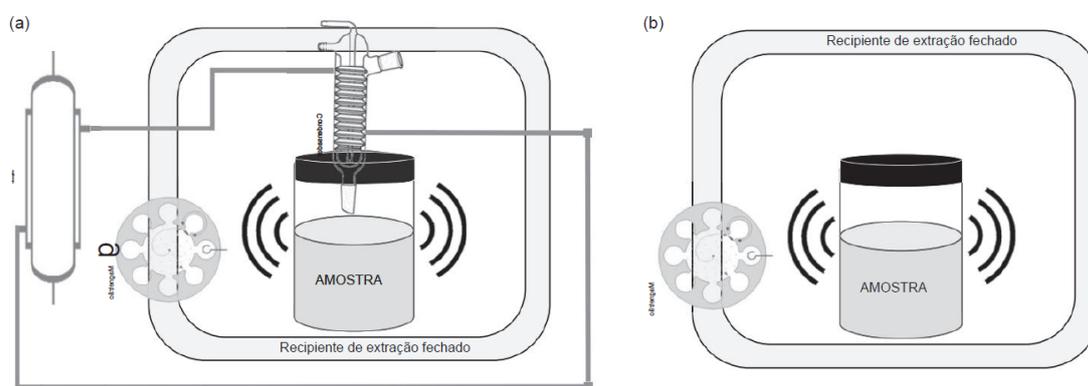
De uma forma geral, a complexidade das estruturas, as propriedades dos compostos bioativos e a estrutura dos materiais extraídos, disponibilizam diferentes métodos de extração na literatura, mas nenhum protocolo de extração universal (CASTRO-VARELA et al., 2022).

A técnica de extração a partir do tratamento de congelamento-descongelamento é um dos métodos mais utilizados no processo de extração de FBP. Neste método, a parede celular é rompida a partir da pressão exercida pelo congelamento de fluidos intracelulares que leva a rachaduras, facilitando a permeação das células e os materiais internos são liberados (LI et al., 2019; MITTAL et al., 2017). Geralmente, as algas são congeladas a cerca de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por várias horas e depois descongeladas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou à temperatura ambiente.

A Extração Assistida por Micro-ondas (EAM) é um método utilizado para melhorar a extração de proteínas de matrizes biológicas e está representado na Figura 5 (GORDALINA et al., 2021). O princípio da EAM baseia-se na transferência de energia

das micro-ondas para os solventes os quais são aquecidos por dois mecanismos: rotação dipolar e condução iônica. Isso causa rupturas nas ligações de hidrogênio e migração de íons dissolvidos, resultando em maior penetração do solvente na matriz, o que facilita a extração dos compostos alvo (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). O aquecimento intracelular subsequentemente leva a efeitos de pressão que, além dos efeitos de eletroporação, levam à ruptura das paredes e membranas celulares.

Figura 5 - Representação esquemática de um extrator de micro-ondas (EAM). A mistura de solventes e amostra estão dentro do béquer (a) Sistema fechado com condensador (b) Sistema fechado simples.



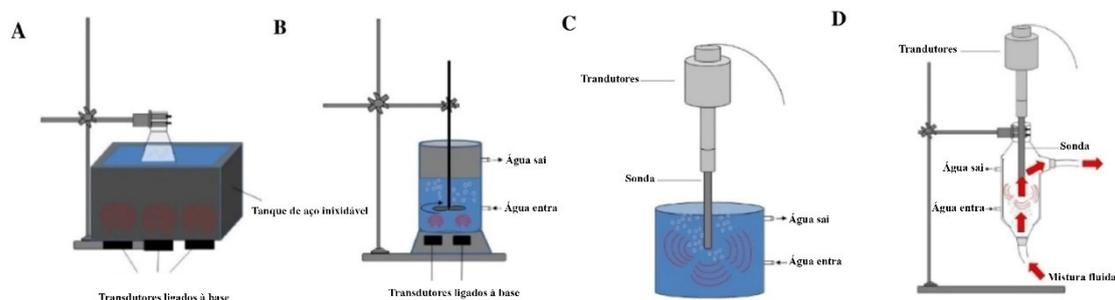
Fonte: Adaptado de ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al. (2017).

Os resultados encontrados na literatura para EAM concentram-se na redução dos tempos de extração e não em seus efeitos sobre parâmetros como a funcionalidade da proteína (GORDALINA et al., 2021). A EAM apresenta um elevado custo e difícil ampliação de escala, contudo utiliza baixos volumes de solventes e mostrou-se eficiente na extração de FBP (RATHNASAMY et al., 2019).

A Extração Assistida por Ultrassom (EAU), conhecida também como sonicação, é uma tecnologia atrativa que atua criando compressão e descompressão da parede celular através de ondas sonoras em frequências variando de 20 kHz a 100 kHz. Quando a pressão estática cai abaixo da pressão de vapor do líquido, ocorre a formação e crescimento de bolhas que devido aos picos de pressão colapsam violentamente levando ao descascamento, erosão, quebra de partículas e degradação das superfícies sólido-líquido. Com isso, ocorre o aumento de temperatura, gerando perturbações na parede celular, facilitando a penetração do solvente nas células e efetivando a liberação dos compostos intracelulares para o solvente em massa (CASTRO-VARELA et al., 2022; GORDALINA et al., 2021). Na Figura 6 é apresentado os sistemas ultrassônicos comumente usados que são equipados com quatro tipos de vasos usados para tratamento

de ultrassom.

Figura 6 - Sistemas ultrassônicos: (A) Banho de ultrassom, (B) Reator de ultrassom com agitação, (C) Sonda de ultrassom e (D) Sonicação contínua com sonda de ultrassom.



Fonte: Adaptado de SARKARAT; MOHAMADNIA; TAVAKOLI, (2022).

As vantagens da EAU são o aumento de rendimentos de extração alcançados em tempos de processamento mais curtos e temperaturas mais baixas, além de menor consumo de solvente, facilitando o processamento a jusante dos compostos alvo (GORDALINA et al., 2021). A desvantagem é a incapacidade de realizar procedimentos em larga escala para extração de FBP, pois torna-se difícil aplicar energia suficiente para grandes quantidades de suspensões celulares (LI et al., 2019).

A extração assistida por enzimas (EAE) é frequentemente o método preferível para extrair proteínas e/ou seus hidrolisados de algas marinhas. As polissacaridasas podem ser aplicadas como um tratamento de ruptura celular antes da extração da proteína para aumentar o rendimento da proteína. A escolha da enzima está altamente correlacionada com o produto final desejado (por exemplo, proteínas intactas, proteínas específicas ou peptídeos bioativos). Em relação à viabilidade, cada caso precisa ser analisado individualmente. Se for necessária uma alta relação enzima:substrato, um tratamento enzimático pode não ser viável em escala industrial, principalmente devido ao custo das enzimas (GORDALINA et al., 2021).

3.3.2 Extração de R-FE com utilização de pressão

A extração de biocompostos de alto valor utilizando tecnologias verdes é particularmente interessante. Aqui, as técnicas de "processos verdes" podem ser definidas como métodos de extração de água para obter ingredientes funcionais de recursos marinhos (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017; SARKARAT; MOHAMADNIA; TAVAKOLI, 2022), aumentando a eficiência da extração e gerando menos impurezas (HUANG et al., 2013). O processamento de alta

pressão é uma tecnologia cada vez mais implementada em produtos alimentares, farmacêuticos e aplicações biotecnológicas (ALEXANDRE et al., 2017).

A aplicação de pressão na parede celular, que emprega temperaturas amenas, pode ser um processo atraente para a extração de compostos bioativos termossensíveis, pois preserva melhor as atividades biológicas (ALEXANDRE et al., 2017). Este método mantém as características naturais dos produtos finais (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016; PEREIRA et al., 2020), oferece uma vantagem essencial em diversos tratamentos de alimentos, preservando nutrientes, cor e sabor (SIMOVIC et al., 2022) e pode aumentar a eficiência do processo de extração, reduzindo o tempo e volume de solvente necessário (KHAN; ASLAM; MAKROO, 2019).

A extração com alta pressão é relatada na literatura para a ruptura celular de algas para a obtenção de combustíveis (HALIM et al., 2012; SAMARASINGHE et al., 2012), como também diferentes bioativos (ALEXANDRE et al., 2017; KHAN; ASLAM; MAKROO, 2019) como, por exemplo, a produção de lipídeos (MULCHANDANI; KAR; SINGHAL, 2015) e FBP (CARLOS, 2020; CASTRO-VARELA et al., 2022; JUBEAU et al., 2013).

3.3.2.1 Homogeneização a Alta Pressão

O método de Homogeneização a Alta Pressão (HAP) é considerado um método não convencional e uma tecnologia verde que pode apresentar um tempo de extração consideravelmente menor e maior rendimento do que outras técnicas convencionais (CIKO et al., 2018). A HAP é um método mecânico de ruptura celular que bombeia a suspensão celular a uma alta pressão (HALIM et al., 2012). O procedimento ocorre forçando um líquido através de um bocal estreito a alta pressão e estabelecendo alta tensão de cisalhamento. Por utilizar temperaturas amenas, este processo torna-se atrativo na extração de compostos bioativos termossensíveis (CASTRO-VARELA et al., 2022).

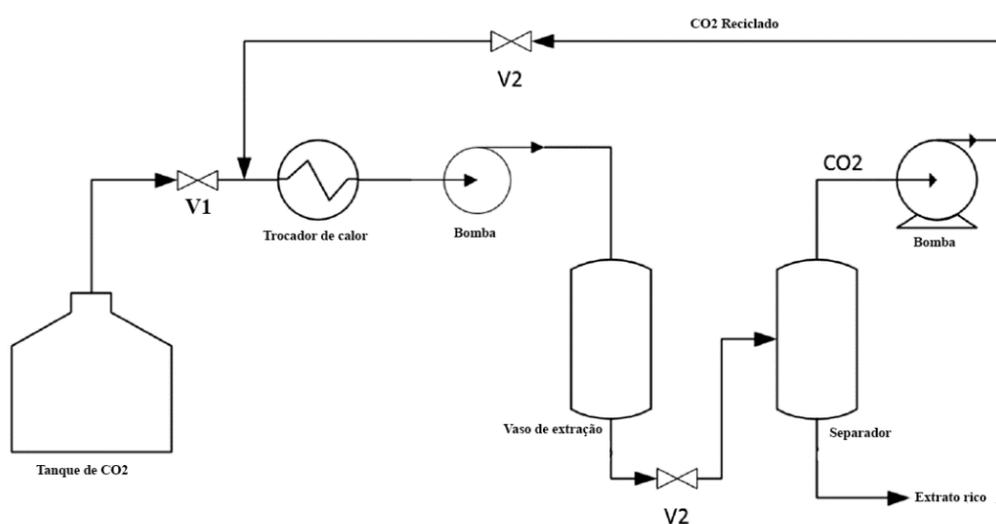
A HAP é altamente eficaz na ruptura celular de algas como *Chlorococcum* (alga verde) (HALIM et al., 2012) para obtenção de biocombustível, extração de lipídios de *Chlorella saccharophila* (MULCHANDANI; KAR; SINGHAL, 2015), extração de R-FE de *Sarcopeltis skottsbergii* (CASTRO-VARELA et al., 2022).

3.3.2.2 Fluidos Supercríticos

A Extração por Fluidos Supercríticos (EFS) é uma técnica de extração alternativa considerada verde, uma vez que uma etapa de concentração pode ser ignorada na maioria das vezes após o processo de extração. Com difusividade e viscosidade semelhantes às de um gás, a EFS é capaz de uma penetração mais rápida e profunda nas partículas sólidas da matriz a ser processada, permitindo maior transferência de massa entre o soluto extraído e o fluido supercrítico (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017; MUKHOPADHYAY, 2002; TAYLOR, 1996).

Para realizar a EFS (Figura 7), o fluido é levado ao seu estado supercrítico pressurizando e aquecendo-o antes de entrar no extrator, com pressão e temperatura desejadas. Em seguida, o solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente em todo o leito fixo por matéria sólida. Durante a extração, o solvente flui através do leito fixo e dissolve os compostos solúveis. A separação dos solutos do fluido supercrítico é conseguida no separador, reduzindo rapidamente a pressão ou aumentando a temperatura ou realizando ambos os procedimentos. Assim, o fluido passará ao estado gasoso, nos quais os solutos não serão mais solubilizados e, assim, serão separados por gravidade. Dependendo do equipamento, o solvente é resfriado e comprimido para ser devolvido, se possível, ao extrator ou liberado para a atmosfera (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Figura 7 - Diagrama de blocos do sistema de extração de fluido supercrítico.



Fonte: Adaptado de SARKARAT; MOHAMADNIA; TAVAKOLI, (2022).

De fato, altas pressões aumentam a taxa de transferência de massa e aumentam tanto a penetração do solvente no material sólido quanto a liberação de R-FE intracelular ao romper a membrana celular. De acordo com as teorias de transferência de massa, as células pressurizadas têm permeabilidade aumentada juntamente com solubilidade aprimorada enquanto a pressão aumenta. Por outro lado, a diminuição da difusividade leva a uma redução na interação entre o fluido supercrítico e a biomassa e isso faz com que o rendimento do processo de extração diminua. Sabe-se também que pressões mais altas também podem causar desprotonação de grupos carregados e a ruptura de pontes salinas e ligações hidrofóbicas, resultando em alterações conformacionais e desnaturação de proteínas (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016).

Enquanto as tecnologias comuns de extração empregam grandes volumes de solventes orgânicos caros e prejudiciais – tais como hexano, diclorometano e clorofórmio –, a EFS é ecologicamente correto e usa solventes relativamente baratos (frequentemente CO₂) para extração de bioprodutos. No entanto, a EFS também apresenta algumas desvantagens como o alto custo inicial do equipamento, além do conhecimento do comportamento da mistura ao usar cossolventes ser limitado (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

A técnica de EFS tem sido usada para processar algas marinhas e outros materiais à base de plantas principalmente para extrair componentes moleculares não polares e de pequeno tamanho, como pigmentos (clorofilas, carotenóides) e alguns lipídios (por exemplo, esteróis) que são valiosos como alimentos e ingredientes farmacêuticos (GALLEGO; BUENO; HERRERO, 2019). A maioria dos estudos está focada em microalgas em vez de macroalgas (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017), sendo necessário mais estudos que englobem as macroalgas, além de ser interessante realizar pesquisas que possam definir uma tendência na extração verde para integrar diferentes processos para obter mais metabólitos, com polaridade diferente. (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

3.3.2.3 *Extração de Líquido Pressurizado (ELP)*

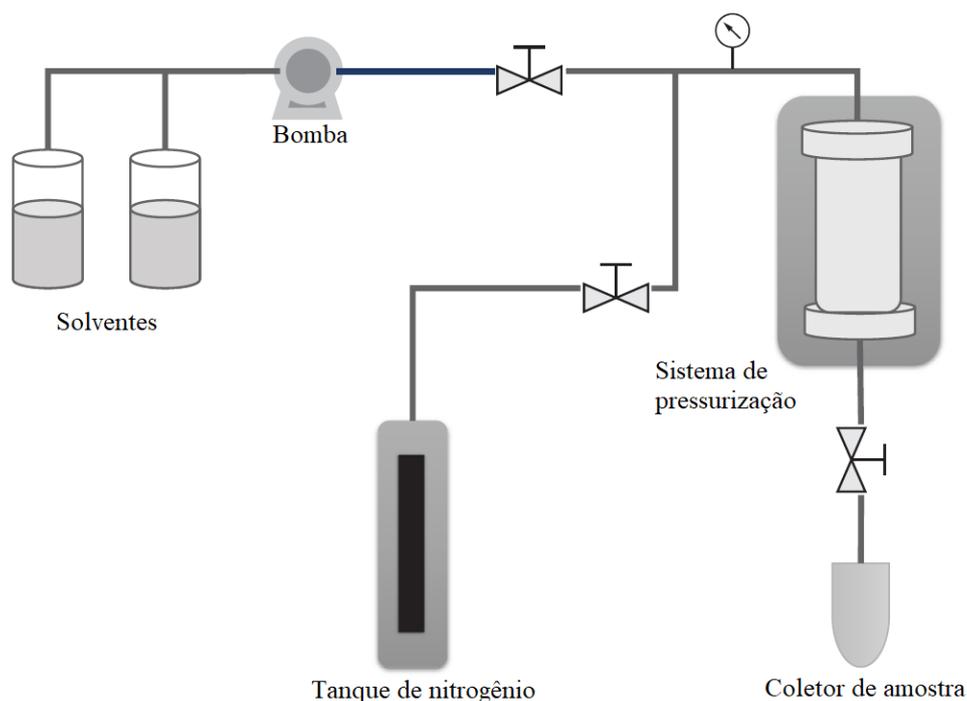
A Extração de Líquido Pressurizado (ELP) é uma tecnologia de extração emergente mais verde introduzida em 1995 (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). A ELP é considerada uma tecnologia verde já que utiliza quantidades menores de solventes orgânicos (10–30% p/v razão, aproximadamente). Apresenta como vantagem a redução da quantidade de resíduos, além de permitir a substituição de solventes perigosos por

solventes amigáveis ao meio ambiente, como a água, etanol ou uma mistura de água e outros solventes (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017; MUSTAFA; TURNER, 2011).

Os parâmetros de pressão e temperatura são ajustados para valores inferiores à temperatura e pressão críticas do solvente, mantendo-o em seu estado líquido (DAY, 2013). Tanto a temperatura quanto a pressão aumentam a taxa de transferência de massa. Altas pressões fazem com que o solvente atinja temperaturas mais altas do que seu ponto de ebulição normal e essas temperaturas mais altas aumentam a solubilidade dos componentes e reduzem a viscosidade e a tensão superficial do solvente (GROSSO et al., 2015). A água é o solvente mais utilizado, mas outros solventes, como propano e éter dimetílico (DME), também podem ser usados. Como o DME é parcialmente miscível com água, ele permite a extração simultânea de metabólitos não polares e a remoção de água de matrizes úmidas (GORDALINA et al., 2021).

Para o processo de extração, primeiramente a amostra é tratada antes de ser introduzida no equipamento (homogeneização, peneira e secagem). Em seguida, a amostra é carregada na célula de extração e uma bomba transfere o solvente de extração para a célula. Terceiro, a célula é pressurizada. Mais tarde, a extração do solvente flui através da célula de extração e é coletada em um tubo no final do caminho do fluxo (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). A Figura 8 representa o esquema de uma extração líquida pressurizada.

Figura 8 - Representação esquemática de uma extração líquida pressurizada (ELP).



Fonte: Adaptado de ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al. (2017).

Em geral, o processo de ELP pode ser definido em três etapas: (i) dessorção, quando o analito é removido de seu sítio na matriz; (ii) difusão, o analito se difunde pelos poros da matriz e atinge a fase de extração; (iii) o analito é transferido para o solvente a granel e depois recolhido. A ELP reduz o tempo de extração porque pode ser automatizado e programado para analisar várias amostras em um curto espaço de tempo (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Existem dois sistemas de ELP: dinâmico e estático. A configuração dinâmica consiste em um bombeamento contínuo de solvente através da célula de extração. Por outro lado, a configuração estática, a mais utilizada, consiste em um ou mais ciclos de extração em que o solvente é substituído em cada ciclo de extração. (MUSTAFA; TURNER, 2011).

A ELP apresenta vantagens como a grande variedade de solventes que podem ser utilizados como polares e apolares, além de explorar as mudanças na solvatação dos solventes resultantes de mudanças de pressão e temperatura. Em geral, a alta temperatura melhora o rendimento de extração dos compostos da matriz, o que também leva a maiores taxas de difusão e aumenta o poder solvente para a extração. Assim, facilita o processo de extração e reduz o tempo de processamento. A desvantagem é que a extração é exaustiva e tende a produzir uma extração não seletiva de compostos, além de um elevado custo inicial da tecnologia, mas esse alto custo pode ser compensado por uma redução no volume de solvente, desperdício e tempo (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Para otimizar o processo de extração, é importante considerar parâmetros como temperatura, pressão, tipo e composição dos solventes, aditivos, composição da matriz, modo de extração, tempo, entre outros. Um parâmetro importante relacionado aos solventes é o modo de operação do ELP, pois afeta diretamente a transferência de massa (metabólitos) da alga para o solvente. A temperatura afeta diretamente à termoestabilidade de alguns metabólitos. O parâmetro tempo também é importante, pois afeta a estabilidade do bioproduto. A pressão é outro fator importante porque pode ser usada para modular a seletividade do processo: em pressão mais alta, melhor rendimento pode ser obtido, mas ao mesmo tempo o processo se torna menos seletivo (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

O primeiro relato sobre a extração de moléculas proteicas com ELP foi um estudo realizado para extração de FBP da *Arthrospira platensis*. Os extratos brutos e purificados obtidos na ELP de microalgas foram analisados por eletroforese capilar

acoplada à espectrometria de massa (CE-MS) sendo testadas diferentes condições de extração, incluindo tempo, temperatura e pressão de extração, natureza do líquido pressurizado, distribuição da microalga dentro da célula de extração, tipo de embalagem, *etc.* As melhores condições foram 104 bar de pressão e 20°C, água como solvente, durante 7 ciclos de 15 min produzindo um rendimento de 20% (p/p). Este estudo demonstrou que a combinação da ELP com CE-MS é uma abordagem promissora para a análise de proteínas de microalgas, abrindo caminho para futuras aplicações em nutrição, biomedicina e biotecnologia. (HERRERO et al., 2005).

Ruiz-Domínguez et al. (2021) apresentou uma nova cianobactéria do gênero *Geitlerinema sp.* isolado do deserto costeiro chileno extraiu FBP por líquido pressurizado e convencional a partir de análise de delineamento experimental baseados em uma metodologia de superfície de resposta (MSR). Os principais resultados apresentaram proteínas totais (~52% em peso) e C-ficocianina. Os dados obtidos mostraram que água e etanol:água (1:1, v/v) melhoraram o rendimento de extração e a recuperação de FBP, favorecidos pelas baixas temperaturas (RUIZ-DOMÍNGUEZ et al., 2021).

A extração de FC e AFC pelo método pressurizado da cianobactéria *Arthrospira platensis* foi avaliado utilizando tampão fosfato de sódio como solução extratora. Os resultados apresentaram alto rendimento de extração quando utilizada alta pressão, sem perda de biofuncionalidade das moléculas. As melhores condições foram obtidas em 100 bar de pressão e 360 minutos de extração alcançando as concentrações de 4,44 g·L⁻¹ e 1,63 g·L⁻¹, respectivamente, FC e AFC. Os extratos purificados apresentaram atividade antioxidante e atividade anticancerígena in vitro para células leucêmicas (CARLOS, 2020).

Diante dos estudos realizados até o momento, ELP provou ser uma boa opção para análises de proteínas, uma vez que o extrato pode ser injetado diretamente no cromatógrafo sem necessidade de mais etapas de purificação (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). Por fim, vale destacar que a maioria dos estudos se concentram em microalgas e não em macroalgas, o que pode representar uma oportunidade para explorar essa tecnologia para extração de proteínas. Atualmente, a tecnologia ELP é utilizada nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Diante das evidências apresentadas, é evidente que a realização do estudo proposto nesta pesquisa representará uma contribuição significativa para o avanço da

análise da extração de FBP de macroalgas vermelhas por meio do método de ELP. Importante ressaltar que tal abordagem ainda não foi descrita na literatura para as *Rhodophytas*, destacando a inovação e originalidade deste trabalho. Ademais, é relevante salientar que o equipamento de célula de recombinação a ser empregado, cujos detalhes serão minuciosamente abordados nas metodologias, não possui registros na literatura para a extração de compostos bioativos de algas, ressaltando a singularidade e potencial impacto deste estudo na área científica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pré-tratamento da Macroalga *Solieria filiformis*

A macroalga *S. filiformis* (homologação SisGen A41C95F) foi cultivada em corda a 200 metros da costa brasileira da praia de Flecheiras, no município de Trairi (Ceará – Brasil). Para o desenvolvimento deste estudo, a espécie foi gentilmente fornecida pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG). As algas foram colhidas e encaminhadas para o laboratório de pesquisa onde foram cuidadosamente lavadas com água corrente e destilada para eliminar areia, epífitas e outros contaminantes indesejados.

Posteriormente, a macroalga foi congelada a -20°C e uma porção da biomassa foi submetida à liofilização por um período que variou de 48 a 72 horas. O processo de liofilização foi realizado no equipamento LIOTOP (modelo K105) e consiste numa tecnologia de secagem. A biomassa congelada é colocada dentro do equipamento e o ar é removido através de bombas de alto vácuo, criando a condição para que ocorra a sublimação da água. Nessa condição, a água passa do estado sólido para o gasoso à temperatura e pressões muito baixas na ausência de oxigênio.

As amostras liofilizadas foram submetidas a um processo minucioso de moagem utilizando um moinho de facas (Fritsch - pulverisette 19) até alcançarem uma granulometria de 0,25 mm. Posteriormente, toda a biomassa foi armazenada a uma temperatura de 4°C , sendo retirada a quantidade necessária e moída com grau e pistilo conforme demanda para os experimentos subsequentes.

4.2 Metodologia

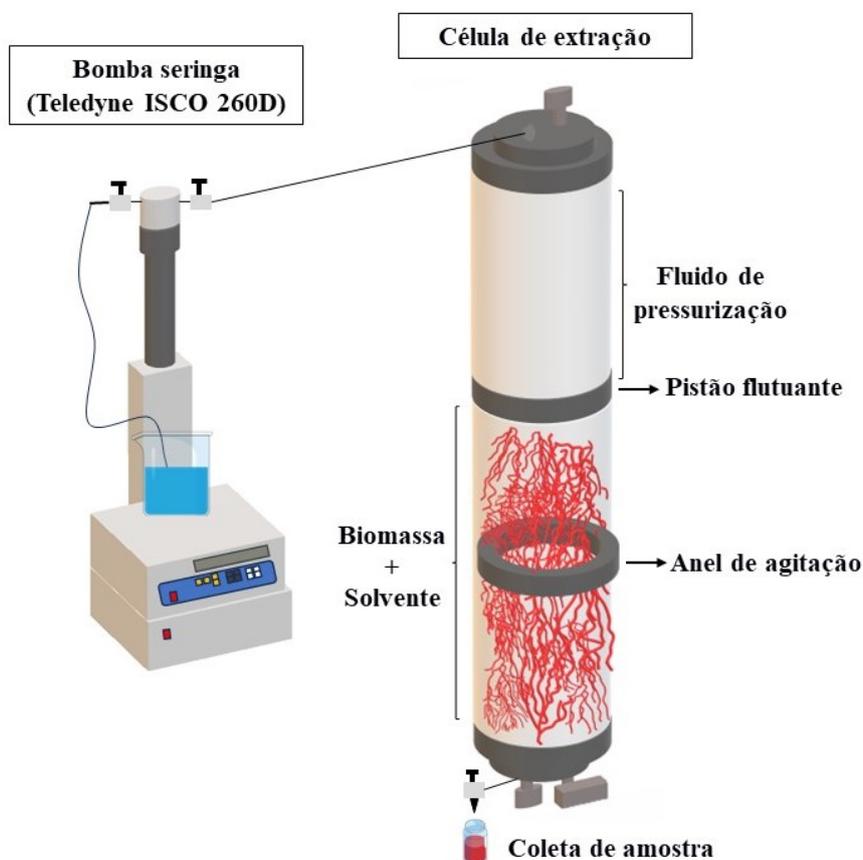
O processo de extração da R-ficoeritrina (R-FE) a partir da macroalga *S. filiformis* utilizando o método de líquido pressurizado foi conduzido empregando dois diferentes tipos de equipamentos e duas distintas metodologias. A primeira metodologia visa determinar qual a estrutura da macroalga proporciona o maior rendimento de extração de R-FE, seja ela úmida ou liofilizada. Essa análise comparativa é essencial devido à falta de dados na literatura sobre a extração de algas úmidas inteiras, representando, portanto, um estudo de grande relevância que pode resultar na diminuição nos processos de extração.

Com base no resultado mais favorável alcançado, que corresponde à estrutura da alga liofilizada, a metodologia 2 investiga uma série de parâmetros, incluindo solvente, pressão, agitação e pré-tratamento da macroalga, visando atingir o objetivo de máximo rendimento de extração de R-FE. As metodologias estão descritas de forma mais minuciosa e específica nas seções subsequentes.

4.2.1 Metodologia 1 – Extração de R-FE pelo método de água pressurizada em célula de extração

Nesta metodologia utiliza-se um aparelho de alta pressão que compreende uma bomba seringa (Teledyne ISCO 260D, EUA) com controle de pressão de até 517 bar, uma faixa de vazão de 107 mL/min e um cilindro de transferência de pistão flutuante de baixa fricção e alta pressão (Vinci Technologies/França) com capacidade volumétrica de 250 mL. Aqui, esse equipamento é denominado célula de extração e está representado na Figura 9.

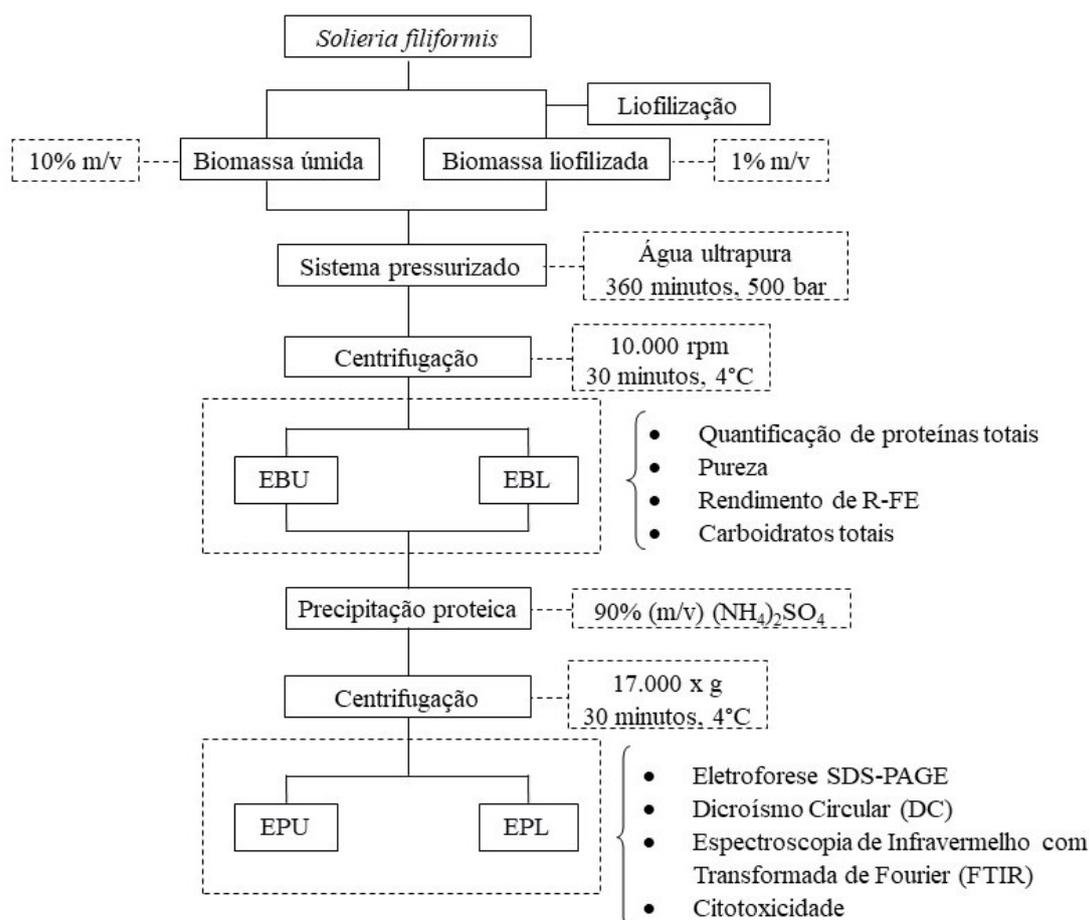
Figura 9 - Equipamento de alta pressão utilizado na metodologia 1 denominado célula de extração.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O procedimento detalhado da metodologia 1 para extração de R-FE de *S. filiformis* é ilustrado na Figura 10. As macroalgas úmidas (10% m/v – alga/solvente) e liofilizadas (1% m/v – alga/solvente), utilizadas sem qualquer processo de moagem, foram suspensas independentemente em 200 mL de água ultrapura em temperatura ambiente (25°C) e pressão constante de 500 bar. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo específicos (15, 30, 60, 120, 240, 360 minutos) e os experimentos foram conduzidos em triplicata. Após cada etapa de extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram denominados extrato bruto de algas úmidas (EBU) e extrato bruto de algas liofilizadas (EBL), os quais foram analisados para quantificar proteínas totais, pureza, rendimento de R-FE e carboidratos totais.

Figura 10 - Procedimento explicativo para extração de R-ficoeritrina de *S. filiformis* com sistema pressurizado – Metodologia 1.



Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: EBU – Extrato bruto de algas úmidas; EBL – Extrato bruto de algas liofilizadas; EPU – Extrato precipitado de algas úmidas; EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas.

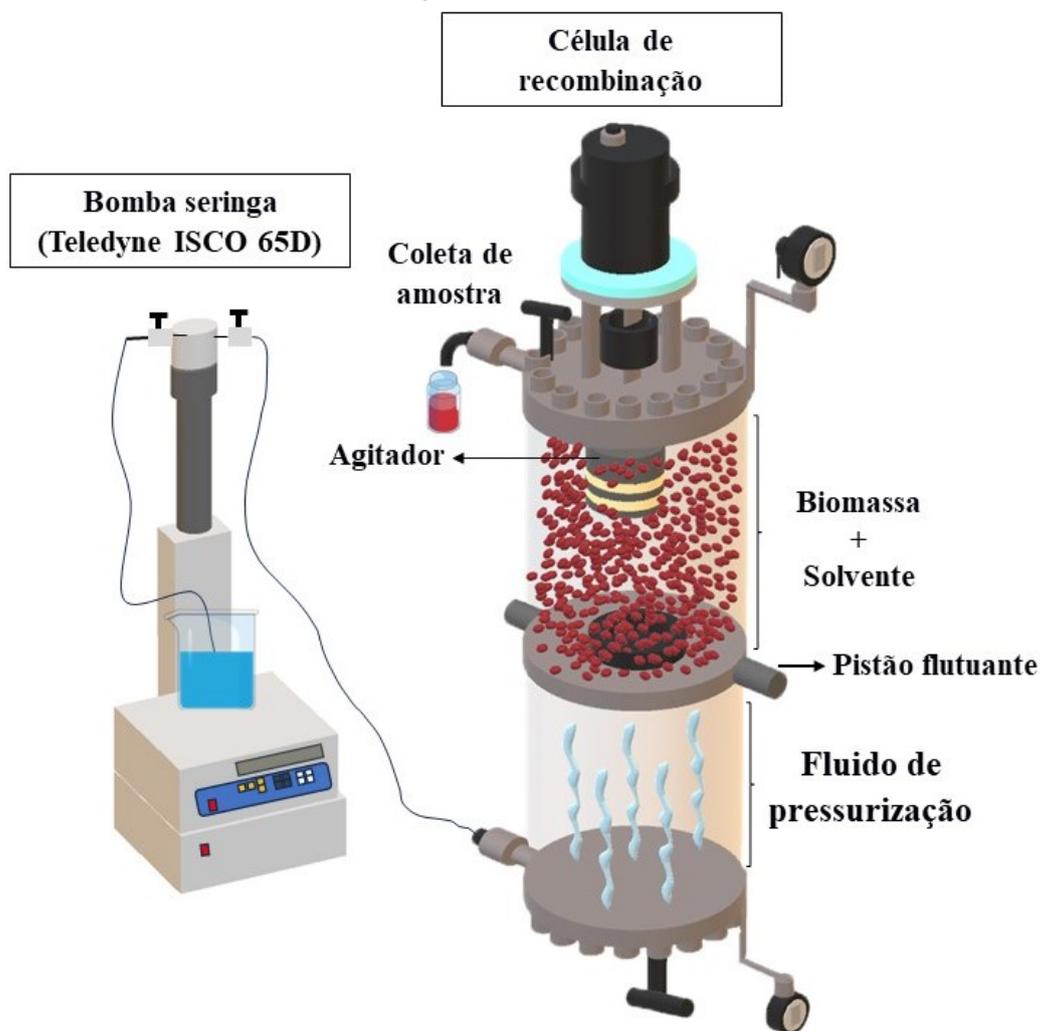
4.2.2 Metodologia 2 – Extração de R-FE pelo método de líquido pressurizado em célula de recombinação

Na metodologia 2 utilizou-se um aparelho de alta pressão que compreende uma bomba de seringa (Teledyne ISCO 65, EUA) com controle de pressão de até 1390 bar, uma faixa de vazão de 25 mL/min e um cilindro de transferência de pistão flutuante de baixa fricção e alta pressão (Vinci Technologies/França) com capacidade volumétrica de 250 mL, semelhante ao apresentado na Figura 9 (célula de extração).

A macroalga passou por um processo de moagem com o auxílio de almofariz e pistilo até obter-se um pó, os quais nesse trabalho será chamado como maceração de sólidos e o pó obtido nomeado de “macerada”. A macroalga macerada (1% m/v) foi suspensa em diferentes solventes (tampão fosfato de potássio 25mM em pH = 6,5 ou água ultrapura) em temperatura ambiente (25°C) e pressão de 500 bar. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo específicos (15, 30, 60, 120, 240, 360 minutos). Com base nessas análises, foi determinado que o solvente de extração mais eficaz é a água ultrapura. Subsequentemente, foram avaliadas três pressões diferentes (200, 500 e 800 bar) no prosseguimento dos estudos.

Com o intuito de investigar o impacto da agitação no processo pressurizado, um novo equipamento, denominado célula de recombinação (RCA 1000), foi utilizado para a extração da R-FE. Neste processo, foram variadas a estrutura da macroalga, incluindo inteira, triturada e macerada. A célula de recombinação é capaz de combinar pressão e agitação no processo de extração, devido a presença de um agitador acionado magneticamente para agitação adequada, com capacidade de 2L e alcance de pressão de até 1000 bar, conforme mostrado na Figura 11. Além da R-FE, neste processo foi possível analisar a extração de outra ficobiliproteína, a R-ficocianina (R-FC), devido aos elevados índices de extração de proteínas totais, que não foram obtidos na metodologia 1.

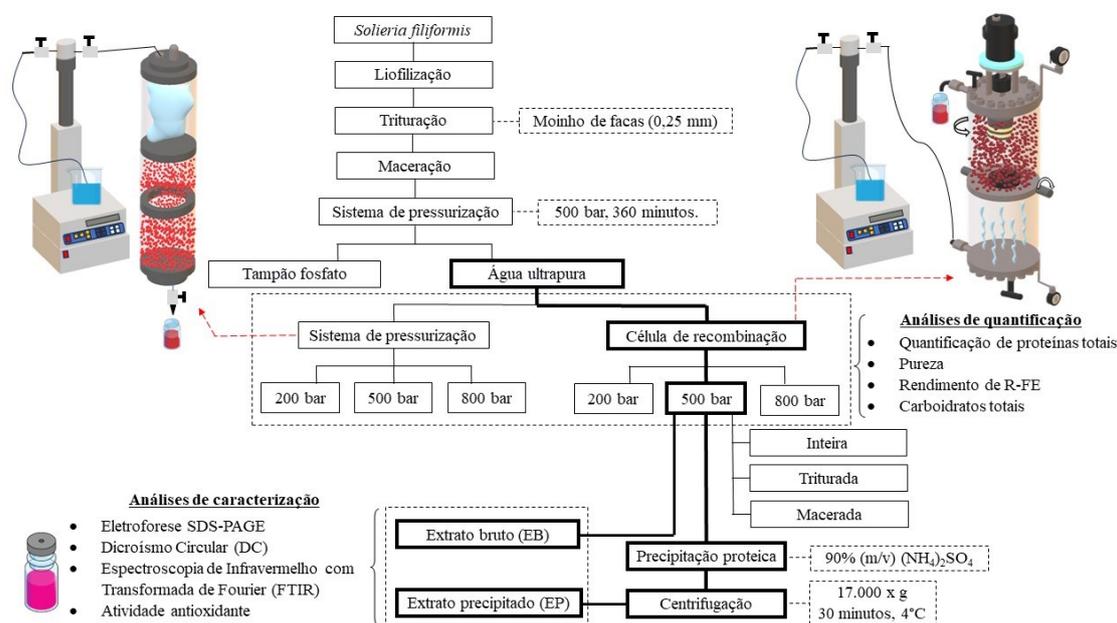
Figura 11 - Equipamento de alta pressão e sistema de agitação utilizado na metodologia 2 denominado célula de recombinação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata. Após cada etapa de extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante resultante foi analisado como extrato bruto (EB) para quantificar proteínas totais, pureza, rendimento de R-FE e carboidratos totais. O procedimento detalhado da metodologia 2 para extração de R-FE de *S. filiformis* é ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Procedimento explicativo para extração de R-ficoeritrina de *S. filiformis* com sistema pressurizado utilizando célula de extração e célula de recombinação – Metodologia 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EB – Extrato bruto; EP – Extrato precipitado.

4.3 Precipitação proteica do Extrato Bruto por sulfato de amônio

A partir do extrato bruto (EB) foi realizado um processo de precipitação de proteínas utilizando 90% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (BASTOS FILHOS, 2016). Posteriormente, a amostra foi agitada por 2 horas e deixada em repouso por 12 horas a temperatura de 4°C. Em seguida, foi centrifugado a 17.000 x g a 4°C por 30 min. O pellet resultante (contendo proteína precipitada) foi solubilizado em água ultrapura e submetido à diálise utilizando uma membrana com corte de 12 kDa contra água ultrapura.

Na metodologia 1, estes resultados levam à formação do extrato precipitado de algas úmidas (EPU) e do extrato precipitado de algas liofilizadas (EPL). Na metodologia 2, estes resultados levam à formação do extrato precipitado (EP).

4.4 Quantificação de proteínas totais e ficobiliproteínas extraídas da macroalga *S. filiformis*

4.4.1 Determinação de proteínas totais

As proteínas solúveis totais dos EB foram determinadas de acordo com a metodologia de Bradford (1976). Uma curva padrão foi desenvolvida a partir de albumina

sérica bovina (BSA). Para esta análise, uma amostra de 100 µL de EB foi misturada com 2,5 mL de reagente de Bradford e deixada em repouso por 10 min. Em seguida, as leituras de absorvância foram feitas a 595 nm utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu UV-2600).

4.4.2 Quantificação de ficobiliproteínas extraída da macroalga *S. filiformis*

Ao longo das etapas de extração, o conteúdo do extrato de pigmentos de FBP processado foi determinado usando um espectrofotômetro de absorção UV-VIS (Shimadzu UV-2600) usando as equações dicromáticas (Equação 1 e 2) relatadas por Sampath-Wiley e Neefus (2007) desenvolvidas para análises de FBP. Amostras em triplicata foram retiradas de cada tratamento.

$$[R_{FE}] \left(\frac{mg}{ml} \right) = 0,1247[(Abs_{564} - Abs_{730}) - 0,4583(Abs_{618} - Abs_{730})] \quad (1)$$

$$[R_{FC}] \left(\frac{mg}{ml} \right) = 0,154(Abs_{618} - Abs_{730}) \quad (2)$$

em que $[R_{FE}]$ é a concentração de R-ficoeritrina ($mg \cdot mL^{-1}$), $[R_{FC}]$ é a concentração de R-ficocianina ($mg \cdot mL^{-1}$) e Abs_{564} , Abs_{618} e Abs_{730} são as absorvâncias das amostras em 564, 618 e 730 nm, respectivamente.

O índice de pureza (IP) da R-FE foi determinado calculando a razão entre a absorvância medida em 564 nm e 280 nm, conforme Equação 3 (SENTHILKUMAR et al., 2013a):

$$IP = \frac{Abs_{564}}{Abs_{280}} \quad (3)$$

em que Abs_{280} representa a absorção de proteínas totais e Abs_{564} é o máximo de absorção de R-FE.

O rendimento de extração de R-FE ($mg \cdot g^{-1}$) foi calculado usando a concentração de R-FE ($[R_{FE}]$, $mg \cdot mL^{-1}$), o volume do solvente de extração (V, mL) e a massa inicial de biomassa (g) conforme definido pela Equação 4:

$$Rendimento\ de\ R - FE \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{[R_{FE}] * V}{massa} \quad (4)$$

Além disso, para análise de pré-tratamento (trituração e maceração) também foram realizadas análises microscópicas em zoom óptico de 4x (OLYMPUS, CX21, JAPÃO) da macroalga *S. filiformis* antes e após pressurização a 500 bar.

4.4.3 Análise fluorimétrica

Os espectros de fluorescência foram determinados em cada etapa do processo de extração de R-FE visando analisar a biofuncionalidade da proteína por meio de sua emissão de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram registrados utilizando um espectrofotômetro (RF-6000) com varreduras de emissão variando de 515 nm a 700 nm com intervalos de 1 nm e excitados em um comprimento de onda de 495 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 Caracterização dos extratos obtidos de R-FE da macroalga *S. filiformis*

Os extratos de R-FE obtidos durante os processos de extração foram caracterizados diante das seguintes técnicas: presença de carboidratos totais, análise do peso molecular das estruturas secundárias através de eletroforese, composição estrutural da biomolécula obtida a partir da análise de dicróismo celular e grupos funcionais presentes nos extratos a partir de FTIR. Além disso, analisou-se a citotoxicidade e atividade antioxidante.

4.5.1 Determinação de carboidratos totais

A metodologia H_2SO_4 -UV proposta por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013) foi utilizada para quantificar o número de carboidratos totais em EB usando uma curva de calibração obtida para glicose de 0 a $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Uma alíquota de 500 μL de EB contendo carboidratos foi misturada com 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em um tubo de ensaio e agitada em vórtex por 30 s. Após resfriamento, as medições de absorção de luz UV foram realizadas a 315 nm utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013).

4.5.2 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético dos EP e EB foram obtidos sob condições desnaturantes para avaliar a pureza de R-FE e a presença de estruturas secundárias

presentes nos extratos. A eletroforese foi realizada em gel de separação de poliacrilamida 12% na presença de β -mercaptoetanol, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970).

O gel de separação foi preparado com acrilamida e 1% de SDS, solubilizados em tampão tris-HCl 1,5 M (pH 8,8). O gel de concentração continha 4% 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 de EP e EB foram diluídas em tampão de amostra com β -mercaptoetanol (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) contendo 1,0% de SDS, 20% de glicerol, 0,02% de Azul de Bromofenol e 5% de β -mercaptoetanol) na proporção de 5:1 (p/p), agitadas em vórtex e aquecidas a 96 °C durante 4 min.

Para estimar a massa molecular das estruturas secundárias de R-FE, foram utilizadas como padrão proteínas com massas moleculares conhecidas: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (30,0 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) α -lactalbumina (14,2 kDa). Foram adicionados aos poços em execução cerca de 15 μ L de amostra e proteína padrão.

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 200 V e corrente de 20 mA por um período de 2 h (a 25 °C), utilizando uma solução de Tris 25 mM (pH 8,3) contendo SDS 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. Ao completar a análise da eletroforese, foram reveladas bandas proteicas com nitrato de prata seguindo a metodologia descrita por Morrissey (1981) ou solução corante Coomassie Brilliant Blue G-250. As massas moleculares aparentes das bandas proteicas foram mensuradas utilizando-se o software GelAnalyzer 23 (LAZAR JR., 2023).

4.5.3 Dicroísmo Circular (DC)

As estruturas secundárias do pigmento R-FE extraído pelo sistema pressurizado foram caracterizadas por espectroscopia de dicroísmo circular (DC) para representar sua composição estrutural quanto à presença de α -hélice, folhas β e estruturas não ordenadas. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram determinados no espectrofotômetro J-815 CD JASCO (Japão) na faixa de comprimento de onda de 190 a 250 nm sob atmosfera de nitrogênio. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm e largura de banda de 1 nm. O extrato foi pré-incubado em diferentes temperaturas (20 a 90 °C) por uma hora. Após, o espectro DC resultante foi analisado

para observar alterações na elipticidade. Para determinação dos componentes de estrutura secundária foi utilizado o servidor online K2D3, segundo metodologia descrita por Louis-Jeune, Andrade-Navarro e Perez-Iratxeta (2012).

4.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é uma ferramenta capaz de analisar a conformação de proteínas e explorar as alterações, presença ou ausência, de grupos funcionais após extração com água pressurizada. Os extratos foram liofilizados e analisados em espectrofotômetro infravermelho Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, EUA) por Reflectância Total Atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos na varredura de 400–4000 cm^{-1} em modo de transmitância e resolução de 2 cm^{-1} . Na segunda metodologia, a R-FE purificada no trabalho de Pereira Martins et al. (2023) foi utilizada como referência.

4.5.5 Ensaios de citotoxicidade dos extratos precipitados de R-FE obtidos com a metodologia 1.

Devido à necessidade de um extrato mais puro para a realização de análises de atividade citotóxica *in vitro*, apenas os EP (EPU e EPL – Metodologia 1) foram avaliados em quatro linhagens de células tumorais: câncer de colorretal (HCT116), câncer de glioblastoma (SNB19), câncer de próstata (PC3) e leucemia (HL60), fornecida pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). O ensaio citotóxico é uma análise quantitativa que vai determinar a capacidade dos extratos obtidos de inibir o crescimento das células cancerígenas.

Essas linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidos em incubadora a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Os EP foram liofilizados e diluídos em PBS estéril (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4) para 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e testadas contra linhagens celulares em uma concentração final de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT baseada em Mosmann (1983) e pôde avaliar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

A densidade celular foi ajustada para concentrações de $0,7 \times 10^5$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$

¹ para HCT116, $0,1 \times 10^6$ células·mL⁻¹ para as linhagens SNB-19 e PC3 e $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HL60. As placas foram incubadas com a amostra na concentração única de 50 ou 500 µg·mL⁻¹ em triplicata por 72 horas em incubadora a 5% CO₂ a 37 °C. Ao final deste período de incubação, as placas foram retiradas e centrifugadas para retirada do sobrenadante. Posteriormente, foi adicionada solução de MTT a 10% (sal de tetrazólio) e as placas foram incubadas por 3h. Após a incubação, foram centrifugados novamente para retirada da solução de MTT. A absorvância foi medida após dissolução do precipitado de formazan com DMSO (Dimetilsulfóxido) puro num espectrofotômetro de placa a 595 nm (RISS *et al.*, 2016). A quantidade de formazan gerado é, presumivelmente, diretamente proporcional ao número de células viáveis. Após análise estatística, os valores de absorvância foram ajustados em suas respectivas porcentagens de inibição. Como passo seguinte, as amostras foram testadas em curva, que variou de 3,91 a 500 µg·mL⁻¹, com o objetivo de determinação dos valores inibitórios de 50% do crescimento celular.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (D.P.M) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad Prism versão 8.01.

4.5.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* foi analisada usando dois métodos diferentes, sendo a eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acordo com Blois (1958) e quelação de íons ferrosos como sugerido por Chew *et al.* (2008). Enquanto o sequestro do radical de DPPH avalia a capacidade de uma substância para neutralizar radicais livres, a análise por quelação de íons ferrosos se concentra na capacidade de uma substância para se ligar a íons metálicos, reduzindo a sua capacidade de catalisar reações pró-oxidantes.

4.5.6.1 Sequestro do radical de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante do ensaio DPPH foi estimada pela redução do radical livre estável DPPH onde 2,50 mL de DPPH 75 µM em metanol foram adicionados a cada extrato. Os extratos foram preparados em concentrações variando de 18,75 µg·mL⁻¹ a 300 µg·mL⁻¹. A reação foi finalizada após 40 min na ausência de luz e a absorvância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2600). Uma curva de calibração feita com DPPH foi utilizada para calcular a concentração restante de DPPH na mistura reacional

após incubação. O BHT foi utilizado como controle positivo. A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada utilizando a Equação 5:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{[A_o - (A - A_b)]}{A_o} \times 100 \quad (5)$$

em que $A_0 = A_{517}$ dos reagentes (500 μL de metanol + 2,5 mL de DPPH); $A = A_{517}$ da reação (300 μL de amostra + 200 μL de metanol + 2,5 mL de DPPH); $A_b = A_{517}$ da amostra (300 μL de amostra + 2,7 mL de água destilada).

4.5.6.2 Método de quelação de íons ferrosos

A atividade antioxidante pelo método de quelação de íons ferrosos, 1,0 mL de sulfato ferroso (FeSO_4) 0,1 mM e 1,0 mL de extratos de amostras em diferentes concentrações, variando de 18,75 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram misturados a 1,0 mL de 0,25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ferrozina (ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4 triazina-p-p'-dissulfônico). Os tubos foram homogeneizados por vórtice e mantidos em repouso por 10 min e então a absorbância foi medida a 562 nm. Um teste de controle foi realizado substituindo a amostra do extrato por água destilada. Neste teste, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi utilizado como referência. Os resultados foram expressos como capacidade de quelação de íons ferrosos (%) e calculados de acordo com a Equação 6:

$$\text{Quelação de íons ferrosos (\%)} = \frac{[A_o - (A - A_b)]}{A_o} \times 100 \quad (6)$$

em que $A_0 = A_{562}$ dos reagentes (1 mL de FeSO_4 + 1 mL de ferrozina + 1 mL de água destilada); $A = A_{562}$ da reação (1 mL de FeSO_4 + 1 mL de ferrozina + 1 mL de amostra); $A_b = A_{562}$ da amostra (2 mL de água destilada + 1 mL de amostra).

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como médias \pm desvios padrão (DP). Os dados foram analisados por meio de ANOVA unidirecional e os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$. A citotoxicidade foi avaliada com base na média \pm desvio padrão da média (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular, e a análise foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.01.

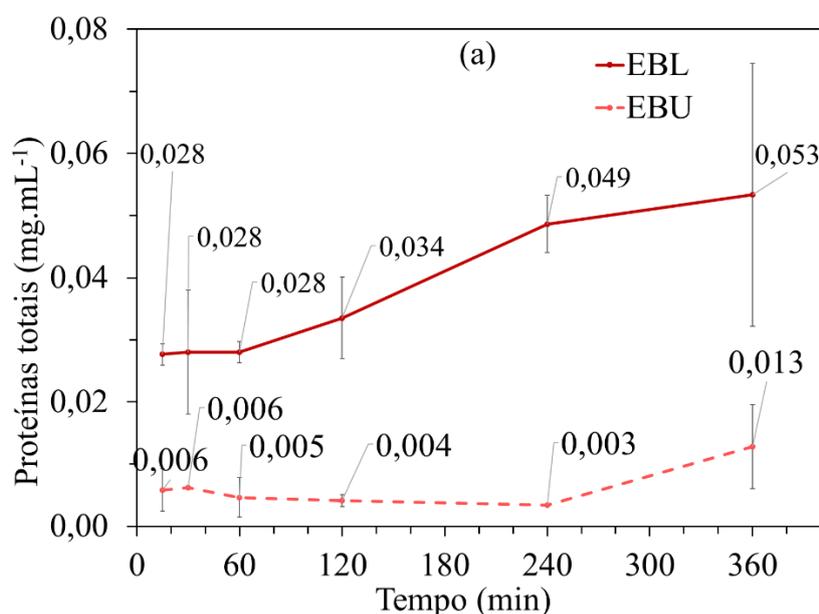
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

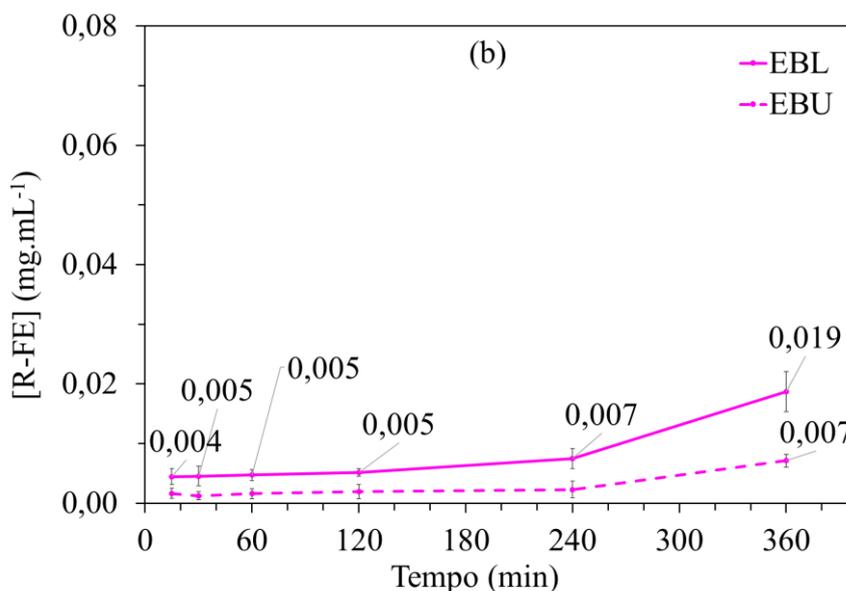
5.1 Análise dos resultados obtidos na Metodologia 1

5.1.1 Análise do extrato bruto obtido na extração de água pressurizada

Neste estudo, o processo de extração é analisado a partir da aplicação de pressão na estrutura da macroalga *S. filiformis*, danificando assim sua parede celular. A Figura 13 mostra a concentração de proteínas totais (13a) e R-FE (13b) obtidas em diferentes tempos de extração sob pressão de 500 bar. Não houve efeito significativo do tempo de extração pressurizado ($p > 0,05$), exceto em 360 min entre as duas diferentes estruturas, úmida e liofilizada. A concentração de proteínas solúveis totais variou de 0,027-0,053 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,006-0,013 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto a concentração de R-FE extraída variou de 0,004-0,019 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,002-0,007 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o EBL e EBU, respectivamente. Os processos apresentam margens de erros significativos, pois durante a coleta de amostra o sistema não é despressurizado que, conseqüentemente, por ser uma concentração muito baixa acaba sendo afetada. Devido à disponibilidade limitada de dados na literatura sobre a extração de R-FE da biomassa sem passar pelo processo de moagem, são necessários dados adicionais para comparações significativas.

Figura 13 - Efeito do tempo na concentração de proteínas totais (a) e concentração de R-FE (b) obtidas por extração pressurizada de *S. filiformis* durante 360 min, sob pressão de 500 bar.





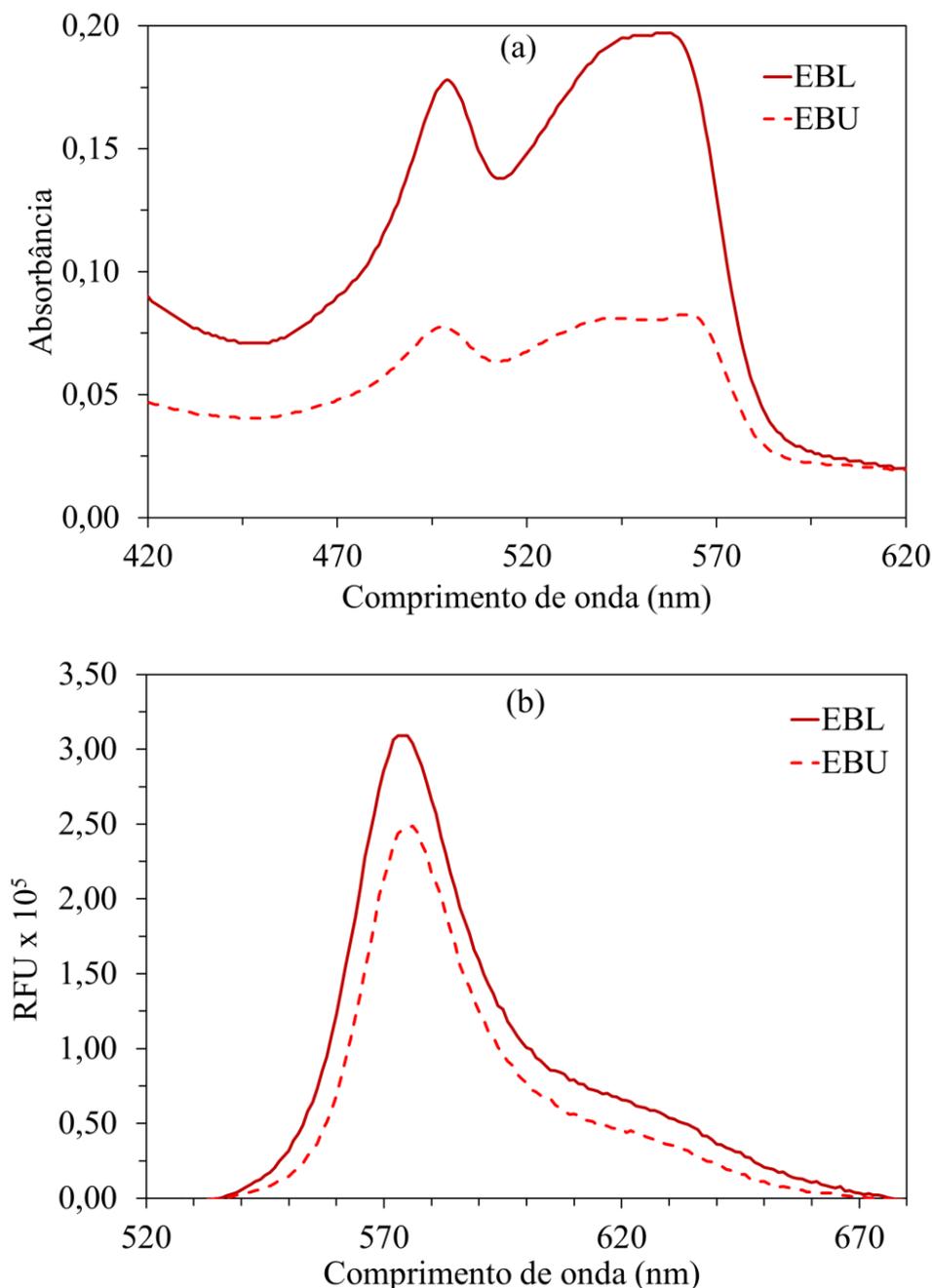
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EBU – Extrato bruto de algas úmidas, linha pontilhada; EBL – Extrato bruto de algas marinhas liofilizadas, linha contínua.

As algas vermelhas possuem um potencial significativo como fonte de proteínas essenciais, com sua composição proteica variando de acordo com a espécie, localização geográfica, estação do ano e diferentes metodologias de extração (MOURITSEN; RHATIGAN; PÉREZ-LLORÉNS, 2018; PEREIRA et al., 2020). A alta concentração de proteínas totais (Figura 13a, linha sólida) comparada à baixa concentração de R-FE (Figura 13b, linha sólida), obtida a partir de algas marinhas inteiras liofilizadas, pode estar associada à extração de outras FBP, tais como R-ficocianina (R-FC) e outras famílias de proteínas presentes em macroalgas vermelhas, como enzimas e proteínas estruturais (MITTAL et al., 2017). Porém, tal diferença não é evidente na estrutura úmida em que a ruptura da parede celular parece menos eficaz se considerada a baixa concentração de proteínas totais e do pigmento R-FE obtidos (Figura 13a e 13b, linha pontilhada).

No processo de liofilização, a alga marinha é congelada e os cristais de gelo sublimam, sugerindo um enfraquecimento da conectividade da parede celular e permitindo assim a liberação de proteínas que de outra forma seriam mais difíceis de serem extraídas (UNTERLANDER; CHAMPAGNE; PLAXTON, 2017). Este processo apresenta vantagens quando se compara a extração com as estruturas liofilizadas e úmidas. A extensão em que um mecanismo específico desempenha um papel significativo pode variar dependendo do tipo de biomassa, sua estrutura e das condições específicas do processo (MITTAL et al., 2017).

Para a análise dos espectros de absorção de R-FE, examinou-se o ponto de extração mais eficaz, que foi de 360 min tanto para a forma úmida quanto para a liofilizada (Figura 14). As alterações observadas em um espectro de absorção visível de R-FE bem definido podem fornecer informações sobre o impacto do tratamento na dissociação e desdobramento de proteínas (SIMOVIC et al., 2022).

Figura 14 - Análise espectrofotométrica de absorção (a) e análise fluorimétrica (b) obtidas por extração pressurizada de *S. filiformis* em 360 min e sob pressão de 500 bar.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EBU – Extrato bruto de algas úmidas, linha pontilhada; EBL – Extrato bruto de algas liofilizadas, linha contínua; RFU – Intensidade de fluorescência.

De acordo com a literatura, a molécula de R-FE apresenta características espectrais com picos de absorbância em 565 nm, 498 nm e ombro/pico em 545 nm, correlacionados com o conteúdo de ficobilinas em sua estrutura. Além disso, exibe uma emissão máxima de fluorescência em 575 nm (BOGORAD, 2003; BRYANT, 1982; GLAZER et al., 1976; JIANG; ZHANG; LIANG, 1999; SIDLER, 1994). O EBU exibiu picos de absorção em 499 nm e entre 540 e 564 nm, juntamente com um pico de fluorescência em 576 nm e um baixo índice de pureza (IP) do extrato de 0,41. Ao mesmo tempo, o EBL apresentou picos de absorção em 499 nm e entre 540 e 563 nm, um IP do extrato de 0,15 e um pico de fluorescência em 575 nm. Ambos os extratos exibiram características consistentes com a estrutura da R-FE (SIMOVIC et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020).

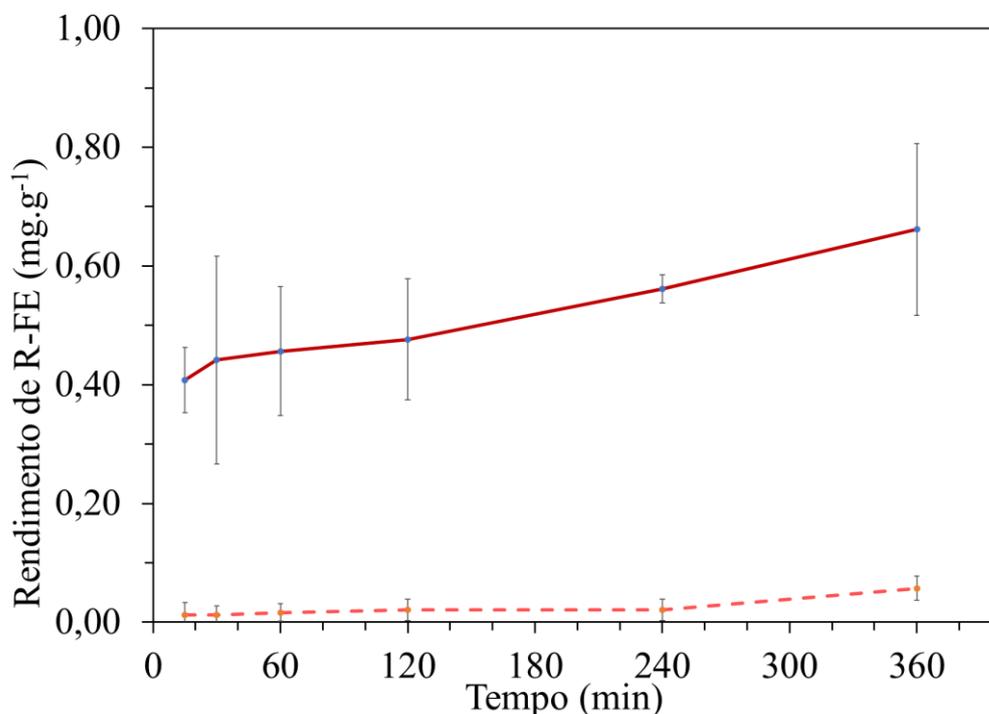
Entretanto, para EBL, a faixa de 540 a 563 nm não está bem definida, indicando a presença de compostos contaminantes capazes de absorver luz nos mesmos comprimentos de onda, como evidenciado pelo baixo IP. Quanto à análise da emissão de fluorescência, quando excitada em 495 nm, revelou um ombro em torno de 620 nm, demonstrando uma assimetria característica da R-FE, conforme observado em estudos anteriores (GAIGALAS et al., 2006; SIMOVIC et al., 2022). De acordo com Simovic et al. (2022), esta assimetria no espectro de emissão da R-FE (Figura 14b) surge das múltiplas interações dos cromóforos PEB e PUB dentro da molécula.

O tratamento de pressão a 500 bar não apresentou alterações significativas no espectro de absorção. Exceto para biomassa liofilizada (EBL, Figura 14a) em que o pico entre 540-563 nm é menos definido, exibindo um ligeiro deslocamento para a esquerda da banda PEB. Investigações anteriores indicaram que a estrutura fina do pico a 560 nm resulta da presença de dímeros cromóforos PEB nas interfaces da subunidade dentro da estrutura hexamérica da R-FE $[(\alpha\beta)_6\gamma]$ (GAIGALAS et al., 2006; SIMOVIC et al., 2022; WOMICK; LIU; MORAN, 2011). Consequentemente, a dissociação parcial do hexâmetro de R-FE induziu a perda da estrutura detalhada da banda PEB a 560 nm. Esta perda é atribuída à desagregação dos dímeros cromóforos PEB nas interfaces das subunidades, possivelmente devido à presença de contaminantes. A banda PEB é mais conservada no EBU do que no EBL. Simovic et al. (2022) concluíram que a variação de pressão entre 10 e 900 bar não apresentou redução significativa no espectro de absorção da R-FE purificada.

O resultado do rendimento da extração da R-FE em função do tempo e da

estrutura da alga é apresentado na Figura 15. No EBL o rendimento variou de 0,408 a 0,661 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca. Enquanto que no EBU, o rendimento variou de 0,013 a 0,057 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa úmida.

Figura 15 - O rendimento de R-FE foi obtido por extração pressurizada da *S. filiformis* durante 360 min sob pressão de 500 bar.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EBU – Extrato bruto de algas úmidas, linha pontilhada; EBL – Extrato bruto de algas liofilizadas, linha contínua.

Geralmente, o rendimento de R-FE depende do solvente, da estrutura e das espécies de algas marinhas utilizadas. Neste estudo, o tempo de 360 minutos de extração e a estrutura da macroalga (seca ou úmida) desempenharam um papel essencial na extração de R-FE. A estrutura de toda a alga, sem qualquer processo de trituração, é um fator crucial a estudar, pois pode eliminar um processo no sistema de extração.

Bastos Filho (2016) realizou estudos para a macroalga *S. filiformis* em 6 h de extração na técnica de homogeneização, que consiste na agitação da alga em béquer, utilizando algas úmidas e trituradas, que atingiram rendimento máximo de 0,031 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa úmida, estimando 0,31 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca, sob pressão atmosférica. Empregando o sistema de pressurização e utilizando a estrutura de biomassa não triturada (inteira), o máximo de R-FE obtido no desenvolvimento deste trabalho com a aplicação de pressão de 500 bar foi de 0,66 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca. Obteve-se nesse estudo, já nos instantes iniciais (15-30 min), um rendimento bem maior comparado com Bastos Filho

(2016). Sendo este resultado final duas vezes maior no mesmo período e sem o processo de britagem, podendo assim observar o efeito da pressão na redução do tempo de extração.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes à extração de R-FE por maceração com água destilada da alga *Sarcopeltis skottsbergii* realizada por Castro-Varela et al. (2022) que atingiu 0,65 mg de R-FE por biomassa seca e é superior ao de Mittal et al. (2017) que utilizaram extração assistida por ultrassom (EAU) na macroalga *Gelidium pusillum*, não triturada, com rendimento de 0,16 mg·g⁻¹ de biomassa seca.

Em estudos de extração aplicando maior pressão pode ocorrer aumento de temperatura e conseqüente desnaturação do pigmento, conforme Pereira et al. (2020), ao atingir 6000 bar de pressão. Simovic et al. (2022) relataram que, em contraste com a temperatura elevada, o tratamento de alta pressão apresentou uma concentração significativa a 4500 bar que teve um efeito menos destrutivo na intensidade da cor de R-FE da macroalga *Porphyra purpurea*, indicando que o tratamento de pressão tem impactos substancialmente menos adversos na estabilidade de R-FE do que o processamento térmico.

A biomassa liofilizada resultou em maior eficiência de extração quando comparada à biomassa úmida. Aplicar pressão à biomassa úmida sem qualquer método de moagem ou pré-tratamento não é adequado para atingir a eficiência desejada de extração de R-FE, pois a parede celular pode não ser totalmente rompida (JUBEAU et al., 2013). Além disso, a alta presença de polissacarídeos presentes na parede celular de macroalgas vermelhas requer métodos de pré-tratamento para extração de R-FE (MITTAL; RANADE, 2023).

Os métodos de processamento para romper a parede celular e alcançar a máxima valorização das macroalgas é essencial para facilitar a extração de composto bioativos. Vários métodos de pré-tratamento foram desenvolvidos, como choque osmótico, cisalhamento e ruptura celular enzimática (HARNEDY; FITZGERALD, 2013), autoclave, banho-maria e banho-maria com agitador magnético (ÖĞRETMEN; DUYAR, 2018), maceração e maceração com nitrogênio (MITTAL et al., 2017), entre outros.

De maneira geral, os métodos de pré-tratamento podem ser categorizados em quatro tipos principais: físicos, químicos, biológicos e físico-químicos. Os métodos físicos têm a vantagem de produzir partículas de biomassa menores, embora isso venha acompanhado de um alto consumo de energia. No entanto, esses métodos físicos apresentam a limitação de não serem capazes de abrir efetivamente a matriz celular até o

nível molecular. Quanto aos métodos enzimáticos, eles demandam baixo consumo de energia e são altamente específicos, mas as enzimas são dispendiosas e têm restrições quanto ao reuso durante o pré-tratamento. Por outro lado, os métodos de pré-tratamento químico e físico-químico não são adequados para a extração de biomoléculas sensíveis devido à sua natureza tóxica, corrosiva ou ao alto consumo de energia (MITTAL; RANADE, 2023).

Com base no critério de rendimento, o EB enriquecido com R-FE foi caracterizado nas condições de extrato obtido em 6 horas de extração de algas úmidas e liofilizadas, EBU e EBL, respectivamente.

5.1.2 Análise de carboidratos totais

O pigmento está concentrado na camada superior do talo da alga marinha (BURLLOT et al., 2023). Quando a pressão aplicada danifica apenas a parede celular, observa-se um alto rendimento de pigmento e um baixo teor de carboidratos totais. No entanto, se ocorrer a destruição total da estrutura física da macroalga, muitos carboidratos também serão extraídos. Dado que este estudo é parte de um projeto mais amplo que busca a extração sequencial de proteínas seguida pelos carboidratos no conceito de biorrefinaria, esse resultado não seria favorável.

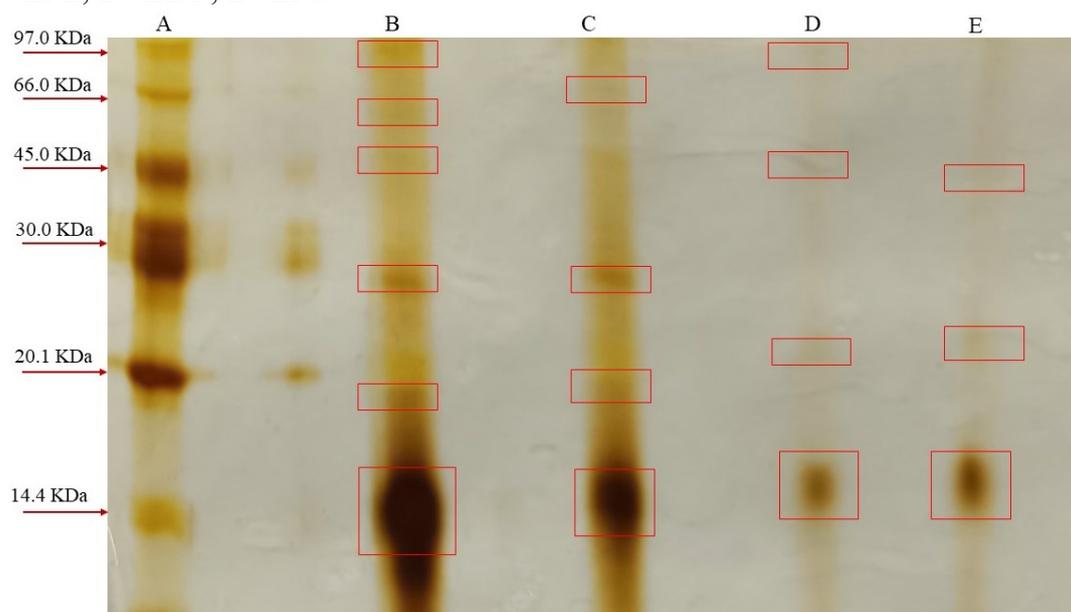
Os carboidratos são extraídos no EB e interferem na partição da biomolécula alvo. Na análise quantitativa desses polissacarídeos, o EBL atingiu concentração de carboidratos de $4,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto o EBU atingiu $0,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. O processo de extração pressurizada é flexível ao aplicar pressão. Quanto maior o processo, menos seletivo ele se torna (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). Isso significa que, à medida que a pressão é aumentada, a extração se torna mais eficiente em liberar uma variedade maior de componentes da matriz da amostra, incluindo os componentes desejados e aqueles que não são necessariamente alvo da extração, devido ao aumento da solubilidade dos analitos na solução extrativa.

Contudo, a pressão de 500 bar e a estrutura da alga sem moagem avaliadas neste estudo apresentaram pouca extração de carboidratos, que se apresenta como uma vantagem do processo sem moagem. Tais valores obtidos são muito inferiores aos encontrados por Munier et al. (2015), atingindo $33,78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ da macroalga *Grateloupia turuturu* liofilizada e moída. Le Guillard et al. (2023) realizaram extração por hidrólise enzimática assistida por ultrassom (EAU) e obtiveram $44,31 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de carboidratos.

5.1.3 Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas presentes no EB foram precipitadas por sulfato de amônio (90% m/v) para reduzir ou eliminar a presença de carboidratos ou outros elementos não interferentes nas proteínas no extrato. Esta etapa não distinguiu as ficobiliproteínas, como ficocianinas e aloficocianinas, que absorvem na região de 600-700 nm. Para analisar as estruturas secundárias presentes nos extratos de R-FE, o perfil eletroforético de EB (EBU/EBL) e EP (EPU/EPL) foram analisados sob condições desnaturantes na presença do agente redutor β -mercaptoetanol. Quando submetidos ao processo de eletroforese, os extratos apresentaram diversas bandas, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 – Perfil eletroforético de R-FE obtido em 6 horas de extração pressurizada da macroalga *S. filiformis*, em pressão de 500 bar, sob condições desnaturantes na presença do agente redutor. A – Marcador de peso molecular: fosforilase B (97,0 KDa); B – EBL; C –EPL; D –EBU; E –EPU.

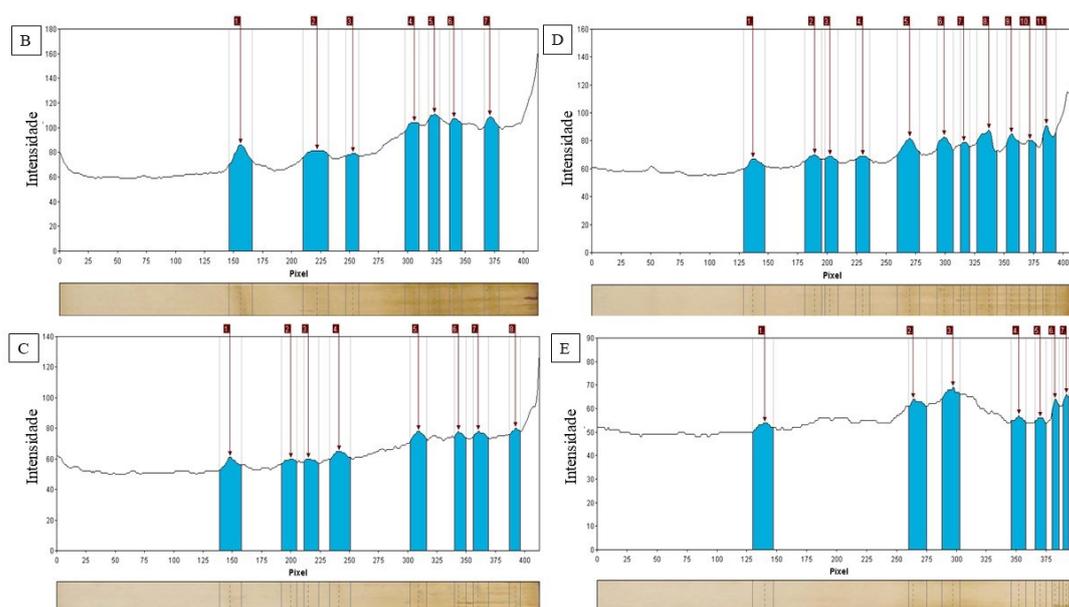


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas; EBL – Extrato bruto de algas liofilizadas; EPU – Extrato precipitado de algas úmidas; EBU – Extrato bruto de algas úmidas.

A R-FE é uma proteína oligomérica de peso molecular em torno de 240 KDa que possui três subunidades diferentes em sua estrutura, α (~16 KDa), β (~21 KDa) e γ (~39 KDa), que estão ligadas a cisteínas específicas por ligações tioéter (SENTHILKUMAR et al., 2013a). De acordo com a análise do perfil eletroforético, os EP (Figura 16C e E) apresentaram bandas mais fortes que o EB. Com uma pré-purificação com sulfato de amônio, um aumento significativo no IP ocorreu apenas para EPL de 0,14 para 0,25 e permaneceu em 0,41 para EPU. As massas moleculares aparentes das bandas

proteicas foram mensuradas utilizando-se o software GelAnalyzer 23 (LAZAR JR., 2023) e são apresentadas na Figura 17. Este software permite detectar, quantificar e comparar a banda de proteína padrão com as bandas dos extratos analisados, estimando o peso molecular das estruturas secundárias detectadas. No eixo Y observa-se a intensidade de sinal em pixel ao longo de uma pista de gel, permitindo a análise quantitativa de amostras. Enquanto no eixo X mostra a posição das bandas ao longo do gel.

Figura 17 - Perfil eletroforético de R-FE foi obtida em 6 horas de extração pressurizada da macroalga *S. filiformis*, obtido pela análise do software gelanalyser (LAZAR JR., 2023). (B) EPL; (C) EBL; (D) EPU; (E) EBU.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas; EBL – Extrato bruto de algas liofilizadas; EPU – Extrato precipitado de algas úmidas; EBU – Extrato bruto de algas úmidas.

Observa-se uma banda forte em torno de 66,0 KDa no EPL que se torna mais suave nos demais extratos, característica do dímero ($\alpha\beta$). Bandas discretas entre 45,0 KDa e 35,0 KDa são observadas em EP, o que pode representar a banda γ . Entre 30,0 e 20,1 KDa, as bandas são mais visíveis nos extratos de algas úmidas, mas também estão mais fracamente presentes nas algas liofilizadas nas quais as bandas α e β são identificadas. Na faixa de 14,4 e 20,1 kDa, diferentes bandas estão presentes em todas as amostras, o que caracteriza a presença de outras ficobiliproteínas (18 kDa) e outras famílias de proteínas (CARLOS, 2020; SIMOVIC et al., 2022). Estes dados coincidem com os espectros de absorvância relatados anteriormente.

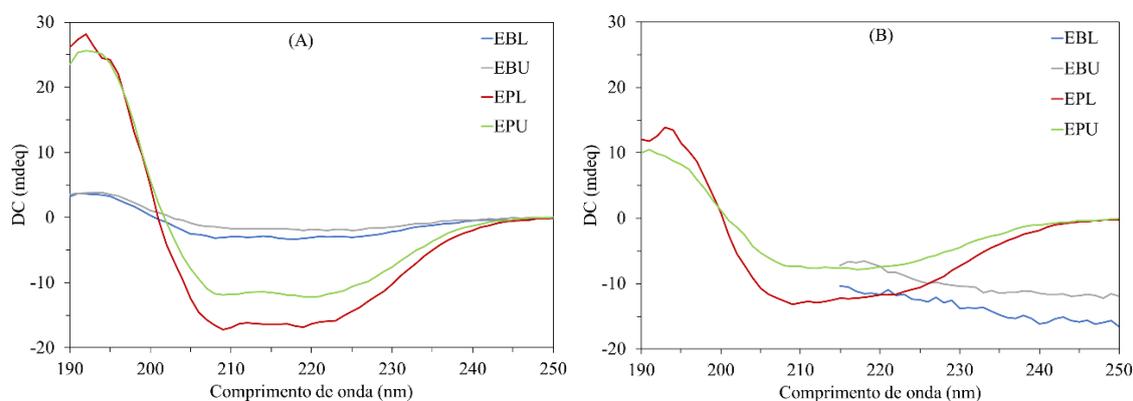
Ainda de acordo com as faixas abordadas, os resultados são semelhantes aos estudos que realizaram a purificação, como Bastos Filho (2016) com subunidades em 18,

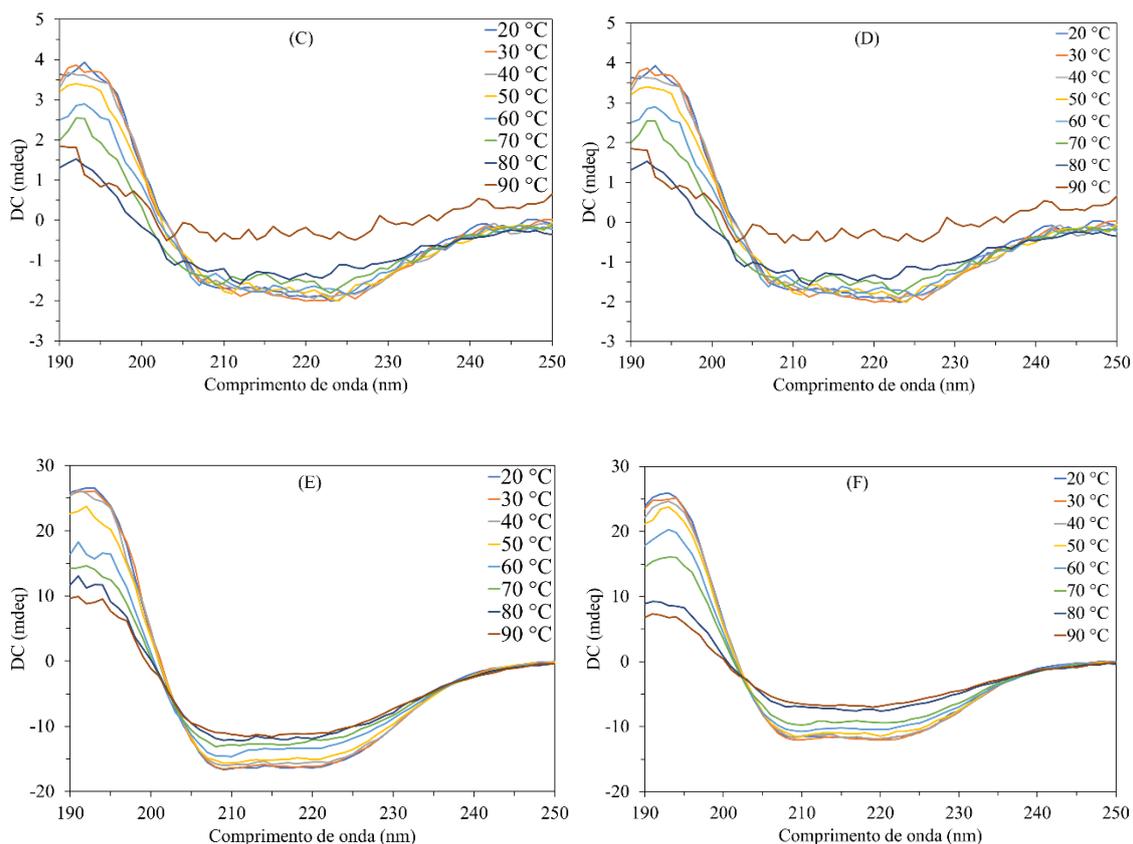
20 e 37 KDa da macroalga *S. filiformis* e Senthilkumar et al. (2013a) de 16, 21 e 39 KDa da macroalga *Portieria hornemannii*, para as subunidades α , β e γ , respectivamente. Para extração com alta pressão, em relação à estrutura da R-FE da macroalga *Porphyra sp* do estudo de Simovic et al. (2022), foi obtida uma banda de ~20 kDa, correspondente às subunidades α e β , e duas bandas discretas entre 30 e 35 kDa correspondentes às subunidades γ .

5.1.4 Dicroísmo Circular (DC)

As estruturas secundárias do pigmento R-FE extraído pelo sistema pressurizado foram caracterizadas por espectroscopia de dicroísmo circular (DC) para representar sua composição estrutural quanto à presença de α -hélice, folhas- β e estruturas não ordenadas, conforme apresentado na Figura 18. Os espectros de DC (Figura 18A) para os extratos precipitados (EPL e EPU) apresentaram elipticidade negativa a partir de 201 nm e um pico na banda positiva em 192 nm, características típicas de proteínas α -hélice (SIMOVIC et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020), enquanto os extratos brutos não apresentaram conformação característica das estruturas secundárias de R-FE. Isto se deve à quantidade de interferentes presentes no extrato bruto, como polissacarídeos sulfatados e outras famílias de proteínas presentes.

Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular (DC) de R-FE de extratos obtidos de *S. filiformis*. (A) Espectros de DC de R-FE dos extratos brutos e liofilizados; (B) Espectros de DC dos extratos após serem submetidos a diferentes temperaturas; (C) Espectro de DC de aquecimento do EBL; (D) Espectro de DC de aquecimento do EBU; (E) Espectros de DC de aquecimento EPL; (F) – Espectro de DC de aquecimento do EPU.





Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas; EBL – Extrato bruto de algas liofilizadas; EPU – Extrato precipitado de algas úmidas; EBU – Extrato bruto de algas úmidas.

Quando submetido a diferentes temperaturas (Figura 18 C-F), os espectros mostraram que a estrutura secundária do pigmento começou a sofrer pequenas alterações a partir de 50°C e significativamente a partir de 70°C, alterando suas estruturas secundárias para estruturas não ordenadas. No entanto, eles ainda apresentaram características de α -hélice para o EPL. Os espectros do EB não apresentaram, desde o início, características de estruturas secundárias de R-FE, o que se deve à quantidade de contaminantes presentes na amostra. Nota-se na Figura 18B que, após serem submetidas a condições extremas de temperatura (90°C), as estruturas secundárias dos extratos precipitados de R-FE não perderam sua conformação característica de α -hélice, mas indicaram desnaturação irreversível da R-FE (SIMOVIC et al., 2022) e um pigmento natural altamente estável, conforme dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Elementos de estrutura secundária da R-FE estimados a partir do espectro de DC para diferentes temperaturas.

Amostras	Estruturas secundárias (%)		Estruturas não ordenadas (%)
	α -hélice	folhas- β	
EPL / R-FE (20°C)	95,23	0,02	4,75
EPL / R-FE (30°C)	95,25	0,02	4,73
EPL / R-FE (40°C)	95,05	0,02	4,93
EPL / R-FE (50°C)	91,48	0,01	8,51
EPL / R-FE (60°C)	83,64	0,03	16,33
EPL / R-FE (70°C)	72,50	0,04	27,46
EPL / R-FE (80°C)	69,60	0,10	30,30
EPL / R-FE (90°C)	64,04	0,14	35,82
EPU / R-FE (20°C)	93,23	0,02	6,75
EPU / R-FE (30°C)	93,35	0,02	6,63
EPU / R-FE (40°C)	92,56	0,02	7,42
EPU / R-FE (50°C)	87,43	0,03	12,54
EPU / R-FE (60°C)	81,87	0,06	18,07
EPU / R-FE (70°C)	75,25	0,4	24,35

Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas; EPU – Extrato precipitado de algas úmidas.

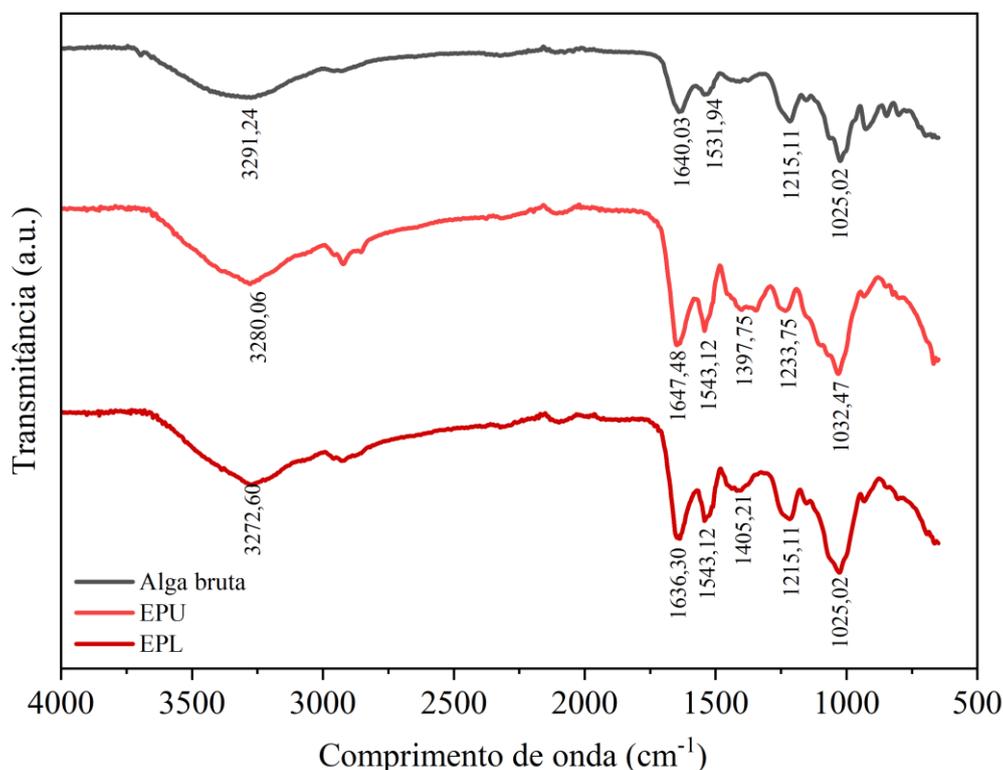
Para a análise dos espectros de DC (Tabela 1) foi utilizado o servidor online K2D3, fornecendo informações relevantes sobre a conformação do R-FE e sua organização estrutural. De acordo com os dados apresentados e a análise pelo servidor online K2D3 da R-FE obtido na extração pressurizada, o espectro DC do EPL apresentou 95,24% de α -hélice, 0,02% de folhas- β e 4,74% de estruturas não ordenadas e para EPU mostrou 93,28% de α -hélice, 0,02% de folhas- β e 6,7% de estruturas não ordenadas. O conteúdo de α -hélice calculado é muito superior ao esperado, onde a porcentagem de α -hélice varia de 60 a 79% (SIMOVIC et al., 2022), confirmando a presença de outras proteínas e contaminantes no EP.

5.1.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta capaz de analisar a conformação de proteínas e explorar as alterações, presença ou ausência, de grupos funcionais após extração com água pressurizada. A

Figura 19 mostra os espectros de FTIR do EP liofilizado obtido a partir da pressurização da biomassa úmida e liofilizada.

Figura 19 - Espectro de FTIR de 4000-500 cm^{-1} dos extratos precipitados e liofilizados de *S. filiformis*.



Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: EPU – extrato precipitado de alga úmida; EPL – extrato precipitado de alga liofilizada.

As bandas detectáveis de R-FE são grupos característicos de amida A, B e I-VII, sendo as principais amida A ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$), amida B ($\sim 3100 \text{ cm}^{-1}$), amida I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) e amida II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) (XU et al., 2022). Dentre estas a região espectral mais sensível às composições de estrutura secundária proteica foi a amida I principalmente as vibrações $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$, especialmente as vibrações de estiramento =CO das ligações peptídicas detectadas como $1647,48 \text{ cm}^{-1}$ e $1636,30 \text{ cm}^{-1}$ para EPU e EPL, respectivamente. A amida I indica a α -hélice como elemento principal de sua estrutura secundária (XU et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020), confirmando os dados avaliados pelo DC.

Amida II pode ser observada em $1543,11 \text{ cm}^{-1}$ para ambos EP. O pico de absorção da Amida A em $3280,06 \text{ cm}^{-1}$ e $3272,60 \text{ cm}^{-1}$ refere-se à vibração de estiramento O—H. Já o pico de absorção em $1032,47 \text{ cm}^{-1}$ e $1025,02 \text{ cm}^{-1}$ pertence à vibração de

estiramento assimétrico C—O—H para EPU e EPL, respectivamente (XU et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020). Ambos os EP possuem os grupos funcionais característicos da R-FE.

A Figura 19, linha preta, representa a alga marinha liofilizada bruta (natural). De acordo com as análises, a banda IR de 1000 a 500 cm^{-1} não é encontrada nos EP, nos compostos ou moléculas e contaminantes que não foram extraídos no processo de pressurização. Os picos de intensidade característicos de R-FE permaneceram semelhantes e induziram que não sofreram conformidades no processo de extração, mantendo a estrutura da R-FE. Tais resultados foram semelhantes aos estudados por Xu, Wang e Hou (2020).

5.1.6 Citotoxicidade

A análise de citotoxicidade da molécula de R-FE foi obtida de EPU e EPL e foi analisada em quatro linhagens de células tumorais: HCT116, SNB19, PC3 e HL60. A concentração inibitória média (IC_{50}) é uma medida quantitativa que indica o nível em que os extratos são suficientes para inibir o crescimento das células cancerígenas. Quando examinado na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a R-FE apresentou inibição inferior a 50%. Ao se aumentar a concentração para 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a inibição foi mais significativa que 50% (Tabela 2).

Tabela 2 - Potencial citotóxico da R-FE extraída da macroalga *S. filiformis* avaliado pelo método MTT para crescimento de células cancerígenas.

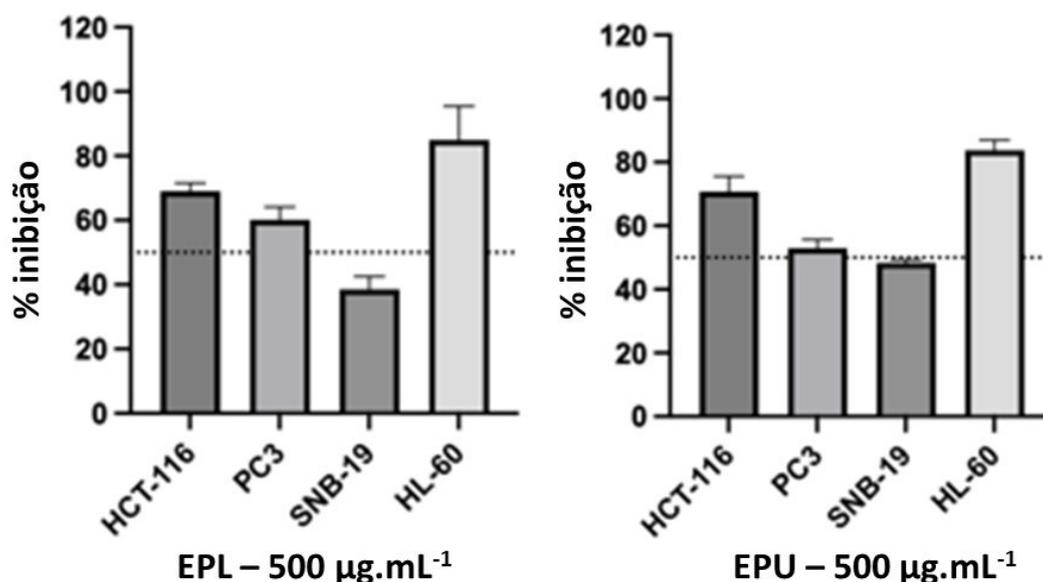
Linhagem de células testadas	EPL		EPU	
	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Câncer de colorretal (HCT-116)	17,88% ± 10,69	69,05% ± 2,50	43,97% ± 5,64	70,76% ± 4,78
Câncer de próstata (PC3)	27,45% ± 1,85	60,17% ± 3,95	40,29% ± 6,54	52,93% ± 2,73
Câncer de glioblastoma (SNB-19)	21,89% ± 3,99	38,55% ± 3,96	33,86% ± 1,58	48,35% ± 1,01
Leucêmica (HL-60)	ND ND	84,96% ± 10.46	ND ND	83,79% ± 3,16

Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: EPU – Extrato precipitado de algas úmidas; EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas; ND - Não determinado.

As amostras não apresentaram citotoxicidade na concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra linhagens celulares de câncer, pois apresentaram inibição inferior a 50%. A R-FE exibiu maior inibição em concentrações mais altas ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) como mostrado na Figura 20. Nenhuma das amostras demonstrou atividade contra a linhagem celular SNB-19. Como passo seguinte, as amostras foram testadas em curva, que variou de 3,91 a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com o objetivo de determinação dos valores inibitórios de 50% do crescimento celular. A inibição da linhagem tumoral de leucemia promieloblástica (HL-60) apresentou o melhor resultado com cerca de 84% e 85% de EPU e EPL, respectivamente.

O mecanismo de ação da R-FE provém da sua capacidade de gerar oxigênio singlete citotóxico, promovendo a destruição seletiva das células tumorais e interrompe o suprimento de nutrientes para o tumor, inibindo seu crescimento e disseminação (PAN et al., 2013). Em células leucêmicas (HL-60), esse oxigênio singlete citotóxico pode levar à morte celular programada (apoptose), destruindo a morfologia da célula, do núcleo celular e causando danos ao DNA, inibindo assim sua proliferação e levando à supressão do crescimento tumoral. Ensaios futuros para análise de qualidade, como a análise de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, pode ser realizado para a detecção de células necróticas e apoptóticas (SENTHILKUMAR et al., 2013b; TAN et al., 2016).

Figura 20 - Efeitos citotóxicos em linhas celulares de câncer. Resultados representados como porcentagem de inibição celular por média e desvio padrão.



Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: EPL – Extrato precipitado de algas liofilizadas; EPU – Extrato precipitado de algas úmidas.

No desenvolvimento deste trabalho utilizou-se um extrato precipitado sem purificação, enquanto os abordados na literatura utilizaram extratos purificados de R-FE. Sathuvan et al. (2022) utilizaram até $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de R-FE purificada da macroalga *Gracilaria corticata* em método cromatográfico rápido e de etapa única usando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, onde apresentou melhor viabilidade celular até $700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para células Hep-2 e Vero. A captação celular foi observada por citometria de fluxo, mostrando eficiência na marcação celular de R-FE em estudos *in vitro*. Esses resultados destacam a capacidade de marcação fluorescente da R-FE em estudos *in vitro*, evidenciada por micrografias de fluorescência e análises de citometria de fluxo em duas linhas celulares distintas (Hep-2 e Vero) (SATHUVAN et al., 2022).

Senthilkumar et al. (2013b) analisaram a citotoxicidade de R-FE extraído de *Portieria hornemannii* e purificada em coluna de troca aniônica Q-Sepharose, que dependia da dose ($500\text{--}1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A análise dos núcleos apoptóticos por coloração nuclear revelou que a R-FE pode induzir significativamente um apoptose nas células cancerígenas (HepG2 e A549), causando a parada do ciclo celular. Isso sugere que o efeito inibitório do crescimento das células cancerígenas pela R-FE pode estar relacionado aos mecanismos de fragmentação do DNA nuclear, possivelmente envolvendo a apoptose (SENTHILKUMAR et al., 2013b).

Neste estudo, o extrato de EPL apresentou o menor IC_{50} de $61,27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na linhagem leucêmica HL60, sendo este o melhor resultado obtido, além de $153,0$ e $306,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para PC3 e HCT116, respectivamente, após 72 horas de incubação, conforme apresentado na Tabela 3. O extrato EPU apresentou IC_{50} de $130,0$ e $111,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para HL60 e HCT116, respectivamente.

Tabela 3 – Valores da IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos de R-FE extraídas de *S. filiformis* avaliadas pelo método MTT nas linhagens leucêmico (HL60), próstata (PC3), câncer de colorretal (HCT116) e glioblastoma (SNB19) com incubação de 72 horas. Maior concentração testada: $500 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Linhagem celular	IC ₅₀ (Intervalo de confiança)	
	EPL	EPU
HL60	61,27 (30,89 – 128,3)	130,0 (96,76 – 176,0)
PC3	306,2 (137,8 – 474,5)	>500
HCT116	153,0	111,0 (59,28 – 192,1)
SNB19	>500	>500

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os extratos precipitados contendo R-FE obtido de *S. filiformis* mostraram-se ativos contra células cancerígenas. Destaca-se que o extrato obtido neste estudo pode possuir outros bioativos interferindo neste resultado tais como outras ficobiliproteínas e carboidratos. Sudhakar, Dharani e Paramasivam (2023) estudaram inibição celular com R-FE purificada da macroalga *Gracilaria corticata* utilizando cromatografia em coluna de celulose DEAE que inibiu significativamente as células HCT-116 de maneira dependente do tempo e da concentração após 48 horas de incubação.

O método de extração pressurizado abordado na metodologia 1 apresentou as vantagens da extração de R-FE sem a adição de nenhum solvente químico durante o processo e isto não gerou nenhum outro resíduo. Além do mais, as condições de temperatura são amenas: temperatura ambiente (25°C), sem aumento de temperatura durante o processo, evitando (assim) a degradação proteica, e estudos anteriores já comprovaram menor consumo de energia (KHAN; ASLAM; MAKROO, 2019).

Desta forma, a metodologia 1 que utilizou extração com água pressurizada apresenta princípios para “tecnologia verde” (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2017). Poucos estudos avaliam o impacto da técnica pressurizada na R-FE, dificultando a comparação dos nossos resultados com outros trabalhos sobre extração de pigmentos de macroalgas. Nesse sentido, infere-se que a extração pressurizada é uma alternativa atrativa à extração não agressiva e com atividade biológica de interesse para a formulação de produtos biotecnológicos em diferentes setores industriais.

5.2 Análise dos resultados obtidos na Metodologia 2

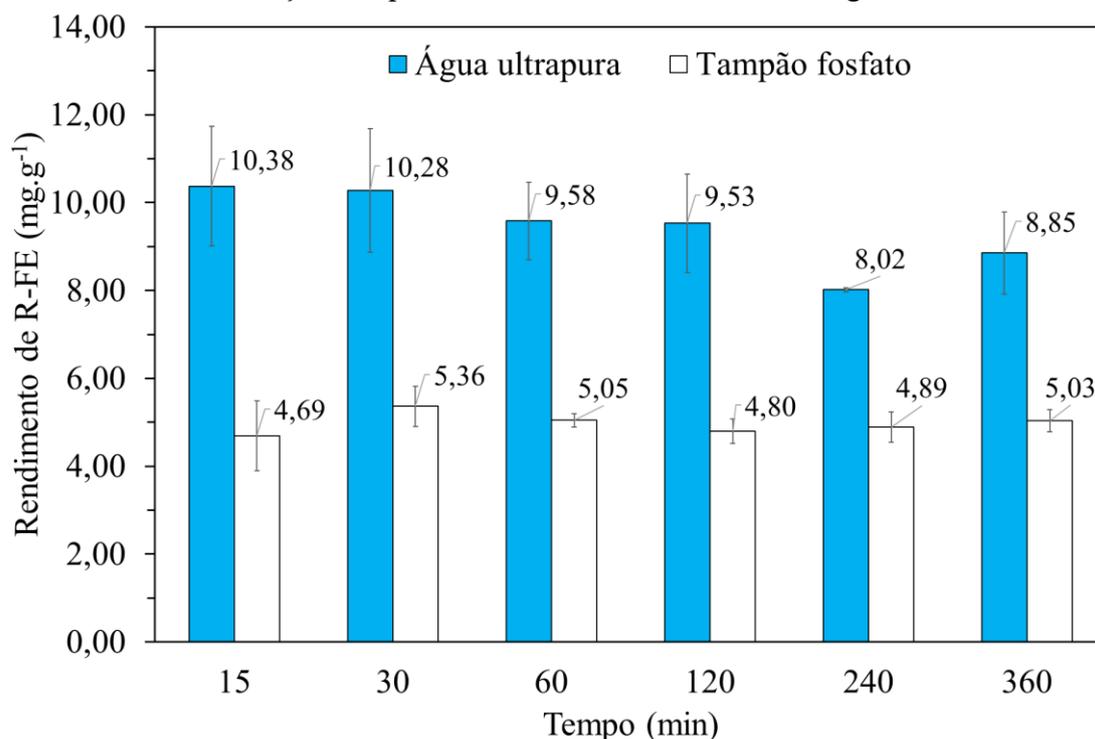
Os resultados apresentados anteriormente demonstraram que a alga liofilizada se apresentou como a melhor estrutura para uma eficiente extração da R-FE da macroalga *S. filiformis*. Dessa forma, a metodologia 2 utilizou alga liofilizada e macerada em diferentes parâmetros de extração e suas combinações foram empregadas para aumentar o rendimento de extração da R-FE da macroalga *S. filiformis* e analisar a possível extração de R-FC. Os resultados são discutidos nas seções seguintes.

5.2.1 Análise de R-Ficoeritrina obtido na extração de líquido pressurizado

A Figura 21 mostra os rendimentos de extração de R-FE em função do tempo e solvente de extração (tampão fosfato e água ultrapura). Para tampão fosfato, o rendimento de R-FE variou de 4,69 a 5,36 mg·g⁻¹. Em comparação, em água ultrapura,

ele variou de 8,85 a 10,37 mg·g⁻¹. Para ambos os solventes, a ANOVA mostrou que não existem diferenças de significância estatística ($p > 0,05$) ao longo do tempo de extração. Os resultados apresentados a seguir sugerem que o rendimento de R-FE aumenta usando água ultrapura como solvente de extração.

Figura 21 - Efeito no rendimento de R-FE utilizando água ultrapura e tampão fosfato como solvente de extração sob pressão constante de 500 bar ao longo de 360 min.



Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo estudos anteriores, a água destilada foi o melhor agente que aumentou a eficiência de extração de proteínas (CASTRO-VARELA et al., 2022; SUDHAKAR et al., 2015; TAN et al., 2020), efetivando os resultados obtidos neste trabalho. Isso ocorre devido à difusão acelerada da molécula em água e à solubilidade de outras proteínas (CASTRO-VARELA et al., 2022). Por se tratar de uma substância quimicamente mais neutra, a água ultrapura pode resultar em uma maior solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, dos biocompostos ativos na solução. A escolha do solvente é um fator restritivo no setor industrial e, assim, a água mostra-se adequada pois é um solvente de baixo custo. Portanto, a água ultrapura é o solvente de extração definido para análises posteriores.

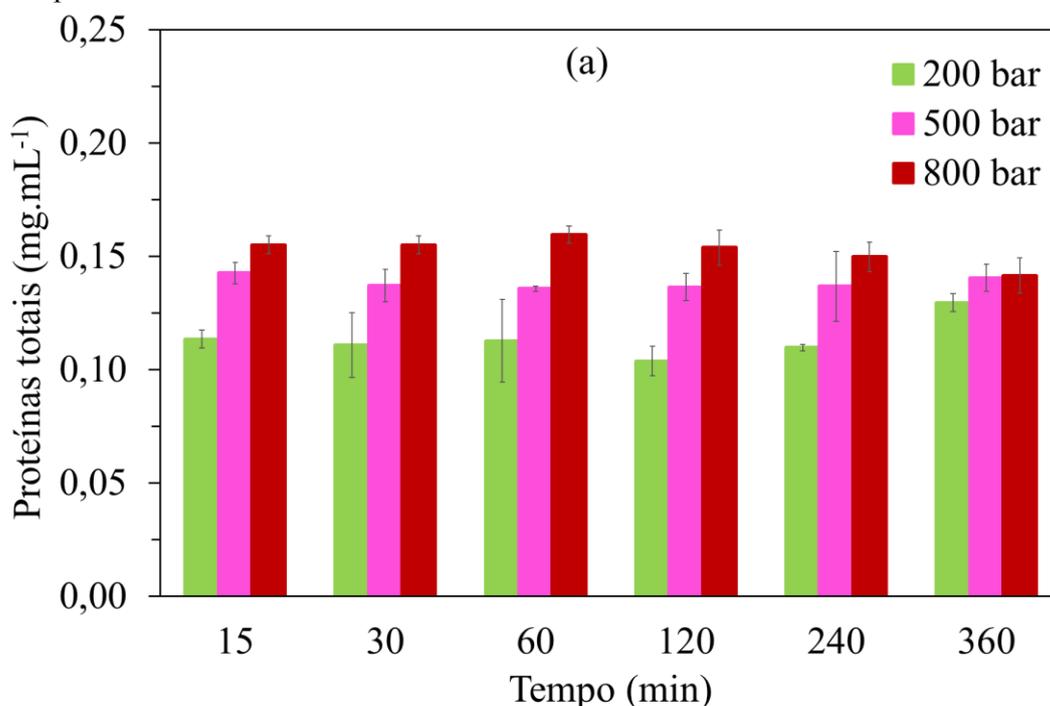
Afim de estudar o efeito da pressão no sistema, a extração de R-FE foi realizada em pressões de 200, 500 e 800 bar. O processo de extração é analisado

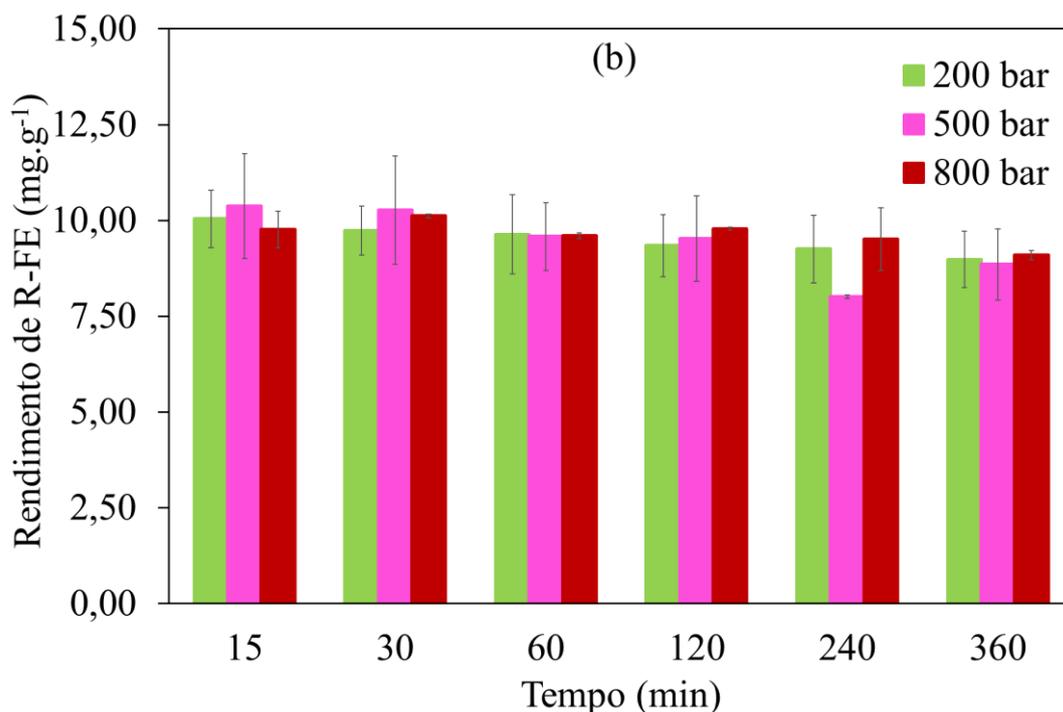
aplicando-se pressão onde ocorre dano à parede celular, diminuindo a resistência à transferência de massa, na qual os sólidos incorporados na matriz se difundem no solvente até atingir uma concentração de equilíbrio (KHAN; ASLAM; MAKROO, 2019).

Na Figura 22 apresenta-se a concentração de proteínas totais (22a) e rendimento de R-FE (22b) obtida em diferentes pressões e tempos de extração. As macroalgas vermelhas apresentam altos teores de proteínas (CASTRO-VARELA et al., 2022; PEREIRA et al., 2020) e, conforme esperado e demonstrado nos resultados (Figura 22a), a concentração de proteínas totais apresenta aumento com o aumento de pressão, relevante logo nos primeiros min de extração.

Atingindo a pressão de 800 bar, alcançou-se uma concentração em torno de $0,15 \pm 0,004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em comparação, a pressão de 500 bar atingiu $0,13 \pm 0,007 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto a pressão de 200 bar alcançou $0,11 \pm 0,014 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todos estes em 30 min de extração. Analisando os resultados apresentados, para o aumento de extração de proteínas totais, ou seja, extração de todo tipo de proteína presente na macroalga *S. filiformis*, o aumento da pressão é significativo no processo de extração sendo 800 bar a condição mais eficaz do processo de extração.

Figura 22 - Concentração de proteínas totais (a) e Rendimento de R-FE (b) obtidos no sistema pressurizado, analisando o efeito de pressão sem processo de agitação ao longo do tempo.





Fonte: elaborado pelo autor.

O aumento da pressão não mostrou que existe significância estatística ($p > 0,05$) para o rendimento de R-FE ao longo do tempo (Figura 22b). Neste processo, a pressão de 200 bar é suficiente para apresentar eficácia no processo de extração de R-FE logo nos instantes iniciais.

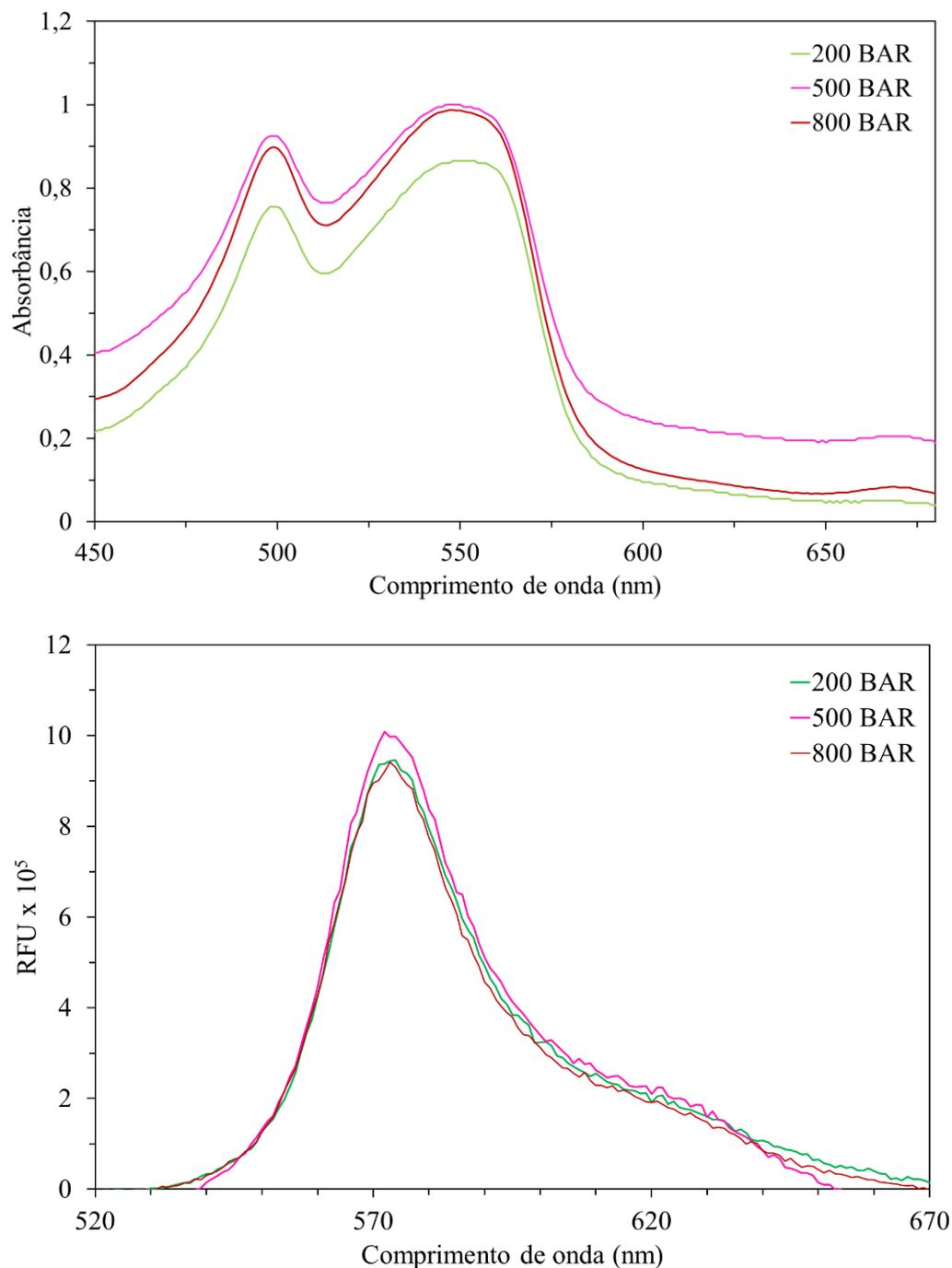
A faixa de pressão analisada (200-500 bar) não acarretou no aumento de temperatura, conforme observado por estudos anteriores em pressões acima de 4500 bar (CASTRO-VARELA et al., 2022) e 6000 bar (PEREIRA et al., 2020), não ocorrendo assim a degradação dos biocompostos extraídos. A aplicação de altas pressões já foi relatada em estudos anteriores. Castro-Varela et al. (2022) realizaram estudos com a macroalga *Sarcopeltis skottsbergii* triturada em condições operacionais de pressão de 3000 bar e água destilada, atingindo um rendimento de R-FE de $5,67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ em dois ciclos de extração, não mencionando o tempo decorrido. Pereira et al. (2020) utilizaram a macroalga *Gracilaria gracilis* triturada, alcançando um rendimento de R-FE de $1,27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sob pressão de 1220 bar em 10 min de extração. Jubeau et al. (2013) extraíram R-FE da macroalga *Porphyridium cruentum* com 2700 bar e obtiveram $3,6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de algas secas em duas etapas de extração, não mencionando o tempo decorrido. Vale ressaltar que nenhum desses estudos foi realizado em sistema de líquido pressurizado. Neste estudo, em sistema de pressurização com água ultrapura, alcançou-se um rendimento de R-FE de $9,74 \pm 0,65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ em condições de 200 bar, sem agitação, ao

longo de 30 min de extração. Sendo este um resultado maior do que todos relatados anteriormente.

Os espectros de absorção dos extratos brutos após extração de R-FE em diferentes pressões e a análise fluorimétrica podem ser analisados na Figura 23. Examinou-se os espectros de absorção em todas as pressões (200, 500 e 800 bar) e no maior tempo de extração, ou seja, 360 minutos, onde estes são capazes de fornecer informações sobre o impacto do tratamento na dissociação e desdobramento de proteínas (SIMOVIC et al., 2022). Independente do aumento de pressão, os espectros exibiram picos semelhante de absorção em 499 nm e entre 540 e 564 nm. Em 200 bar apresentou um pico de fluorescência em 574 nm e um baixo IP do extrato de 0,56. Ao mesmo tempo, em 500 bar apresentou um IP do extrato de 0,49 e um pico de fluorescência em 574 nm. O espectro característico de 800 bar apresentou um pico de fluorescência em 573 nm e baixo IP de 0,49. Ambos os extratos exibiram características consistentes com a estrutura de uma R-FE (SIMOVIC et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020).

Todos os extratos não apresentaram as bandas PEB definidas, que seria característico de R-FE de maior pureza, indicando a presença de compostos contaminantes capazes de absorver luz nos mesmos comprimentos de onda, como evidenciado pelo baixo IP. Isto demonstra que ocorreu a dissociação parcial do hexâmetro de R-FE induzindo a perda da estrutura detalhada da banda PEB a 560 nm. Esta perda é atribuída à desagregação dos dímeros cromóforos PEB nas interfaces das subunidades, possivelmente devido à presença de contaminantes.

Figura 23 - Análise espectrofotométrica de absorção (a) e análise fluorimétrica (b) obtidas por extração pressurizada de *S. filiformis* em 360 min obtidos em diferentes pressões.

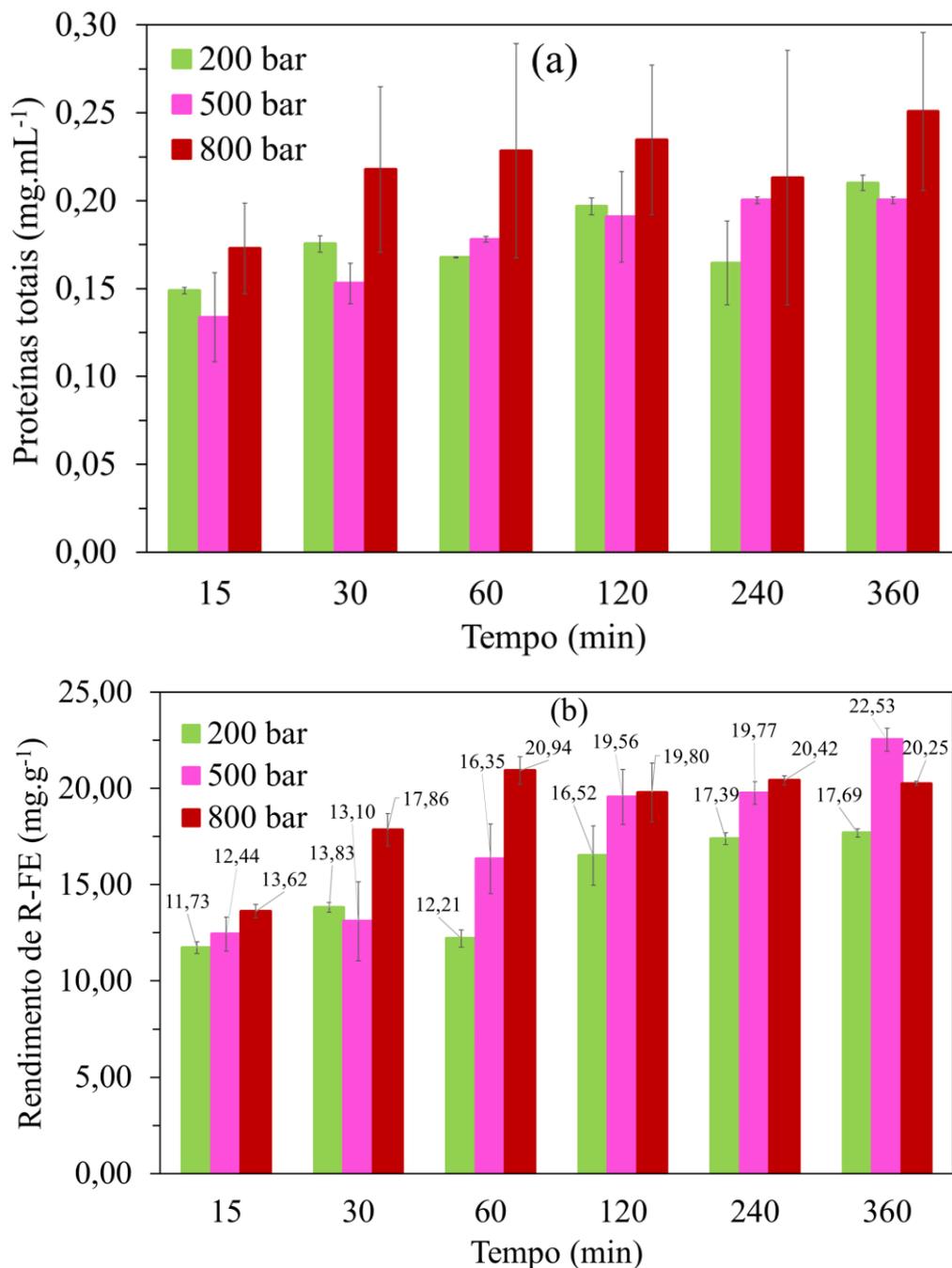


Fonte: elaborado pelo autor.

Com a finalidade de aumentar o rendimento de R-FE no sistema de pressurização, analisou-se o efeito da pressão com a inserção de agitação no processo de extração, ao longo de 360 min. Aqui, este equipamento denomina-se “célula de recombinação” e os resultados são apresentados na Figura 24. Para a extração de proteínas

totais (Figura 24a), o aumento de pressão com agitação teve uma concentração significativa variando de 0,17 a 0,25 mg·mL⁻¹ para 800 bar de pressão. Em comparação, 500 bar atingiu 0,13 a 0,20 mg·mL⁻¹, enquanto em 200 bar variou-se de 0,14 a 0,21 mg·mL⁻¹.

Figura 24 - Concentração de proteínas totais (a) e Rendimento de R-FE (b) obtidos em célula de recombinação, analisando o efeito de pressão com processo de agitação ao longo do tempo.

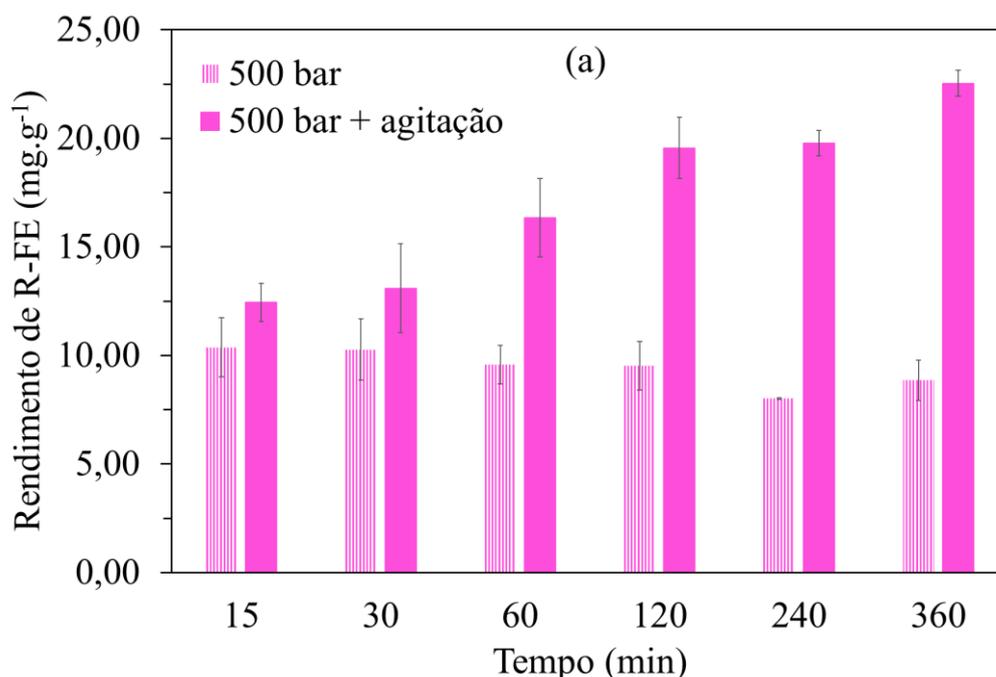


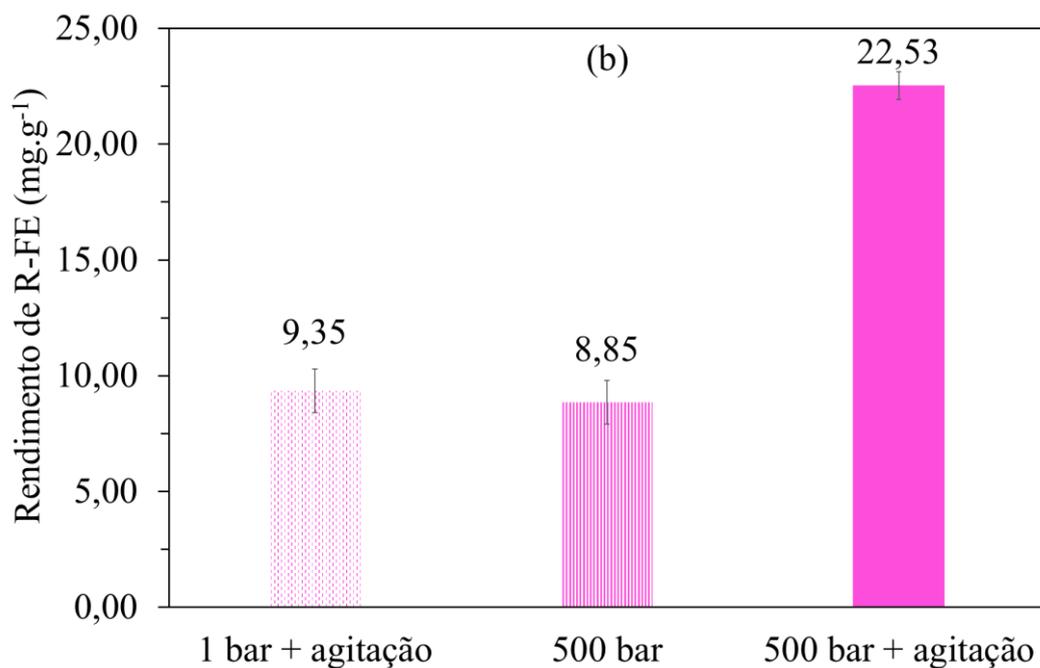
Fonte: elaborado pelo autor.

Na célula de recombinação, o aumento da pressão não mostrou que existe significância estatística ($p > 0,05$) sobre o rendimento de R-FE. Ao analisar o tempo de extração a partir de 120 minutos, observa-se que o rendimento atinge um platô para todas as pressões analisadas até 360 minutos de extração. Conseqüentemente, conclui-se que um tempo de extração de 120 minutos é o mais eficaz em termos de viabilidade econômica. Nesse período, é possível obter um alto rendimento de R-FE ($19,56 \pm 1,42 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) em menor tempo de extração. Contudo, a pressão de 500 bar alcançou o melhor rendimento de R-FE, atingindo $22,53 \pm 0,60 \text{ mg}$ de R-FE por grama de biomassa seca em 360 min de extração. Em comparação, o rendimento de R-FE em 500 bar de pressão sem processo de agitação variou de 8,85 a $10,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 25b, coluna rosa), não tendo efeito significativo o tempo de extração.

As variáveis indicam que a extração é eficiente na faixa de pressão testada de 200-800 bar. Em pouco tempo de extração (15-30 min) alcançam-se altos rendimento de R-FE e este resultado torna-se mais eficiente com a inserção de agitação em sistema pressurizado, sendo este um fator crítico para o aumento de R-FE da macroalga *S. filiformis*. Essa comparação pode ser observada na Figura 25. Não foi relatado anteriormente na literatura a extração de R-FE em célula de recombinação, sendo este trabalho o primeiro a ser relatado.

Figura 25 - Comparação do rendimento de extração de R-FE do sistema pressurizado e em célula de recombinação ao longo de 360 min em 500 bar (a) e o efeito da pressão e inserção de agitação no tempo de 360 min de extração (b).

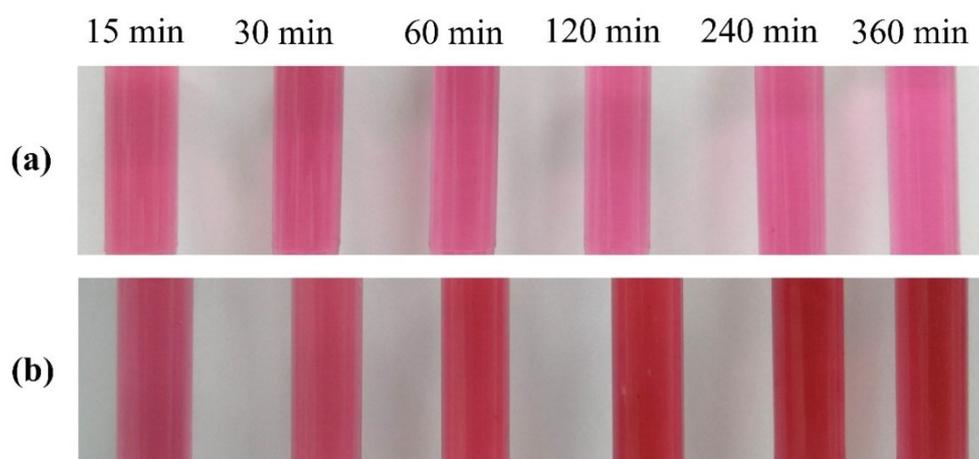




Fonte: elaborado pelo autor.

Na Figura 26 pode ser observado a coloração dos extratos proteicos totais obtidos da extração de R-FE na extração pressurizada em 500 bar com e sem agitação. O processo de extração com agitação apresentou coloração mais intensa, se tornando mais avermelhada.

Figura 26 – Coloração dos extratos brutos proteicos na extração de R-FE do sistema pressurizado e em célula de recombinação ao longo de 360 min em 500 bar (a) e o efeito da pressão e inserção de agitação no tempo de 360 min de extração (b).

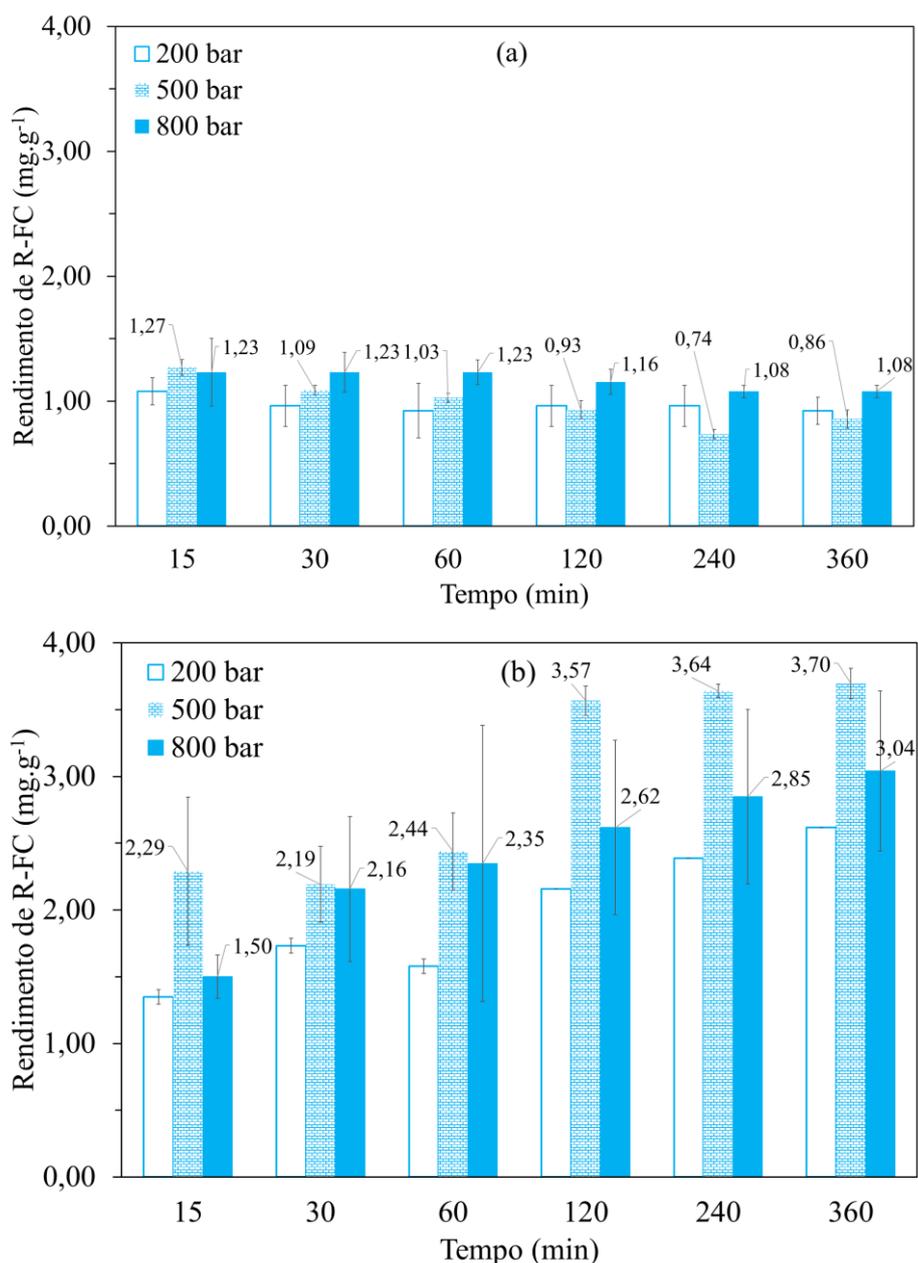


Fonte: elaborado pelo autor.

Neste trabalho foi possível analisar a extração de outras ficobiliproteínas, como as R-ficocianinas (R-FC) (Figura 27). As R-FC são pigmentos fotossintéticos de

coloração azulada mais presente em cianobactérias (CARLOS, 2020), mas que estão presentes em quantidades menores nas macroalgas vermelhas visto que as R-FE são majoritárias (MITTAL et al., 2017). A quantidade de R-FE e R-FC presentes na biomassa de algas variam de acordo com a espécie, estações do ano, cultivo e localização geográfica (MOURITSEN; RHATIGAN; PÉREZ-LLORÉNS, 2018; PEREIRA et al., 2020). Decidiu-se realizar tal análise na célula de recombinação devido a maior quantidade de extração de proteínas totais.

Figura 27 - Rendimento de R-FC extraídos da macroalga *S. filiformis* pelo método de pressurização em célula de extração (a) e célula de recombinação (b) em diferentes pressões ao longo de 360 min.

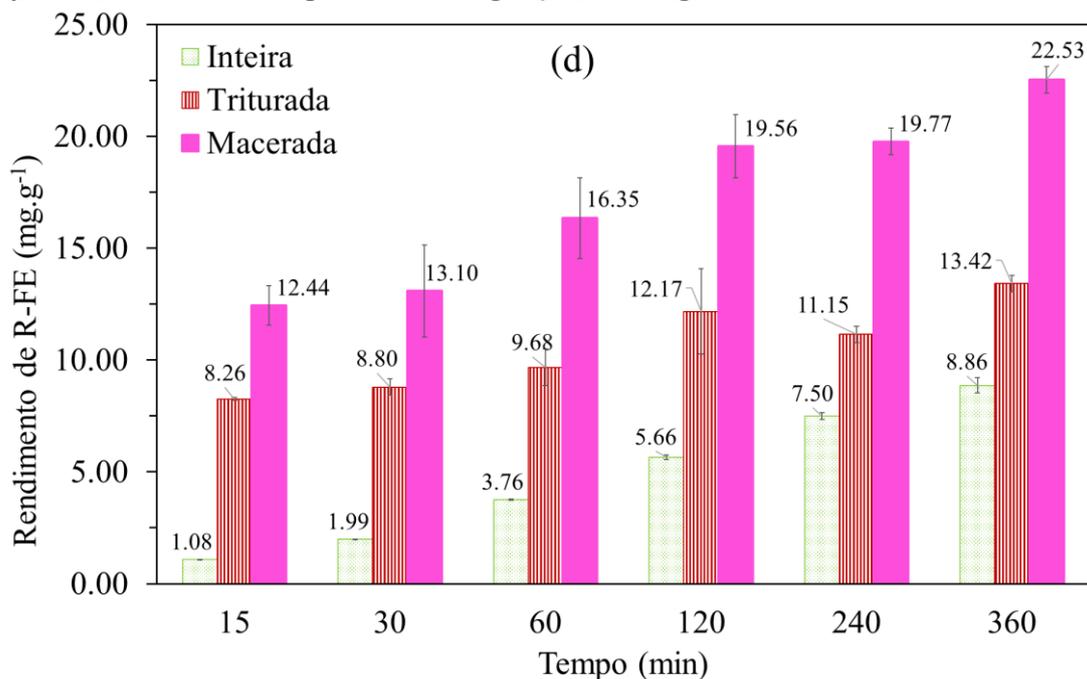


Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados apresentados, o aumento de pressão não é um fator essencial para o aumento de rendimento de R-FC. O melhor resultado é apresentado para 500 bar de pressão em célula de recombinação, cujo o rendimento de R-FC variou de 2,29-3,70 mg·g⁻¹. O melhor parâmetro para o aumento do rendimento ocorreu com agitação em 120 min de extração alcançando 3,57 mg·g⁻¹, sendo este mais viável economicamente. As margens de erro apresentadas nos gráficos são analisadas a partir do desvio padrão e por não ocorrer uma depressurização do sistema para coleta de amostras apresenta uma diferenciação entre os experimentos para 800 bar de pressão. Mittal et al. (2017) analisaram o rendimento de extração de ficobiliproteínas por diferentes métodos de extração da macroalga vermelha *Gelidium pusillum*. Na extração combinada de maceração mais EAU alcançou-se um rendimento de R-FC de 1,56 ± 0,01 mg·g⁻¹, considerado este processo com 93,13 % de eficiência de extração.

Considerou-se prudente explorar o rendimento de R-FE sobre o efeito sinérgico dos pré-tratamentos mecânicos de trituração e maceração sólida da estrutura da macroalga em pressão de 500 bar com agitação ao longo do tempo (Figura 28).

Figura 28 – Rendimento de R-FE em diferentes tamanhos de partículas da macroalga *S. filiformis*, em 500 bar de pressão com agitação, ao longo de 360 min.



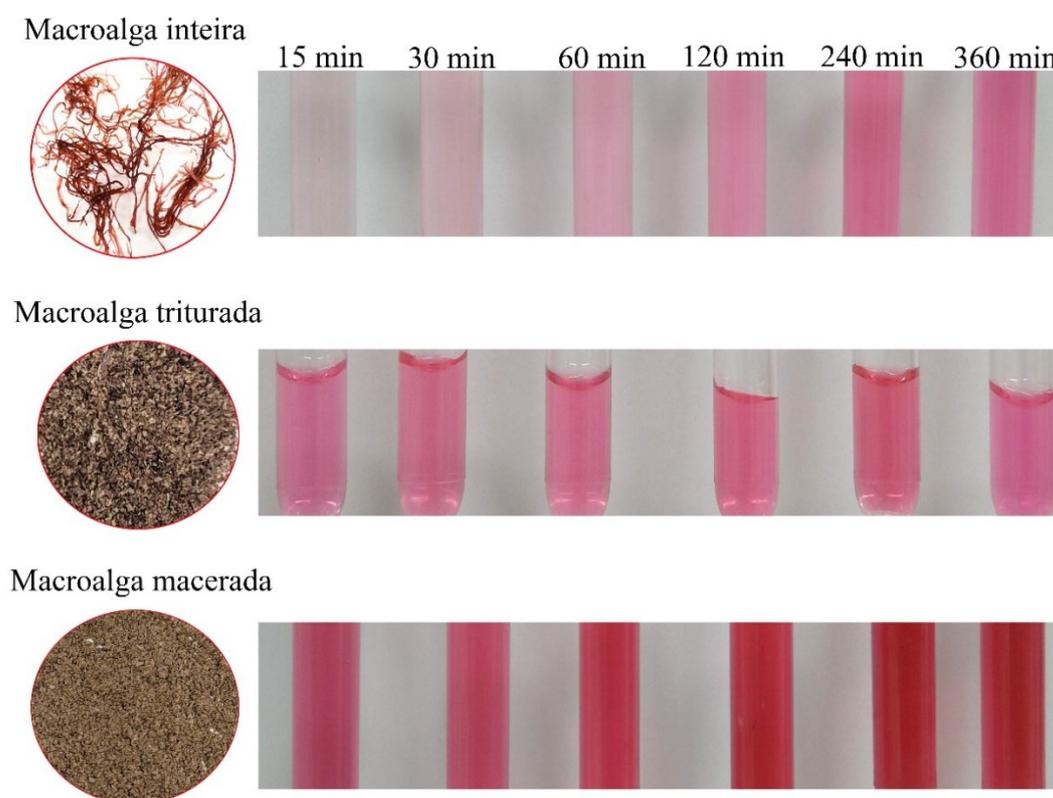
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que o tamanho da macroalga *S. filiformis* inteira (8,86 mg·g⁻¹), triturada (13,42 mg·g⁻¹) e macerada (22,53 mg·g⁻¹), influencia no aumento do rendimento

de R-FE. De acordo com os resultados obtidos, o processo de maceração em combinação com outros processos de extração é relatado na literatura sendo eficaz no aumento do rendimento de R-FE (MITTAL et al., 2017; PEREIRA et al., 2020).

Na metodologia 2, utilizando a célula de recombinação, pressão com agitação, os resultados demonstraram que altos rendimentos de R-FE são alcançados em poucos minutos de extração (30 min). Isso ocorre pois o processo de agitação promove uma melhor homogeneização do sistema e um maior contato entre o solvente e a biomassa *S. filiformis*. Observa-se na estrutura inteira liofilizada, sem processo de trituração, que o rendimento de R-FE variou de 1,09-8,86 mg·g⁻¹ ao longo de 360 min de extração. Em comparação, na metodologia 1, pressão sem agitação (*Seção 5.1.1*), a mesma estrutura de alga variou de 0,41-0,66 mg·g⁻¹. A eficiência de extração da R-FE é alcançada mesmo diminuindo etapas na metodologia apresentada (*Figura 12, seção 4.2.2*), como o processo de trituração e maceração, diminuindo assim custos e tempo no processo. É possível analisar na *Figura 29* a coloração dos extratos proteicos totais obtidos da extração de R-FE em célula de recombinação a 500 bar para macroalga inteira, triturada e macerada.

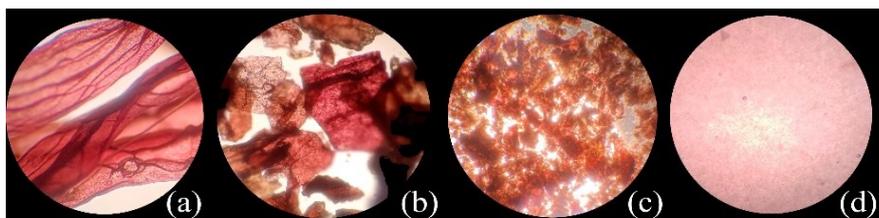
Figura 29 - Coloração dos extratos brutos proteicos na extração de R-FE em célula de recombinação ao longo de 360 min em 500 bar para macroalga inteira, triturada e macerada.



Fonte: elaborado pelo autor.

A estrutura da macroalga vermelha *S. filiformis in natura* foi analisada por microscopia óptica com zoom de 4x e é apresentada na Figura 30. Observa-se a parede celular no processo de trituração (30b) e maceração (30c) da macroalga. Diferenças consideráveis na cor e morfologia da biomassa após o tratamento relaciona o grau de extração, mostrando a ruptura celular (MITTAL et al., 2017). Figura 30(a) apresenta-se intacta e rica em pigmento. Figura 30(c) demonstra como a maceração pode promover a quebra da parede celular. A diminuição da partícula da macroalga contribuiu para uma maior exposição da R-FE devido a maior área superficial, como também outras proteínas, polissacarídeos, e lipídios, no processo de extração. A Figura 30(d) mostra a ruptura da célula em 500 bar após 360 min de extração.

Figura 30 - Microscopia óptica 4x da macroalga *S. filiformis* avaliando o efeito do tamanho de partícula em pressão 1 bar: (a) inteira, (b) triturada, e (d) ruptura da parede celular após extração em 500 bar em 360 min.



Fonte: elaborado pelo autor.

A Tabela 4 resume os principais resultados de R-FE extraídas neste trabalho a partir da metodologia 2 e as da literatura, mostrando a espécie de macroalga vermelha, o método de pré-tratamento, caso tenha sido realizado, o método de extração, o rendimento alcançado e mais algumas informações relevantes. Foram discutidos as pesquisas mais recentes e os que não foram relatados é devido a ausência de resultados em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ou $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo apresentados em porcentagem de recuperação. É importante destacar que o teor de R-FE na biomassa pode variar de acordo com diversos fatores, como a espécie da alga, a estação do ano, a localização geográfica e a incidência e absorção de luz.

Tabela 4 - Rendimento de extração de ficobiliproteínas de macroalgas vermelhas por diferentes métodos de extração.

Macroalgas vermelhas	FBS	Pré-tratamento	Método de extração	Solventes analisados	Tempo	Temp.	Informações	Resultados obtidos	Referências
<i>Solieria filiformis</i>	R-FE R-FC	Liofilizada e macerada	Maceração + Extração pressurizada com agitação	Água ultrapura Tampão fosfato	120 min	25°C	200 – 800 bar	R-FE = 19,53 mg·g ⁻¹ R-FC = 3,57 mg·g ⁻¹	Este trabalho.
<i>Palmaria palmata</i>	R-FE	Macroalga úmida cortada	Digestão enzimática fúngica	Tampão acetato	320 min	24°C	Seis isolados de fungos derivados de <i>P. palmata</i>	R-PE = 8.1	(LE STRAT et al., 2023)
<i>Palmaria palmata</i>	R-FE	Liofilizada em pó	Cavitação hidrodinâmica	Água destilada	100 passagens (219 min)	22 ± 2°C	0,5 – 3 bar	R-FE = 13,34 mg·kg ⁻¹	(MITTAL; RANADE, 2023)
<i>Grateloupia turuturu</i>	R-FE	Macroalga úmida cortada	Hidrólise Enzimática Assistida por Ultrassom	Água de torneira	180 min	20°C	300 W 145 L·h ⁻¹	R-FE = 4,28 mg·g ⁻¹	(LE GUILLARD et al., 2023)
<i>Sarcopeltis skottsbergii</i>	R-FE	Liofilizada e triturada	Homogeneização de alta pressão	Água ultrapura Tampão fosfato	2 passagens	-	passagens (1-3) pressões (1000 – 4000 bar)	R-FE = 5,7 mg·g ⁻¹	(CASTRO-VARELA et al., 2022)
<i>Gracilaria gracilis</i>	R-FE	Liofilizada e moída em misturador	Homogeneização de alta pressão	Tampão fosfato	10 min	Ambiente	1 – 6000 bar	R-FE = 1,27 mg·g ⁻¹	(PEREIRA et al., 2020)
<i>Pyropia yezoensis</i>	R-FE	Liofilizadas e moídas em pó por um pulverizador	Extração assistida por enzima	Tampão fosfato	300 min	28,86°C	pH = 5 – 9 Agarase (104 U·g ⁻¹), Celulase (100 U·g ⁻¹).	R-FE = 6,89 mg·g ⁻¹	(WANG et al., 2020b)
<i>Gelidium pusillum</i>	R-FE R-FC	Maceração	Maceração + Ultrassonicação	Tampão fosfato	55 min	-	Estudo sinérgico de diferentes metodologias.	R-FE = 1,56 mg·g ⁻¹ R-FC = 1,19 mg·g ⁻¹	(MITTAL et al., 2017)
<i>Gracilaria sp.</i>	FBS	-	Líquido iônico	Tampão fosfato Tampão McIlvaine	20 min	Ambiente	Diferentes tipos de líquidos iônicos.	FBS = 0,36 mg·g ⁻¹	(MARTINS et al., 2016)
<i>Porphyridium cruentumem</i>	B-FE	Cultivo em bioreator	Homogeneização de alta pressão	Água destilada e meio de cultivo Hemerick	-	3°C	1 a 3 passagens pressão (250–2700 bar)	R-FE = 3,6 mg·g ⁻¹	(JUBEAU et al., 2013)

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: R-FE – R-ficoeritrina; R-FC – R-ficocianina; FBS – Ficobiliproteínas.

Este estudo alcançou o maior rendimento de R-FE relatado até o momento na literatura, atingindo $22,53 \pm 0,60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sob uma pressão de 500 bar em 360 minutos de extração. Com o objetivo de tornar o processo mais eficiente, o maior rendimento, ainda não descrito na literatura, também pode ser alcançado em 120 minutos de extração, resultando em um alto rendimento de R-FE de $19,53 \pm 1,42 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Considerando uma abordagem em escala industrial e o conceito de biorrefinaria, o processo de maceração sólida seria inviável. No entanto, eliminando essa etapa, ainda é possível obter um alto rendimento com a estrutura da alga triturada. Nesta análise, a extração de R-FE alcançou $12,17 \pm 1,90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em 120 minutos de extração sob uma pressão de 500 bar. Pensando no critério para uma escala industrial, a extração em célula de recombinação com estrutura da alga triturada em 120 minutos de extração seria o processo aqui escolhido. A seguir são abordados os estudos mais recentes sobre macroalgas vermelhas, diferentes metodologias e os resultados alcançados apresentados anteriormente na Tabela 4.

Mittal & Ranade (2023) utilizaram macroalgas secas e em pó e analisaram a influência dos principais parâmetros operacionais, como queda de pressão e número de passagens, no desempenho da extração. Eles demonstraram que a cavitação hidrodinâmica baseada em vórtice aumenta a taxa de extração de R-FE para $13,34 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, cerca de $0,013 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, além do aumento de proteínas e carboidratos em uma melhoria de 2 a 20 vezes, sendo significativamente melhor do que os recipientes agitados. Descobriu-se que a queda de pressão de 2 bar exibe taxa máxima de extração dentro da faixa considerada (0,5–3 bar). A produtividade energética (kg de produto/kJ) diminuiu acentuadamente com o aumento no número de passagens além de 100.

A combinação das técnicas de extração assistida por enzimas (EAE) e a extração assistida por ultrassom (EAU) foram discutidos por Le Guillard et al. (2023). Tal estudo otimizou o processo de hidrólise enzimática assistida por ultrassom (HEAU) da alga vermelha *Grateloupia turuturu* úmida e cortada em moinho de corte para a extração de R-FE. Isso foi realizado aplicando uma metodologia de superfície de resposta baseada em um planejamento composto central, analisando parâmetros como a concentração da enzima, temperatura, pH e tempo de reação. Nas condições otimizadas, o rendimento cinético de R-FE alcançou $4,28 \pm 0,09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco em condições otimizadas de 180 min, a 300 W de potência, 20 °C e vazão de $145 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. Este resultado corresponde a um rendimento 2,3 vezes maior do que com a extração convencional com tampão fosfato em *G. turuturu* liofilizado. Tais resultados demonstraram que a HEAU otimizado é um método eficiente para extrair R-FE de *G. turuturu* úmido sem a

necessidade de etapas dispendiosas de pré-tratamento encontradas na extração convencional.

Castro-Varela et al. (2022) avaliaram os processos de ruptura e separação celular usando duas tecnologias verdes, extração assistida por ultrassom (EAU) e homogeneização de alta pressão (HAP), para obter um extrato enriquecido com R-FE de *Sarcopeltis skottsbergii*. O processo de otimização abordou um projeto composto central de três fatores (CCD) de dois níveis e a metodologia de superfície de resposta (RSM). O método HAP foi o método de extração mais eficiente nas condições obtidas de potência de pressão de 100-400 MPa, 2-3 passes e água destilada como solvente. Além disso, o rendimento de extração de R-FE alcançou $5,7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca nas condições ideais (300 MPa, 2 passagens com água destilada), 50-60% maiores que os rendimentos de PE obtidos com EAU. Um processo de purificação foi testado a partir de uma membrana que apresentou rejeição à R-ficoeritrina concentrada a 30 KDa. Além disso, a R-ficoeritrina apresentou capacidade antioxidante em ensaio de DPPH, utilizando ácido ascórbico como controle positivo.

Pereira et al. (2020) realizaram uma avaliação da otimização da extração de FBP da macroalga vermelha *Gracilaria gracilis* por meio de diferentes métodos, incluindo EAU (banho-maria ultrassônico e sonda ultrassônica), HAP, congelamento-descongelamento e maceração. Os resultados indicaram que a maceração foi o método de extração mais eficiente, resultando em um rendimento de $3,58 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa nas condições ideais (tempo = 10 min; concentração = 0,1 M; relação líquido:sólido = 1:50). Além disso, as quantidades de R-FC também foram determinadas sob essas condições ideais, totalizando $0,62 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A análise da biomassa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) antes e depois dos tratamentos de ruptura celular demonstrou que a maceração resultou em uma ruptura mais eficiente da parede celular. Por outro lado, os rendimentos de R-FE foram mais baixos ($1,27\text{--}1,79 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) ao utilizar a sonda ultrassônica. O método de extração HAP mostrou-se menos eficaz em comparação com os outros métodos, resultando em rendimentos de R-FE de 0,25 a $1,27 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (aproximadamente 65% menos que a maceração).

Com base nos dados apresentados na Tabela 4, os extratos de R-FE obtidos neste estudo demonstraram um rendimento mais elevado. Contudo, a aplicação de elevadas pressões pode causar efeitos adversos em biomoléculas (HUANG et al., 2013; KHAN; ASLAM; MAKROO, 2019). Diante deste cenário, a biofuncionalidade dos biocompostos obtidos foi analisada nas seções seguintes. Como o objetivo do trabalho

visa o maior rendimento de R-FE, a caracterização da R-FE obtida foi realizada no ponto de extração mais eficaz, sendo esse em 500 bar de pressão com agitação em 360 min de extração.

5.2.2 Análise de Carboidratos Totais

Os carboidratos são extraídos no EB e interferem na partição da biomolécula alvo. Na análise quantitativa desses polissacarídeos, o EB atingiu concentração de carboidratos de $38,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A célula de recombinação mostrou-se um processo menos seletivo comparado com a *seção 5.1.2*, com alta quantidade de carboidratos extraídos. A aplicação de pressão combinada com agitação tornou mais eficiente o processo de extração de R-FE e, conseqüentemente, tornou-se mais eficiente em liberar uma variedade maior de componentes da matriz da amostra, incluindo os componentes desejados e aqueles que não são necessariamente alvo da extração, devido ao aumento da solubilidade dos analitos na solução extrativa.

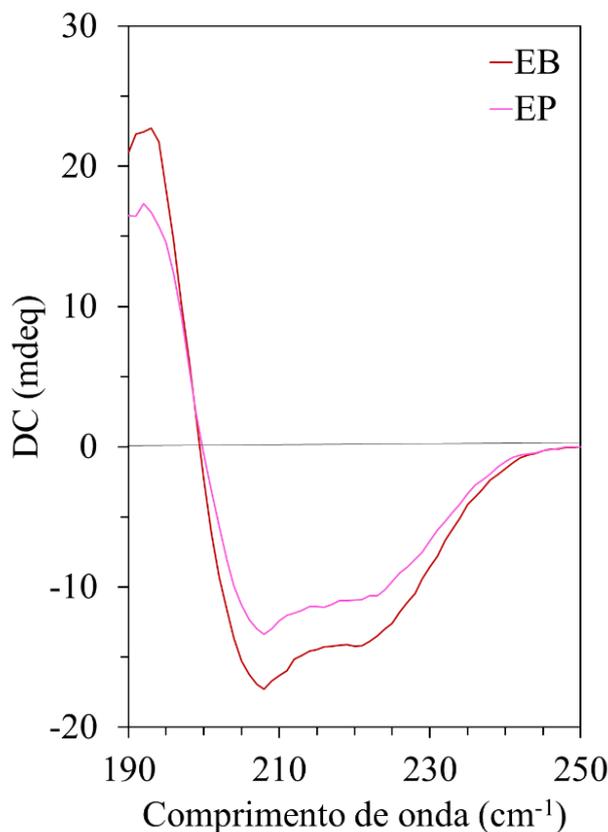
Precipitou-se o EB com 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de acordo com estudos realizados por Bastos Filhos (2016) para a macroalga *S. filiformis*, visando a redução de carboidratos e a concentração de proteínas totais. Contudo o objetivo não foi alcançando, pois os carboidratos foram precipitados juntamente com as proteínas. Ao ressolubilizar o pellet contendo o precipitado proteico, analisou-se nesse processo o EP obtido e ele manteve a quantidade de carboidratos totais do EB.

Tais valores obtidos são semelhantes aos de Munier et al. (2015), atingindo $33,78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ da macroalga *Grateloupia turuturu* liofilizada e moída. Le Guillard et al. (2023), realizando extração por hidrólise enzimática assistida por ultrassom (EAU), obtiveram $44,31 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de carboidratos da macroalga *Grateloupia turuturu*. Os carboidratos encontram-se presente no talo da *S. filiformis* (BURLLOT et al., 2023), o que indica que tal processo de extração não rompeu apenas a parede celular, mas toda a estrutura da macroalga, conforme ilustrado na Figura 30 (*Seção 5.2.1*).

5.2.3 Dicroísmo Circular (DC) da R-FE

Os espectros de DC dos extratos obtidos são apresentados na Figura 31, cujas estruturas secundárias do pigmento de R-FE extraído pela célula de recombinação foram analisadas. Ambos os extratos apresentaram elipticidade negativa a partir de 200 nm e pico na banda em 192-193 nm, características típicas de proteínas α -hélice (SIMOVIC et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020).

Figura 31 - Espectro de DC do extrato bruto e precipitado de R-FE obtidos da macroalga *S. filiformis* pela célula de recombinação.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EB – Extrato bruto; EP – Extrato precipitado.

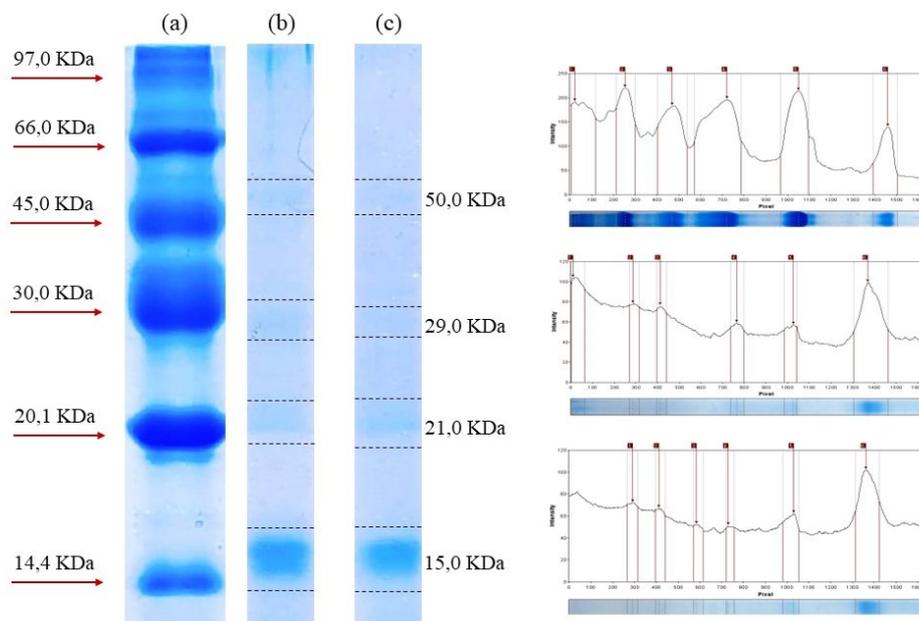
De acordo com os dados apresentados e a análise pelo servidor online K2D3 da R-FE obtida na extração pressurizada pela célula de recombinação, o espectro de DC do EB apresentou 90,39% de α -hélice, 0,01% de folhas- β e 9,60% de estruturas não ordenadas; enquanto o EP mostrou 80,51% de α -hélice, 0,04% de folhas- β e 19,45% de estruturas não ordenadas. O conteúdo de α -hélice calculado no EP o torna característico de R-FE, enquanto o EB é superior ao esperado, visto que a porcentagem de α -hélice característico de R-FE varia de 60 a 79% (SIMOVIC et al., 2022), confirmando assim a presença de outras proteínas e contaminantes no EB.

5.2.4 Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas do EB foram precipitadas por sulfato de amônio (90% m/v) e o perfil eletroforético dos EB e EP foram analisados sob condições desnaturantes na presença do agente redutor β -mercaptoetanol, conforme mostra a Figura 32. As subunidades das bandas de proteínas foram medidas usando o software GelAnalyzer 23.1 (LAZAR JR., 2023). De acordo com a análise do perfil eletroforético, ambos extratos

apresentaram bandas semelhantes. A pré-purificação com sulfato de amônio (90% m/v) apresentou um aumento ($p < 0,05$) no IP de 0,39 para 0,55.

Figura 32 – Perfil eletroforético de R-FE obtida da macroalga *S. filiformis* em 6 horas de extração em célula de recombinação em 360 min de extração, sob pressão de 500 bar, em condições desnaturantes na presença do agente redutor.



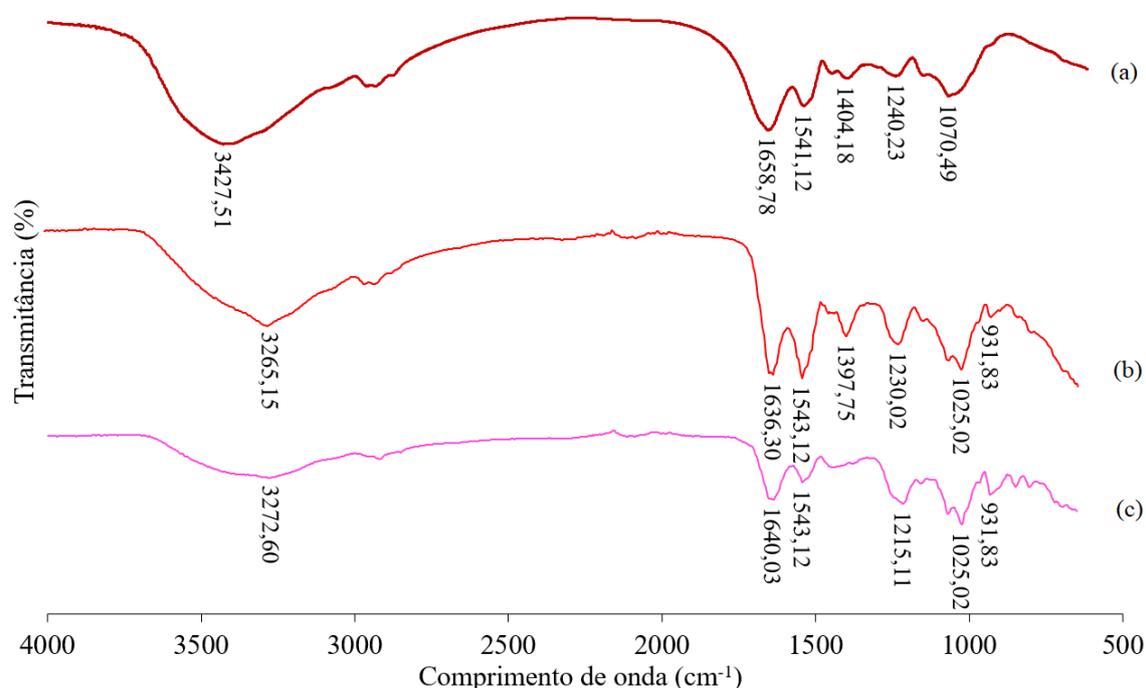
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: (a) – Marcador de peso molecular: fosforilase B (97,0 KDa); (b) – Extrato bruto (EB); (c) – Extrato precipitado (EP).

Analisando o perfil de eletroforese obtido por revelação de azul de Comossie, uma banda forte é observada em 15,0 KDa, estrutura secundária α característica de R-FE, e bandas mais brandas apareceram em 21,0 (β), 29,0(γ) e 50,0 KDa. O resultado é semelhante ao estudo realizado por Nguyene et al. (2020) com uma R-FE purificada da macroalga *Gracilaria gracilis* que relatou quatro subunidades: α (18 kDa), β (21 kDa), γ (29 kDa) e γ' (27 kDa). Pereira Martins et al. (2023) abordou a purificação da R-FE obtida da macroalga *S. filiformis* apresentando banda apenas em 18 KDa. Senthilkumar et al. (2013a) encontrou bandas de 16, 21 e 39 KDa da macroalga *Portieria hornemannii*, para as subunidades α , β e γ , respectivamente. Para extração com alta pressão, sobre a estrutura do R-FE da macroalga *Porphyra sp* do estudo de Simovic et al. (2022), obteve-se uma banda de ~20 kDa, correspondente às subunidades α e β , e duas bandas discretas entre 30 e 35 kDa correspondentes às subunidades γ . Estes dados coincidem com os espectros de dicroísmo circular relatados anteriormente.

5.2.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR de R-FE de *S. filiformis* forneceram informações sobre diferentes componentes presentes nos extratos (Figura 33). A Figura 33(a) representa o espectro característico de R-FE purificada obtida no trabalho de Pereira Martins et al. (2023). As Figura 33(b) e (c) são os EB e EP, respectivamente. De acordo com as análises, os picos de intensidade característicos de R-FE mostraram um perfil semelhante, não apresentando conformidades no processo de extração, mantendo assim a estrutura de R-FE. Tais resultados foram semelhantes aos estudados por Xu, Wang e Hou (2020).

Figura 33 - Espectro de FTIR de 4000-500 cm^{-1} dos extratos obtidos da *S. filiformis* em célula de recombinação, (a) R-FE purificada de Pereira Martins et al. (2023); (b) EB – extrato bruto; (c) EP – extrato precipitado.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os espectros de FTIR de R-FE obtidos da macroalga *S. filiformis* mostram diferentes componentes presentes nos extratos. Todos os espectros apresentam um perfil semelhante. A região espectral característica da estrutura secundária proteica foi a amida I (ligação =CO), principalmente as vibrações 1700-1600 cm^{-1} , característicos das ligações peptídicas detectadas como 1640,03 cm^{-1} presente em ambos os extratos. A amida I indica a α -hélice como elemento principal de sua estrutura secundária, confirmando os dados avaliados pelo DC (seção 5.2.3) (XU et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020).

Amida II (ligações -NH) pode ser observada em 1543,12 cm^{-1} para ambos extratos. O pico de absorção da Amida A em 3265,15 cm^{-1} e 3272,60 cm^{-1} refere-se à

vibração de estiramento O—H, e o pico de absorção em $1025,02\text{ cm}^{-1}$ pertence à vibração de estiramento assimétrico C—O—H (XU et al., 2022; XU; WANG; HOU, 2020).

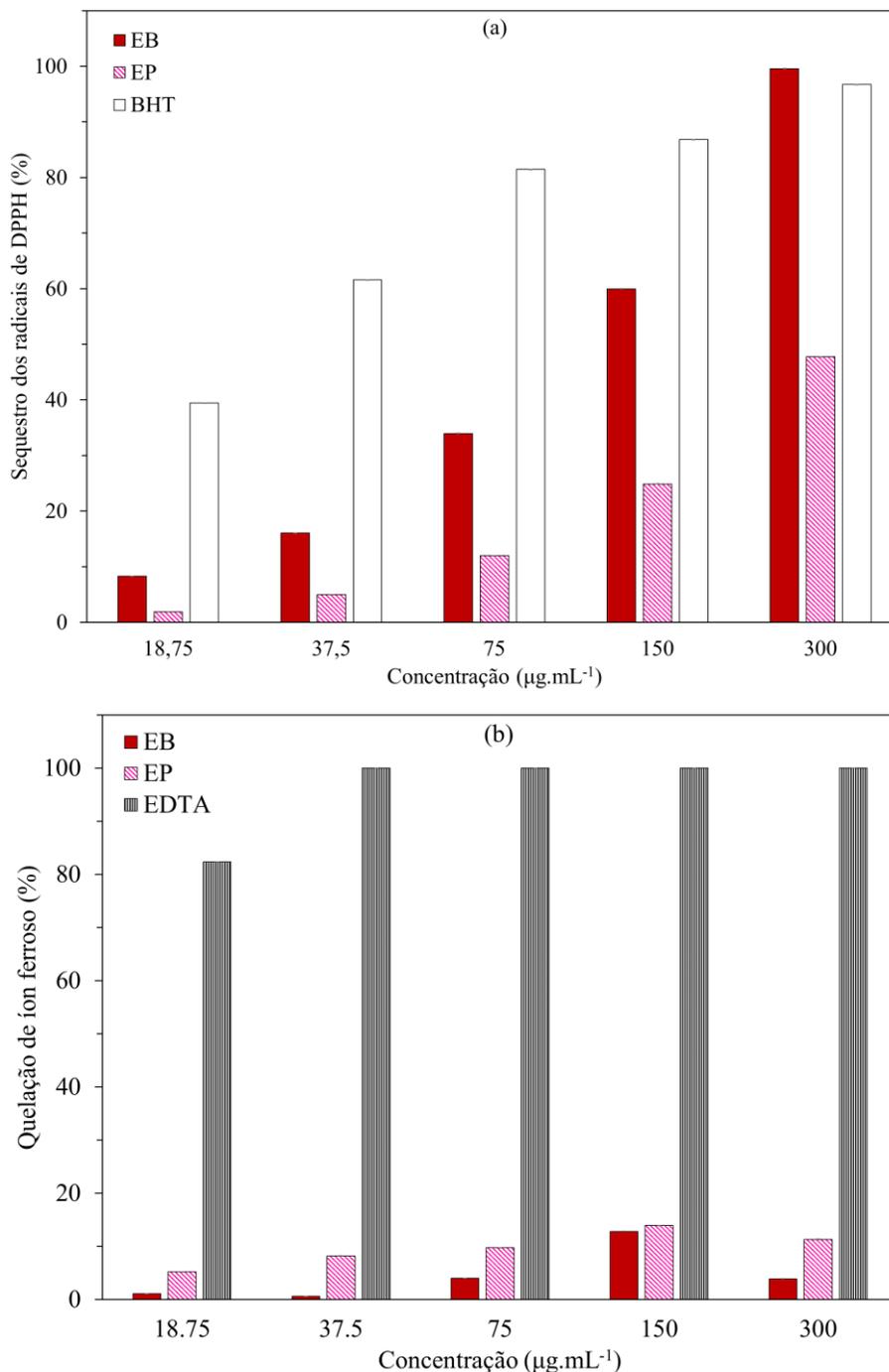
A presença do polissacarídeo sulfatado, carragenana, pode ser observado em ambos os extratos através da banda típica em $1220\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$, atribuída à vibração de estiramento de grupos éster sulfato e um sinal em 930 cm^{-1} (PEÑUELA et al., 2021a). Este resultado coincide com a análise de carboidratos totais (Seção 5.2.2) em que a precipitação com sulfato de amônio não foi eficiente para a remoção de carboidratos. A análise de FTIR demonstrou que a extração pressurizada não causou quaisquer alterações nos picos característicos da R-FE e, portanto, a estrutura química não foi alterada pela extração com célula de recombinação.

5.2.6 Atividade Antioxidante

As algas marinhas são reconhecidas como uma das fontes mais abundantes de antioxidantes naturais (CORNISH; GARBARY, 2010), capazes de substituir antioxidantes sintéticos como o butilhidroxitolueno (BHT) e a terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Esses antioxidantes sintéticos podem ser prejudiciais à saúde, com potenciais efeitos adversos, incluindo danos ao fígado e risco de câncer. Portanto, as indústrias alimentícia e farmacêutica têm buscado substituir de forma segura os antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, destacando a importância das algas marinhas nesse contexto (ULAGESAN; NAM; CHOI, 2021).

Os extratos aquosos obtidos da extração de R-FE em célula de recombinação da *S. filiformis* apresentaram resultados significativos para a atividade antioxidante e são mostrados na Figura 30. Os testes foram realizados para os métodos de sequestro dos radicais de DPPH, sendo o BHT o controle positivo; para a quelação do íon ferroso, o EDTA foi utilizado como padrão. Ambas análises realizaram diferentes concentrações do extrato variando de $18,75$ a $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura 34 - Atividade antioxidante dos EB e EP extraídos da *S. filiformis* em diferentes concentrações por diferentes técnicas de medição: (a) Sequestro dos radicais de DPPH e (b) quelação de íons ferrosos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: EB – Extrato bruto; EP – Extrato precipitado, BHT – Hidroxitolueno butilado; EDTA – etilenodiaminotetracético.

No presente estudo, os extratos contendo R-FE apresentaram maior nível de potencial antioxidante em DPPH do que o método de quelação de íons ferroso. A atividade sequestradora do radical DPPH pelo EB mostrou-se dependente da concentração, atingindo sua atividade máxima de 99,55% na concentração de 300 µg·mL⁻¹

¹, semelhante ao encontrado para o BHT (96,73%), usado como controle positivo neste ensaio (Figura 34a). O EP apresentou atividade máxima de 47,77%, reduzindo a atividade oxidante à metade. Ambos extratos atingiram baixa capacidade quelante de Fe^{2+} , sendo na concentração de $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ observada sua atividade máxima de 12.93% e 13.94%, respectivamente, EB e EP, sendo o valor bem abaixo do alcançado pelo EDTA (100%), o controle positivo deste ensaio (Figura 34b).

Realizando apenas o processo de precipitação, sem método de purificação, sugere-se que os extratos apresentam bioativos (outras ficobiliproteínas e polissacarídeos sulfatados, carragenana) que podem apresentar um efeito sinérgico desses compostos na atividade redox (CASTRO-VARELA et al., 2022; PEÑUELA et al., 2021a), como comprovada alta atividade do EB. Castro-Varela et al. (2022) encontrou o maior nível de atividade antioxidante em homogeneização de alta pressão com água destilada ($11,0 \pm 2,5\%$) pelo método de DPPH e sugere aplicação em alimentos (LE GUILLARD et al., 2015; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019). Senthilkumar et al. (2013b) alcançou atividade antioxidante máxima para a R-FE da alga *Portieria hornemannii* de 43,55%, contudo utilizando uma concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Os resultados sugerem que os extratos contendo R-FE tem efeito na eliminação de radicais DPPH, sendo uma fonte inovadora de antioxidantes naturais funcionais que tem a função de proteger contra o estresse oxidativo e pode ser utilizado como ingredientes naturais em alimentos, farmacêutica e cosmética (CASTRO-VARELA et al., 2022; LE GUILLARD et al., 2015; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019).

Diante dos estudos e resultados abordados, fica evidente que esta pesquisa representa uma contribuição significativa para o avanço da análise da extração de R-FE de macroalgas vermelhas por meio do método de extração com líquido pressurizado. É importante destacar que essa abordagem ainda não foi descrita na literatura para as *Rhodophytas*, o que ressalta a inovação e originalidade deste trabalho. Além disso, é relevante salientar que o uso da célula de recombinação não tem registros na literatura para a extração de compostos bioativos de algas, o que destaca ainda mais a singularidade e o potencial impacto deste estudo na área científica.

Sugere-se para trabalhos futuros um estudo aprofundado de técnicas de purificação como, por exemplo, cromatografia em leito expandido, para melhor aproveitamento da R-FE obtida, principalmente em aplicações biotecnológicas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a extração pressurizada mostrou-se uma técnica verde promissora para alcançar altos rendimento de R-FE da macrolaga *Solieria filiformis* sendo eficaz na faixa de pressão estudada (200-800 bar). A extração de R-FE pelo método de água pressurizada sem processo de agitação e trituração alcançou um rendimento de R-FE de $0,66 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de alga seca, sendo a biomassa liofilizada a mais eficiente neste estudo. O extrato contendo R-FE obtido nesta etapa é ativo contra células cancerígenas (cepa leucêmica HL60). Notavelmente, o uso de água ultrapura como solvente e a agitação durante a extração, célula de recombinação, surgiram como um fator essencial que contribui para o aumento do rendimento de R-FE, atingindo um pico de $22,53 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sob pressão de 500 bar. A R-ficocianina (R-FC) também foi extraída com rendimento de $3,57 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em 120 min de extração. Os extratos apresentaram capacidade antioxidante com 99,55% na redução dos radicais DPPH e 13,94% na quelação de íons ferrosos. É importante ressaltar que esta técnica de extração não exibiu impacto discernível nas estruturas secundárias ou na desnaturação da proteína, preservando assim a sua biofuncionalidade, mostrando-se uma alternativa atrativa para extração não agressiva e com atividade biológica de interesse.

REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 12 set. 2013.
- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Experimental Design, Modeling, and Optimization of High-Pressure-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Pomegranate Peel. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 5, p. 886–900, 1 maio 2017.
- BASTOS FILHOS, A. J. U. Purificação e caracterização do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga marinha *Solieria filiformis* (kützing) p. W. Gabrielson, 2016. 89 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- BEI, H. et al. The Experimental Research of R-phycoerythrin Subunits on Cancer Treatment: A New Photosensitizer in PDT. <https://home.liebertpub.com/cbr>, v. 17, n. 1, p. 35–42, 5 jul. 2004.
- BEKASOVA, O. Properties and potential applications of bioconjugates of R-phycoerythrin with Ag⁰ or CdS nanoparticle synthesized in its tunnel cavity: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 255, p. 128181, 1 jan. 2024.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature** **1958 181:4617**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.
- BOCCIA, F.; PUNZO, G. Nutraceuticals: Some remarks by a choice experiment on food, health and new technologies. **Food Research International**, v. 130, p. 108888, 1 abr. 2020.
- BOGORAD, L. Phycobiliproteins and Complementary Chromatic Adaptation. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.26.060175.002101>, v. 26, n. 1, p. 369–401, 28 nov. 2003.
- 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, 7 maio 1976.
- BRYANT, D. A. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria, **Journal of General Microbiology**. [s.l.: s.n.].
- BURLOT, A. S. et al. Concise review of the genus *Solieria* J. Agardh, 1842. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, n. 3, p. 961–982, 1 jun. 2023.
- CAAMAL-FUENTES, E.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Physicochemical Characterization and Biological activities of Sulfated Polysaccharides from Cultivated *Solieria filiformis* Rhodophyta. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 10.1177/1934578X1701200601, p. 803–806, 2017.
- CARLOS, T. A. V. **Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis* e avaliação da sua atividades antioxidante e citotoxicidade in**

in vitro em linhagens cancerígenas. Dissertação de mestrado—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2020.

CASTRO-VARELA, P. et al. Highly Efficient Water-Based Extraction of Biliprotein R-phycoerythrin From Marine the Red-Macroalga *Sarcopeltis skottsbergii* by Ultrasound and High-Pressure Homogenization Methods. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 16 jun. 2022.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Sciences** 2012, Vol. 13, Pages 8615-8627, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 11 jul. 2012.

CHEN, H.; QI, H.; XIONG, P. **Phycobiliproteins—A Family of Algae-Derived Biliproteins: Productions, Characterization and Pharmaceutical Potentials.** **Marine Drugs** MDPI, 1 jul. 2022.

CHEW, Y. L. et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1067–1072, 1 jul. 2008.

CHOI, Y. J.; GURUNATHAN, S.; KIM, J. H. Graphene Oxide–Silver Nanocomposite Enhances Cytotoxic and Apoptotic Potential of Salinomycin in Human Ovarian Cancer Stem Cells (OvCSCs): A Novel Approach for Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 710, v. 19, n. 3, p. 710, 1 mar. 2018.

CIKO, A. M. et al. **Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae.** **Marine Drugs** MDPI AG, 23 set. 2018.

CORNISH, M. L.; GARBARY, D. J. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. **ALGAE**, v. 25, n. 4, p. 155–171, 1 dez. 2010.

DAY, L. Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, n. 1, p. 25–42, 1 jul. 2013.

DE ARAÚJO, I. W. F. et al. Iota-carrageninas de *Solieria filiformis* (Rhodophyta) e seus efeitos na inflamação e coagulação [Iota-carragenanas da rodoficea *Solieria filiformis* e seus efeitos na inflamação e coagulação]. **Acta Scientiarum - Tecnologia**, v. 34, n. 2, p. 127–135, [s.d.].

DENIZ, I.; OZEN, M. O.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 13–18, 1 fev. 2016.

ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, D. A. et al. Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, John Wiley and Sons Ltd, 1 jan. 2017.

GAIGALAS, A. et al. A Multistate Model for the Fluorescence Response of R-phycoerythrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 635–644, 1 maio 2006.

GALLAND-IRMOULI, A. V. et al. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 739, n. 1, p. 117–123, 28 fev. 2000.

GALLEGO, R.; BUENO, M.; HERRERO, M. Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – An update. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 198–213, 1 jul. 2019.

GAO, K.; MCKINLEY, K. R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. **Journal of Applied Phycology**. [s.l.] KluwerAcademic Publishers, 1994.

GLAZER, A. N. et al. Biliproteins of cyanobacteria and *Rhodophyta*: Homologous family of photosynthetic accessory pigments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 2, p. 428–431, 1 fev. 1976.

GORDALINA, M. et al. Macroalgae as protein sources—a review on protein bioactivity, extraction, purification and characterization. **Applied Sciences (Switzerland)** MDPI, 1 set. 2021.

GROSSO, C. et al. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. **Marine Drugs**, MDPI AG, 1 maio 2015.

HALIM, R. et al. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, n. 1, p. 116–121, 1 mar. 2012.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 375–382, 1 abr. 2013.

HERRERO, M. et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of *Spirulina platensis* proteins obtained by pressurized liquid extraction. **Electrophoresis**, v. 26, n. 21, p. 4215–4224, nov. 2005.

HSIEH-LO, M. et al. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. **Algal Research**, v. 42, p. 101600, 1 set. 2019.

HUANG, H. W. et al. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 1, p. 54–62, 1 set. 2013.

INSIGHTS, F. M. **Phycoerythrin Market | Global Sales Analysis Report - 2032**. Disponível em: <<https://www.futuremarketinsights.com/reports/phycoerythrin-market>>. Acesso em: 21 nov. 2023.

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.

JUBEAU, S. et al. High pressure disruption: A two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*.

Journal of Applied Phycology, v. 25, n. 4, p. 983–989, 2 ago. 2013.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 22 maio 2013.

KAWSAR, S. et al. Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. **Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora and Vegetation**, 2011.

KHAN, S. A.; ASLAM, R.; MAKROO, H. A. High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 1, p. e12896, 1 fev. 2019.

KOVALESKI, G. et al. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 1065355, 1 dez. 2022.

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

LAZAR JR., I. **GelAnalyzer.com**. Disponível em: <<http://www.gelanalyzer.com/?i=1>>. Acesso em: 5 nov. 2023.

LE GUILLARD, C. et al. Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. **Algal Research**, v. 12, p. 522–528, 1 nov. 2015.

LE GUILLARD, C. et al. Optimization of R-phycoerythrin Extraction by Ultrasound-Assisted Enzymatic Hydrolysis: A Comprehensive Study on the Wet Seaweed *Grateloupia turuturu*. **Marine Drugs** 2023, Vol. 21, Page 213, v. 21, n. 4, p. 213, 28 mar. 2023.

LE STRAT, Y. et al. Quantification of Xylanolytic and Cellulolytic Activities of Fungal Strains Isolated from *Palmaria palmata* to Enhance R-phycoerythrin Extraction of *Palmaria palmata*: From Seaweed to Seaweed. **Marine Drugs** 2023, Vol. 21, Page 393, v. 21, n. 7, p. 393, 5 jul. 2023.

LI, W. et al. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 340–353, 1 mar. 2019.

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, 1 fev. 2012.

MARTINS, M. et al. Recovery of phycobiliproteins from the red macroalga: *Gracilaria sp.* using ionic liquid aqueous solutions. **Green Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 4287–4296, 2016.

MITTAL, R. et al. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 92–103, 1 set. 2017.

MITTAL, R.; RANADE, V. V. Intensifying extraction of biomolecules from macroalgae using vortex based hydrodynamic cavitation device. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 94, p. 106347, 1 mar. 2023.

MITTAL, R.; SHARMA, R.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction of R-phycoerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 277–286, 1 maio 2019.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307–310, 1 nov. 1981.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MOURITSEN, O. G.; RHATIGAN, P.; PÉREZ-LLORENS, J. L. World cuisine of seaweeds: Science meets gastronomy. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 14, p. 55–65, 1 dez. 2018.

MUBARAKALI, D. et al. Synthesis and characterization of CdS nanoparticles using C-phycoerythrin from the marine cyanobacteria. **Materials Letters**, v. 74, p. 8–11, 1 maio 2012.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide. (Book Review)**. USA: Urban & Fischer Verlag, 2002. v. 9

MULCHANDANI, K.; KAR, J. R.; SINGHAL, R. S. Extraction of Lipids from *Chlorella saccharophila* Using High-Pressure Homogenization Followed by Three Phase Partitioning. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 6, p. 1613–1626, 27 jul. 2015.

MUNIER, M. et al. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 150, p. 400–407, 1 maio 2014.

MUNIER, M. et al. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. **Journal of Chromatography B**, v. 992, p. 23–29, 15 jun. 2015.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 3 out. 2011.

NGUYEN, H. P. T. et al. Purification of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Gracilaria gracilis* by anion-exchange chromatography. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 1, p. 553–561, 1 fev. 2020.

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, 1 set. 2006.

ÖĞRETMEN, Ö. Y.; DUYAR, H. A. The effect of different extraction methods and pre-treatments on agar yield and physico-chemical properties of *Gelidium latifolium* (Gelidiaceae, Rhodophyta) from Sinop Peninsula Coast of Black Sea, Turkey. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1355–1360, 1 abr. 2018.

PAN, Q. et al. Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. **Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 87–95, 2013.

PEÑUELA, A. et al. Environmentally Friendly Valorization of *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) from IMTA Using a Biorefinery Concept. **Marine Drugs** **2018**, Vol. 16, Page 487, v. 16, n. 12, p. 487, 6 dez. 2018.

PEÑUELA, A. et al. Anti-Herpes simplex virus (HSV-1) activity and antioxidant capacity of carrageenan-rich enzymatic extracts from *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 322–330, 31 jan. 2021a.

PEREIRA MARTINS, J. R. et al. Nanoencapsulation of R-phycoerythrin extracted from *Solieria filiformis* improves protein stability and enables its biological application as a fluorescent dye. **Journal of Microencapsulation**, v. 40, n. 1, p. 37–52, 2023.

PEREIRA, T. et al. Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. **Food Chemistry**, v. 321, p. 126688, 15 ago. 2020.

PLIEGO-CORTÉS, H. et al. **Growth, biochemical and antioxidant content of *Rhodymenia pseudopalmata* (Rhodymeniales, Rhodophyta) cultivated under salinity and irradiance treatments.** Journal of Applied Phycology. **Anais...Springer Netherlands**, 1 out. 2017.

RATHNASAMY, S. K. et al. Functional deep eutectic solvent-based chaotic extraction of phycobiliprotein using microwave-assisted liquid-liquid micro-extraction from *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and its biological activity determination. **Algal Research**, v. 44, p. 101709, 1 dez. 2019.

RUIZ-DOMÍNGUEZ, M. C. et al. Rapid Green Extractions of C-Phycocyanin from *Arthrospira maxima* for Functional Applications. **Applied Sciences** **2019**, Vol. 9, Page 1987, v. 9, n. 10, p. 1987, 15 maio 2019.

RUIZ-DOMÍNGUEZ, M. C. et al. Bioprospecting of cyanobacterium in Chilean coastal desert, *Geitlerinema sp.* molecular identification and pressurized liquid extraction of bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 128, p. 227–239, 1 jul. 2021.

SAMARASINGHE, N. et al. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. **Renewable Energy**, v. 48, p. 300–308, 1 dez. 2012.

SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D. An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phyocyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (*Bangiiales, Rhodophyta*). **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 2, p. 123–129, 29

abr. 2007.

SARKARAT, R.; MOHAMADNIA, S.; TAVAKOLI, O. **Recent advances in non-conventional techniques for extraction of phycobiliproteins and carotenoids from microalgae.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022.

SATHUVAN, M. et al. Single-step purified R-phycoerythrin transmits cellular imaging functionalities in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 194, p. 563–570, 1 jan. 2022.

SENTHILKUMAR, N. et al. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 55, p. 150–160, 1 abr. 2013a.

SENTHILKUMAR, N. et al. Further studies and biological activities of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 107–116, 1 nov. 2013b.

SIDLER, W. A. **The Molecular Biology of Cyanobacteria.** Dordrecht: Springer Netherlands, 1994.

SIMOVIC, A. et al. Probing the stability of the food colourant R-phycoerythrin from dried Nori flakes. *Food Chemistry*, v. 374, p. 131780, 16 abr. 2022.

SOUSA, W. M. et al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. *Carbohydrate Polymers*, v. 152, p. 140–148, 5 nov. 2016.

SUDHAKAR, M. P. et al. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. *Algal Research*, v. 8, p. 115–120, 1 mar. 2015.

SUDHAKAR, M. P.; DHARANI, G.; PARAMASIVAM, A. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potential of R-phycoerythrin extracted from *Gracilaria corticata* seaweed. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, v. 6, p. 100352, 1 jan. 2023.

SUN, L. et al. 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, 25 out. 2004.

TAN, H. et al. R-Phycoerythrin Induces SGC-7901 Apoptosis by Arresting Cell Cycle at S Phase. *Marine Drugs* 2016, Vol. 14, Page 166, v. 14, n. 9, p. 166, 12 set. 2016.

TAN, H. T. et al. Optimization of the Freezing-Thawing Method for Extracting Phycobiliproteins from *Arthrospira sp.* *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3894, v. 25, n. 17, p. 3894, 26 ago. 2020.

TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction.** 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

- THANGAM, R. et al. Theranostic potentials of multifunctional chitosan–silver–phycoerythrin nanocomposites against triple negative breast cancer cells. **RSC Advances**, v. 5, n. 16, p. 12209–12223, 20 jan. 2015.
- TRAN, T. et al. Effect of high hydrostatic pressure on the structure of the soluble protein fraction in *Porphyridium cruentum* extracts. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 58, p. 102226, 1 dez. 2019.
- ULAGESAN, S.; NAM, T. J.; CHOI, Y. H. Extraction and Purification of R-Phycoerythrin Alpha Subunit from the Marine Red Algae *Pyropia Yezoensis* and Its Biological Activities. **Molecules** **2021**, Vol. 26, Page 6479, v. 26, n. 21, p. 6479, 27 out. 2021.
- UNTERLANDER, N.; CHAMPAGNE, P.; PLAXTON, W. C. Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 25, p. 439–444, 1 jul. 2017.
- WANG, C. et al. Immunomodulatory activity of R-phycoerythrin from *Porphyra haitanensis* via TLR4/NF- κ B-dependent immunocyte differentiation. **Food & Function**, v. 11, n. 3, p. 2173–2185, 26 mar. 2020a.
- WANG, C. et al. Response surface optimization of enzyme-assisted extraction of R-phycoerythrin from dry *Pyropia yezoensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 2, p. 1429–1440, 1 abr. 2020b.
- WANG, L. et al. Characteristics of an R-Phycoerythrin with Two γ Subunits Prepared from Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120333, 17 mar. 2015.
- WOMICK, J. M.; LIU, H.; MORAN, A. M. Exciton delocalization and energy transport mechanisms in R-phycoerythrin. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 12, p. 2471–2482, 31 mar. 2011.
- XU, Y. et al. Study of fluorescence spectroscopy and molecular mechanisms for the interaction of Hg²⁺ ions and R-phycoerythrin from marine algae (*Porphyra yezoensis*). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 236, p. 112586, 1 nov. 2022.
- XU, Y.; WANG, Q.; HOU, Y. Efficient Purification of R-phycoerythrin from Marine Algae (*Porphyra yezoensis*) Based on a Deep Eutectic Solvents Aqueous Two-Phase System. **Marine Drugs** **2020**, Vol. 18, Page 618, v. 18, n. 12, p. 618, 4 dez. 2020.
- ZEPEDA, E.; FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Nutraceutical assessment of *Solieria filiformis* and *Gracilaria cornea* (Rhodophyta) under light quality modulation in culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 4, p. 2363–2373, 1 ago. 2020.