



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

GUILHERME PAIVA DE ARAUJO PEIXOTO

**R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis*:
PURIFICAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA
MICROCÁPSULA**

FORTALEZA

2020

GUILHERME PAIVA DE ARAUJO PEIXOTO

R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis*:
PURIFICAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA
MICROCÁPSULA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Bioquímica. Área de concentração: Insumos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientador: Me. Acrisio José Uchôa Bastos Filho.

FORTALEZA

2020

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)

- P43r Peixoto, Guilherme Paiva de Araújo.
R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* : purificação, encapsulação e caracterização morfológica da microcápsula / Guilherme Paiva de Araújo Peixoto. – 2020.
77 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.
Coorientação: Prof. Me. Acrisio José Uchôa Bastos Filho.
1. Pigmento natural vermelho. 2. Iota-carragenana. 3. Macroalga marinha. 4. Spray dryer. 5. Liofilização.
I. Título.

CDD 661

GUILHERME PAIVA DE ARAUJO PEIXOTO

R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis*:
PURIFICAÇÃO, ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA
MICROCÁPSULA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Bioquímica. Área de concentração: Insumos Biotecnológicos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valder Bezerra Peixoto e Eleonora Paiva de Araujo, pelo suporte, apoio, amor, amizade e compreensão durante toda a minha graduação. A eles dedico todas as minhas vitórias.

À minha irmã, Maria Cecília Paiva de Araujo Peixoto, que mesmo distante fisicamente sempre se fez presente por meio de mensagens de carinho e amor.

À Professora Dr^a. Márjory Lima Holanda Araujo, por me aceitar no seu laboratório e por toda a orientação e ensinamentos durante todos o período de desenvolvimento desse trabalho.

Ao Mestre Acrísio José Uchôa Bastos Filho, por toda a orientação, paciência, disponibilidade e amizade nos momentos bons, pela cobrança e disciplina nos momentos de seriedade e também pelo carinho e conforto nos momentos difíceis da elaboração desse projeto. Acima de tudo, por me escutar e entender minhas dificuldades e limitações.

A toda a equipe do Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP), pelo apoio e valorosa contribuição para esse trabalho. Em especial aos amigos Lucas Lopes, Ewerton Lima, João Neto, Lorena, Victor Pontes e todos os membros do BioAP pela amizade e carinho recebidos desde o momento que entrei no laboratório.

À Professora Dr^a. Norma Maria Barros por disponibilizar o espaço do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) para condução dos meus experimentos.

A toda a equipe do CARBOLEC pelo auxílio na condução da minha pesquisa e pelos momentos de descontração. Em especial aos amigos Ariel Mesquita, Rebecka e Anderson.

À Professora Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas por disponibilizar o espaço do Laboratório de Algas Marinhas (LABALGAS) para condução dos meus experimentos.

Ao secretário do curso de graduação em Biotecnologia, Gilmar Ferreira, por toda a disponibilidade, proatividade, paciência e ajuda nos momentos de necessidade.

Aos amigos que fiz durante a graduação, que caminharam comigo nessa difícil, porém recompensadora jornada na biotecnologia, por todos os momentos de descontração, apoio, ensinamentos e por estarem lá por mim quando eu mais precisei. Em especial a Vanessa Rodrigues, Joaquim Júnior, Thaís de Oliveira, Ayrton Markos, Raíssa Dias, Walber Júnior, Vinicius Cardoso e Lucas Calixto. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Aos amigos que fiz na UFC, que, mesmo em diferentes caminhadas dentro da Universidade, se faziam presentes para aliviar os pesos do dia a dia. Em especial a Eros Muniz, Enzo Matias e Mauro Vieira.

Aos meus companheiros de banda na Filanos, Caio Braga, Renner Braga, Marco Ribeiro e Rodrigo Martins.

Aos meus amigos da época do colégio, por todas as risadas, lágrimas, momentos de descontração e palavras de apoio que carregarei com carinho por onde eu for. Em especial a Davi Mendes, Igor Montenegro, Eduardo Linhares, Ricardo Carneiro, Gabriel Mendonça, Pedro Sales, João Vitor Câmara, João Vitor Petrola, Victor Farias, Rodrigo Gomes, Pietro Portugal e a todos do “Bagre”. Obrigado pela amizade sincera.

Aos amigos Leonardo Sambonet, André Arnaud, Igor Emílio (Magão) e José Victor pela grande força e apoio dados durante a elaboração e condução desse trabalho, pelos desabafos e palavras de conforto e pela disponibilidade e companheirismo inigualáveis.

A Clara Mendes, por toda a convivência e por estar sempre ao meu lado nas dificuldades e também nas conquistas da graduação e da vida. Pelo carinho e cuidado sem iguais e por sempre se importar comigo. Obrigado por todo o amor e companheirismo.

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) pela ajuda e orientação durante toda a minha graduação.

À Universidade Federal do Ceará, por meio do DBBM, por disponibilizar o espaço e todo o material necessário para a condução desse trabalho.

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

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

RESUMO

A R-Ficoeritrina é um pigmento fotossintético proteico natural (ficobiliproteína) presente em macroalgas vermelhas, como a *Solieria filiformis*, encontrada no litoral cearense. Tal pigmento possui aplicações como sonda fluorescente em técnicas de citometria e ensaios histoquímicos além de várias aplicações na indústria farmacêutica por apresentar atividade antioxidante, atividade antitumoral e atividade anti-inflamatória já relatadas na literatura. Além disso, existe a possibilidade de sua aplicação como corante natural na indústria de alimentos. Todavia, essa molécula apresenta instabilidade espectroscópica, química e biológica em situações de temperatura e pHs extremos e intensidades de luz por longos períodos e a encapsulação tem sido realizada para aumentar a estabilidade da molécula e suas propriedades. Diferentes técnicas de encapsulamento e materiais de parede têm sido avaliadas. Sendo assim, o presente trabalho objetivou o encapsulamento da R-Ficoeritrina pura extraída de *Solieria filiformis*, utilizando iota-carragenana como agente encapsulante por meio da atomização e liofilização. A influência da concentração de iota-carragenana como agente encapsulante e a manutenção das propriedades espectroscópicas da R-FE foram avaliadas. Para tanto, foi realizada uma extração seguindo o protocolo estabelecido por Bastos-Filho (2016), na qual foi obtido rendimento de 1,6 mg R-FE/g alga seca e IP de 0,53, seguida de purificação de acordo com Lopes (2018), etapa que apresentou rendimento final de 0,6 mg R-FE/g alga seca e IP de 2,50. O pigmento foi encaminhado para secagem em *spray dryer* e liofilizador em soluções homogeneizadas com gradiente de concentração (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%) de agente encapsulante iota-carragenana. A eficiência dos métodos foi analisada por micrografia confocal e MEV, sendo constatado o sucesso das técnicas de encapsulação. O processo de secagem por *spray dryer* apresentou a formação de microcápsulas com tamanho de partícula e morfologia satisfatórias, já as propriedades espectroscópicas do pigmento foram mantidas com mais eficiência no material obtido pelo processo de liofilização.

Palavras-chave: Pigmento natural vermelho. Iota-carragenana. Macroalga marinha. *Spray dryer*. Liofilização.

ABSTRACT

R-phycoeritrin is a photosynthetic natural proteic pigment (phycobiliprotein) found in red macroalgae, such as *Solieria filiformis*, found in the cearense coast. Such pigment possess applications such as fluorescent probe in cytometry techniques and histochemists essays besides numerous applications in the pharmaceutical industry for its antioxidant, anti-tumor and anti-inflammatory activities already described in the literature. Besides that, there is the possibility of application in the food industry, as natural dye. However, this molecule presents spectroscopic, chemical and biological instability in situations of extreme temperature and pH and high light intensities for long periods and encapsulation has been used to increase the molecule stability and its properties. Many different encapsulation techniques and coating materials have been evaluated. Therefore, the present work aimed the encapsulation of pure R-phycoeritrin extracted from *S. filiformis*, using iota-carragenan as coating material, in order to increase the molecule stability through spray drying and freeze drying. The influence of the concentration of iota-carragenan as coating material and R-PE spectroscopy properties were evaluated. For that, a extraction was conducted following the protocol established by Bastos-Filho (2016), which yielded 1,6 mg R-PE/g dry algae and PI of 0,53, followed by purification according to Lopes (2018), stage that presented final yield of 0,6 mg R-PE/g dry alge and PI of 2,50. The pigment was forwarded to drying in spray dryer and freeze-dryer in homogeneous solutions with concentration gradient (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%) of coating material iota-carragenan. The efficiency of the methods was analyzed by confocal and electron scanning, being verified the success of the encapsulation techniques. The spray drying process showed microcapsule formation with satisfactory particle size and morphology, as for the spectroscopics properties of the pigment were kept with more efficiency in the freeze-dried material.

Keywords: Red natural pigment. Iota-carragenan. Red Seaweed. Spray dryer. Freeze drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre o tamanho do mercado e o potencial de valor agregado das biomoléculas e produtos derivados de macroalgas marinhas	17
Figura 2 – R-Ficoeritrina em pó comercializada pela empresa Binmei Biotechnology ..	18
Figura 3 – Radiação eletromagnética visível	20
Figura 4 – Espectros de absorção de luz dos pigmentos fotossintetizantes ficoeritrina, ficocianina e clorofila <i>a</i> presentes em macroalgas vermelhas	21
Figura 5 – Representação esquemática da membrana do tilacoide e dos ficolissomos ...	22
Figura 6 – Estrutura típica de um ficobilissomo encontrado em macroalgas vermelhas:	23
Figura 7 – Diagrama de Montagem das Subunidades de ficobiliproteínas	24
Figura 8 – Estrutura Química dos Cromóforos Bilina	25
Figura 9 – Coloração e fluorescência da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i> . Pico da cromatografia de troca iônica	26
Figura 10 – Representação das estruturas de ficoeritrinas com suas ficobilinas	27
Figura 11 – Estrutura tridimensional das subunidades α e β , do trímero e do hexâmero da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha <i>Gracilaria chilensis</i>	28
Figura 12 – Características espectroscópicas da R-Ficoeritrina pura extraída de <i>Solieria filiformis</i>	29
Figura 13 – Representação de Modelos de Microcápsulas	32
Figura 14 – Representação esquemática do processo de microencapsulação por <i>spray dryer</i>	33
Figura 15 – Representação esquemática de um liofilizador	34
Figura 16 – Representação esquemática das diferentes estruturas de unidades diméricas de carragenanas	36
Figura 17 – Macroalga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) P.W. Gabrielson (<i>Rhodophyta</i> , <i>Gigartinales</i> , <i>Solieriaceae</i>)	40

Figura 18 – Protocolo de extração da R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	41
Figura 19 – Protocolo de purificação da R-Ficoeritrina da Macroalga Vermelha <i>Solieria filiformis</i>	42
Figura 20 – Medidas de tamanho das microcápsulas de R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	54
Figura 21 – Micrografias das microcápsulas de R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> obtidas por atomização (<i>spray dryer</i>) utilizando diferentes concentrações de iota carragenana	56
Figura 22 – Micrografias das microcápsulas de R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> obtidas por atomização (<i>spray dryer</i>) utilizando diferentes concentrações de iota carragenana	57
Figura 23 – Micrografias da R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> encapsulada obtidas por liofilização utilizando diferentes concentrações de iota-carragenana	60
Figura 24 – Microscopia Confocal de R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> encapsulada (Liofilização) com diferentes concentrações de iota carragenana	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das macroalgas quanto aos pigmentos fotossintéticos, principais componentes da parede celular e função ecológica	13
Tabela 2 – Principais espécies de algas cultivadas no mundo em milhares de toneladas, entre 2000 e 2018	15
Tabela 3 – Valor comercial de ficobiliproteínas	19
Tabela 4 – Tabela de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	50
Tabela 5 – Comparação entre os valores do rendimento, recuperação e índice de pureza da R-FE nas etapas de extração e purificação relatados na literatura e no presente trabalho.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Classificação, Características Gerais e Importância Ecológica das Algas ...	12
1.1.1	<i>Rhodophyceae</i>	13
1.2	Importância Econômica das Macroalgas e das suas Biomoléculas	14
1.3	Pigmentos fotossintéticos de macroalgas marinhas	19
1.3.1	<i>Ficoeritrinas</i>	25
1.4	Extração e purificação da ficobiliproteína R-Ficoeritrina	29
1.5	Encapsulamento da R-Ficoeritrina	31
1.5.1	<i>Carragenas</i>	35
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Materiais	39
3.1.1	<i>Macroalga marinha vermelha S. filiformis</i>	39
3.1.2	<i>Reagentes químicos</i>	40
3.2	Métodos	41
3.2.1	<i>Extração da R-ficoeritrina de S. filiformis</i>	41
3.2.2	<i>Purificação da R-ficoeritrina de S. filiformis</i>	41
3.2.2.1	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	42
3.2.2.2	<i>Ultrafiltração</i>	42
3.2.3	<i>Rendimentos e índices de pureza das etapas de extração e purificação</i>	43
3.2.3.1	<i>Dosagem de proteínas totais</i>	43
3.2.3.2	<i>Rendimento de pigmentos e índice de pureza</i>	43
3.2.3.3	<i>Rendimento de proteínas totais e de R-Ficoeritrina</i>	44
3.2.3.4	<i>Recuperação da R-Ficoeritrina</i>	44
3.2.4	<i>Caracterização da Microcápsula de R-Ficoeritrina</i>	45
3.2.4.1	<i>Efeito da concentração de iota-carragenana como matriz encapsulante</i>	45
3.2.4.2	<i>Atomização</i>	45
3.2.4.3	<i>Liofilização</i>	45
3.2.5	<i>Caracterização da Microcápsula de R-Ficoeritrina de S. filiformis</i>	46

3.2.5.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	46
3.2.5.2	<i>Microscopia confocal de varredura</i>	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Extração da R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	47
4.2	Purificação da R-Ficoeritrina de <i>Solieria filiformis</i>	48
4.2.1	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	48
4.2.2	<i>Ultrafiltração</i>	49
4.3	Microencapsulação da R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	53
4.3.1	<i>Efeito da concentração de iota-carragenana como matriz encapsulante</i>	53
4.3.2	<i>Atomização</i>	53
4.3.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	54
4.3.2.2	<i>Microscopia confocal de varredura</i>	56
4.3.3	<i>Liofilização</i>	58
4.3.3.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	58
4.3.3.2	<i>Microscopia confocal de varredura</i>	60
4.4	Perspectivas	61
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classificação, Características Gerais e Importância Ecológica das Algas

De modo geral, as algas formam um grupo heterogêneo de complexa classificação, visto que o termo “alga” é designado a vários organismos que diferem em relação à sua origem, morfologia e composição química e que possuem representantes em dois dos três domínios da vida, *Eubacteria* e *Eukarya*, totalizando mais de dez mil espécies espalhadas pelos reinos *Plantae*, *Bacteria*, *Protozoa* e *Chromista* (LOURENÇO, 2006; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

As algas são geralmente classificadas em dois grandes grupos: macroalgas (algas marinhas), que ocupam faixas litorâneas e podem chegar a grandes tamanhos; e microalgas, algas microscópicas que são encontradas em regiões bentônicas, litorais e na coluna de água dos oceanos, na forma de fitoplanctons (HASAN et al., 2009; EL GAMAL, 2012). Segundo Chapman et al (1980) e El Gamal (2012), o grupo das macroalgas inclui as algas marrons ou pardas (*Phaeophyceae*), as algas verdes (*Chlorophyceae*) e as algas vermelhas (*Rhodophyceae*). A classificação das algas quanto a sua pigmentação, estrutura da parede celular e função biológica pode ser vista na Tabela 1.

As algas são importantes recursos marinhos que desempenham um papel fundamental no suporte à rica biodiversidade dos oceanos. Elas são, de modo geral, organismos fotossintetizantes, podendo ser uni ou pluricelulares, que possuem funções biológicas e ecológicas semelhantes às das plantas terrestres, porém diferindo dessas por não apresentarem raízes verdadeiras, vasos condutores especializados, folhas ou flores (BAWEJA, P., KUMAR, S., SAHOO, D., & LEVINE, I., 2016).

Observa-se, nos ambientes marinhos, que as algas atuam provendo alimento, abrigo e habitat para diversos seres vivos, além da produção de oxigênio para outros organismos, sendo fundamentais no equilíbrio do ecossistema como um todo. Assim sendo, mudanças no habitat das algas marinhas podem resultar em efeitos cascata para todo o ecossistema (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; LOURENÇO, 2006; TAYLOR; TAYLOR; KRINGS, 2009).

O aumento nas concentrações de gases estufa causado por atividades antropogênicas vem causando um profundo impacto nos ambientes marinhos, ocasionando aumento na temperatura e acidificação dos oceanos, como efeito das mudanças climáticas. Essas mudanças físicas e químicas nos oceanos podem ter efeitos devastadores para as algas e para

diversos outros organismos aquáticos indiretamente a longo prazo, prejudicando irreversivelmente o ecossistema marinho (HARLEY et al., 2012).

Tabela 1 - Classificação das macroalgas quanto aos pigmentos fotossintéticos, principais componentes da parede celular e função ecológica

Grupo	Pigmentos fotossintéticos	Principais componentes da parede celular	Função ecológica
Chlorophyta (Algas verdes)	Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides	Celulose, carbonato de cálcio em algas calcárias	Produtores primários; as algas calcárias são fontes importantes de calcário nos recifes de corais
Ochrophyta (Algas marrons)	Clorofila <i>a</i> , <i>c</i> , xantofilas	Celulose, alginatos	Produtores primários; são os principais componentes das florestas de <i>kelps</i>
Rhodophyta (Algas vermelhas)	Clorofila <i>a</i> , ficobilinas (ficocianina, ficoeritrina), carotenoides	Ágar, carragenana, carbonato de cálcio em algas coralinas	Produtores primários; as algas coralinas são fontes importantes de calcário nos recifes de corais

Fonte: Adaptado de Castro; Huber (2012).

1.1.1 Rhodophyceae

As algas vermelhas são o grupo mais diversos de macroalgas, apresentando mais de 7000 espécies. Elas são um grupo antigo de plantas aquáticas eucarióticas. As rodófitas variam consideravelmente em relação às suas respostas a fatores ambientais, tendo se adaptado a viver tanto em condições de água fresca como em água salobra, barrenta e condições marinhas (BAWEJA, P., KUMAR, S., SAHOO, D., & LEVINE, I., 2016).

Membros do grupo *Rhodophyta* conseguem tolerar uma variação de níveis de luz maior que qualquer outro grupo de organismos fotossintetizantes por apresentarem pigmentos acessórios adicionais juntamente à clorofila “a” em seus cloroplastos. A presença desses pigmentos acessórios (comumente conhecidos como ficobiliproteínas como a ficoeritrina e a ficocianina) permite que esses organismos vivam nas áreas mais inóspitas das profundezas do

oceano, onde pouca ou quase nenhuma luz solar é encontrada (BAWEJA, P., KUMAR, S., SAHOO, D., & LEVINE, I., 2016).

Os cloroplastos de algas vermelhas contêm ficobilina, um pigmento hidrossolúvel que geralmente domina a aparência do talo da planta. O aparato fotossintético das *Rhodophyceae* apresenta as ficobiliproteínas como principal pigmento absorvedor de luz. Os ficobilissomos são aglomerados polipeptídicos dessas ficobiliproteínas presentes na membrana do tilacóide das macroalgas vermelhas. Em algumas algas vermelhas a coloração varia com a razão ficoeritrina/ficocianina (VAN DEN HOEK et al., 2009).

1.2 Importância Econômica das Macroalgas e das suas Biomoléculas

A diversa utilização de algas marinhas data a partir dos primeiros registros que temos acesso das civilizações humanas. Ao redor do mundo, as algas vêm sendo utilizadas em vários contextos, contudo, o cultivo de algas para o consumo humano é o mais significativo, principalmente nas comunidades litorâneas. Atualmente, algumas das utilizações mais comuns das macroalgas marinhas são: alimentação, produção de biocombustível, fertilizantes e produção de compostos bioativos (HU, 2019).

O cultivo de macroalgas marinhas tem crescido exponencialmente nas últimas décadas, apresentando uma produtividade (em biomassa cultivada) que mais que triplicou nos últimos vinte anos, atingindo 32,4 milhões de toneladas em 2018, o que representa um valor estimado de 13,3 bilhões de dólares (US\$) (FAO, 2020). A perspectiva de crescimento exponencial deve atingir US\$ 44,7 bilhões até 2023 (FISH 2.0, 2017). Com uma grande predominância de produção por países do Leste e Sudeste asiáticos, como China, Indonésia e Coreia, as espécies mais significativas no cultivo e produção de macroalgas estão listadas na Tabela 2.

No contexto do Brasil, verifica-se que no período de 1997 a 2017 o país importou o equivalente a 79,45 milhões de dólares (20,3 mil toneladas) em biomassa e compostos bioativos de origem algácea, enquanto exportou aproximadamente duas mil toneladas a um valor de aproximadamente US\$ 2,4 milhões (DANTAS, 2018).

Tabela 2 - Principais espécies de algas cultivadas no mundo em milhares de toneladas, entre 2000 e 2018

	2000	2005	2010	2015	2016	2017	2018
Milhares de toneladas, peso vivo							
Kelp japonês (<i>Laminaria japonica</i>)	5 380.9	5 699.1	6 525.6	10 302.7	10 662.6	11 174.5	11 448.3
Macroalga eucheuma nieol ¹ (<i>Eucheuma</i> spp.)	215.3	986.9	3 479.5	10 189.8	9 775.9	9 578.0	9 237.5
Macroalga Gracilaria (<i>Gracilaria</i> spp.)	55.5	933.2	1 657.1	3 767.0	4 248.9	4 174.2	3 454.8
Wakame (<i>Undaria pinnatifida</i>)	311.1	2 439.7	1 505.1	2 215.6	2 063.5	2 341.7	2 320.4
Nori nieol (<i>Porphyra</i> spp.)	424.9	703.1	1 040.7	1 109.9	1 312.9	1 733.1	2 017.8
Musgo marinho Elkhorn (<i>Kappaphycus alvarezii</i>)	649.5	1 283.5	1 884.2	1 751.8	1 524.5	1 545.2	1 597.3
Algas pardas (<i>Phaeopyceae</i>)	2 852.8	1 827.2	3 021.2	436.8	805.0	666.6	891.5
Laver (<i>Porphyra tenera</i>)	529.2	584.2	565.2	688.5	713.4	831.2	855.0
Hijiki (<i>Sargassum fusiforme</i>)	12.1	115.6	97.0	209.3	216.4	254.6	268.7
Eucheuma espinhosa (<i>Eucheuma denticulatum</i>)	84.3	171.5	258.7	274.0	214.0	193.8	174.9
Spirulina nieol (<i>Spirulina</i> spp.)	...	48.5	93.5	81.2	73.4	72.0	69.6
Macroalgas nieol	32.5	13.6	8.9	15.2	15.8	20.0	22.5
Outras algas	47.4	25.2	37.6	22.1	24.2	28.1	27.8
Total	10 595.6	14 831.3	20 174.3	31 063.8	31 650.5	32 612.9	32 386.2

Fonte: FAO (2020). Legenda: ¹nieol – Não Incluída Em Outro Lugar; (...) – Sem produção, ou sem dados disponíveis.

De um ponto de vista bioenergético, diversos estudos mostraram a viabilidade da produção de biodiesel a partir de micro e macroalgas (LIU, X., CLARENS, A. F., & COLOSI, L. M., 2012; DEMIRBAS, A., & FATIH DEMIRBAS, M., 2011; YEW, G. Y. et al, 2019).

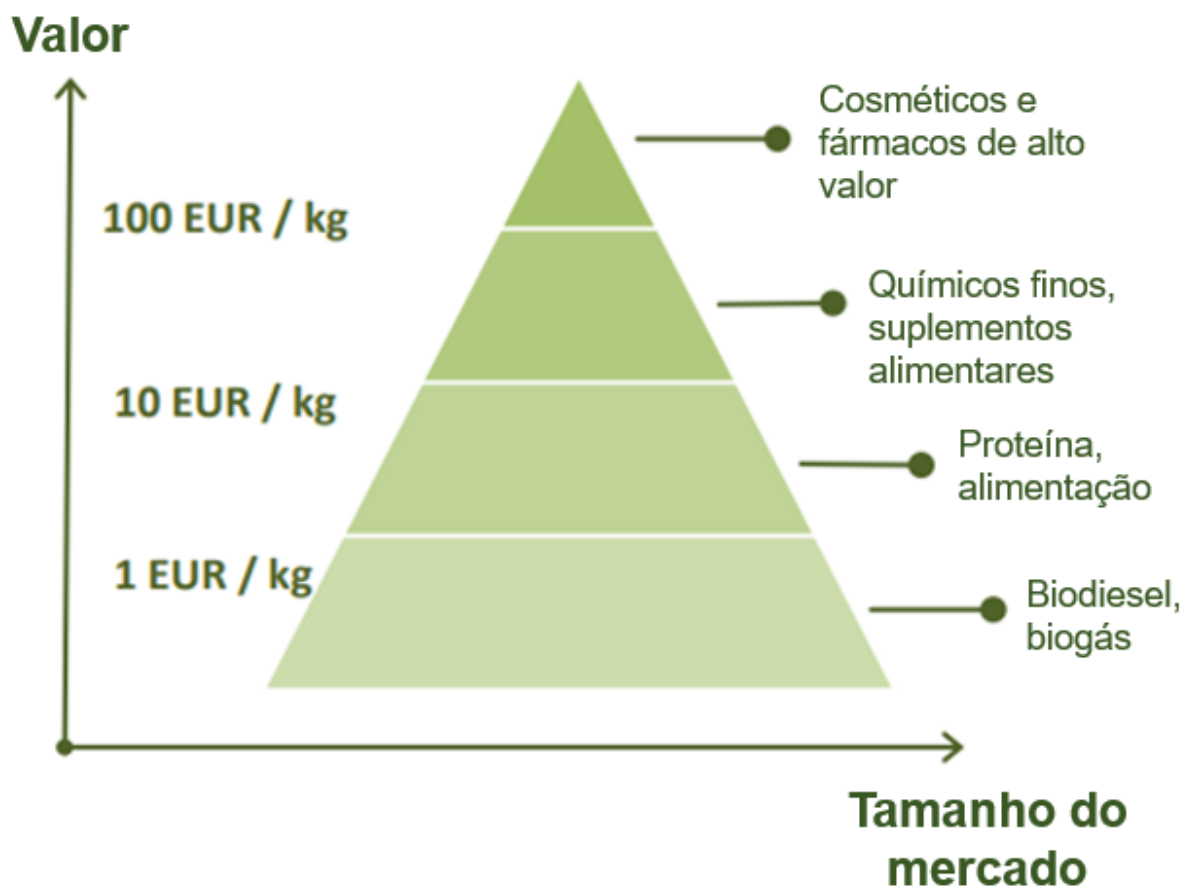
Outra utilização que vem sendo atribuída às macroalgas marinhas é a de fertilizante orgânico do solo, com o intuito de gerar uma maior produtividade de cultivares no campo (ABDEL-RAOUF N, 2012; CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014). Oliveira (2017) também evidenciou o potencial de um extrato bruto da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* como biofertilizante para culturas de alface (*Lactuca sativa*). Segundo o portal GlobalFert (2019), o mercado global de bioestimulantes de algas deve alcançar a marca de 17,1 milhões de dólares até 2025.

No setor da indústria de alimentos, as macroalgas já vêm sendo utilizadas amplamente como fonte de polissacarídeos com propriedades emulsificantes, estabilizantes, gelificantes e espessantes. Denominados de ficocolóides (hidrocolóides), o ágar e a carragenana são os principais polissacarídeos das macroalgas vermelhas e o alginato das macroalgas pardas. Os hidrocolóides das macroalgas marinhas são utilizados na fabricação de geleias, pudins, gelatinas, sorvetes, iogurtes, entre outros (DE JESUS RAPOSO et al., 2015; SULERIA et al., 2015; CASTRO; HUBER, 2012).

Como alimento, podemos observar que as macroalgas vermelhas apresentam um maior teor de proteínas do que as algas verdes e as pardas (HAMED et al., 2015), o que faz delas mais atrativas de um ponto de vista nutricional. As rodófitas também são uma excelente fonte de vitaminas, particularmente, membros das famílias de vitaminas B e C (MACARTAIN et al., 2007; VALENTE et al., 2015). Omega-3 (ω -3) ácido graxo poli-insaturado (AGPI) também é um constituinte importante na composição das algas vermelhas e é uma classe de moléculas que exercem um papel fundamental na saúde humana, ao reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas e os níveis de colesterol lipoproteína de baixa densidade, conhecido como LDL (MOHAMED et al., 2012).

As macroalgas marinhas apresentam, ainda, numerosos metabólitos secundários com propriedades farmacológicas e medicinais (EL GAMAL, 2010). Alguns exemplos são esteróides e metabólitos com atividade anti-inflamatória isolados da alga verde *Ulva laetuea* (AWAD et al., 2000) e *Cladophora fascicularis* (HIGA, 1989; KUNIYOSHI et al., 1985); enzimas com atividade anticâncer e imunossupressora da alga *Arrainvilla rawsonii* (CHEN et al., 1994). Cycloeudesmol isolado da macroalga marinha *Chondria oppositoclada* apresentou forte atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (FENICAL AND SIMS, 1974). Atividade antiviral relatada no fosfolípídeo isolado de *Ulva fasciata*, esfingosina, por Garg et al. (1992). A Figura 1 mostra um gráfico relacionando o tamanho do mercado e o valor agregado potencial para derivados de macroalgas, mostrando que os químicos finos e substâncias com aplicações farmacológicas são os compostos que possuem maior valor agregado por massa da substância.

Figura 1 – Relação entre o tamanho do mercado e o potencial de valor agregado das biomoléculas e produtos derivados de macroalgas marinhas



Fonte: Fish 2.0 (2017).

Nesse contexto de biomoléculas de macroalgas, se destacam os pigmentos fotossintéticos, como as ficoeritrinas e as ficocianinas de rodófitas. Esses pigmentos são naturais, com elevado poder corante e fluorescentes (Figura 2). Apresentam importância em virtude da carência de corantes naturais vermelhos e compostos fluorescentes no mercado (BASTOS-FILHO, 2016; GLAZER, 1984).

Com enfoque na indústria farmacêutica, várias atividades biológicas das ficobiliproteínas já foram descritas na literatura, como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, dentre outras (PAN et al., 2013; CHEN et al., 2014; GAO et al., 2015; PALIWAL et al., 2015; THANGAM et al., 2015; LEE et al., 2017; HU, 2019; LAW et al., 2019). Devido as suas propriedades espectroscópicas, como alta fluorescência e diferentes picos de absorção da luz visível, as ficobiliproteínas se apresentam como promissoras sondas fluorescentes que podem ser utilizadas em técnicas de citometria de fluxo, imunoenensaio de fluorescência, microscopia de fluorescência, ensaios imunohistoquímicos e diversas outras

aplicações biomédicas (KRONICK; GROSSMAN, 1983; WHITE, L. STRYER, 1987; FUCHS et al., 1988; LANSDORP et al., 1991; SOHN; SAUTTER, 1991; DOUCET et al., 2001; TELFORD et al., 2001; HU, 2019).

Já sob o aspecto de aplicação na indústria alimentícia, Brito (2017) aplicou a R-ficoeritrina (R-FE) extraída da macroalga vermelha *Soliera filiformis* como corante em formulações de iogurte natural.

Figura 2 – Ficoeritrina em pó comercializada pela empresa Binmei Biotechnology



Fonte: Binmei Biotechnology (2020).

Apesar da ampla aplicação dessas proteínas e do elevado volume de produção e cultivo de macroalgas no mundo, as ficobiliproteínas de macroalgas ainda são subaproveitadas e o mercado apresenta uma demanda considerável para esses biocompostos, que possuem um alto valor comercial atualmente, como evidenciado na Tabela 3, a qual mostra a comercialização desses pigmentos por diversas empresas (preços baseados no grau de pureza da biomolécula). Um levantamento realizado por Sekar et al. (2008) mostrou a existência de aproximadamente 300 patentes com o tema de ficobiliproteínas depositadas em bancos ao redor do mundo, a maioria nos Estados Unidos e Japão. Burowitzka (2013) estimou o mercado global de ficobilinas em mais de US\$ 60 milhões.

Tabela 3 – Valor comercial de ficobiliproteínas

Molécula	Prefixo	Marca	Valor (em US\$.mg⁻¹)	Referência
Ficoeritrina (FE)	B	Columbia Biosciences	20,40	(BIOSCIENCES, 2020a)
	R	Columbia Biosciences	10,20	(BIOSCIENCES, 2020b)
	R	Agilent	26,00	(AGILENT, 2020a)
	B	Sigma-Aldrich	367,00	(ALDRICH, 2020a)
	R	Sigma-Aldrich	163,00	(ALDRICH, 2020b)
Ficocianina (FC)	C	Agilent	26,00	(AGILENT, 2020b)
	C	Sigma-Aldrich	16,90	(ALDRICH, 2020c)
Aloficocianina (AFC)	-	Columbia Biosciences	40,80	(BIOSCIENCES, 2020c)
	-	Agilent	26,00	(AGILENT, 2020c)
	-	Sigma-Aldrich	423,00 ^a	(ALDRICH, 2020d)

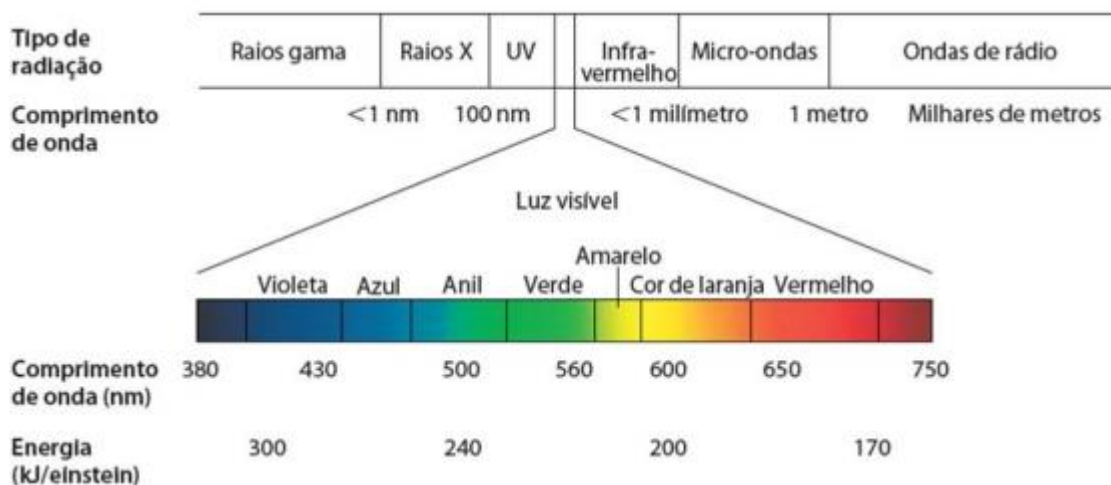
Fonte: Adaptado de Lopes, 2018. Legenda: a – AFC vendida em volume de 0,5 mL.

1.3 Pigmentos fotossintéticos de macroalgas marinhas

As ficobiliproteínas são uma família de pigmentos hidrossolúveis, que são geralmente ligados covalentemente a um grupo prostético, chamado de cromóforo, bilina ou ficobilina. Elas são encontradas no citoplasma ou estroma de cianobactérias e algas do grupo das rodófitas, glaucófitas e criptomonas (APT et al., 1995; GLAZER et al., 1976, 1988, 1989, 1994; MACCOLL, 1998; ZHANG; CHEN, 1999). Lourenço (2006) evidencia que a ficobilina é o pigmento fotossintético em si, porém ele não apresenta atividade se não houver uma proteína acoplada a sua estrutura. Em algas vermelhas o conteúdo relativo dessas proteínas é geralmente alto, podendo chegar a 50% do total de proteínas hidrossolúveis (GANTT AND LIPSCHULTZ, 1974; KE, 2001) e pode representar até 20% da alga seca (BOGORAD, 1975).

As ficobiliproteínas apresentam capacidade de absorção eletromagnética na região do espectro da luz visível (Figura 3), fornecendo energia suficiente para disparar uma sequência de reações de transferência de elétrons até o centro de reação do fotossistema II, integrando uma complexa e eficiente cadeia de transmissão essencial à fotossíntese (GLAZER, 1989; NELSON; COX, 2014; SFRISO; GALLO; BALDI, 2018).

Figura 3 – Radiação eletromagnética visível



Fonte: Nelson, Cox (2014).

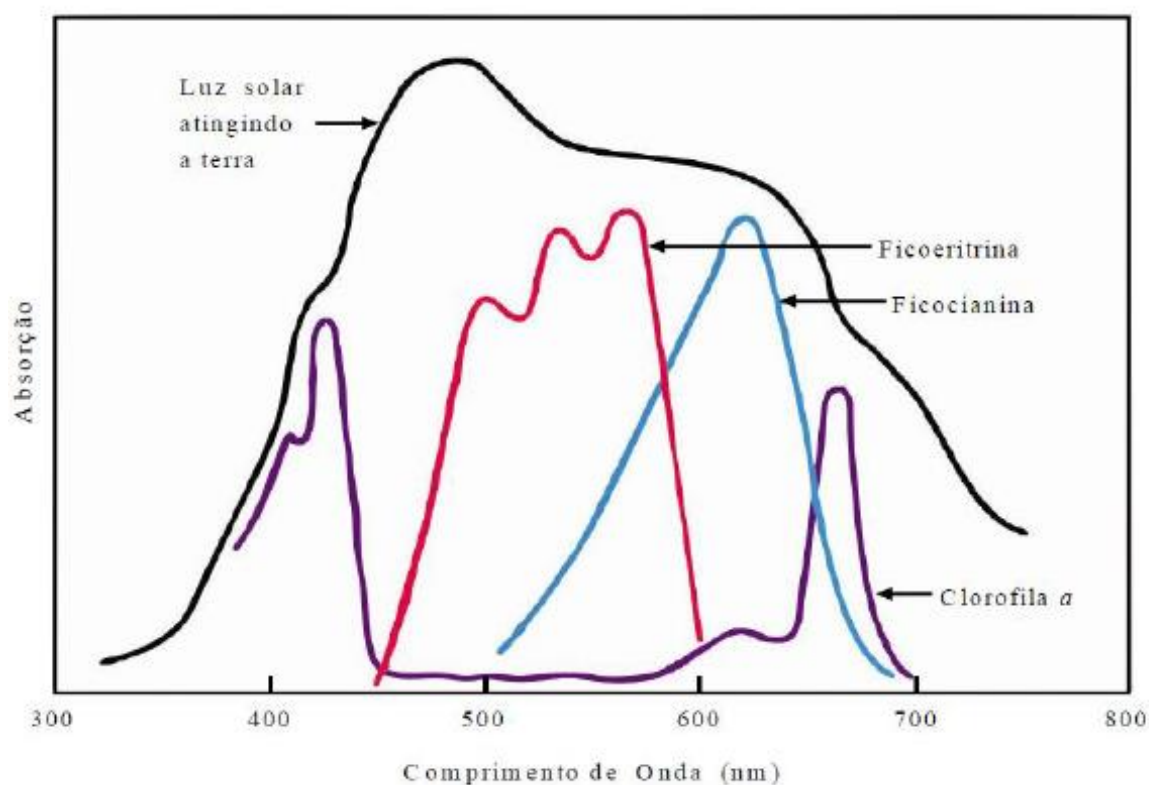
O espectro de luz visível corresponde a radiação com comprimento de onda na faixa de 400 a 700 nm e é chamado de radiação fotossintética ativa. Por um processo conhecido como aclimação cromática complementar, os organismos fotossintetizantes conseguem ajustar sua estrutura de captação de luz para permitir a absorção dos diferentes comprimentos de luz desse espectro, dependendo da profundidade onde se encontram (KAISER et al., 2005; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009).

Assim sendo, verifica-se que os organismos que crescem em águas rasas apresentam maior teor de ficocianinas, que são pigmentos especializados em absorver luz amarela/vermelha. Já os organismos de águas profundas apresentam maior conteúdo de ficobilinas como as ficoeritrinas, especializadas em absorver luz azul/verde, visto que essa radiação é mais abundante em águas profundas (SAGERT; SCHUBERT, 1995; KEHOE; GUTU, 2006; KEHOE, 2010). As algas vermelhas, por exemplo, são capazes de se desenvolver e crescer fartamente em altas profundidades pelo alto teor de ficoeritrinas em seus tilacoides, pois essas ficobiliproteínas têm uma eficiente absorção de luz na faixa de 450 a 570 nm (WANG et al., 2015).

As ficobilinas dão às ficobiliproteínas diferentes propriedades espectroscópicas, como coloração e faixa de absorção de luz, que pode variar de 450 a 670 nm, região na qual a clorofila apresenta baixa taxa de absorção (ADIR; LERNER, 2003; LUNDELL et al., 1981; MACCOLL, 1998). As ficobiliproteínas podem ser classificadas em três grandes grupos de acordo com o nível de energia da ficobilina ou comprimento de onda máximo (λ_{max}) na região do espectro de absorção da luz visível (Figura 4), que podem ser: de alta energia, como as ficoeritrinas (FE) ($\lambda_{\text{max}} = 540\text{-}570$ nm) e as ficoeritrocianinas (FEC) ($\lambda_{\text{max}} = 570$ nm); de

energia intermediária, como as ficocianinas (FC) ($\lambda_{\text{max}} = 610\text{-}620\text{ nm}$); e as de baixa energia, aloficocianinas (AFC) ($\lambda_{\text{max}} = 650\text{-}655\text{ nm}$) (MACCOLL, 1998; HU, 2019). As ficobiliproteínas podem ainda ser classificadas quanto a sua cor em dois grupos: as de coloração vermelha, ficoeritrinas, e as de coloração azul, ficocianinas (O'CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980). O uso de prefixos na identificação de FE e FC são em referência a sua origem taxonômica. Por exemplo, R- é o prefixo utilizado para os pigmentos de origem de Rodófitas, B- para algas da ordem Bangiales e C- para pigmentos de origem de Cianobactérias (KORNPROBST, 2011; W. LI et al., 2019).

Figura 4 – Espectros de absorção de luz dos pigmentos fotossintetizantes ficoeritrina, ficocianina e clorofila *a* presentes em macroalgas vermelhas



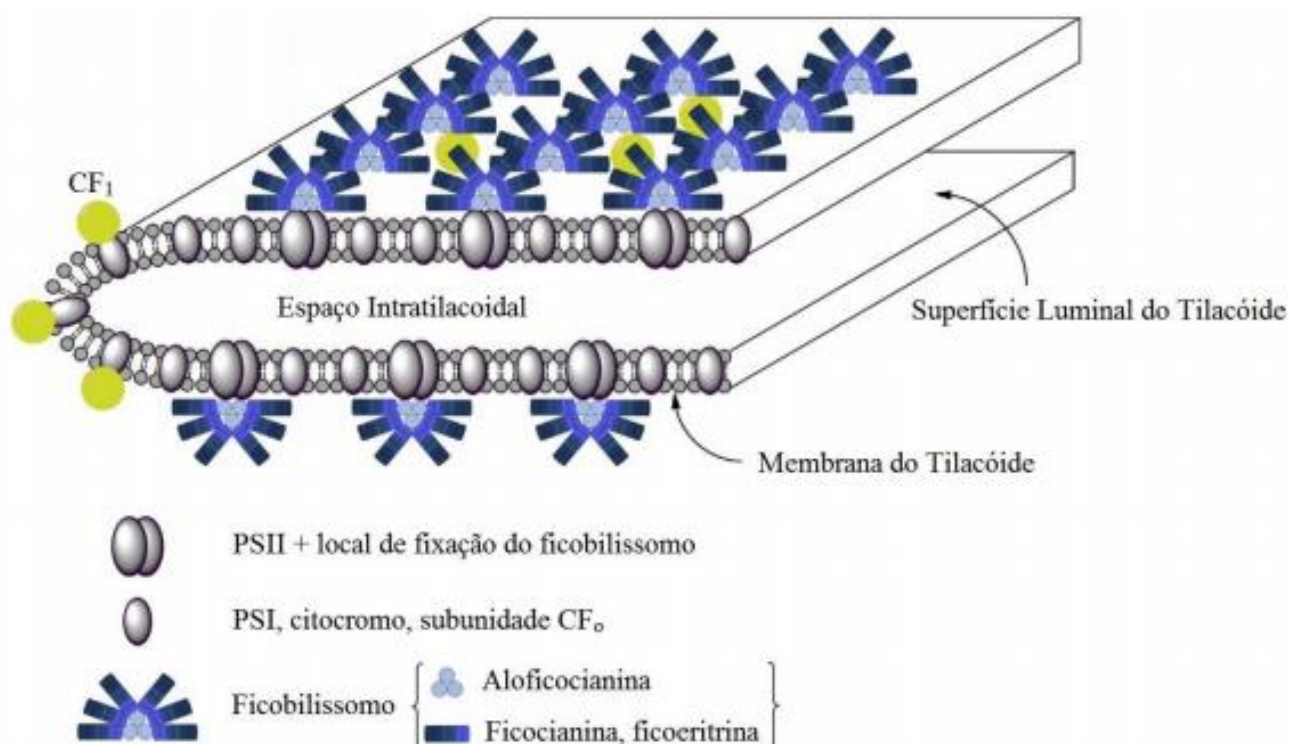
Fonte: Adaptado de Nelson & Cox (2014).

As ficobiliproteínas são estruturas supramoleculares organizadas, *in vivo*, em estruturas moleculares chamadas de ficobilissomos (GANTT, 1980). A principal função desse coletor de fótons é a sobrevivência dos organismos em ambientes com baixa intensidade de luz. De fato, quando as radiações vermelhas e amarelas vão desaparecendo com o aumento da profundidade na água, os ficobilissomos se mostram capazes de absorver luz em zonas espectrais nas quais a clorofila é ineficiente, e, por conseguinte, transmitir essa energia para o

centro reativo do fotossistema II (GLAZER, 1989; KE, 2001).

Os ficobilissomos são encontrados na parede externa do tilacoide, no estroma, como mostra a Figura 5. O ficobilissomo é constituído basicamente por uma associação de ficobiliproteínas e peptídeos de ligação (LUNDELL; WILLIAMS; GLAZER, 1981; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995).

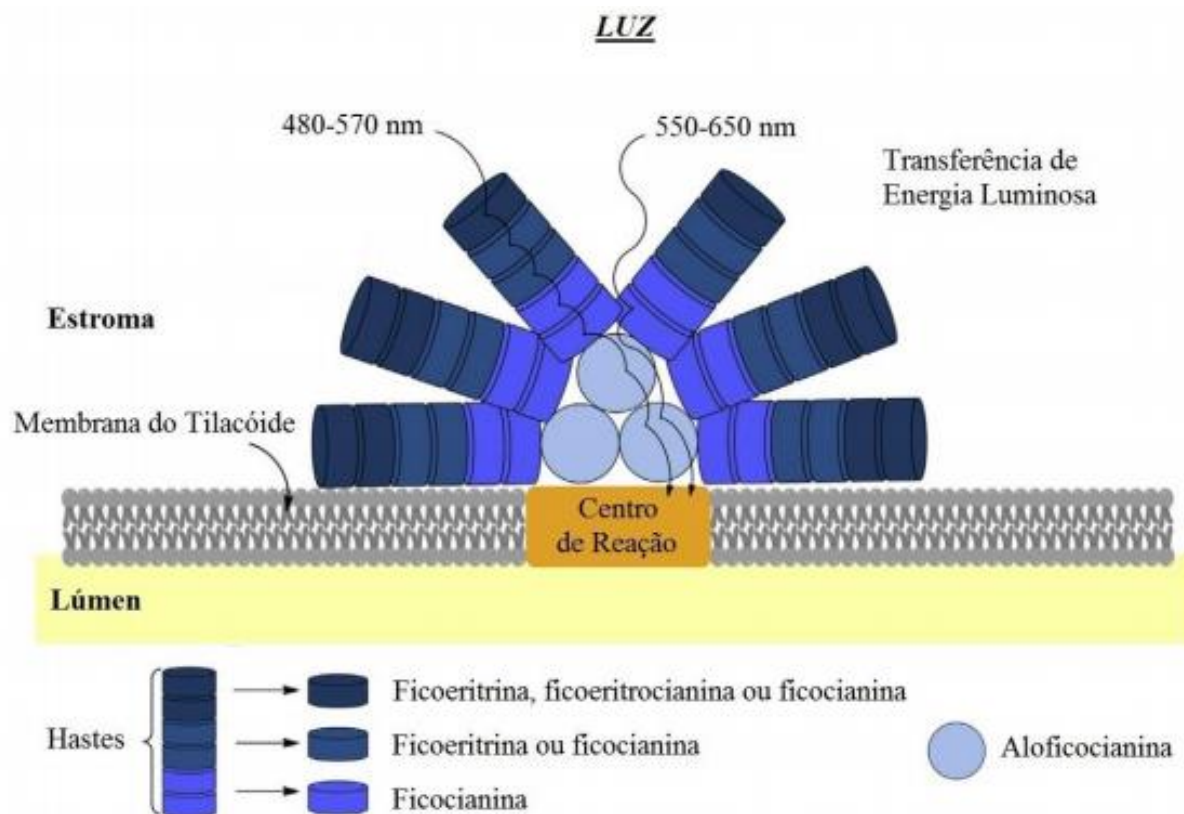
Figura 5 – Representação esquemática da membrana do tilacoide e dos ficobilissomos



Fonte: Dumay et al., 2014. Legenda: PS: Fotossistema; CF: Fator de acoplamento.

A estrutura do ficobilissomo (Figura 6) permite que a energia de excitação proveniente da luz solar atinja o centro reacionário fotossintético, partindo de qualquer um dos vários cromóforos presentes em sua composição, com uma eficiência de aproximadamente 100% (GLAZER, 1984, 1989). O arranjo das ficobilinas na conformação do ficobilissomo faz com que a transferência de energia luminosa ocorra a partir da absorção pela ficoeritrina ou ficoeritrocianina, passando para a ficocianina, posteriormente a aloficocianina para finalmente chegar a clorofila *a* do centro de reação, por transferência de éxcitons (BALD, KRUIP, & RÖGNER, 1996; GLAZER & HIXSON, 1977; SUN, WANG, GONG, & CHEN, 2004; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; BERMEJO ROMÁN et al., 2002; NELSON; COX, 2014).

Figura 6 – Estrutura típica de um ficobilissomo encontrado em macroalgas vermelhas



Fonte: Dumay et al., 2014.

O ficobilissomo possui duas estruturas distintas: as hastes e o núcleo. O núcleo é essencialmente composto por aloficocianinas. Já as hastes são constituídas pelos pigmentos fotossintéticos ficocianina e ficoeritrina, onde o pigmento de maior energia fica situado na ponta das hastes (ficoeritrina) e o de menor energia, fica alojado na base da haste (ficocianina) (DUMAY et al., 2014; BASTOS-FILHO, 2016).

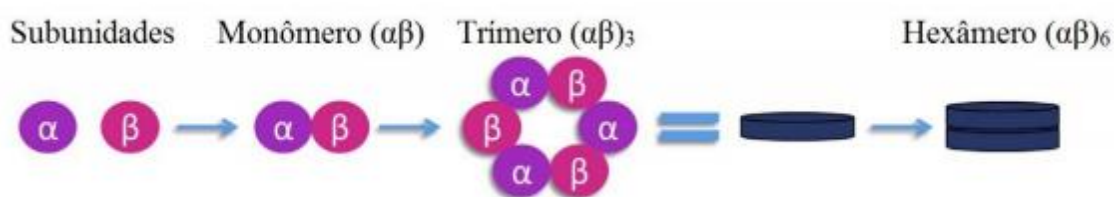
A conexão entre as hastes, o núcleo e a membrana do tilacoide ocorre pela presença de peptídeos de ligação, que, dependendo da espécie, podem chegar a representar 15% da porção proteica do ficobilissomo (TANDEAU DE MARSAC & COHEN-BAZIRE, 1977). As principais funções dos peptídeos de ligação são fixar o ficobilissomo à membrana do tilacoide e estabilizar a estrutura do ficobilissomo (DUMAY et al., 2014).

Os peptídeos de ligação podem ser classificados a partir do seu peso molecular em quatro grupos: Grupo I ou L_{CM} (70–120 kDa), com função de fixação do núcleo à membrana do tilacoide, e, também, atua comoceptor final de éxcitons, contribuindo para a transferência de energia luminosa ao fotossistema II; Grupo II ou L_R (25-35 kDa), atuando na estabilização da ficobiliproteína e fixação da haste no núcleo; Grupo III (12-22 kDa), grupo constituído de subunidades de ficobiliproteínas e, finalmente, Grupo IV ou L_C (9-12 kDa), com função de

montagem e fixação do núcleo (DUCRET ET AL., 1998; GLAZER, 1984).

As ficobiliproteínas são constituídas de duas subunidades (α e β) e uma terceira subunidade diferente (γ), que é encontrada nas ficoeritrinas (FE) atuando como peptídeo de ligação. (GLAZER; HIXSON, 1975; SIDLER, 1994; GALLAND-IRMOULI et al., 2000; NIU; WANG; TSENG, 2006, DUMAY et al., 2014). As subunidades estão dispostas na forma de disco como ilustra a Figura 7.

Figura 7 – Diagrama de Montagem das Subunidades de ficobiliproteínas

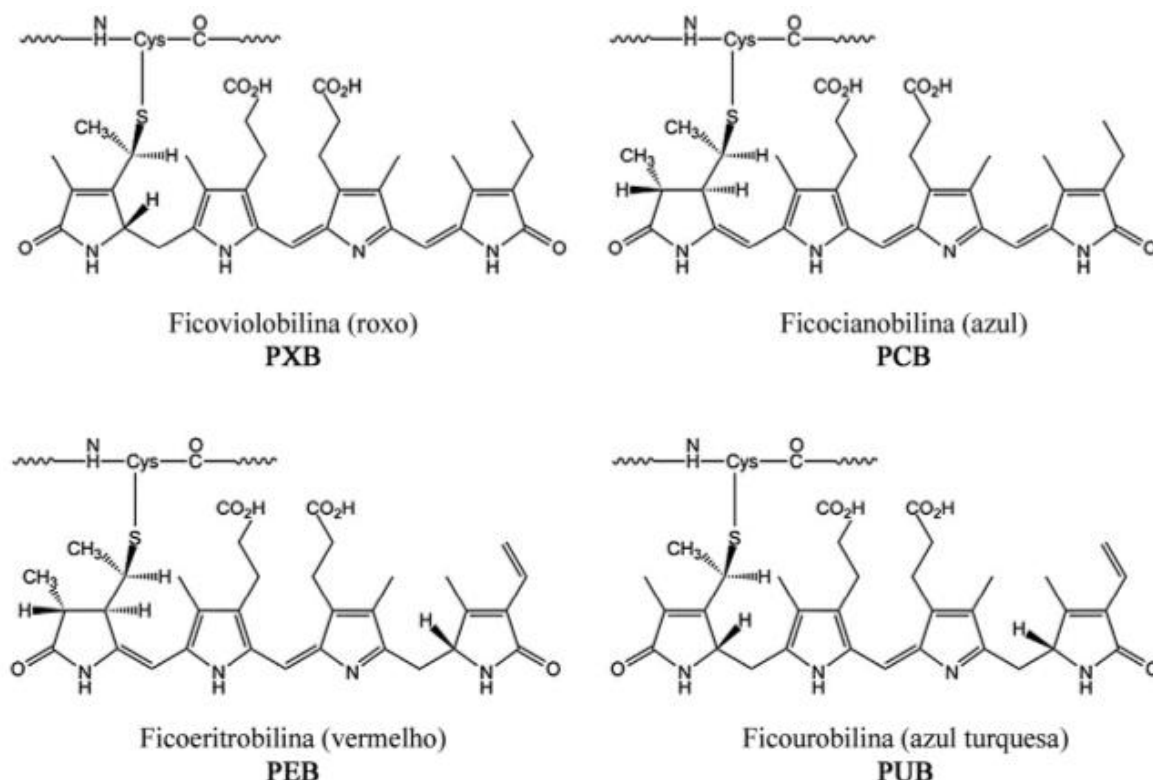


Fonte: Dumay et al., 2014.

A ficoeritrocianina pode ser encontrada na forma trimérica $[(\alpha\beta)_3]$ ou hexamérica $[(\alpha\beta)_6]$; a aloficocianina se apresenta na forma trimérica $[(\alpha\beta)_3]$; a ficocianina apresenta duas conformações possíveis, com base no pH, podendo ser hexamérica $[(\alpha\beta)_6]$ em pH 5-6 ou trimérica $[(\alpha\beta)_3]$ em pH 7,0; A ficoeritrina por sua vez pode ser encontrada na sua forma hexamérica com a subunidade gama (γ) $[(\alpha\beta)_6\gamma]$, assim como sem a subunidade gama $[(\alpha\beta)_6]$, variando de acordo com o organismo da qual a FE foi isolada (BOGORAD, 1975; GANTT & LIPSCHULTZ, 1974; GLAZER, 1994; SUN et al., 2009, DUMAY et al., 2014).

As bilinas são grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadeia aberta ligados covalentemente por ligações do tipo tioéster a resíduos de cisteína. Em cada subunidade das ficobiliproteínas podem existir uma ou mais bilinas ligadas, podendo ser de quatro tipos (Figura 8): ficoeritrobilina (PEB, $\lambda_{\max} = 560$ nm), de coloração vermelha; ficourobilina (PUB, $\lambda_{\max} = 450$ nm), com coloração amarela; ficocianobilina (PCB, $\lambda_{\max} = 620-650$ nm), de coloração azul; e ficoviolobilina (PXB, $\lambda_{\max} = 575$ nm), que apresenta coloração púrpura (BRITO, 2017; O'CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980; GLAZER, 1994; SUN et al., 2003; APT, COLLIER, & GROSSMAN, 1995; DUMAY et al., 2014).

Figura 8 – Estrutura Química dos Cromóforos Bilina



Fonte: Dumay, 2014.

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

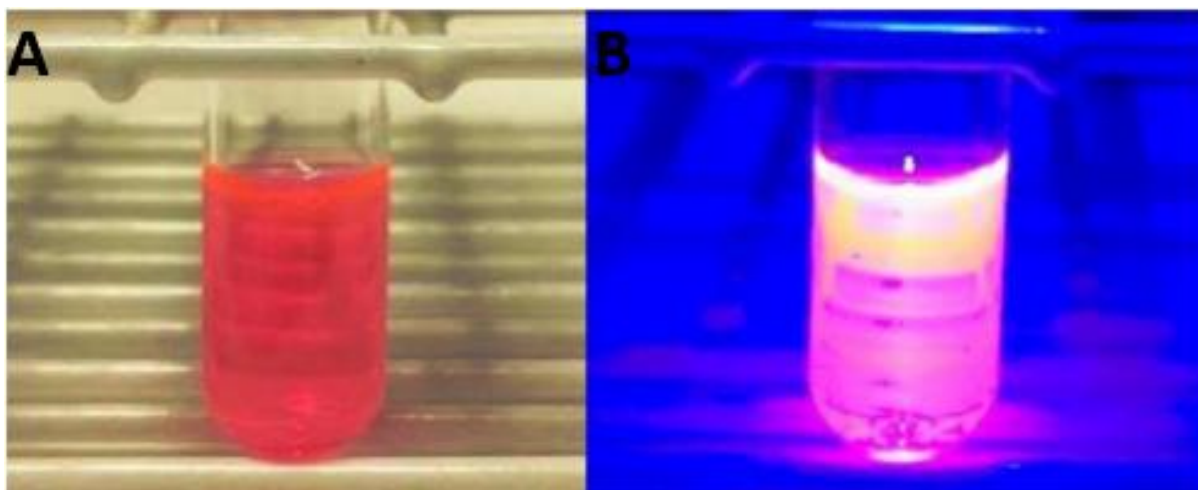
1.3.1 Ficoeritrinas

Ficoeritrinas são o pigmento principal encontrado em rodófitas, mas também podem ser encontrados em cianobactérias (GLAZER, 1994; DUMAY et al., 2014). Elas são conhecidas também por representarem o grupo de ficobiliproteínas mais dinâmico, devido as suas propriedades espectrais de absorção e fluorescência (em torno de 575 nm), como mostra a Figura 9 (BASTOS-FILHO, 2016; SUN et al., 2003).

Assim como outras ficobiliproteínas, diferentes formas de ficoeritrinas ocorrem dependendo da espécie e essas podem ser classificadas também em relação as suas propriedades espectroscópicas, sendo divididas em cinco grupos: B-Ficoeritrina (B-FE)

$[(\lambda_{\text{max}} = 565 \text{ nm}, 545 \text{ nm}, \text{ e um ombro a } 499 \text{ nm})]$, b-Ficoeritrina (b-FE) $[(\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}, \text{ e um ombro a } 565 \text{ nm})]$, C-Ficoeritrina (C-FE) $[(\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm})]$, CU-Ficoeritrina (CU-FE) $[(\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}, 540 \text{ nm e/ou } 565 \text{ nm})]$ e R-Ficoeritrina (R-FE) $[(\lambda_{\text{max}} = 565 \text{ nm}, 498 \text{ nm e um ombro/pico a } 545 \text{ nm})]$ (BOGORAD, 1975; GLAZER et al., 1976; BRYANT, 1982; SIDLER, 1994; DUMAY et al., 2014). B-PE e R-PE são mais abundantes em algas vermelhas. Já b-FE, C-FE e CU-FE são encontradas em cianobactérias (DUMAY et al., 2014; ZHAO et al., 2013; BERMEJO; TALAVERA; ALVAREZ-PEZ, 2001; WANG et al., 2015). Por possuir cromóforos e características de absorção semelhantes à R-Ficoeritrina, a CU-Ficoeritrina é geralmente classificada como R-FE (STADNICHUK, 1995).

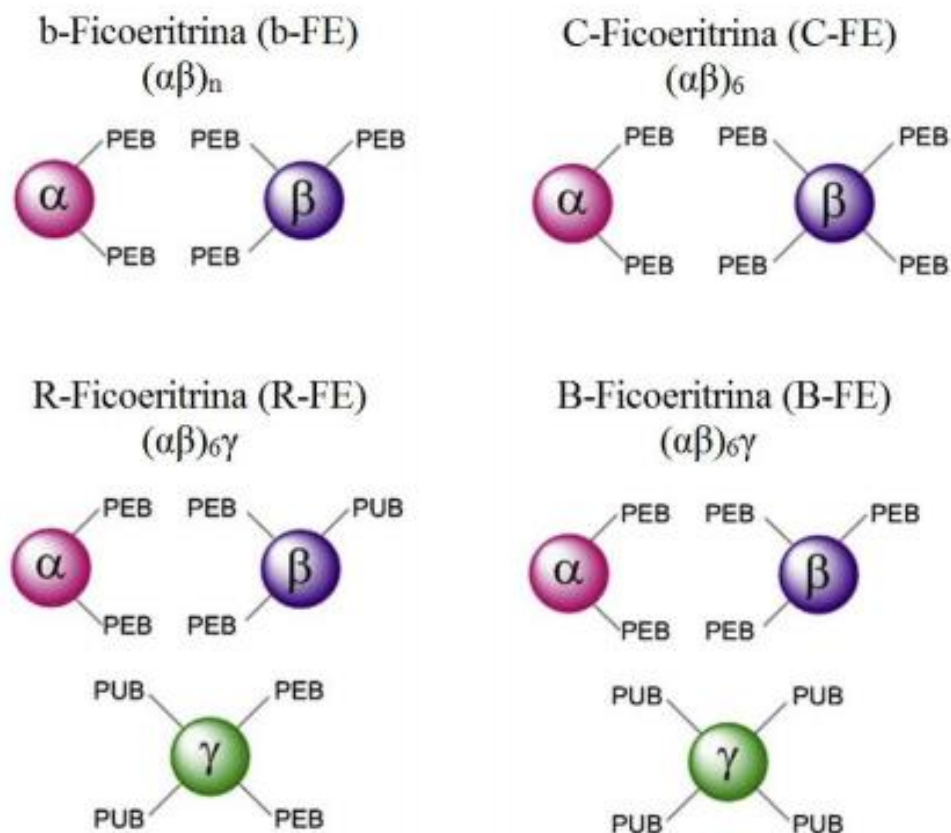
Figura 9 – Coloração e fluorescência da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*. Pico da cromatografia de troca iônica



Fonte: Bastos-Filho, 2016. Legenda: A - Coloração da R-Ficoeritrina sob luz branca; B – Fluorescência da R-ficoeritrina sob luz azul.

As diferenças espectrais de absorbância entre os tipos de ficoeritrina ocorrem devido à quantidade e disposição espacial das ficobilinas presentes na sua composição. B-FE e R-FE são compostas por subunidades α , β e γ , sendo descritas como complexos hexaméricos $(\alpha\beta)_6\gamma$, enquanto b-FE e C-FE são formados por $(\alpha\beta)$ sem a subunidade γ (Figura 10) (GLAZER et al., 1983; ISAILOVIC; LI; YEUNG, 2004; SUN et al., 2009).

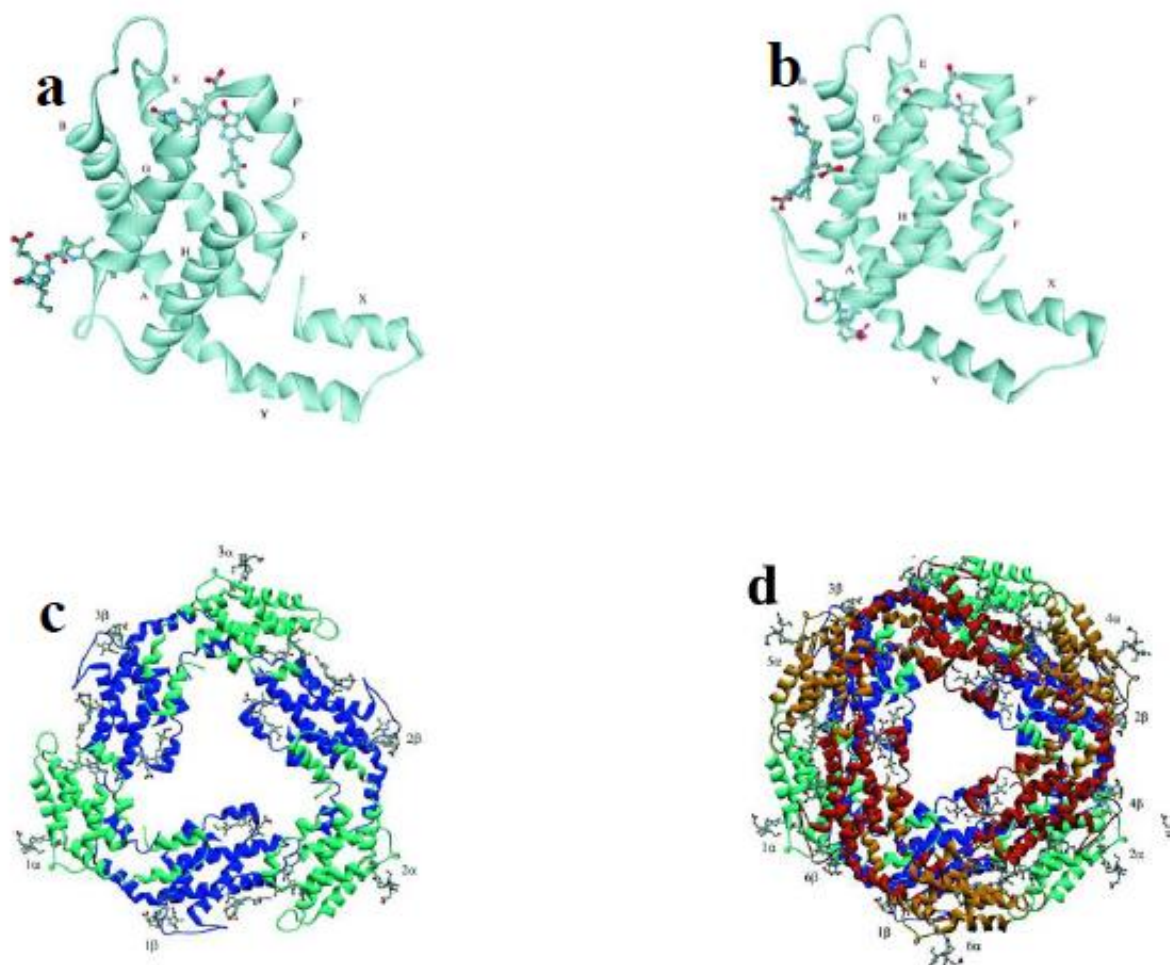
Figura 10 – Representação das estruturas de ficoeritrinas com suas ficobilinas



Fonte: Dumay et al., 2014.

Contreras-Martel et al. (2001) determinaram a estrutura tridimensional cristalográfica da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *Gracilaria chilensis*, em que evidenciou os cromóforos ligados às subunidades α (Figura 11a) e β (Figura 11b), além de determinar as estruturas trimérica (Figura 11c) e hexamérica (Figura 11d) formadas por essas subunidades. Há relatos de cristais de R-Ficoeritrina de outras macroalgas (CHANG et al., 1996; Miyabe et al., 2017).

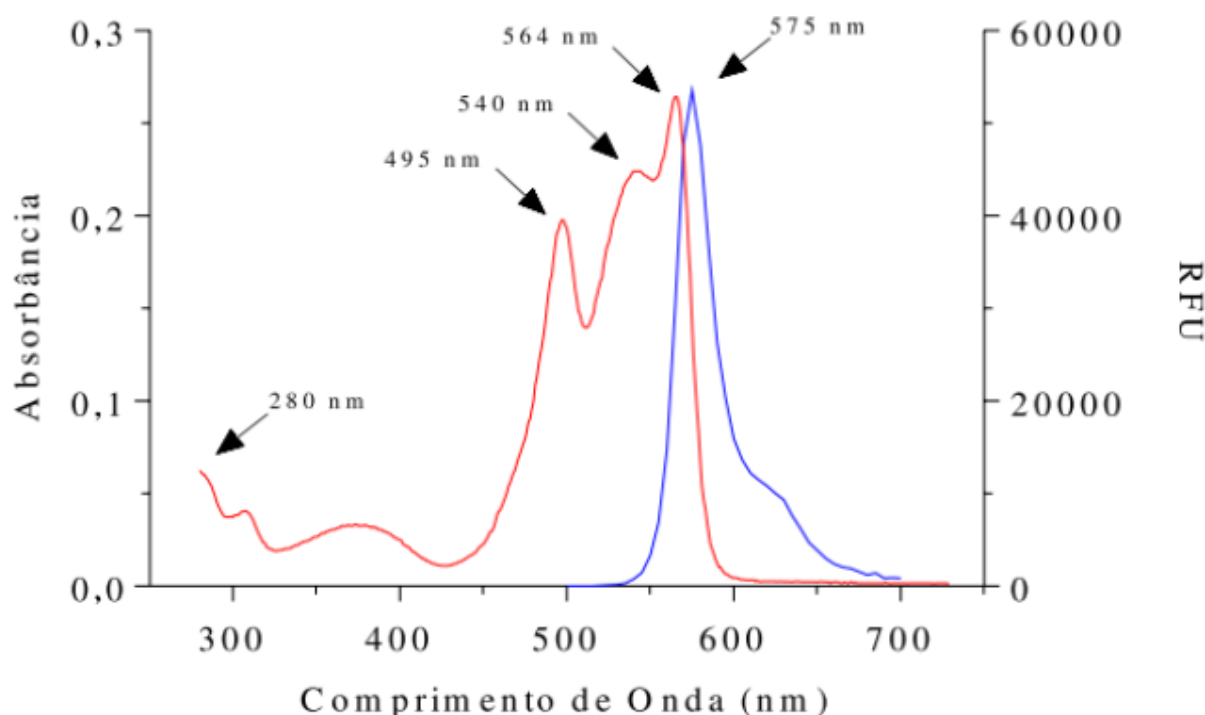
Figura 11 - Estrutura tridimensional das subunidades α e β , do trímero e do hexâmero da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *Gracilaria chilensis*



Fonte: Adaptado de Contreras-Martel et al. (2001). Legenda: (a) estrutura da subunidade α ligada a duas ficobilinas; (b) estrutura da subunidade β ligada a três ficobilinas; (c) estrutura trimérica da R-Ficoeritrina ($\alpha\beta$)₃; (d) estrutura hexamérica da R-Ficoeritrina ($\alpha\beta$)₆

As características espectroscópicas da R-FE pura, extraída da macroalga vermelha *S. filiformis*, foram relatadas por Bastos-Filho (2016). A figura 12 mostra os picos de absorção a 495 e 564 nm, o ombro de absorção a 540 nm e o pico de fluorescência a 575 nm quando excitada a 495 nm.

Figura 12 – Características espectroscópicas da R-Ficoeritrina pura extraída de *Solieria filiformis*



Fonte: Bastos-Filho, 2016. Legenda: Linha vermelha – perfil de absorvância; Linha Azul – perfil de fluorescência. RFU – Unidade Relativa de Fluorescência

1.4 Extração e purificação da ficobiliproteína R-Ficoeritrina

Devido à R-Ficoeritrina ser um composto intracelular, são necessários métodos de rompimento da parede celular para a sua eficiente liberação durante o processo de extração (MITTAL et al., 2017). Há diversos métodos relatados na literatura, tais como: maceração em nitrogênio líquido e/ou moinhos (MUNIER et al., 2014; SUDHAKAR et al., 2015; WU et al., 2015; PEREIRA et al., 2020), ultrassonicação (LE GUILLARD et al., 2015; MITTAL et al., 2017; PEREIRA et al., 2020), homogeneização (HARNEDY; FITZGERALD, 2013), catálise enzimática (DUMAY et al., 2013; MITTAL; RAGHAVARAO, 2018), e também a combinação de dois ou mais métodos, a fim de se melhorar o rendimento de pigmento (LE GUILLARD et al., 2015). Contudo a presença de grandes concentrações de polissacarídeos na parede celular das rodófitas dificulta a eficiência dos processos de extração e purificação, sendo necessárias várias operações unitárias para se alcançar um alto rendimento e eficiência, ressaltando que o acréscimo dessas operações é inversamente proporcional ao rendimento final do produto (KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982; MITTAL et al., 2017).

Por ser uma molécula hidrossolúvel, a R-Ficoeritrina é comumente extraída em solventes aquosos – sendo o tampão fosfato o mais utilizado (SUDHAKAR et al., 2015) – a partir de diferentes estados da matéria-prima, podendo ser alga úmida (GU et al., 2018; SENTHILKUMAR et al., 2013a; SUDHAKAR et al., 2015; WANG et al., 2015), alga congelada (NIU; WANG; TSENG, 2006) e alga liofilizada (GALLAND-IRMOULI et al., 2000; MUNIER et al., 2014; NGUYEN et al., 2020; PEREIRA et al., 2020).

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

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

O fracionamento proteico com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é costumeiramente o método utilizado imediatamente após a extração dos pigmentos das macroalgas vermelhas, como primeira etapa de purificação, segundo a literatura (NAIR et al., 2018; SENTHILKUMAR et al., 2013a; SUN et al., 2009; WANG et al., 2015; WU et al., 2015), alcançando índices de pureza de 1,4 (LIU et al., 2005), 1,62 (NAIR et al., 2018) e 2,38 (SENTHILKUMAR et al., 2013) de R-Ficoeritrina das espécies *Polysiphonia urceolata*, *Centroceras clavulatum* e *Bangia fuscopurpurea*, respectivamente. Todavia, metodologias que excluem essa etapa de fracionamento proteico, como a proposta por Lopes (2018) que apresentou IP final de 2,36, são opções viáveis para aplicações que não exigem uma pureza da R-FE tão elevada ou para baratear o processo de purificação, por eliminar uma operação unitária.

A etapa seguinte de purificação de proteínas e, portanto, de pigmentos, é representada pelas cromatografias, que são aplicadas com o objetivo de aumentar o IP das biomoléculas. Cromatografias de troca-iônica (carga das moléculas), exclusão molecular (tamanho das moléculas), interação hidrofóbica (hidrofobicidade) e hidroxapatita (afinidade) foram utilizadas para a purificação de R-FE de diversas macroalgas vermelhas. Nguyen et al. (2020) e Wu et al. (2015) alcançaram índices de pureza de 3,25 e 5,2 para R-FE das espécies *Gracilaria gracilis* e *Portieria hornemannii*, respectivamente. Nair et al. (2018), por sua vez, encontraram pureza de 6,34 para a R-FE da macroalga *Centroceras clavulatum*. Cromatografias sequenciadas também foram relatadas na literatura. Bastos-Filho (2016)

alcançou pureza 4,5 para R-FE da macroalga *S. filiformis* utilizando em sequência as cromatografias de troca-iônica e de exclusão molecular.

Eletroforese também foi utilizada como método de purificação de R-Ficoeritrina da macroalga *Palmaria palmata*, alcançando IP de 3,2, como relatado por Galland-Irmouli et al. (2000).

1.5 Encapsulamento da R-Ficoeritrina

As ficoeritrinas apresentam uma coloração rosa vibrante que é atrativa para a indústria, destacando-se a potencial aplicação na indústria alimentícia. Além disso, já foi relatado o potencial antioxidante das R-FE, evidenciando que seu consumo pode trazer benefícios para a saúde. Ademais, podem ser atribuídas diversas aplicações biomédicas às ficoeritrinas, devido às suas propriedades espectroscópicas. Todavia, de acordo com a literatura, a R-FE possui instabilidade quando armazenada em temperatura ambiente, e quando exposta a temperaturas muito elevadas, pHs extremos e intensidades de luz durante um período longo (ZHAO et al., 2013; SENTHILKUMAR et al., 2013a; MUNIER et al., 2014; WU et al., 2015).

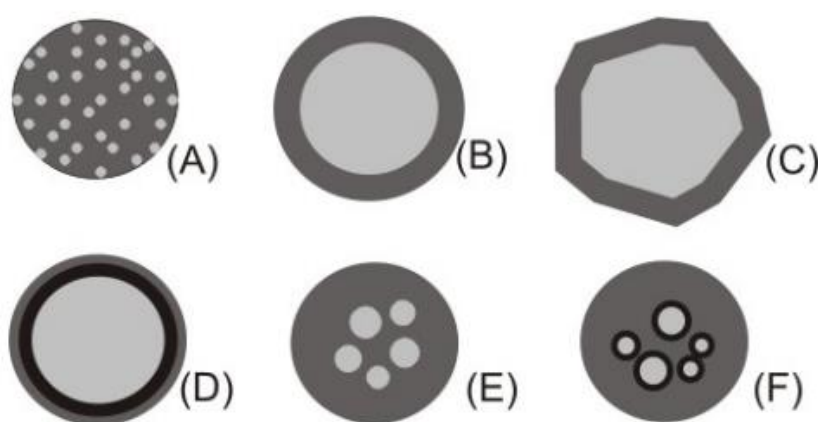
Devido a essa instabilidade espectroscópica da R-FE frente à diferentes pH, luz e temperatura, a microencapsulação pode ser uma estratégia utilizada para aumentar a estabilidade do pigmento e ampliar suas possibilidades de aplicações em produtos industrializados, por exemplo, como corante alimentício (BASTOS-FILHO, 2016; BRITO, 2017; GANESAN & SHANMUGAM, 2020).

A encapsulação é um processo de empacotamento de partículas (ex: compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, conservantes) em cápsulas (KAREL, LANGER, 1988). O material encapsulado é denominado de núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (GIBBS, 1999). Segundo Baker (1986), as cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em 3 categorias: macro- (>5000 µm), micro- (0,2-5000 µm) e nanocápsulas (<0,2 µm).

Em termos de construção, as cápsulas podem ser divididas em dois grupos: aquelas nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede; e aquelas nas quais o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz. O primeiro grupo pode ser classificado como sistema do tipo reservatório, e caracteriza as “verdadeiras” microcápsulas; e o segundo, classificado como sistema matricial, resulta nas chamadas microsferas (KING, 1995; RÉ, 1998).

A principal diferença entre as microcápsulas e as microsferas está no fato de que, nas microsferas, uma pequena fração do material “encapsulado” permanece exposto na superfície, o que é evitado pela verdadeira encapsulação. No entanto, o termo ‘encapsulação’ tem sido usado em seu sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas quanto de microsferas (DEPYPERE, 2003). As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo (CONSTANT; STRINGHETA, 2002). A Figura 13 apresenta alguns dos principais modelos de microcápsulas.

Figura 13 – Representação de Modelos de Microcápsulas



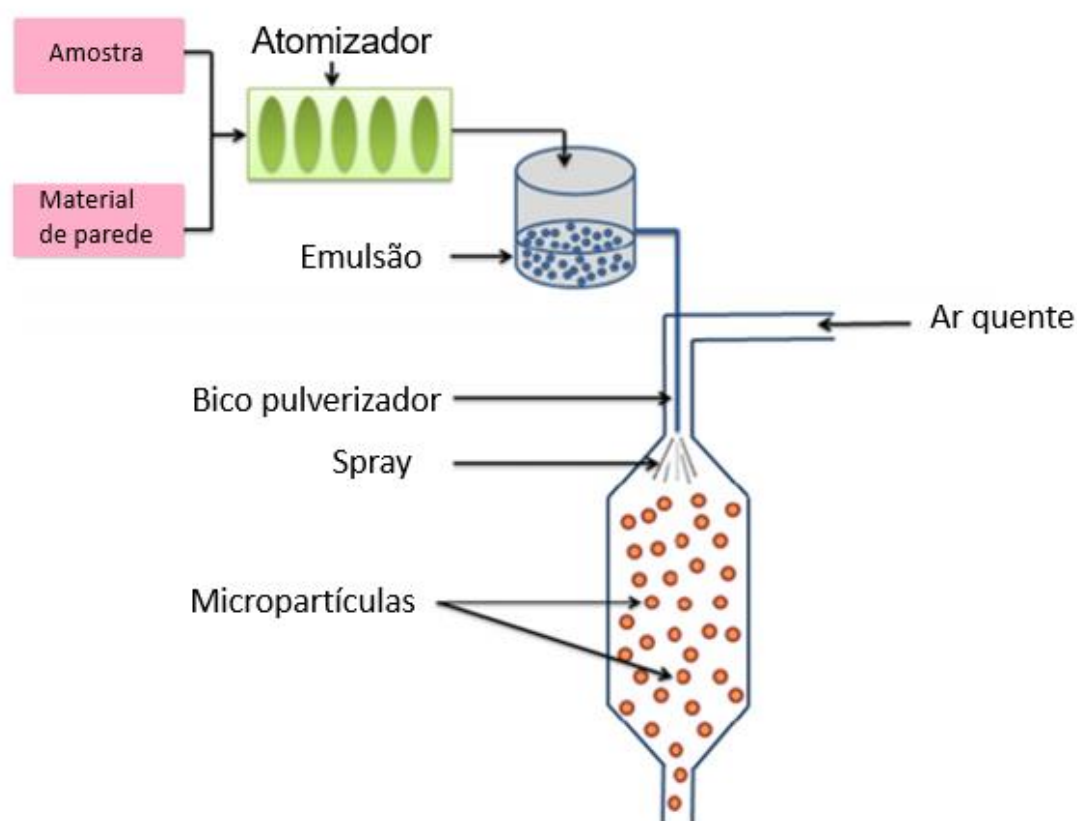
Fonte: Azeredo, 2005. Legenda: (A) – Matriz (microsfera); (B) – Microcápsula simples; (C) – Simples; Irregular; (D) – Duas paredes; (E) – Vários núcleos; (F) – Agrupamento de microcápsulas.

A microencapsulação é uma técnica de encapsulamento de bioativos, utilizando um ou mais agentes encapsulantes, que geralmente é adotada para obtenção de pelo menos um dos seguintes objetivos: reduzir as interações do núcleo com os fatores ambientais a que ele será exposto; retardar reações que resultem em perda de características organolépticas ou nutricionais; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo; promover maior solubilidade do material contido no núcleo; facilitar manuseio e transporte (DEPYPERE, 2003; PSZCZOLA, 1998; REINECCIUS, 1991; EUN et al., 2019). A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, como: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (RÉ, 1998).

Há diversas técnicas diferentes para a produção dessas microcápsulas, como por exemplo, por atomização, extrusão, leito fluidizado, coacervação, liofilização, secagem em tambor, entre outros (CELESTINO, 2010; EUN, 2019).

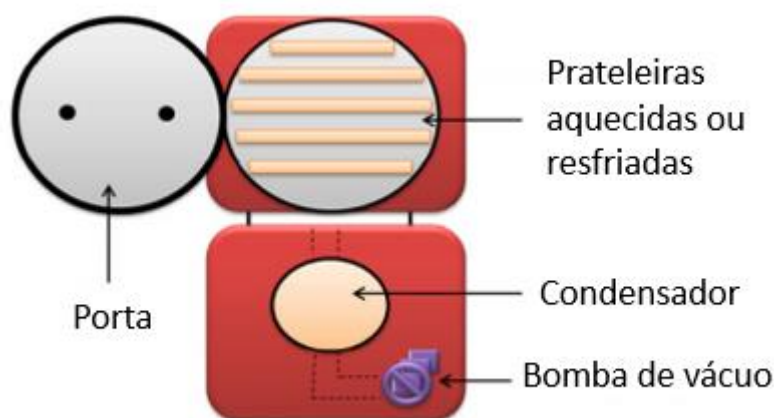
Dentre esses métodos, a secagem por atomização, também conhecida por *Spray dryer*, é a mais utilizada pela indústria de alimentos, por possuir tempos de secagens curtos e apresentar um custo associado a técnica relativamente baixo, chegando a ser até 50 vezes menor que um processo de liofilização, por exemplo (BAKRY, 2015). A amostra é misturada com o agente encapsulante para formação de uma solução líquida homogênea. Em seguida, é bombeada através de um atomizador, transformando esse líquido em pequenas gotículas, que entrarão em contato com um ar aquecido dentro de uma câmara de alta temperatura, removendo a água da gotícula, resultando em um pó fino. Como a exposição à alta temperatura é rápida, a substância encapsulada não ultrapassa dos 100 °C, preservando a bioatividade do material encapsulado (AZEREDO et al., 2005). Algumas desvantagens dessa técnica são a baixa estabilidade oxidativa decorrente das altas temperaturas associadas ao processo e um rendimento (eficiência de encapsulamento) não muito alto (BAKRY, 2015). Uma representação esquemática do processo descrito pode ser vista na Figura 14.

Figura 14 – Representação esquemática do processo de microencapsulação por *spray dryer*



Já a liofilização é um método baseado na desidratação por sublimação de um produto congelado. Consiste em duas etapas, sendo a primeira, o congelamento rápido do produto e posteriormente, a sublimação do gelo sob vácuo (UNIVERSITY OF IDAHO, 2004; AZEREDO, 2005). Um processo de encapsulação pode ser realizado por meio de liofilização de uma emulsão do material do núcleo com um encapsulante. O método gera produtos de excelente qualidade, uma vez que minimiza as alterações associadas a altas temperaturas (CELESTINO, 2010). De fato, Desobry et al. (1997), observaram que a encapsulação de β -caroteno por liofilização resultou em menor degradação durante o processo (8%), quando comparada à atomização (11%) e à secagem em tambor (14%). Algumas desvantagens do método são a alta quantidade de energia utilizada, longos períodos de processamento e maiores custos associados à produção do material (DESOBRY et al., 1997; BAKRY et al., 2015). Uma representação de um liofilizador está ilustrada na Figura 15.

Figura 15 – Representação esquemática de um liofilizador



Fonte: Bakry et al., 2015.

Um dos principais fatores que irão influenciar a estabilidade desses compostos é o material de revestimento utilizado na encapsulação (ROSENBERG, 1990). Para ser considerado um bom material de revestimento deve-se atender a alguns requisitos, como boas propriedades para formar filme, baixa higroscopicidade e baixo custo, sendo selecionado de acordo com sua eficiência de encapsulação, grau de proteção do núcleo e características microscópicas da superfície (BRAZEL, 1999). Os carboidratos são os mais utilizados para os processos industriais de microencapsulação (DZIEZAK, 1988), como por exemplo a goma arábica, pois é solúvel, pouca viscosa e com boas propriedades emulsificantes, porém, por apresentar um alto custo de produção e problemas na sua disponibilidade, a busca por

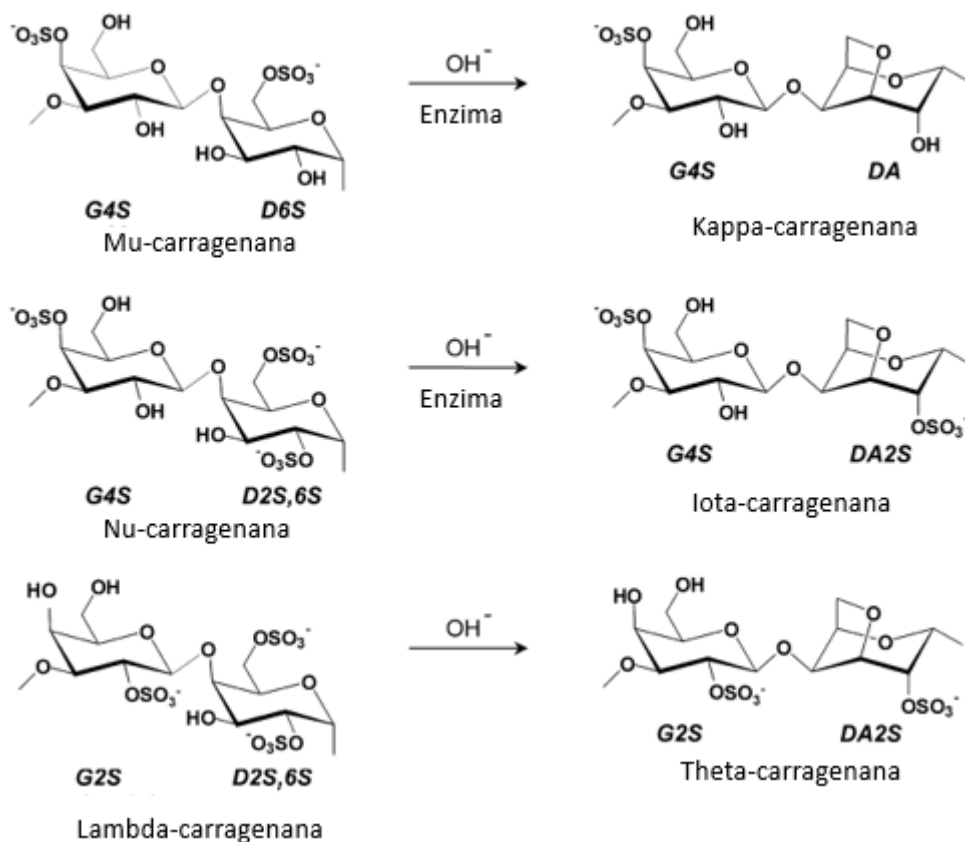
carboidratos que possam substituir a goma arábica é encorajada (SERVAT *et al.*, 2010). Uma opção para revestir a microcápsula de R-FE seria a carragenana, polissacarídeo presente nas macroalgas marinhas vermelhas, que pode ser extraído do resíduo da extração de pigmentos.

1.5.1 Carragenanas

Carragenanas representam uma importante classe de ingredientes texturizantes para a indústria alimentícia. Elas são ingredientes naturais que são usadas há décadas em diversas aplicações culinárias (VAN DE VELDE & DE RUITER, 2002). Carragenana é um nome genérico para uma família de polissacarídeos sulfatados (galactanas sulfatadas), hidrofílicas e de cadeia linear, extraídos de certas espécies de *Rhodophyta* (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Ressalta-se, porém, que apesar de extensiva utilização na indústria, não existem muitos relatos na literatura que mostram esses polissacarídeos de macroalgas como agentes encapsulantes em processos de microencapsulação (HAMBLETON *et al.*, 2009; PAPOUTSIS *et al.*, 2018).

Elas são constituídas de unidades (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade G) e (1→4)-α-D-galactopiranosose (unidade D) ou (1→4)-3,6-anidro-α-D-galactopiranosose (unidade DA), formando a unidade de repetição de dissacarídeo das carragenanas (Figura 16). As carragenanas são classificadas de acordo com a quantidade de grupos sulfatos das unidades G e D da cadeia principal (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

Figura 16 – Representação esquemática das diferentes estruturas de unidades diméricas de carragenanas



Fonte: Van de Velde et al., 2002.

As três carragenanas mais relevantes do ponto de vista comercial são a ι- (iota), κ- (kappa) e λ- (lambda) carragenana (KNUTSEN et al., 1994). Além desses três tipos mais comuns, outros dois tipos, conhecidos como μ- (mu) e ν- (nu) carragenana são encontrados em amostras de carragenanas comerciais. As estruturas dos diferentes tipos de carragenana estão em destaque na Figura 16. Os diferentes tipos de carragenana são obtidos de diferentes espécies de macroalgas. K-carragenana, por exemplo, é predominantemente extraída da macroalga tropical *Kappaphycus alvarezii*. *Eucheuma denticulatum*, por sua vez, é a principal espécie produtora de ι-carragenana, que pode ser extraída também da macroalga utilizada no presente trabalho, *Solieria filiformis* (RUDOLPH, 2000).

K- e ι-carragenanas são galactanas gelificantes, ao passo que λ-carragenanas são utilizadas como agente espessante. Essa diferença no comportamento reológico das carragenanas se dá pelo fato da unidade DA de κ- e ι- possuírem a conformação 1C_4 (carbono tetravalente) e as unidades D de λ-carragenana não apresentarem essa conformação (Figura 16). Essa conformação (1C_4) da unidade DA em ι- e κ-carragenana permite uma conformação

helicoidal da estrutura secundária, que é essencial às propriedades de formação do gel (HANSEN, LARSEN, & GRØNDAL, 2000; VAN DE VELDE et al., 2002).

Diante do que foi explicitado, o presente trabalho se propõe a microencapsular a R-ficoeritrina de *Solieria filiformis*, por meio de técnica de *spray drying* e liofilização, utilizando iota-carragenana como agente encapsulante em diferentes concentrações a fim de caracterizar a microcápsula quanto a sua morfologia e capacidade de manutenção das propriedades espectroscópicas do pigmento. Produzindo assim, um corante natural de cor atrativa à indústria com grande possibilidade de aplicação biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair, purificar e encapsular a R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *S. filiformis*, a fim de caracterizar morfológicamente a microcápsula obtida, além de avaliar a iota-carragenana como agente encapsulante.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e purificar o pigmento R-Ficoeritrina de *S. filiformis*;
- Microencapsular o pigmento R-Ficoeritrina de *S. filiformis* através da técnica de *Spray drying* usando iota-carragenana como agente encapsulante;
- Microencapsular o pigmento R-Ficoeritrina de *S. filiformis* por liofilização usando iota-carragenana como agente encapsulante;
- Caracterizar as microcápsulas de R-Ficoeritrina por microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Macroalga marinha vermelha *S. filiformis*

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

A macroalga úmida foi transportada em sacos plásticos pretos para o laboratório, onde foram exaustivamente lavadas com água corrente para a retirada de epífitas, sal e grãos de areia, e, em seguida, com água destilada. Após esse processo de lavagem e separação, as amostras da macroalga foram armazenadas a -20° C em porções de 500 g até a sua utilização.

Figura 17 - Macroalga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson (*Rhodophyta*, *Gigartinales*, *Solieriaceae*)



Foto: Francisco Lucas de Souza

Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Gênero: Solieria

Fonte: Lopes (2018).

3.1.2 Reagentes químicos

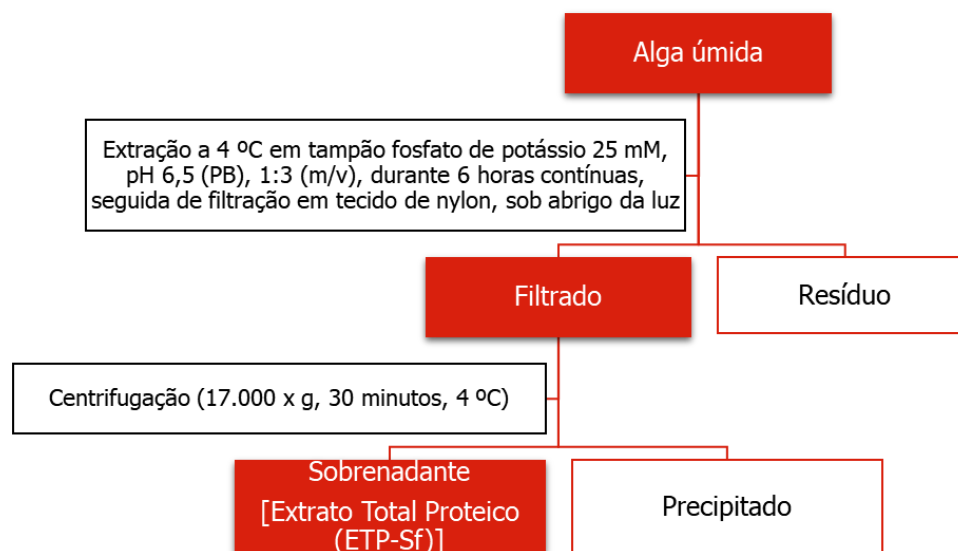
A matriz cromatográfica DEAE-Sephacel e o concentrador de amostra Vivaspin foram adquiridos da GE Healthcare. Albumina sérica bovina (BSA) foi obtida da Sigma-Aldrich. Iota-carragenana obtida da Danisco. Todos os demais reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração da R-ficoeritrina de *S. filiformis*

Segundo o protocolo proposto por Bastos-Filho (2016), mostrado na Figura 18, a macroalga úmida foi triturada em liquidificador industrial em contato com tampão fosfato de potássio 0,025 M (PB) na proporção de 1:3 (m/v), pH 6,5, e em seguida o material foi mantido sob agitação mecânica por 6 horas contínuas protegido da luz. Posteriormente, o homogenato foi filtrado em tecido de trama fina, o resíduo descartado e o filtrado centrifugado a 17.000 x g, 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi denominado extrato total proteico de *Solieria filiformis* (ETP-Sf) e foi avaliado quanto ao teor de proteínas e R-Ficoeritrina e quanto ao rendimento e índice de pureza do pigmento. A recuperação de R-FE foi considerada de 100% por ser a primeira etapa de separação do pigmento. A conversão de unidade entre massa úmida e massa seca foi feita considerando que a alga úmida contém em média 90% de umidade.

Figura 18 – Protocolo de extração da R-ficoeritrina de *S. filiformis*



Fonte: Bastos-Filho (2016).

3.2.2 Purificação da R-ficoeritrina de *S. filiformis*

O protocolo de purificação da R-FE adotado no presente trabalho foi proposto por

Lopes (2018) e está evidenciado na Figura 19.

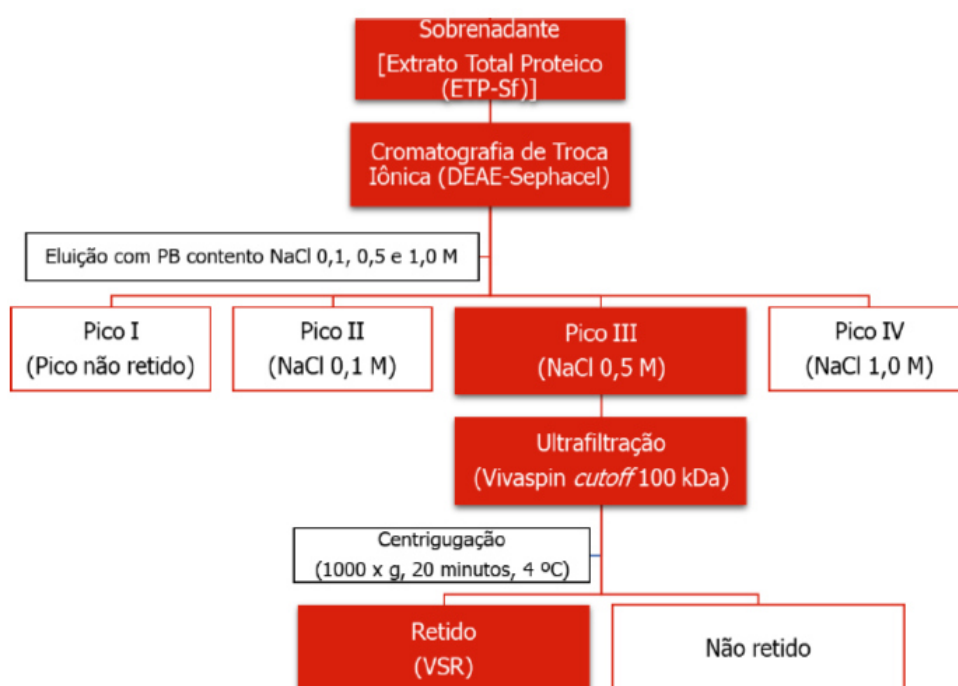
3.2.2.1 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica em matriz DEAE Sephacel foi previamente equilibrada com tampão PB, em coluna de vidro de dimensões de 4 x 50 cm, sob fluxo de 2,5 mL/min. Após a eluição da fração não retida, as proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com PB contendo NaCl na concentração 0,5M (fração mais pigmentada). Em seguida, a fração cromatográfica foi dialisada (*cutoff* 12 kDa) contra água destilada.

3.2.2.2 Ultrafiltração

A fração cromatográfica contendo R-Ficoeritrina previamente dialisada foi submetida à ultrafiltração em concentrador de amostra Vivaspin (*cutoff* 100 kDa), a 1000 x g, a 4 °C, durante 20 minutos. A fração retida no filtro foi posteriormente utilizada para a microencapsulação do pigmento.

Figura 19 – Protocolo de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga vermelha *Solieria filiformis*



Fonte: Lopes (2018).

3.2.3 *Rendimentos e índices de pureza das etapas de extração e purificação*

3.2.3.1 *Dosagem de proteínas totais*

Os teores de proteínas totais das amostras obtidas de cada etapa do processo de purificação foram determinados seguindo o método proposto por Bradford (1976), utilizando uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para o ensaio, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 100 µL das soluções proteicas e agitadas. Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

3.2.3.2 *Rendimento de pigmentos e índice de pureza*

A determinação das concentrações de R-FE do ETP-Sf e das frações de cada etapa de purificação foi realizada conforme a Equação 1 proposta por Sampath-Wiley e Neefus (2007):

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

Onde:

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

A_{564} = Absorbância a 564 nm;

A_{618} = Absorbância a 618 nm;

A_{730} = Absorbância a 730 nm.

Para calcular o índice de pureza do pigmento, seguiu-se a Equação 2 proposta por Senthilkumar et al. (2013):

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

Onde:

IP = Índice de pureza;

A_{280} = Absorbância a 280 nm;

A_{564} = Absorbância a 564 nm.

3.2.3.3 Rendimento de proteínas totais e de R-Ficoeritrina

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

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

Onde:

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

PT = Teor de proteínas totais (mg);

Sf = Massa de alga úmida (gAU).

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

Onde:

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

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

Sf = Massa de alga úmida (g AU).

3.2.3.4 Recuperação da R-Ficoeritrina

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

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

Onde:

η = Recuperação de R-Ficoeritrina (%);

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

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

3.2.4 Microencapsulação da R-ficoeritrina de *S. filiformis*

3.2.4.1 Efeito da concentração de iota-carragenana como matriz encapsulante

Soluções contendo iota-carragenana nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% foram preparadas em água destilada sob aquecimento até o ponto de fervura. As soluções foram misturadas com auxílio de agitador mecânico. Após resfriamento à temperatura ambiente, o pigmento R-Ficoeritrina foi adicionado à solução até se estabelecer uma solução com concentração final de 0,002%. As soluções com 1,5% e 2,0% de carragenana apresentaram viscosidade, mas não foi observada gelificação. A mistura foi homogeneizada até a sua completa dissolução.

Após o revestimento com iota-carragenana, as cápsulas foram encaminhadas para o processo de secagem por atomização (*spray dryer*) e liofilização e posteriormente analisadas quanto sua morfologia por microscopia confocal e de varredura (MEV).

3.2.4.2 Atomização

A microencapsulação da R-Ficoeritrina por atomização foi feita utilizando um *spray dryer* modelo LM-MDSi 1.0 com capacidade máxima de secagem de 1,0 L de água por hora com bico pulverizador de 0,7 mm de diâmetro. Os parâmetros da microencapsulação foram determinados segundo Purnamayati, Dewi e Kurniashi (2018), com modificações. Temperatura do ar de entrada a 110 °C, temperatura do ar de saída a 56 °C e com um fluxo de alimentação de 5,1 mL/min. A medida das partículas para classificação em microcápsulas foi feita por análise da barra de escala das micrografias.

3.2.4.3 Liofilização

A microencapsulação da R-Ficoeritrina por liofilização foi realizada utilizando o liofilizador L101 da Liotop® com volume máximo de processamento de 5,0 L por ciclo. As soluções aquosas foram desidratadas por liofilização à temperatura mínima de -55° C e sob condições de vácuo. A medida das partículas para classificação em microcápsulas foi feita por

análise da barra de escala das micrografias.

3.2.5 Caracterização da Microcápsula de R-Ficoeritrina de S. filiformis

3.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada na Central Analítica da UFC por meio do equipamento de microscopia eletrônica de varredura (Quanta 450 FEG), onde foram analisadas as microcápsulas obtidas por liofilização e atomização a partir das soluções com diferentes proporções de material de parede. Os materiais foram montados sobre fitas adesiva dupla face e fixado em suporte metálico. A placa metálica com a microcápsula foi recoberta com ouro em metalizadora (Quorum Q150T ES). As imagens foram analisadas e geradas com grau de amplificação de 100 – 10,000 vezes.

3.2.5.2 Microscopia confocal de varredura (MEV)

A microscopia confocal de varredura foi realizada na Central Analítica da UFC por meio do equipamento de microscopia confocal (LM 710 - Zeiss), onde foram analisadas as microcápsulas formadas por atomização e liofilização a partir das soluções com diferentes concentrações de iota-carragenana. As amostras foram excitadas a 495 nm, 540 nm e 564 nm. O perfil de fluorescência foi estudado com emissão a 575 nm (CARACCILOLO, 2015; PATEL, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ressalta-se que, por conta da pandemia de Coronavírus que assolou o país e o mundo em 2020, os resultados apresentados no presente trabalho são ensaios preliminares e não puderam ser repetidos ou continuados como desejado, por impossibilidade de acesso aos laboratórios e demais dependências da universidade.

4.1 Extração da R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

A extração da R-Ficoeritrina de *S. filiformis* apresentou um rendimento de 0,16 mg de R-FE/ g de alga úmida (mg R-FE/g AU). O rendimento equivalente, caso fosse utilizado 1,0 g da macroalga seca, seria de 1,6 mg de R-FE/g (mg R-FE/g AS). O índice de pureza da R-FE no extrato proteico total foi de 0,53. Tais valores corroboram com o rendimento do extrato obtido por Bastos-Filho (2016), Brito (2017) e Lopes (2018) para a R-FE da mesma macroalga vermelha.

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

Punampalam, Khoo e Sit (2018) extraíram ficobiliproteínas da macroalga *Bangia atropurpurea* e obtiveram rendimento de 1,7 mg R-FE/g AS, com índice de pureza 0,59. O estudo apresentou valores de rendimento e pureza do pigmento vermelho similares aos encontrados no presente trabalho com *S. filiformis*, todavia os referidos autores utilizaram a técnica de sonicação para a etapa de extração, método bem mais dispendioso para a indústria, o que poderia dificultar a aplicação comercial do pigmento. Pereira et al (2020) por sua vez, propuseram a extração de ficobiliproteínas da macroalga *Gracilaria gracilis* por diferentes técnicas de extração, como maceração e extrações com auxílio de técnicas de ultrassom. O maior rendimento observado foi de 3,77 mg R-FE/g AS na técnica de maceração, com índice de pureza de 0,21, mostrando a eficiência que pode ser obtida por uso de uma metodologia mais barata. Os autores constataram também que na metodologia de extração por sonda

ultrasônica, além de um rendimento mais baixo observado (1,27 mg R-FE/g AS), a técnica resultou na extração simultânea de pigmentos clorofilados, juntamente com as ficobiliproteínas. A presença de clorofila no extrato de ficobiliproteínas pode ser considerado um contaminante (LAURECI, BRESCIANI, LAMI & MORABITO, 2017), por resultar na mudança de cor dos extratos para um tom mais esverdeado em detrimento da coloração rosa característica do extrato de R-FE. Esse fato evidencia a importância da escolha do método de extração não apenas para avaliação do rendimento do processo, mas também na manutenção das propriedades espectroscópicas do pigmento.

4.2 Purificação da R-Ficoeritrina de *Solieria filiformis*

4.2.1 Cromatografia de troca iônica

A interação do extrato bruto proteico de *S. filiformis* aplicado em cromatografia de troca iônica com a matriz de DEAE-Sephacel e com o tampão fosfato resultou no fracionamento dos pigmentos, sendo o maior rendimento observado no pico eluído com PB contendo NaCl 0,5 M (PIII-DEAE), o qual apresentou uma coloração rosa intensa. O referido rendimento foi de R-FE 0,10 mg R-FE/g AU, equivalente a uma recuperação de 62,39%, com IP de 1,60. Tais resultados estão de acordo com Lopes (2018) que utilizou a mesma metodologia que o presente trabalho e representam melhorias consideráveis na recuperação de R-FE quando comparados com os valores obtidos por Bastos-Filho (2016) e Brito (2017).

Bastos-Filho (2016), que utilizou a mesma espécie de alga, alcançou rendimento de R-FE de apenas 0,0297 mg R-FE/g AU após metodologia de purificação que compreendeu precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de troca iônica. Na mesma sequência metodológica, o autor alcançou recuperação de somente 21,82% e IP de 1,63. Brito (2017), que propôs uma otimização do protocolo de purificação de R-FE de *S. filiformis*, alcançou, após a sequência de precipitação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sob temperatura de congelamento e cromatografia de troca iônica, rendimento de 0,0605 mg R-FE/g AU, recuperação de 42,91% e IP de 1,15. Todos esses dados, em comparação aos obtidos pelo presente trabalho, indicam que o protocolo elaborado por Lopes (2018), que exclui a etapa de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mostrou-se mais eficiente e foi responsável por um aumento de até três vezes em termos de rendimento e de recuperação. O autor do protocolo obteve rendimento de 0,11 mg R-FE/g AU, IP de 1,58 e taxa de recuperação de 62,32% nessa etapa de purificação. Esses valores foram bem próximos dos obtidos no presente trabalho.

Nguyen et al (2020) realizaram purificação de R-FE de *Gracilaria gracilis* por cromatografia de troca iônica e alcançaram valores de rendimento máximo e pureza de 0,68 mg R-FE/gAS e 3,25, respectivamente, valores superiores aos alcançados por este trabalho. Contudo, a sua recuperação foi cerca três vezes menor que a obtida nesse trabalho, sendo de apenas 19%. Da mesma forma, Munier et al (2015) também realizaram a purificação da R-FE da macroalga vermelha *Grateloupia turuturu* diretamente em cromatografia de troca iônica, alcançando rendimento de 1,41 mg R-FE/g AS, com pureza de 2,89, apresentando, porém, recuperação de apenas 27%. Vale ressaltar que esses valores de altos rendimentos de pigmento com baixa recuperação foram obtidos utilizando metodologias mais caras para a sua extração (extração com nitrogênio líquido e liofilização), as quais elevam o valor final do pigmento puro. Ao contrário do que os autores obtiveram, o presente trabalho alcançou rendimento menor, porém com recuperação elevada, tornando-o mais vantajoso por apresentar metodologia menos onerosa para a indústria.

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

4.2.2 Ultrafiltração

Após ultrafiltração do PIII-DEAE, o filtrado de coloração rosa clara e sem fluorescência foi descartado e o material retido (vivaspin retido, VSR) de intensa coloração e fluorescência foi coletado, alcançando um rendimento de 0,062 mg R-FE/g AU, o que representou uma recuperação de 38,58%, com IP de 2,50.

Observa-se uma significativa queda nos valores de recuperação de R-FE na etapa de VSR quando em comparação com aqueles obtidos na etapa cromatográfica (PIII-DEAE). Porém, dado que a finalidade desta etapa foi elevar o índice de pureza do pigmento, o resultado foi satisfatório, resultando numa pureza de até duas vezes maior em relação a outros

trabalhos para a mesma macroalga. Lopes (2018) alcançou um rendimento de 0,064, com recuperação de 37,69% e IP de 2,36 na etapa de purificação por ultrafiltração da R-FE de *S. filiformis*. Todos os valores são inferiores ou similares aos obtidos nesse trabalho.

Desse modo, o rendimento, recuperação e índice de pureza observados nessa etapa do processo de purificação da R-FE, se mostraram superiores aos encontrados na literatura para *S. filiformis*, evidenciando que essa metodologia contribui de forma eficaz para a purificação da R-Ficoeritrina dessa alga vermelha, além de ser pouco custosa. Todavia, novas otimizações do processo devem ser buscadas, visando o escalonamento do processo em escala industrial, fator que ainda limita o procedimento. De acordo com diferentes índices de pureza encontrados em cada etapa do processo, é possível, ainda, escolher para qual aplicação biotecnológica o pigmento poderia ser destinado. A Tabela 4 apresenta os dados obtidos para rendimento, recuperação e índice de pureza para cada etapa do processo de purificação da R-FE de *S. filiformis*. A Tabela 5 apresenta um comparativo entre o processo otimizado de purificação da R-FE de *S. filiformis* estabelecido pelo presente trabalho e os processos já relatados para a mesma espécie de macroalga.

Tabela 4 – Tabela de purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*

Etapas	Rendimento por massa de alga úmida (mg/g)		Rendimento por massa de alga seca (mg/g)	Recuperação (%)	Índice de Pureza
	Proteína	R-FE			
	Total	Total			
ETP-Sf	0,33	0,16	1,6	100,00	0,53
PIII-DEAE	0,21	0,10	1,0	62,39	1,60
VSR	0,09	0,06	0,6	38,58	2,50

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Há poucos dados na literatura sobre ultrafiltração de ficobiliproteínas, além do fato desse método ser utilizado apenas como etapa de pré-purificação e concentração de amostras

para posterior aplicação em cromatografias de exclusão molecular, não apresentando dados de rendimento e recuperação, como na metodologia proposta por Wang et al. (2015) para a macroalga *Polysiphonia urceolata*. Denis et al. (2009), por sua vez, utilizaram o chamado Amicon 8050 Stirred Cell, um mecanismo de ultrafiltração por centrifugação, que atingiu pureza de 0,5 e rendimento de 0,57 mgR-FE/gAU. O elevado valor do rendimento se deve ao fato de os pesquisadores terem aplicado o extrato bruto diretamente no sistema de ultrafiltração, atingindo um valor de mais de nove vezes maior que o alcançado pela metodologia utilizada no presente estudo para *S. filiformis*. Contudo, o índice de pureza para o método foi de cinco vezes menor que o IP atingido pelo presente trabalho.

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

Etapas	Rendimento de R-FE (mg/g) *			Recuperação de R-FE (%)			Índice de Pureza		
	Bastos-Filho (2016)	Lopes (2018)	Presente trabalho	Bastos-Filho (2016)	Lopes (2018)	Presente trabalho	Bastos-Filho (2016)	Lopes (2018)	Presente trabalho
ETP-Sf	0,14	0,17	0,16	100	100	100	0,42	0,62	0,53
Pico III-DEAE	0,03	0,11	0,10	21,82	62,32	62,39	1,63	1,58	1,60
VSR	-	0,06	0,06	-	37,69	38,58	-	2,36	2,50

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.3 Microencapsulação da R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

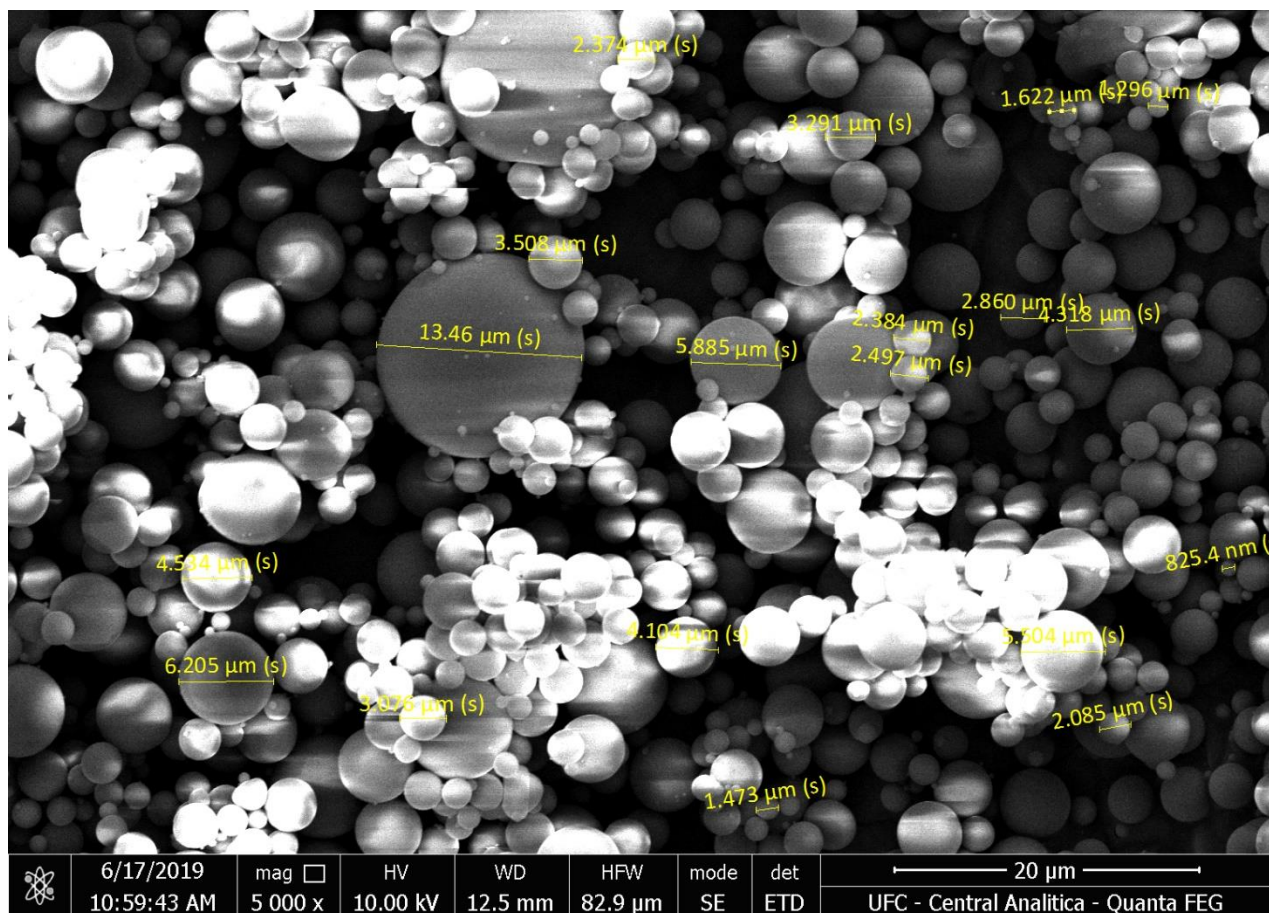
4.3.1 Efeito da concentração de iota-carragenana como matriz encapsulante

A influência da concentração do material de revestimento, iota-carragenana, nos materiais obtidos pelo processo de atomização e liofilização será discutida nos tópicos referentes a cada técnica.

4.3.2 Atomização

No presente trabalho foram obtidas microcápsulas de tamanhos que variaram de 0,5 μm a 15 μm . A Figura 20 mostra algumas medições feitas por MEV. O tamanho médio observado foi de $3,70 \pm 2,99 \mu\text{m}$. O alto valor de desvio encontrado evidencia a diversidade de tamanhos obtidos nas microcápsulas. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que utilizaram a técnica de spray dryer (DELIA et al., 2018; GUTIERREZ et al., 2018; ZANONI et al., 2019). Não houve variação significativa nos tamanhos das microcápsulas obtidas com diferentes concentrações de iota-carragenana como matriz encapsulante.

Figura 20 – Medidas de tamanho das microcápsulas de R-Ficoeritrina de *S. filiformis* com 1,5% de iota-carragenana como material de revestimento de parede



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

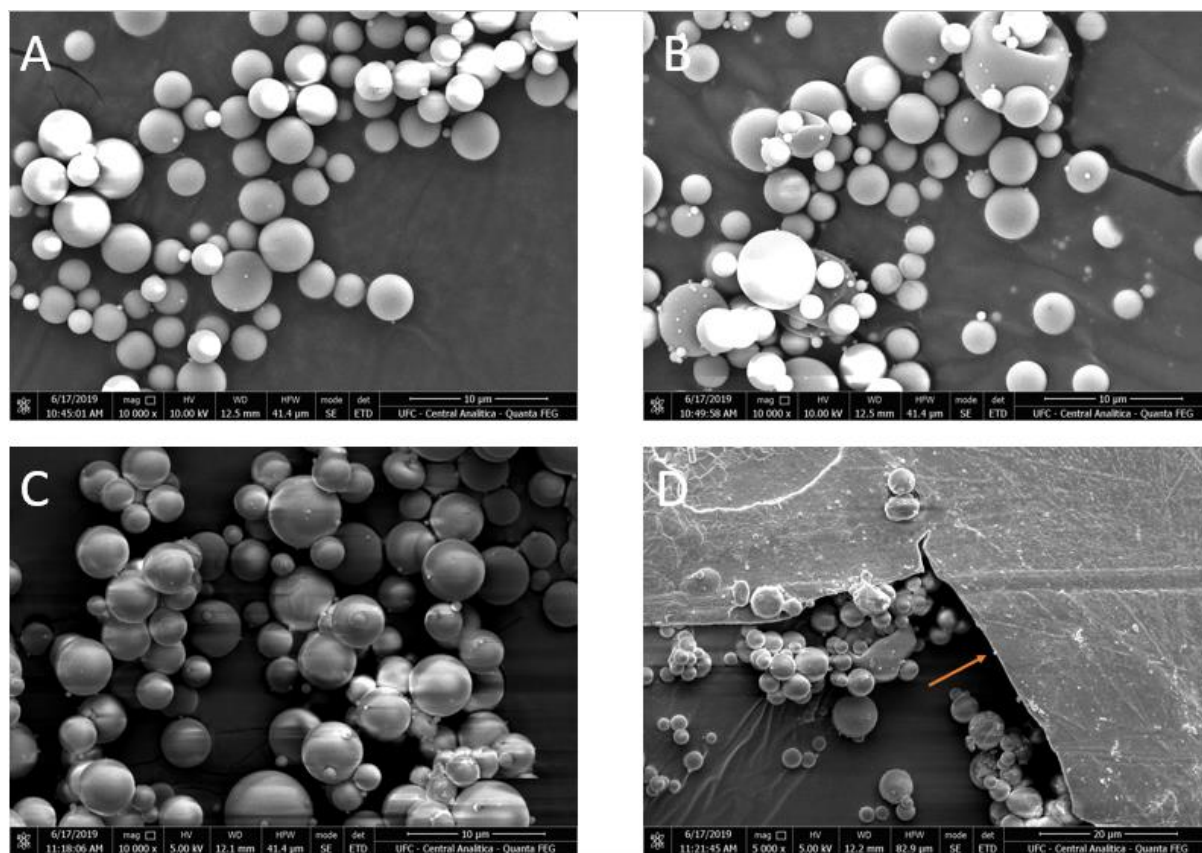
As micrografias resultantes da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas obtidas pelo processo de atomização com diferentes concentrações de iota carragenana estão mostradas na Figura 21. Foi possível verificar uma boa formação de microcápsulas de conformação esféricas, majoritariamente lisas e de aspecto uniforme, características importantes para assegurar a segurança e a manutenção das propriedades do material encapsulado (KAR et al., 2019). Esse aspecto morfológico pode ser atribuído ao uso da carragenana como agente encapsulante, como mostrado no estudo de Hadiyanto et al. (2019), quando foram feitas duas encapsulações de ficocianina extraída de *Spirulina sp.*, comparando a utilização de quitosana e carragenana como agentes encapsulantes, evidenciando a melhor conformação na microcápsula obtida com esta última. Papoutsis et al (2019) também estudaram o efeito de diferentes agentes encapsulantes no revestimento de

bagaço de limão e secadas por atomização, evidenciando uma melhor formação de microcápsulas tanto nas amostras revestidas com proteína de soja, como nas revestidas com ι-carragenana.

A morfologia das microcápsulas obtidas neste trabalho se mostrou como visualmente satisfatória quando em comparação com outros estudos que objetivaram a formação de microcápsulas pela técnica de spray dryer (DELIA et al., 2018; ZANONI et al., 2019; MAHDI et al., 2019; KAR et al., 2019). A referida técnica geralmente apresenta microcápsulas com a superfície levemente enrugada (formas esféricas irregulares), comportamento associado ao encolhimento das microcápsulas durante o processo de secagem, devido a drástica perda de umidade e resfriamento súbito da amostra (MEDINA-TORRES et al., 2013; ORTIZ-BASURTO, RUBIO-IBARRA, RAGAZZO-SANCHEZ, BERISTAIN & JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, 2017). De fato, Cervantes-Martinez et al. (2014) e Gutierrez et al. (2018) evidenciaram esse comportamento em amostras encapsuladas com mucilagem de *Aloe vera* e mucilagem ácida de *Opuntia* como agentes encapsulantes.

No presente trabalho, foi possível observar um leve enrugamento apenas no material revestido com 2,0% de iota carragenana (Figura 20d), evidenciando mais uma vez o importante papel atribuído ao material de revestimento de parede da cápsula e a relevância da concentração deste na amostra no processo de secagem por spray dryer (BAKRY, 2015), observando que materiais mais uniformes foram obtidos quando em menores concentrações de carragenana. Observa-se também que na concentração de 2,0% há uma considerável quantidade de forma laminar (Figura 20d – seta) gerado em detrimento das microcápsulas que o trabalho objetiva, sendo encontrados melhores resultados quando em concentrações menores do polissacarídeo. Uma possível explicação para esse resultado pode ser o fato de que as soluções contendo iota-carragenana em concentrações mais altas apresentam maior viscosidade, o que pode ter gerado um entupimento no bico injetor do *spray dryer* ou permitido entrada de ar no sistema, o que, consequentemente, pode ter acarretado na formação de menos cápsulas (DRUSCH, 2007). Esses resultados, no entanto, contrastam com os evidenciados por Rubilar et al. (2012), que constataram que a eficiência de encapsulação por atomização de óleo de linhaça aumentou de 54,6% para 90,7% quando utilizando uma maior concentração de goma arábica como material de parede (de 25% para 30%). O filme gerado ainda caracteriza, porém, um revestimento do pigmento bem-sucedido.

Figura 21 – Micrografias das microcápsulas de R-Ficoeritrina de *S. filiformis* obtidas por atomização (*spray dryer*) utilizando diferentes concentrações de iota-carragenana



Fonte: Elaborado pelo autor (2020). Legenda: A – 0,5% de iota carragenana; B – 1,0% de iota carragenana; C – 1,5% de iota carragenana; D – 2,0% de iota carragenana. Seta indicativa da formação de filme.

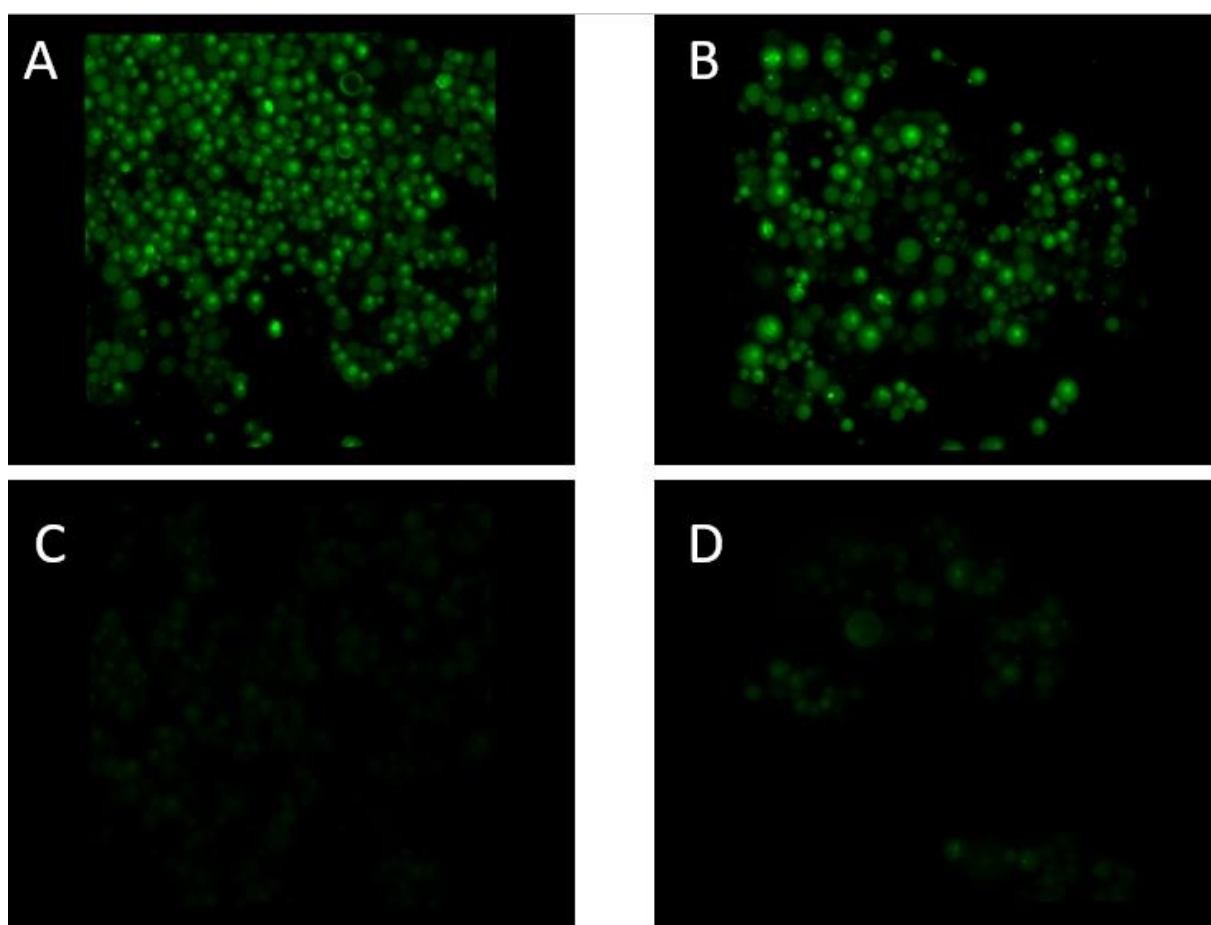
4.3.2.2 Microscopia confocal de varredura

As propriedades espectroscópicas do pigmento encapsulado por *spray dryer*, por sua vez, foram analisadas a partir das imagens geradas por microscopia confocal, as quais estão mostradas na Figura 22. As imagens evidenciaram o sucesso do processo de encapsulação ao manter as propriedades espectroscópicas do pigmento, evidenciadas pela fluorescência, principalmente nas concentrações de 0,5% e 1,0% de iota-carragenana. As microcápsulas com concentração de 1,5% e 2,0% de material de parede aparentaram apresentar menor emissão de fluorescência do pigmento, sendo possível sugerir que a concentração do material de revestimento de parede pode influenciar na fluorescência da amostra, visto que em maiores concentrações de carragenana, teremos menores concentrações do pigmento encapsulado. Todavia, é necessário conduzir uma investigação posterior sobre intensidade de fluorescência da amostra, pois apenas com a técnica de microscopia confocal não é possível ter certeza.

Pode ser também levantada a hipótese de que com o espessamento da parede da microcápsula, ocorra uma maior dificuldade de visualização da fluorescência do pigmento, sem necessariamente prejudicar a manutenção das suas propriedades espectroscópicas. Patel et al. (2020) estudaram o comportamento das propriedades espectroscópicas de ficobiliproteínas extraídas de *Palmaria palmata* sob variação de pH e temperatura, constatando, por análise de imagens de microscopia confocal, que a *nanocápsula* obtida no estudo foi eficaz na manutenção da fluorescência da amostra por um período superior de tempo quando comparada ao pigmento não encapsulado.

É possível observar claramente nas micrografias que em diversas microcápsulas há um ponto de fluorescência bem evidente, geralmente no centro, evidenciando uma maior concentração do pigmento nessa região.

Figura 22 – Micrografias das microcápsulas de R-Ficoeritrina de *S. filiformis* obtidas por atomização (*spray dryer*) utilizando diferentes concentrações de iota-carragenana



Fonte: Elaborado pelo autor (2020). Legenda: A - 0,5% de iota carragenana; B – 1,0% de iota carragenana; C – 1,5% de iota carragenana; D – 2,0% de iota carragenana.

4.3.3 Liofilização

4.3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A encapsulação por liofilização não resultou na formação de microcápsulas esféricas, mas sim em estruturas laminares, caracterizando filmes de revestimento, como mostrado na Figura 23. Essa morfologia pode ser atribuída a natureza da técnica de liofilização, a qual geralmente não forma cápsulas, mas sim um pó ou filme com pouquíssima perda de material (BAKRY et al., 2015; VELASCO et al., 2003).

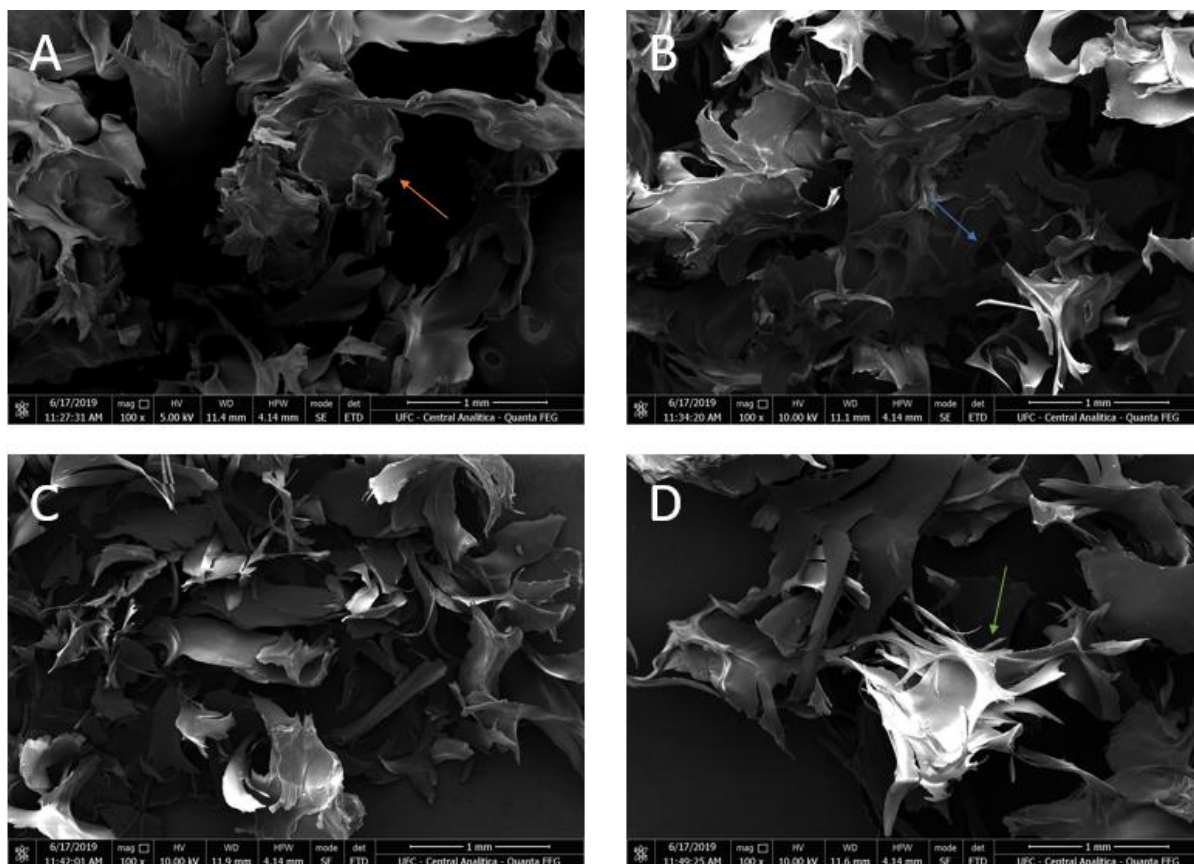
O tamanho das partículas desse pó gerado pela secagem não pôde ser analisado nas imagens geradas pelo presente estudo devido ao baixo grau de amplificação utilizado na lente do microscópio eletrônico na análise (x100), mas poderia ser determinado por peneiramento (mash). Infelizmente, por conta da pandemia, o acesso ao laboratório para realização dessa medição foi restringido. Todavia, sabe-se que o processo de secagem por liofilização gera partículas relativamente grandes, geralmente entre 15 e 100 μm (EZHILARASI et al., 2013), devido a baixa temperatura envolvida no processo de liofilização e a falta de forças que quebrariam o líquido congelado em pequenas gotas ou que alterariam substancialmente a topologia da superfície da amostra durante a fase de evaporação (CHEN et al., 2011).

Pela análise das micrografias, foram observadas morfologias que variaram de floculada a laminar com presença e ausência de poros irregulares e de tamanhos variados, morfologias comuns nos processos de encapsulação por liofilização (EZHILARASI et al., 2013; CHEN et al., 2011; GANESAM, SHANMUGAM, 2020; XU et al., 2020; TIWARI, CHAKKARAVARTHI, BHATTACHARYA, 2015; PELLICER et al., 2019). Segundo Kaushik e Roos (2007), essa conformação protege bem o material encapsulado contra fatores ambientais de degradação, como calor e oxidação. É possível observar a formação de morfologia mais floculada, com lâminas retorcidas nas menores concentrações e lâminas mais lisas nas maiores concentrações. A presença de poros nas lâminas não é verificada com frequência. Uma sutil diferença é notada no encapsulamento da R-FE com 0,5% de iota-carragenana (Figura 23a) que apresenta as bordas do material com um aspecto mais curvo e retorcido, em comparação com os outros tratamentos em que as bordas aparecem mais retas. Ezhilarasi et al. (2013) sugerem que esse comportamento pode ocorrer devido a uma maior maleabilidade da parede do material, quando em menores concentrações do carboidrato, enquanto que em maiores concentrações ocorre uma rigidez e o material acaba “quebrando” em razão do resfriamento associado a técnica de liofilização, gerando o aspecto mais laminar

que vemos mais claramente na Figura 23d.

O presente trabalho utilizou a técnica de liofilização por essa geralmente apresentar altos níveis de rendimento e não promover geração de calor, tendo em vista o perfil termossensível do pigmento encapsulado. De fato, Ganesam & Shanmugam (2020) chegaram a valores superiores a 82% na eficiência de encapsulação de uma FE com revestimento de kappa-carragenana, isolada de *Kappaphycus alvarezii* e Xu et al. (2020) estudaram o efeito de quatro métodos de secagem na qualidade sensorial, composição de aminoácidos, estrutura de ficobiliproteínas e taxa de reidratação de *Porphyra haitanensis*, sendo verificado que o método de liofilização se destacou frente às outras técnicas em todos os quesitos avaliados, sendo o que apresentou maior taxa de estruturas α -hélice intactas de ficobiliproteínas. Ainda com foco no rendimento do processo, Pellicer et al. (2020) estudaram a estabilidade de um flavorizante sintético de morango, constatando que o encapsulamento por liofilização apresentou as menores taxas de perda de material (12%) quando em comparação com outras técnicas como *spray dryer* (38% de perda) e técnicas de leite fluido (68% de perda).

Figura 23 - Micrografias da R-Ficoeritrina de *S. filiformis* encapsulada obtidas por liofilização utilizando diferentes concentrações de iota-carragenana



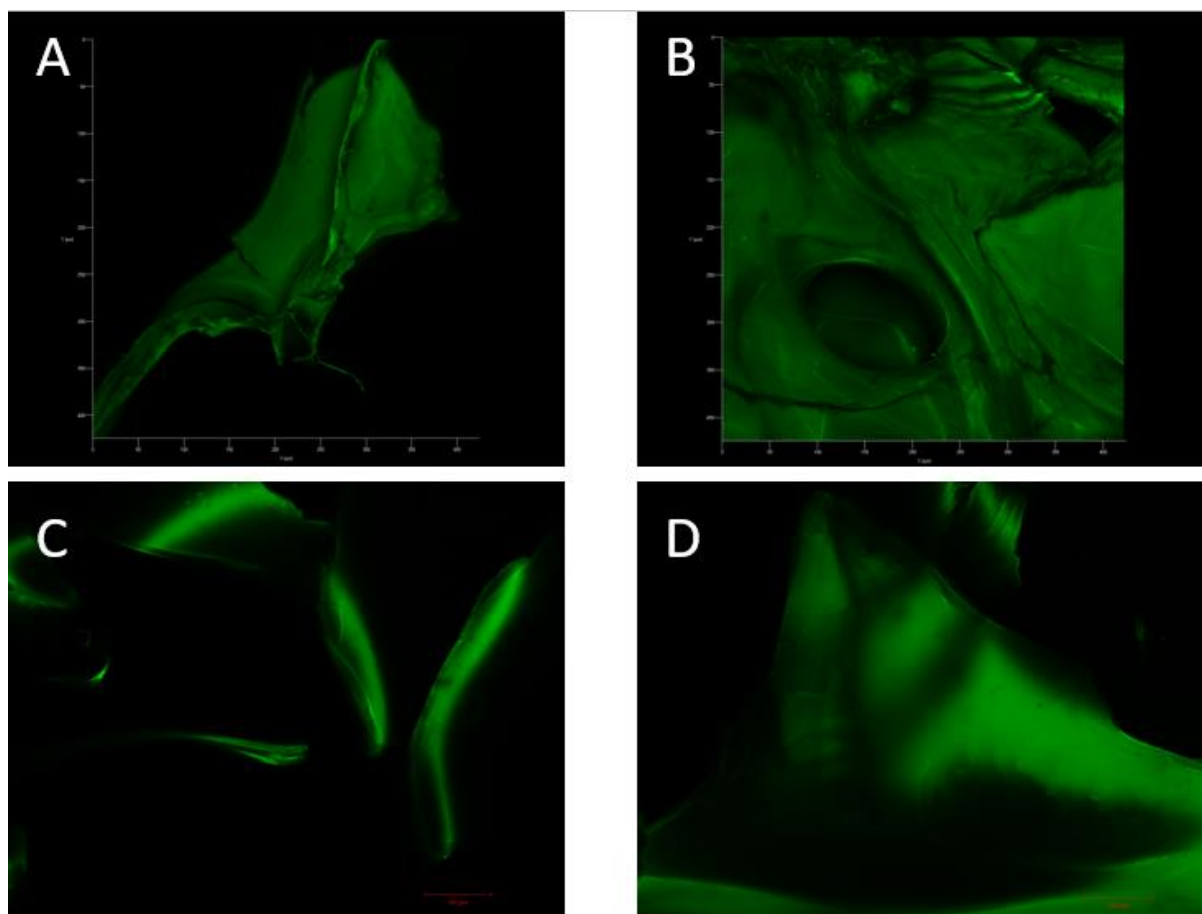
Fonte: Elaborado pelo autor (2020). Legenda: A - 0,5% de iota carragenana. Seta Laranja – Detalhe da conformação da parede; B – 1,0% de iota carragenana. Seta Azul – Formação de poros; C – 1,5% de iota carragenana; D – 2,0% de iota carragenana. Seta Verde – Detalhe da conformação da parede.

4.3.3.2 Microscopia confocal de varredura

A fluorescência emitida pelas amostras da R-FE encapsulada por liofilização evidenciou o sucesso da encapsulação pela carragenana, além de uma boa manutenção das propriedades espectroscópicas em todos os tratamentos (Figura 24). É notável que os materiais provenientes da liofilização também apresentaram fluorescência quando em comparação com os materiais secados por atomização. No entanto, deve ter sido obtida uma maior eficiência de encapsulação e rendimento associados ao método de liofilização, além de sugerir a manutenção das características espectroscópicas e estruturais do pigmento tendo em vista que se mais pigmento permanece retido e com estrutura preservada no encapsulamento, maior será a fluorescência percebida pelos métodos de captura de imagem (GANESAM, SHANMUGAM, 2020; CELESTINO, 2010).

Chandralekha et al. (2016) demonstraram que a técnica de liofilização se destacava frente a outros métodos de secagem no quesito de retenção de cor e recuperação de bioatividade da molécula em estudo com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Ademais, em estudo recente, Galetović et al. (2020) extraíram, purificaram e encapsularam por liofilização ficobiliproteínas isoladas de cianobactérias da região do Atacama, Chile. Os resultados evidenciaram que os pigmentos apresentaram estabilidade química e espectroscópica em variação de pH 5,0 a 8,0 e em temperaturas de 0 a 50 °C. Os pigmentos foram então utilizados em testes como corantes em formulações lácteas.

Figura 24 - Microscopia Confocal de R-Ficoeritrina de *S. filiformis* encapsulada (Liofilização) com diferentes concentrações de iota carragenana



Fonte: Elaborado pelo autor (2020). Legenda: A - 0,5% de iota carragenana; B – 1,0% de iota carragenana; C – 1,5% de iota carragenana; D – 2,0% de iota carragenana. Escala: 10 µm.

4.4 Perspectivas

Percebe-se que o presente trabalho buscou metodologias e técnicas que visam um

menor custo associado à formação do encapsulado de R-FE da *S. filiformis* nas diferentes etapas do processo. O cultivo da macroalga em cordas pode favorecer o escalonamento do processo em escala industrial, por exemplo, assim como a possibilidade de extração do agente encapsulante iota-carragenana da própria macroalga, sendo aplicado o conceito de biorrefinaria. As etapas de extração e purificação também podem ser manipuladas com adições ou retiradas de operações unitárias, visando diferentes aplicações do pigmento final.

5 CONCLUSÃO

A R-Ficoeritrina pura, extraída da macroalga marinha *Solieria filiformis*, abundante no litoral cearense, foi encapsulada com sucesso utilizando iota-carragenana como material de parede por meio das técnicas de atomização (*spray dryer*) e liofilização. Foram obtidas microcápsulas de R-FE e iota-carragenana com morfologias esféricas e laminares fluorescentes. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar a estabilidade do pigmento encapsulado, visando sua aplicação biotecnológica e industrial.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF N. **Agricultural importance of algae**. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, v. 11, n. 54, 2012.

ADIR, N.; LERNER, N. **The crystal structure of a novel unmethylated form of C-phycocyanin, a possible connector between cores and rods in pycobilisomes**, J. Biol. Chem. 278, 25926–25932, 2003.

AGILENT. **Agilent (AFC)**. Disponível em:
<https://www.chem.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=PB20-10&catId=SubCat2ECS_655142>. Acesso em: 30 set. 2020^a.

AGILENT. **Agilent (C-FC)**. Disponível em:
https://www.chem.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=PB11&catId=SubCat2ECS_655142. Acesso em: 30 set. 2020b.

AGILENT. **Agilent (R-FE)**. Disponível em:
https://www.chem.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=PB32-10&catId=SubCat2ECS_655142. Acesso em: 30 set. 2020c.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (C-FC)**. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52468?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-2>. Acesso: 30 set. 2020a.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (AFC)**. Disponível em:
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a7472?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-4. Acesso em: 30 set. 2020b.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (R-FE)**. Disponível em:
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52412?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-5. Acesso em: 30 set. 2020c.

ALDRICH, S. **Sigma-Aldrich (B-FE)**. Disponível em:
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1286?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-3. Acesso em: 30 set. 2020d.

AWAD, N. E. **Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca***. Phytother Res. 14, 641–643, 2000.

AZEREDO, H.M.C., DIVISION, C., ESTEVINHO, B.N., ROCHA, F., SANTOS, L., ALVES, A., DE AZEREDO, H.M.C., AZEREDO, H.M.C. **Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos**, Alimentação e Nutrição, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2005.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWafa, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. **Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications**, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(1), 143–182, 2015.

BALD, D., KRUIP, J., & RÖGNER, M. **Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems**, *Photosynthesis Research*, 49(2), 103–118, 1996.

BAKER, R. **Controlled release of biologically active agentes**, New York: John Wiley & Sons, p.206-214, 1986.

BAWEJA, P., KUMAR, S., SAHOO, D., & LEVINE, I. **Biology of Seaweeds**. Seaweed in Health and Disease Prevention, 41–106, 2016.

Disponível em: <<http://www.livescience.com/16759-sea-weeds-global-warming.html>>.

Acesso em: 10 ago. 2020.

BASTOS FILHO, A. J. U. **Purificação e caracterização do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha Solieria filiformis (Kützinger) P. W. Gabrielson**. Universidade Federal do Ceará, 2016.

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

BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. **Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from Porphyridium cruentum. Semipreparative highperformance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits**. *Journal of chromatography. A*, v. 917, n. 1-2, p. 135–45, 2001.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. **Problems associated with spray drying of sugar-rich foods**, *Drying Technology*, 15, 671e684, 1997.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (R-FE)**. Disponível em: <<https://columbiabiosciences.com/product/surelight-r-phycoerythrin/>>. Acesso em: 30 set. 2020a.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (B-FE)**. Disponível em: <<https://columbiabiosciences.com/product/surelight-b-phycoerythrin-b-pe/>>. Acesso em: 30 set. 2020b.

BIOSCIENCES, C. **Columbia Biosciences (AFC)**. Disponível em: <<https://columbiabiosciences.com/product/surelight-allophycocyanin-apc/>>. Acesso em: 30 set. 2020c.

BIOTECHNOLY, B. **Binmei Biotechnology (FE)**. Disponível em: <<http://en.binmeichina.com/Phycoerythrin/Phycoerythrin%20Powder.shtml>>. Acesso em: 10 out. 2020.

BOGORAD, L. **Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation**. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26, 369–401, 1975.

BOROWITZKA, M. **High-value products from microalgae—their development and commercialisation**, *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756, 2013.

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

BRAZEL, C. S. **Microencapsulation: offering solutions for the food industry**, Cereal Foods World, v.44, n.6, p.388-393, 1999.

BRITO MONTEIRO, Á. A. **Otimização da extração de R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P. W. Gabrielson e sua aplicação como corante natural em alimentos**. Universidade Federal do Ceará, 2017.

BRYANT, D. A.; GLAZER, A. N.; EISERLING, F. A. **Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp.** Archives of Microbiology, v. 110, n. 1, p. 61–75, 1976.

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

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

CARACCIOLO, G. **Liposome –protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines**, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11(3), 543 -557, 2015.

CERVANTES-MARTÍNEZ, C. V.; MEDINA-TORRES, L.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; CALDERAS, F.; SÁNCHEZ-OLIVARES, G.; HERRERA-VALENCIA, E. E.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. **Study of spray drying of the Aloe vera mucilage (*Aloe vera barbadensis* Miller) as a function of its rheological properties**, LWT - Food Science and Technology, 55(2), 426–435, 2014.

CHALOUB, R. M.; MOTTA, N. M. S.; DE ARAUJO, S. P.; DE AGUIAR, P. F.; DA SILVA, A. F. **Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas* sp. (*Cryptophyceae*)**. Algal Research, v. 8, p. 89–94, 2015.

CHANDRALEKHA, A.; TAVANANDI, A.H.; AMRUTHA, N.; HEBBAR, H.U.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GADRE, R. **Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life**, Drying technology, 34(11), 1307-1318, 2016.

CHANG, W.; JIANG, T.; WAN, Z.; ZHANG, J.; YANG, Z.; LIANG, D. **Crystal Structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å Resolution**, Journal Of Molecular Biology, v. 262, n. 5, p. 721-722, 1996.

CHEN, I.L.; GERWICK, W.H.; SCHATZMAN, R.; LANEY, M. **Isorawsonol and related IMO dehydrogenase inhibitors from the tropical alga *Avrainvillea rawsoni***. J. Nat. Prod. 57, 947–952, 1984.

CHEN, C.; CHI, Y. J.; XU, W. **Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate**, Food and Bioprocess Technology, 2011.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C. **Microencapsulação de ingredientes alimentícios**. Bol. SBCTA, v.36, n.1, p.12-18, 2002.

CONTRERAS-MARTEL, C. **Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from Gracilaria chilensis: A case of perfect hemihedral twinning**, Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 57, n. 1, p. 52–60, 2001.

DANTAS, A. C. M. **Gracilaria birdiae como biomassa para a produção de pigmento e ágar sob o conceito de biorrefinaria e sua importância no mercado brasileiro**. Universidade Federal do Ceará, 2018.

DELIA, S. C.; CHÁVEZ, G. M.; LEÓN-MARTÍNEZ FRANK, M.; ARACELI, S. G. P.; IRAIS, A. L.; FRANCO, A. A. **Spray drying microencapsulation of betalain rich extracts from Escontria chiotilla and Stenocereus queretaroensis fruits using cactus mucilage**, Food Chemistry, 2018.

DEMIRBAS, A.; ATIH DEMIRBAS, M. **Importance of algae oil as a source of biodiesel**. Energy Conversion and Management, 52(1), 163–170, 2011.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, A. M. B.; DE MORAIS, R. M. S. C. **Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications**. *Mar. Drugs*, 13, 2967-3028, 2015.

DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F.; PIETERS, J. G. **Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities**, Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol., v.1, n.2, p.75-94, 2003.

DESOBRY, S. A.; NETTO, F. M.; LABUZA, T. P. **Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for -carotene encapsulation and preservation**, J. Food Sci., v. 62, n.6, p.1158-1162, 1997.

DRUSCH, S. **Sugar beet pectin: a novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying**, Food Hydrocolloids 21:1223–8, 2007.

DUMAY, J.; CLÉMENT, N.; MORANÇAS, M.; FLEURENCE, J. **Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction**, Bioresource Technology, 2013.

DZIEZAK, J. D. **Microencapsulation and encapsulated ingredients**, Food Technol., v.42, n.4, p.136-151, 1988.

EL GAMAL, A. A. **Biological importance of marine algae**, Saudi Pharmaceutical Journal, 18(1), 1–25, 2010.

ERIKSEN, N. T. **Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine**, Appl Microbiol Biotechnol 80:1–14, 2008.

EUN, J. B.; MARUF, A.; DAS, P. R.; NAM, S. H. **A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying**, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–26, 2019.

EZHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; JENA, B. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. **Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality**, Journal of Food Engineering, 117(4), 513–520, 2013.

FAO. **FAO Aquaculture Newsletter**, FAO Aquaculture Newsletter, 2020.

FISH 2.0. **FISH 2.0 ALGAE investor insights**, 2017.

GALLAND-IRMOULI, A. V.; PONS, L.; LUÇON, M.; VILLAUME, C.; MRABET, N. T.; GUÉANT, J. L.; FLEURENCE, J. **One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis**. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 739, n. 1, p. 117–123, 2000.

GALETOVIĆ, A.; SEURA, F.; GALLARDO, V.; GRAVES, R.; CORTÉS, J.; VALDIVIA, C.; GÓMEZ-SILVA, B. **Use of Phycobiliproteins from Atacama Cyanobacteria as Food Colorants in a Dairy Beverage Prototype**, Foods, 9(2), 244, 2020.

GANTT, E.; LIPSCHULTZ, C. A. **Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis**. Biochemistry (Mosc.) 13, 2960–2966, 1974.

GAO, Y.; GREGOR, C.; LIANG, Y.; TANG, D.; TWEED, C. **Algae biodiesel - a feasibility report**. Chemistry Central Journal, v. 6, n. 1, p. 1-16, 23 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC.

GANESAN, A.R.; SHANMUGAM, M. **Isolation of phycoerythrin from *Kappaphycus alvarezii*: a potential natural colourant in ice cream**, J Appl Phycol, 2020.

GANTT, E. **Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and Blue-Green algae**. In J. F. D.G.H. Bourne, & K. W. Jeon (Eds.), International Review of Cytology (Vol. 66(pp. 45–80), 1980.

GANTT, E.; LIPSCHULTZ, C. A. **Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis**, Biochemistry, 13(14), 2960–2966, 1974.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; MULLIGAN, C. N. **Encapsulation in the food industry: a review**, Int. J. Food Sci. Nutr., v.50, p.213-224, 1999.

GLAZER, A. N.; HIXSON, C. S. **Characterization of R-phyocyanin. Chromophore content of R-phyocyanin and C-phycoerythrin**. Journal of Biological Chemistry, 250(14), 5487–5495, 1975.

GLAZER, A. N. **Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer.** *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Bioenergetics*, v. 768, n. 1, p. 29-51, 1984.

GLAZER, A. N.; LUNDELL, D. J.; YAMANAKA, G.; WILLIAMS, R. C. **The structure of a «simple phycobilisome.** *Annales de L'Institut Pasteur / Microbiologie*, v. 134, n. 1, p. 159-180, 1983.

GLAZER, A. N. **Light Harvesting by Phycobilisomes.** *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, v. 14, n. 1, p. 47-77, 1985.

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

GLAZER, A. N. **Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores,** 105-112, 1994.

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

GLAZER, A. N. **Phycobiliproteins.** In: Lester Packer, A.N.G. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 291-303 (Chapter 31), 1988.

GRAHAM, J. E.; GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**, 2009.

GU, D.; LAZO-PORTUGAL, R.; FANG, C.; WANG, Z.; MA, Y.; KNIGHT, M.; ITO, Y. **Purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* by centrifugal precipitation chromatography,** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1087-1088, n. 2017, p. 138-141, 2018.

GUTIÉRREZ, M. C.; UTRILLA-COELLO, R. G.; SOTO-CASTRO, D. **Effect of *Opuntia ficus-indica* mucilage in the ecological extraction, drying, and storage of eggplant anthocyanins,** *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), 2018.

HADIYANTO, H.; CHRISTWARDANA, M.; SUZERY, M.; SUTANTO, H.; NILAMSARI, A. M.; YUNANDA, A. **Effects of Carrageenan and Chitosan as Coating Materials on the Thermal Degradation of Microencapsulated Phycocyanin from *Spirulina sp.*** *International Journal of Food Engineering*, 2019.

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

HAMBLETON, A.; FABRA, M.J.; DEBEAUFORT, F.; DURY-BRUN, C.; VOILLEY, A. **Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion-based films used for encapsulation of active food compounds,** *J. Food Eng.*, 93, 80-88, 2009.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; ÖZOGUL, Y.; REGENSTEIN, J. M. **Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 446-465, 2015.

HANSEN, J. H.; LARSEN, H.; GRØNDAL, J. **Carrageenan compositions and methods for their production.** US patent application: US 6,063,915, 2000.

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

HIGA, T. **2-(1-Chloro-2-hydroxyethyl)-4, 4-dimethylcy-clohexa2, 5-dienone, precursor of 4, 5-dimethylbenzo[b] furan from red alga *Desmia hornemanni*.** Tetrahedron Lett. 26, 2335–2336, 1985.

HIGA, T. **Bioactive metabolites from marine organisms of Okinawa waters in studies in natural products chemistry**, vol. 5 structure elucidation (Part B). In: Attaur-Rahman (Ed.), Publisher Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, p. 341, 1989.

HIGGS, M. D.; VANDERAH, D. J.; FAULKNAR, D. J. **Polyhalog**, 1977.

HU, I. C. **Production of potential coproducts from microalgae**, Biofuels from Algae, 345–358, 2019.

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

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

KAR, A; MAHATO, D. K; PATEL, A. S; BAL, L. M. **The Encapsulation Efficiency and Physicochemical Characteristics of Anthocyanin from Black Carrot (*Daucus Carota Ssp. Sativus*) as Affected by Encapsulating Materials**, Curr Agri Res, 2019.

KAREL, M.; LANGER, R. **Controlled release of food additives.** In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Flavor encapsulation. Washington, DC: ACS, p.29-36, 1988.

KAUSHIK, V.; ROOS, Y. H. **Limonene encapsulation in freeze drying of gum arabicsucrose-gelatin systems**, LWT Food Sci. Technol. 40, 1381–1391, 2007.

KEHOE, D. M. **Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 20, p. 9029–30, 2010.

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

K. E.; COLLIER, J. L.; GROSSMAN, A. R. **Evolution of the phycobiliproteins.** J. Mol. Biol. 248, 79–96, 1995.

KE, B. **Photosynthesis Photobiochemistry and Photobiophysics**, Advances in Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, 2001.

- KING, A. H. **Encapsulation of food ingredients**. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. Washington, DC: ACS, p.26-39, 1995.
- KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. **A modified system of nomenclature for red algal galactans**. *Botanica Marina*, 37, 163–169, 1994.
- KORNPORST, J. **Encyclopedia of marine natural products**, Wiley, 2011.
- KULA, M.-R.; KRONER, K. H.; HUSTEDT, H. **Purification of enzymes by liquid-liquid extraction**, In: *Reaction Engineering. Advances in Biochemical Engineering*. 24. ed. Berlin: Springer, 1982.
- KUNIYOSHI, M.; YAMADA, K.; HIGA. **A biologically active diphenyl ether from the green alga *Cladophora fascicularis***. *Experientia* 41, 523–524, 1985.
- LAURECI, R.; BRESCIANI, M.; LAMI, A.; MORABITO, G. **Chlorophyll a interference in phycocyanin and allophycocyanin spectrophotometric quantification**, *Journal of Limnology*, 77(1), 1–14, 2017.
- LE GUILLARD, C.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BRUZAC, S.; RAGON, J.; FLEURENCE, J.; BERGÉ, J. **Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition**, *Algal Research*, v. 12, p. 522–528, 2015.
- LIU, L. N.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; ZHOU, B. **One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata***, *Journal of Biotechnology*, v. 116, n. 1, p. 91–100, 2005.
- LIU, X.; CLARENS, A. F.; COLOSI, L. M. **Algae biodiesel has potential despite inconclusive results to date**. *Bioresource Technology*, 104, 803–806, 2012.
- LI, W.; SU, H.; JUN CHEN, Y. P.; LIU, L.; LIU, Q.; QIN, S. **Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects**, *Biotechnology Advances*, Volume 37, Issue 2, Pages 340-353, 2019.
- LOURENÇO, S. O. **A Diversidade das Algas**. In: *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. a. p. 33–129.
- LOURENÇO, S. O. **Tópicos Especiais Sobre Cultivo de Microalgas**. In: *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. b. p. 453–475.
- LUNDELL, D. J.; WILLIAMS, R. C.; GLAZER, A. N. **Molecular architecture of a light-harvesting antenna. In vitro assembly of the rod substructures of *Synechococcus 6301* phycobilisomes**, *J. Biol. Chem.* 256, 3580–3592, 1981.
- MACCOLL, R. **Cyanobacterial phycobilisomes**, *J. Struct. Biol.* 124, 311–334, 1988.

- MACARTAIN, P.; GILL, C. I. R.; BROOKS, M.; CAMPBELL, R.; ROWLAND, I. R. **Nutritional Value of Edible Seaweeds**, Nutrition Reviews, Volume 65, Issue 12, Pages 535–543, 2007.
- MAHDI, A. A.; MOHAMMED, J. K.; AL-ANSI, W.; GHALEB, A. D. S.; AL-MAQTARI, Q. A.; MA, M.; WANG, H. **Microencapsulation of Fingered citron extract with gum arabic, modified starch, whey protein, and maltodextrin using spray drying**, International Journal of Biological Macromolecules, 2019.
- MAKKAR, H. P. S.; TRAN, G.; HEUZÉ, V.; GIGER-REVERDIN, S.; LESSIRE, M.; LEBAS, F.; & ANKERS, P. **Seaweeds for livestock diets: A review**. Animal Feed Science and Technology, 212, 1–17, 2016.
- MEDINA-TORRES, L.; GARCÍA-CRUZ, E. E.; CALDERAS, F.; GONZÁLEZ LAREDO, R. F.; SÁNCHEZ-OLIVARES, G.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. **Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*)**, LWT - Food Science and Technology, 50(2), 642–650, 2013.
- MENSI, F.; KSOURI, J.; MENSI, F.; SEALE, E. **Optimizing R-phycoerythrin purification from the red algae *Gracilaria verrucosa* in polymer-salt aqueous two-phase system using response surface methodology**, Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô, v. 41, p. 63–77, 2014.
- MITTAL, R.; TAVANANDI, H. A.; MANTRI, V. A.; RAGHAVARAO, K. M. **Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta)**, Ultrasonics Sonochemistry, v. 38, p. 92-103, 2017.
- MITTAL, R.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. **Extraction of R-Phycoerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*, employing consortia of enzymes**, Algal Research, v. 34, p. 1–11, 2018, 2017.
- MIYABE, Y.; FURUTA, T.; TAKEDA, T.; KANNO, G.; SHIMIZU, T.; TANAKA, Y.; GAI, Z.; YASUI, H.; KISHIMURA, H. **Structural Properties of Phycoerythrin from *Dulse* *Palmaria palmata***, Journal Of Food Biochemistry, v. 41, n. 1, p. 1-11, 5 jul. 2016.
- MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H. A. **Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy**. Trends in Food Science & Technology, 23(2), 83–96, 2012. Disponível em: <<https://www.globalfert.com.br/noticias/novas-tecnologias/valor-do-mercado-de-fertilizantes-de-algas-no-valor-de-usd-17-1-milhoes-ate-2025/#:~:text=FELTON%2C%20Califórnia%20%2C%2019%20de%20fevereiro,17%2C1%20milhões%20até%202025%20.&text=O%20extrato%20de%20algas%20marinhas,em%20pó%20quanto%20em%20líquido>>. Acesso em: 4 set. 2020.
- MUNIER, M.; JUBEAU, S.; WIJAYA, A.; MORANÇAS, M.; DUMAY, J.; MARCHAL, L.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. **Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum***, Food Chemistry, v. 150, p. 400–407, 2014.
- MUNIER, M.; MORANÇAS, M.; DUMAY, J.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. **One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu***,

Journal Of Chromatography B, v. 992, p. 23-29, 2015.

NAIR, D.; KRISHNA, J. G.; PANIKKAR, M. V. N.; NAIR, B. G.; PAI, J. G.; NAIR, S. S. **Identification, purification, biochemical and mass spectrometric characterization of novel phycobiliproteins from a marine red alga, *Centroceras clavulatum***, International Journal of Biological Macromolecules, v. 114, p. 679–691, 2018.

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; & DASTIDAR, M. G. **Production and characterization of biodiesel from algae**. Fuel Processing Technology, 120, 79–88, 2014.

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

NGUYEN, H. P. T.; MORANÇAS, M.; DÉLÉRIS, P.; FLEURENCE, J.; NGUYEN-LE, C. T.; VO, K. H.; DUMAY, J. **Purification of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Gracilaria gracilis* by anion-exchange chromatography**, J Appl Phycol 32, 553–561, 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, 2006.

O'CARRA, P.; MURPHY, R. F.; KILLILEA, S. D. **The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification.** *Biochem J*, 187 (2): 303–309, 1980.

OLIVEIRA, A. C. V. **Efeitos da aplicação do extrato bruto da alga vermelha *Gracilaria birdiae* em cultura de alface (*Lactuca sativa*)**. 2017. Universidade Federal do Ceará, 2017.

ORTIZ-BASURTO, R. I.; RUBIO-IBARRA, M. E.; RAGAZZO-SANCHEZ, J. A.; BERISTAIN, C. I.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M. **Microencapsulation of *Eugenia uniflora* L. juice by spray drying using fructans with different degrees of polymerisation**, Carbohydrate Polymers, 175, 603–609, 2017.

PAPOUTSIS, K.; GOLDING, J.; VUONG, Q.; PRISTIJONO, P.; STATHOPOULOS, C.; SCARLETT, C.; BOWYER, M. **Encapsulation of Citrus By-Product Extracts by Spray-Drying and Freeze-Drying Using Combinations of Maltodextrin with Soybean Protein and κ -Carrageenan**, Foods, v. 7, n. 7, p. 115-125, 2018.

PATEL, A. S.; LAKSHMIBALASUBRAMANIAM, S.; NAYAK, B.; TRIPP, C.; KAR, A.; SAPPATI, P. K. **Improved stability of phycobiliprotein within liposome stabilized by polyethylene glycol adsorbed cellulose nanocrystals**, International Journal of Biological Macromolecules, 2020.

PELLICER, J. A.; FORTEA, M. I.; TRABAL, J.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. I.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. **Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed**, Powder Technology, Volume 347, 179-185, 2019.

PEREIRA, T.; BARROSO, S.; MENDES, S.; AMARAL, R. A.; DIAS, J. R.; BAPTISTA, T.; GIL, M. M. **Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae**

Gracilaria gracilis for substitution of synthetic food colorants, Food Chemistry, 126688., 2020.

PEREIRA, T.; BARROSO, S.; MENDES, S.; GIL, M. M. **Stability, kinetics, and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis***, Journal of Food Science, 2020.

PORRAS-SAAVEDRA, J.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; LARTUNDO-ROJAS, L.; DE JESÚS PEREA-FLORES, M.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J.; PALACIOS-GONZÁLEZ, E.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. **Chemical components distribution and morphology of microcapsules of paprika oleoresin by microscopy and spectroscopy**, Food Hydrocolloids, 81, 6–14, 2018.

PSZCZOLA, D. **Encapsulated ingredients: providing the right fit**, Food Technol., v.52, n.12, p.70-77, 1998.

PUNAMPALAM, R.; KHOO, K. S.; SIT, N. W. **Evaluation of antioxidant properties of phycobiliproteins and phenolic compounds extracted from *Bangia atropurpurea***, Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences, v. 14, n. 2, p. 289–297, 2018.

PURNAMAYATI, L.; DEWI, E. N.; KURNIASHI, R. A. **Phycocyanin stability in microcapsules processed by spray drying method using different inlet temperature**, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 116, n. Conference 1, p. 012076, 2018.

RÉ, M. I. **Microencapsulation by spray drying**. Drying Technol., v.16, p.1195-1236, 1998.

REINECCIUS, G. A. **Carbohydrates for flavor encapsulation**, Food Technol., v.51, n.3, p.144-146, 149, 1991.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. **Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials**. J. Agr. Food Chem., v.38, p.1288-1294, 1990.

RUBILAR, M; MORALES, E; CONTRERAS, K; CEBALLOS, C; ACEVEDO, F.; VILLARROEL, M.; SHENE, C. **Development of a soup powder enriched with microencapsulated linseed oil as a source of omega-3 fatty acids**, Eur J Lipid Sci Technol 114:423–33, 2012.

RUDOLPH, B. **Seaweed product: red algae of economic significance**. In R. E. Martin, E. P. Carter, L. M. Davis, & G. J. Flich (Eds.), Marine and Freshwater Products Handbook (pp. 515–529). Lancaster, USA: Technomic Publishing Company, Inc, 2000.

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

SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D. **An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phycocyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (*Bangiales*, *Rhodophyta*)**, In: JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, 2007.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. **Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization**, J Appl Phycol 20:113–136, 2008.

SENTHILKUMAR, N., KURINJIMALAR, C., THANGAM, R., SURESH, V., KAVITHA, G., GUNASEKARAN, P., RENGASAMY, R. **Further studies and biological activities of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii***, International Journal of Biological Macromolecules, v. 62, p. 107–116, 2013.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A. **Microencapsulation: a Promising Alternative for Preserving Natural Products**. Revista Fitos, v. 5, p. 52–57, 2010.

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

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

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

SOUZA LOPES, F. L. **Otimização do processo de purificação da r-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha solieria filiformis e determinação da sua capacidade antioxidante**. Universidade Federal do Ceará, 2018.

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

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

SUDHAKAR, M. P.; JAGATHEESAN, A.; PERUMAL, K.; ARUNKUMAR, K. **Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants**, Algal Research, v. 8, p. 115–120, 2015.

SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; CHEN, L. **A rod-linker-contained R-phycoerythrin complex from the intact phycobilisome of the marine red alga *Polysiphonia urceolata***. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 76(1–3), 1–11, 2004.

SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; ZHAO, M.; FU, X.; WANG, L. **Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica***. Protein Expression and Purification, 64(2), 146–154, 2009.

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

TANDEAU DE MARSAC, N.; COHEN-BAZIRE, G. **Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(4), 1635–1639, 1977.

TAYLOR, E. L.; TAYLOR, T. N.; KRINGS, M. **Algae.** In: THOMAS, N. T.; EDITH, L. T.; KRINGS, M. (Eds.). Paleobotany. 2. ed. Elsevier, 2009. p. 121–160.

TONTUL, I.; TOPUZ, A. **Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties,** Trends in Food Science & Technology, 63, 91–102, 2017.

TIWARI (SHARMA), S.; CHAKKARAVARTHI, A.; BHATTACHARYA, S. **Imaging and image analysis of freeze-dried cellular solids of gellan and agar gels,** Journal of Food Engineering, 165, 60–65, 2015.

UNIVERSITY OF IDAHO. Department of Chemistry. **Phases of matter.** Disponível em: <<http://www.chem.uidaho.edu/~honors/phases.html>>. Acesso em: 02 ago. 2004.

VALENTE, L. M. P.; REMA, P.; FERRARO, V.; PINTADO, M.; SOUSA-PINTO, I.; CUNHA, L. M.; ARAÚJO, M. **Iodine enrichment of rainbow trout flesh by dietary supplementation with the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*.** Aquaculture, 446, 132–139, 2015.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. 2009. **Algae. An Introduction to Phycology.** Cambridge University Press, Daryaganj, New Delhi, India.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S.H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. **¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry,** Trends in Food Science & Technology, v. 13, n. 3, p. 73–92, 2002.

YEW, G. Y.; LEE, S. Y.; SHOW, P. L.; TAO, Y.; LAW, C. L.; NGUYEN, T. T. C.; CHANG, J. S. **Recent advances in algae biodiesel production: From upstream cultivation to downstream processing.** Bioresource Technology Reports, 100227, 2019.

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

WANG, L.; WANG, S.; FU, X.; SUN, L. **Characteristics of an R-Phycoerythrin with Two γ Subunits Prepared from Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*,** Plos One, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015.

WINBERG, P. C.; FITTON, H. J.; STRINGER, D.; KARPINEC, S. S.; GARDINER, V. A. **Controlling seaweed biology, physiology and metabolic traits in production for commercially relevant bioactives in glycobiology.** In: Jacquot, J.P., Gadad, P. (Eds.), Bourgougnon, N. (vol Ed.), Advances in Botanical Research. Sea Plants, vol. 71, pp. 221–252, 2014.

WU, Q.; FU, X. P.; SUN, L. C.; ZHANG, Q.; LIU, G. M.; CAO, M. J.; CAI, Q. F. **Effects of physicochemical factors and in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activity of R-phycoerythrin from red algae *Bangia fusco-purpurea***, International Journal of Food Science & Technology, p. n/a–n/a, 2015.

XU, D.; SUN, N.; XUAN, S.; WANG, C.; HUANG, T.; LI, C.; ZHANG, J.; YANG, W. **Effect of different drying methods on the physicochemical properties and phycobiliprotein structure of *Porphyra haitanensis***, International Journal of Food Engineering, 20200081, 2020.

ZANONI, F.; PRIMITERRA, M.; ANGELI, N.; ZOCCATELLI, G. **Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: effects on stability and color properties**, Food Chemistry, 125535, 2019.

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

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