



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

ÁUREA ANETTE MONTEIRO BRITO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA DA MACROALGA
MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson E SUA
APLICAÇÃO COMO CORANTE NATURAL EM ALIMENTOS**

FORTALEZA

2017

ÁUREA ANETTE MONTEIRO BRITO

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA
VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson E SUA APLICAÇÃO COMO
CORANTE NATURAL EM ALIMENTOS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo

Coorientador: Me. Acrísio José Uchôa Bastos Filho

Fortaleza
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- B877o Brito, Áurea Anette Monteiro.
Otimização da extração de R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P. W. Gabrielson e sua aplicação como corante natural em alimentos / Áurea Anette Monteiro Brito. – 2017. 90 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientação: Prof. Me. Acrísio José Uchôa Bastos Filho.

1. R-ficoeritrina. 2. *Solieria filiformis*. 3. Corante natural. 4. Corante alimentício. 5. Análise sensorial.
I. Título.

CDD 661

ÁUREA ANETTE MONTEIRO BRITO

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE R-FICOERITRINA DA MACROALGA MARINHA
VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson E SUA APLICAÇÃO COMO
CORANTE NATURAL EM ALIMENTOS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 06/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ticiania de Brito Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Tatiana de Oliveira Lemos
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

A Deus.

Aos meus pais, Maria Alice e José Antônio.

Em memória à minha mãe e ao meu avô.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e saúde durante essa caminhada.

Aos meus pais, Maria Alice Brito e José António Brito, que sempre lutaram por mim e fizeram todo o possível para que eu conseguisse chegar até aqui. Infelizmente, minha mãe faleceu depois do meu primeiro ano de curso, mas, onde quer que ela esteja, sei que ela está sorrindo para mim nesse momento tão esperado.

Às minhas irmãs, Aksana Brito e Alícia Brito, pelos momentos de tristeza e alegria que compartilhamos juntas durante essa fase, amo muito vocês!

À toda minha família, por todo suporte e ajuda nesses anos que não foram fáceis. Especialmente aos meus avôs maternos, meu, recentemente falecido, avô paterno, às minhas tias, principalmente, Ermelinda Amélia e Maria de Fátima e ao meu tio e padrinho Vicente Barradas Monteiro, serei eternamente grata a todos vocês!

Ao Lucas Secon, por todo apoio durante os últimos dois anos, pela amizade e parceria, pela sua força de vontade de sempre me ver crescer e, principalmente, por aturar pacientemente os estresses nessa etapa final, muito obrigada (Tmo)!

Agradeço imensamente à minha orientadora, Dra. Márjory Holanda, pela confiança depositada em mim e por ter me aceito na sua equipe, mesmo com pouco conhecimento inicial. Por todo conhecimento a mim transmitido, pelos momentos descontraídos e pela alegria contagiante, muito obrigada!

Ao meu coorientador, Acrísio Bastos, pela paciência em me explicar tudo e pela alegria de trabalhar contigo durante esses últimos dois anos. Esse trabalho não seria o mesmo sem você, muito obrigada!

A todos os integrantes do Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP), principalmente George Meredite, pelos momentos de tensão e alegria, foi um prazer fazer parte desse grupo de pesquisa e espero que cada um de vocês alcancem os seus objetivos e sejam muito felizes, obrigada por tudo!

À profa. Dra. Norma Benevides que permitiu o uso de equipamentos e reagentes do seu laboratório, CARBOLEC, contribuído para a realização deste trabalho. Obrigada!

À profa. Dra. Maria Raquel Miranda por permitir o uso de equipamentos no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos (LABFRUTOS), Obrigada!

À Mônica Lopes do LABFRUTOS que, gentilmente, ajudou no manuseio de equipamentos, permitindo análises de dados importantíssimos para esse trabalho, obrigada!

À Livia, do Laboratório de Frutos Tropicais, que realizou as análises colorimétricas, muito obrigada!

À profa. Dra. Maria do Carmo Passos Rodrigues que ajudou demais na parte da análise sensorial junto com a profa. Dra. Tatiana Lemos, muitíssimo obrigada!

A todos os integrantes do Laboratório de Análise sensorial que me ajudaram na realização da análise sensorial, sou muito grata a cada um de vocês!

Ao Francisco Éwerton que, voluntariamente, ajudou durante a realização da análise sensorial, muitíssimo obrigada!

À Coordenação do curso de Bacharelado em Biotecnologia, por estar sempre prontamente disponível a ajudar os alunos e melhorar a nossa formação, meu mais sincero obrigada!

Ao inestimável Gilmar Ferreira, secretário do curso, que sempre me ajudou desde a primeira vez que pisei na sua sala. Obrigada por todas as declarações (acho que sou recordista em pedir declaração), pelas informações e por você ter tanta disposição em levar a Biotecnologia UFC sempre a um patamar mais alto.

Ao corpo docente da Biotecnologia UFC, muito obrigada!

Às minhas inestimáveis amigas do curso, Ana Cecília e Bárbara Gurgel, com quem dividi momentos especiais. Vocês são as melhores pessoas que eu conheci durante esta etapa da minha vida! Muito obrigada pelas risadas, reclamações, alegria e parceria durante todos esses anos, levarei vocês no meu coração, suas lindas!

À Coordenadoria de Assuntos Internacionais (CAI) por toda ajuda e compreensão, obrigada!

À Universidade Federal do Ceará por ter me aceitado no programa de intercâmbio e por disponibilizar recursos e espaço para a realização deste trabalho, muitíssimo obrigada!

À CAPES e ao CNPQ pela disponibilização de recursos que permitiram a realização deste trabalho, obrigada!

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre”. (*Gandhi*).

RESUMO

Os corantes naturais têm sido cada vez mais exigidos por consumidores de produtos alimentícios industrializados, visto que vários corantes artificiais têm sido relacionados a diferentes reações adversas à saúde humana. Vários corantes naturais já são usados pela indústria alimentícia, e as ficobiliproteínas extraídas das cianobactérias e algas vermelhas têm sido menos aplicadas devido ao baixo rendimento de extração. Uma espécie de alga vermelha encontrada em abundância no litoral cearense e com potencial para cultivo em sistema de maricultura é a *Solieria filiformis*, uma fonte renovável de R-ficoeritrina (R-FE). A R-FE apresenta uma coloração vermelha e fluorescência laranja/dourada. Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o rendimento da extração e purificação da R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *S. filiformis*, caracterizar suas propriedades espectroscópicas em diferentes pHs e seu potencial como corante natural vermelho em iogurte. Para tal, foi realizada extração aquosa seguida de precipitação proteica com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 90% de saturação a temperatura de $-18\text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas para obtenção da F0-90 que, em seguida, foi submetido à cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel, onde foi obtido rendimento duas vezes maior de R-FE do que os relatados na literatura para a mesma espécie de alga. O pico de cromatografia liofilizado (PIII-DEAE) foi solubilizado em tampões de diferentes pHs (2 a 12) e as características espectroscópicas da R-FE se mostraram estáveis na faixa de pH de 5 a 11. Os iogurtes que receberam as maiores concentrações da F0-90 e do PIII-DEAE apresentaram as melhores classificações para aceitação global, principalmente quando foi utilizado o pigmento com maior índice de pureza, diante do iogurte comercial. Diante disso foi possível concluir que a extração e purificação da R-FE de *S. filiformis* com uma etapa de congelamento aumenta duas vezes o rendimento de pigmento, o qual estável na faixa de pH de 5 a 11, além de representar uma excelente alternativa a corantes artificiais, podendo ser usada como corante natural em iogurte.

Palavras-Chave: R-ficoeritrina; Corante Natural; Corantes alimentícios, *Solieria filiformis*, Análise sensorial.

ABSTRACT

Natural dyes have been increasingly demanded by consumers of industrialized food products, as various artificial dyes have been linked to different adverse reactions to human health. Several natural dyes are already used by the food industry, and phycobiliproteins extracted from cyanobacteria and red algae have been less applied because of the low extraction yield. A species of red algae found in abundance on the Ceará coast and with potential for cultivation in a mariculture system is *Solieria filiformis*, a renewable source of R-phycoerythrin (R-FE). The R-FE has a red coloration and orange/gold fluorescence. Based on this, the objective of this work was to optimize the extraction and purification efficiency of R-phycoerythrin from *S. filiformis* red marine macroalga, to characterize its spectroscopic properties at different pHs and its potential as a natural red dye in yoghurt. For this purpose, aqueous extraction followed by protein precipitation with 90% saturation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at $-18\text{ }^\circ\text{C}$ for 48 hours was obtained to obtain F0-90, which was then subjected to ion exchange chromatography DEAE-Sephacel matrix, where twice the yield of R-FE was obtained than those reported in the literature for the same algal species. The freeze-dried chromatography peak (PIII-DEAE) was solubilized in buffers of different pHs (2 to 12) and the spectroscopic characteristics of the R-FE were stable in the pH range of 5 to 11. The yogurts that received the highest concentrations of F0-90 and PIII-DEAE presented the best classifications for global acceptance, especially when the pigment with the highest purity was used, before commercial yoghurt. It was concluded that the extraction and purification of *S. filiformis* R-FE with a freezing step increases the pigment yield twice, which is stable in the pH range of 5 to 11, and represents an excellent alternative to Artificial dyes, and can be used as a natural dye in yogurt.

Keywords: R-phycoerythrin; Natural dye; Food dyes; *Solieria filiformis*, sensory analysis.

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Classificação dos corantes alimentícios	18
Figura 2	Mercado mundial de corantes alimentícios naturais	19
Figura 3	Estrutura química das bilinas e suas ligações a resíduos de cisteína nas ficobiliproteínas	27
Figura 4	Estrutura do ficobilissomo encontrado em cianobactérias e algas vermelhas	28
Figura 5	Organização das subunidades proteicas α e β das ficobiliproteínas de cianobactérias e algas vermelhas	29
Figura 6	Representação esquemática da distribuição das bilinas nas subunidades proteicas α , β e γ das ficoeritrinas de cianobactérias e algas vermelhas	31
Figura 7	Estrutura tridimensional da R-ficoeritrina extraída de <i>Polysiphonia urceolata</i>	32
Figura 8	Características espectroscópicas da R-ficoeritrina purificada da macroalga vermelha <i>Solieria filiformis</i>	33
Figura 9	Macroalga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i> cultivada na Praia de Flecheiras, Trairi, CE	40
Figura 10	Protocolo otimizado de extração e purificação da R-ficoeritrina da macroalga vermelha <i>Solieria filiformis</i>	44
Figura 11	Aspecto visual das soluções tamponadas de R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> (PIII-DEAE) em diferentes pHs no tempo zero	49
Figura 12	Aspecto visual das soluções tamponadas de R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> de pHs extremos. (A) Tampão Acetato de sódio, 20 mM, pH 2,0; (B) Tampão Fosfato de potássio 20 mM, pH 12,0	49
Figura 13	Concentrações de R-ficoeritrina para cada pH. (a) tempo zero; (b) após 30 min.; (c) após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min	51
Figura 14	Intensidade de fluorescência para cada pH. (a) tempo zero; (b) após 30 min.; (c) após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min	52

Figura 15	Efeito do pH e estabilidade do espectro de absorção da R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> (PIII-DEAE). (a) Tempo zero; (b) após 30 min; (c); após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min	53
Figura 16	Efeito do pH e estabilidade do espectro de fluorescência da R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> (PIII-DEAE). (a) Tempo zero; (b) após 30 min.; (c); após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min	54
Figura 17	Apresentação das amostras de iogurte adicionados de F0-90 rico no pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i> submetidos a análise sensorial. (1) 0,0124 mR-FE/mL; (2) 0,0248 mg R-FE/mL; (3) 0,0372 mg R-FE/mL; (4) 0,0496 mg R-FE/mL; (5) 0,062 mg R-FE/mL; (6) iogurte comercial	60
Figura 18	Apresentação das amostras de iogurte adicionados de PIII-DEAE rico no pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i> submetidos a análise sensorial. (1) 0,0162 mR-FE/mL; (2) 0,0203 mg R-FE/mL; (3) 0,0243 mg R-FE/mL; (4) 0,0284 mg R-FE/mL; (5) 0,0324 mg R-FE/mL; (6) iogurte comercial	60
Figura 19	Frequência de notas hedônicas atribuídos a aceitação global de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i>	61
Figura 20	Frequência das notas hedônicas para a cor de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i> distribuídas pelas regiões de aceitação e rejeição	62
Figura 21	Frequência de notas hedônicas atribuídos a aceitação global de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i>	63
Figura 22	Frequência das notas hedônicas para a cor de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i> distribuídas pelas regiões de aceitação e rejeição	63
Figura 23	Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i>	64
Figura 24	Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de <i>S. filiformis</i> , distribuídas nas regiões de intenção negativa e positiva	

	65
Figura 25	Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de <i>S.filiformis</i>	66
Figura 26	Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de <i>S.filiformis</i> , distribuídas nas regiões de intenção negativa e positiva	66
Figura 27	Frequência das notas da escala do ideal atribuídas a cor de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de <i>S.filiformis</i>	68
Figura 28	Frequência das notas da escala do ideal atribuídas a cor de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de <i>S.filiformis</i>	70

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 Atividade antimutagência e mutagência de corantes sintéticos e naturais adicionados em alimentos	22
Tabela 2 Classificação química, nome alternativo e classificação dos diferentes pigmentos naturais adicionados em alimentos	23
Tabela 3 Origem, propriedades físico-químicas e aplicações dos corantes naturais mais utilizados pela indústria de alimentos	25
Tabela 4 Agregação e distribuição das bilinas nas subunidades proteicas das ficobiliproteínas de cianobactérias e algas vermelhas	30
Tabela 5 Protocolos de extração e purificação de R-ficoeritrinas de macroalgas vermelhas distribuídas pelo mundo	35
Tabela 6 Tabela de purificação da R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i> utilizando o protocolo otimizado	47
Tabela 7 Análise colorimétrica de iogurte natural adicionado de diferentes concentrações das frações F0-90 e PIII-DEAE contendo R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i> e iogurte de morango comercial	56
Tabela 8 Perfil dos julgadores participantes da análise sensorial de iogurtes naturais adicionados da F0-90 e PIII-DEAE contendo a R-FE de <i>S. filiformis</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
A_{280}	Absorbância a 280 nm
A_{564}	Absorbância a 564 nm
A_{618}	Absorbância a 618 nm
A_{730}	Absorbância a 730 nm
a^*	Coordenada vermelho/verde
AFC	Aloficocianina
b^*	Coordenada amarelo/ azul
b-FE	b-Ficoeritrina
B-FE	B-Ficoeritrina
C50	Resíduo de cisteína 50
C61	Resíduo de cisteína 61
C82	Resíduo de cisteína 82
C139	Resíduo de cisteína 139
C158	Resíduo de cisteína 158
C-FE	C-ficoeritrina
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para alimentos
CU-FE	CU-ficoeritrina
F0-90	Fração 90% de sulfato de amônio
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
FEC	Ficoeritrocianina

g	Grama
HCl	Ácido clorídrico
IF	Intensidade de fluorescência
IP	Índice de Pureza
kDA	kilodalton
L*	Luminosidade
M	Molar
m/v	Proporção massa/volume
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	nanômetro
PBS	Ficobilissomo
PCB	Ficocianobilina
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de dados de proteínas)
PEB	Ficoeritrobilina
PXB	Ficoviolobilina
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
R _{R-FE}	Rendimento de R-ficoeritrina
R-FE	R-ficoeritrina
Sf	Solieria filiformis
T	Temperatura
Tris	Trisaminometano

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Corantes alimentícios	17
2.2 Corantes alimentícios naturais versus artificiais	19
2.2.1 Corantes alimentícios de origem natural	23
2.2.1.1 Pigmentos Proteicos de Algas: Ficobiliproteínas	26
2.3 Extração e purificação de R-Ficoeritrina e sua aplicação na indústria alimentícia.....	33
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Materiais	40
4.2 Métodos	41
4.2.1 Otimização do protocolo de extração e purificação da R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	41
4.2.2 Determinação dos Teores de Proteínas	42
4.2.3 Determinação dos teores, rendimentos e índice de pureza da R-Ficoeritrina	43
4.2.4 Efeito do pH sobre as propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	45
4.2.5 Análises colorimétricas de iogurtes coloridos com R-Ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	45
4.2.6 Análise Sensorial de iogurtes adicionados de R-ficoeritrina de <i>S. filiformis</i>	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXO	86

1. INTRODUÇÃO

A procura por corantes naturais por parte da indústria alimentícia vem crescendo gradativamente. Um dos motivos do aumento dessa procura é devido ao fato de muitos corantes artificiais terem sido relacionados a diferentes reações adversas à saúde humana (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

O Brasil, por ser o país de maior biodiversidade mundial, (BRANDON *et al.*, 2005; FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006) possui matéria-prima suficiente para realização de pesquisa básica e aplicada no intuito de obter novas fontes de corantes naturais, porém essa área ainda é relativamente pobre (SATO *et al.*, 1992).

Dentre as riquezas da biodiversidade brasileira, as algas têm sido objetos de vários trabalhos na literatura relatando as aplicações de seus compostos (fenólicos, polissacarídeos, proteínas, pigmentos e peptídeos) em diferentes indústrias, inclusive as alimentícias (MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012; TEIXEIRA, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2014; HAFTING *et al.*, 2015).

Alguns pigmentos fotossintéticos sintetizados pelas macroalgas vermelhas denominados de ficobiliproteínas (ficocianina e ficoeritrina), têm sido relacionados a várias aplicações devido à sua coloração e fluorescência (FESTIN; BJÖRKLUND; TÖTTERMAN, 1987; FLEURENCE, 2003; LIN *et al.*, 2014; SONANI, 2016), podendo oferecer diferentes tonalidades das cores azul e vermelha, respectivamente.

No litoral brasileiro há ocorrência de várias espécies de macroalgas vermelhas, e, na costa cearense, a espécie *Solieria filiformis* é abundante, além de ter potencial para o cultivo em sistema de maricultura (LIMA, 2012). Essa espécie tropical é uma fonte sustentável de ficobiliproteínas, principalmente de R-ficoeritrina (BASTOS-FILHO, 2016) que é um pigmento pertencente ao grupo das ficoeritrinas, conhecidas por sua coloração vermelha e fluorescência laranja/dourada (ALBERTSSON, 2003). Vários pesquisadores relataram aplicações da R-ficoeritrina, no entanto, existem poucos trabalhos que usaram espécies tropicais para a extração desse pigmento.

Com base nisso, o presente trabalho teve como propósito principal otimizar a extração da R-ficoeritrina a partir da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*, bem como

avaliar a estabilidade das suas características espectroscópicas frente a variações de pH e o seu potencial como aditivo alimentício em iogurte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Corantes Alimentícios

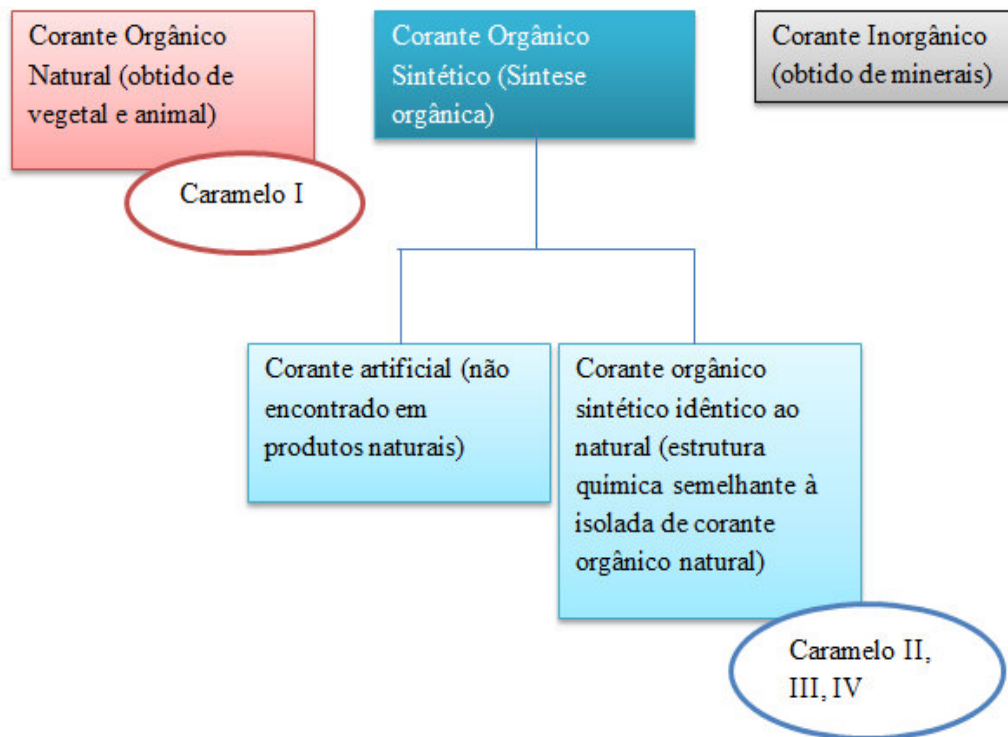
A aceitação de um alimento é fortemente influenciada pelo seu tamanho, forma, textura, aroma, paladar e, principalmente, pela sua cor. A cor é um dos atributos mais impactantes na avaliação do consumidor sobre um produto e é usada como um parâmetro crucial indicativo no controle da qualidade e como estimulador de apetite (APARECIDA *et al.*, 2012; FERREIRA; ZAMITH; ABRANTES, 2014; NASCIMENTO; PRATO, 2016).

A coloração de alimentos se dá naturalmente ou por meio de uso de aditivos alimentares conhecidos como corantes. O uso de corantes é tão antigo quanto à história das civilizações. No Egito antigo, onde se tem como referência do início da coloração de alimentos, usava-se extratos vegetais e vinho para colorir alimentos, deixando estes com uma melhor aparência. Desde então, o interesse por compostos com capacidade de coloração aumentou gradativamente (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Segundo a legislação brasileira, dentre as funções dos aditivos alimentares temos a função corante e, para melhor entendimento:

Aditivo alimentar: é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais. (BRASIL, 1997).

Exerce a função corante qualquer substância ou mistura de substâncias capaz de conferir ou intensificar a coloração de alimentos e bebidas, onde podem ser divididos em três grandes grupos: corante orgânico natural, orgânico sintético (artificial e orgânico sintético idêntico ao natural) e inorgânico (Figura 1) (BRASIL, 1978).

Figura 1: Classificação dos corantes alimentícios.

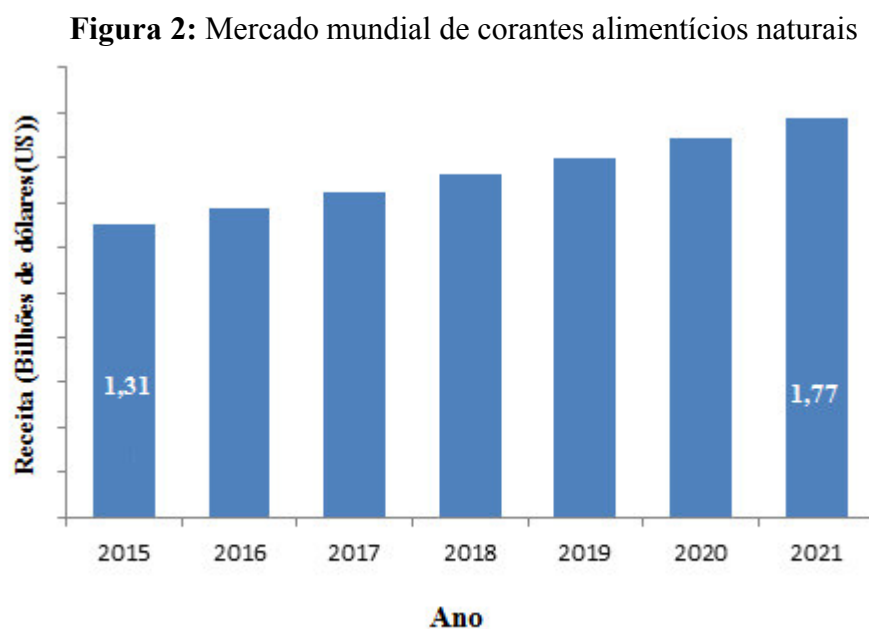
Fonte: Adaptado ANVISA (2015).

Corante orgânico natural é aquele em que o princípio corante é extraído de vegetal ou animal, por processo tecnológico adequado. Já o corante orgânico sintético é obtido por síntese orgânica, também por um processo tecnológico adequado, sendo que pode ser artificial (aquele não encontrado em produtos naturais) ou idêntico ao natural (aquele em que a estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de um corante natural). Por último, temos o corante inorgânico que é obtido a partir de minerais passando por processos de elaboração e purificação permitindo o seu uso em alimentos. Existe também um grupo de corantes chamados de caramelos, porém eles estão inseridos dentro dos corantes orgânicos naturais e corantes orgânico sintéticos.

2.2. Corantes alimentícios naturais versus artificiais

A preferência da indústria por corantes artificiais é devido à estabilidade destes em relação a fatores como pH, luz, oxigênio, temperatura, poder tintorial e, principalmente, devido a um menor custo de produção em relação aos naturais. Porém, o crescimento anual de

corantes sintéticos é de 2 a 5%, enquanto que os naturais têm o crescimento de 5 a 10% (SCHIOZER, A. L.; BARATA, 2007; RODRIGUES, P., 2015). Segundo pesquisa de mercados, os corantes naturais representaram 55% (equivalente a 1,31 bilhões de dólares) do mercado mundial de corantes em 2015, e a expectativa para 2021 é que eles atinjam 60% do mercado de corantes. O crescimento do mercado para corantes naturais de acordo com a *Zion Market Research* está representado na Figura 2 abaixo.



Fonte: Adaptado de *Zaion Research* (2016)

Do ponto de vista nutricional, o uso de corantes em alimentos não traz qualquer vantagem, mas os aspectos toxicológicos e as quantidades empregadas em alimentos vêm preocupando a população e a comunidade científica em relação ao cumprimento da legislação e quanto à influência desses corantes na saúde humana (SATO *et al.*, 1992).

A autorização de uso de qualquer aditivo alimentar deve ser precedida de avaliações toxicológicas adequadas, considerando qualquer efeito cumulativo, sinérgico ou de proteção, sendo mantidos sob observação ou reavaliação quando necessário (BRASIL, 1997; ALBUQUERQUE, 2012). Nem sempre a liberação desses aditivos foi controlada ou monitorada, o que levou a coloração de alimentos por substâncias altamente tóxicas. No século XIX, por exemplo, verificaram-se casos de morte pelo consumo de alimentos que

foram coloridos com chumbo negro, sulfato de cobre e chumbo vermelho, na Inglaterra. Além disso, foram vários os casos de liberação de corantes desenvolvidos sem qualquer avaliação toxicológica, na Europa e nos Estados Unidos, principalmente (PRADO; GODOY, 2003).

De acordo com Pinheiro *et al.* (2008) e Bissacotti, Angst e Saccol (2015), o JECFA (*Joint Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO) Expert Committee on Food Additives*) avalia a segurança do uso de aditivos alimentares assessorando o comitê de aditivos alimentares em suas decisões. O valor da Ingestão Diária Aceitável, IDA, de aditivos alimentares é expresso em mg/kg do peso corpóreo por dia, ou seja, é a quantidade de substância que ingerida diariamente e durante a vida do homem, não causa riscos à saúde humana. Cada país tem seu órgão regulador (Brasil: ANVISA, EUA: FDA) e suas regulações, o que justifica o fato de alguns corantes, amarantho e carmosina, por exemplo, serem proibidos em alguns países e liberados em outros (BARREIRO; MORALES; FERREIRA, 2014).

Alguns estudos indicam reações adversas ao uso de aditivos como: reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, alterações no comportamento, em geral, e carcinogenicidade em longo prazo (LÚCIA; POLÔNIO; PERES, 2009). Os corantes artificiais têm sido indicados como os principais aditivos desencadeadores dessas reações adversas (sobretudo os azocorantes (-N=N-), como a anilina), sendo que as reações mais comuns são urticária crônica, angioedema e asma (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Porém, vale ressaltar que os dados até então obtidos geram incertezas e contradições, o que sugere uma necessidade de se aprofundar mais nos estudos relacionados aos efeitos à saúde humana por parte desses corantes. Alguns corantes artificiais (amarelo crepúsculo, azorrubina, tartrazina, ponceau 4R, amarelo quinoleína e vermelho 40) têm sido relacionados ao aumento de hiperatividade quando utilizados em alimentos infantis (PINHEIRO; ABRANTES, 2012). Ward (1997) e McCann *et al.* (2007) realizaram estudos para avaliar os efeitos do consumo de corantes sintéticos sobre crianças hiperativas, sendo que nos dois casos houve um aumento da hiperatividade.

Fisher, no início do século XX, iniciou os estudos sobre ação mutagênica e carcinogênica de corantes artificiais, mostrando resultados positivos de carcinogenicidade para o vermelho escarlata. Desde então, vários corantes artificiais têm sido estudados quanto à ação mutagênica e/ou carcinogênica. O amarelo-manteiga, por apresentar resultados positivos, teve seu uso proibido como corante (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

De acordo com Yamazaki *et al.* (1994, 1997), alguns corantes artificiais amarelos (tartrazina e crepúsculo) podem causar inibição da síntese de tromboxano, o que interfere na coagulação sanguínea. É importante acrescentar que estudos realizados, pelos mesmos autores, com alguns corantes vermelhos, naturais e artificiais, também mostraram capacidade de inibição do tromboxano. Apesar de existirem vários estudos indicando efeitos negativos de corantes artificiais, estes também podem apresentar efeitos positivos à saúde humana como são apresentados na Tabela 1.

Por outro lado, os corantes naturais, por muitos anos, foram considerados inócuos à saúde por serem de origem vegetal ou animal. No entanto, hoje é sabido que não é exatamente assim. Alguns estudos indicaram efeitos negativos (como foi o caso citado acima de inibição do tromboxano) de alguns corantes naturais na saúde humana. Acero *et al.* (1998), avaliaram a indução de asma ocupacional e reações alérgica a carmim, sendo que os resultados foram positivos. Outro trabalho de Wuthrich, Kagi e Stiicker (1997), mostrou influência do consumo do carmim sobre reações anafiláticas. A Tabela 1 mostra ação mutagênica e antimutagênica de alguns corantes naturais e sintéticos.

Tabela 1: Atividade antimutagênica e mutagênica de corantes sintéticos e naturais adicionados em alimentos.

Tipos de corantes	Atividade mutagênica	Atividade antimutagênica
Natural	Cochonilha	Bixina
	Curcumina	β-caroteno
		Curcumina
Sintético	Amaranto	
	Alaranjado C.I.	Eritrosina
	Tartrazina	
	Vermelho <i>kokun</i>	

Fonte: Modificado de Antunes e Araújo (2000).

A ação antimutagênica não é o único efeito positivo dos corantes naturais, o que justifica o fato de que apesar da sua produção ser mais cara, 55% das indústrias acreditam na tendência de maior consumo desses tipos corantes (EMBRAPA, 2009).

Estudos revelaram que as clorofilas possuem atividades anti-inflamatórias, antimutagênicas, antigenotóxicas e antioxidante. Elas podem melhorar a habilidade dos linfócitos humanos em resistir a danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bem como diminuir a biodisponibilidade de químicos cancerígenos (SU *et al.*, 2005; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

A curmumina apresenta atividade antioxidante protegendo as células contra danos oxidativos, além de suas propriedades anti-inflamatória e antisséptica. Há relatos de sua potencial atividade de inibir o início, promoção e progressão de cânceres, aumentar a atividade de algumas enzimas responsáveis pela digestão, entre outras funções (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Além dos dois exemplos supracitados, outros corantes naturais também apresentam vários benefícios à saúde humana. Volp, Renhe e Stringueta (2009), em seu trabalho, citaram que provavelmente, as betalaínas estão envolvidas na proteção do LDL-colesterol contra modificações oxidativas, além de serem antioxidantes naturais.

Em seu recente trabalho, Sonani *et al.* (2016) mostraram os benefícios do uso das ficobiliproteínas como corantes naturais tanto na indústria de alimentos como na de cosméticos, visto que elas têm apresentado efeitos benéficos à saúde como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetor, atividade anticancerígena, entre outros.

2.2.1. Corantes Alimentícios de Origem Natural

Nos últimos anos, a demanda por produtos naturais aumentou e, a demanda por corantes naturais não foge a essa realidade. Os corantes naturais podem ser classificados em cinco grupos principais segundo a sua estrutura química: compostos tetrapirrólicos, tetraterpenos, O-heterocíclicos, quinonas e N-heterocíclicos. O nome alternativo e a classificação dos diferentes pigmentos de origem natural aplicados em alimentos estão mostrados na Tabela 2 (SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S 2007; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; REED, E.; ROCHA, D. 2014; LUANA, 2012).

Tabela 2: Classificação química, nome alternativo e classificação dos diferentes pigmentos naturais adicionados em alimentos.

Classificação Química	Nome Alternativo	Classificação do Pigmento	Pigmentos
Tetrapirróis	Porfirina	Clorofilas, hemes, biliproteínas	Clorofila α Clorofila β
Tetraterpenos	Carotenóides	Carotenos, xantofilas	Luteína B-caroteno B-criptoxantina
O-heterocíclicos	Flavonóides	Antocianinas, flavonóis e flavonas	Cianidina Pelargonidina Delfinidina
Quinonas	Fenólicos	Naftaquinonas, antraquinonas, alo-melaninas e taninos	Naftaquinona
N-heterocíclicos	Indigóides e pirimidinas	Betalaínas, indigóides, purinas, pteridinas, flavinas	Betacianina Índigo Adenina Pterina

Fonte: Adaptado Schiozer, A. L.; Barata, L. E. S. (2007).

Essa classificação com base na estrutura química dos pigmentos é importante para a indústria alimentícia devido às suas diferentes propriedades físico-químicas e colorações específicas, o que fornece um leque maior de opções de corantes para os mais diversos alimentos.

Para a indústria alimentícia, a cor representa um fator essencial visto que o primeiro contato do consumidor com o alimento é visual, e esta informa sobre os aspectos de um alimento antecipando a recepção de todas as outras informações e pode produzir uma resposta forte como “sensação de água na boca” quando se vê alimentos nas vitrines. Sendo assim, é necessário a realização de análise sensorial que vai medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e/ou materiais. É importante enfatizar que as características visuais do alimento induzem o consumidor a esperar o sabor correspondente (DUTCOSKY, 1996). O objetivo da análise sensorial, então, é detectar a diferença entre os produtos

baseando nas diferenças perceptíveis na intensidade de algum atributo. Para analisar as características sensoriais de um produto para um determinado fim, normalmente, a análise sensorial é realizada por uma equipe montada, sendo que pode ser avaliado a seleção da matéria-prima a ser utilizada em um novo produto, o efeito de processamento, a qualidade da textura, o sabor, a estabilidade de armazenamento, a reação do consumidor, entre outros. Existem métodos diferenciados que são elaborados de acordo com o objetivo específico de cada análise visando a obtenção de respostas mais adequadas ao perfil pesquisado do produto. O método a ser utilizado depende do produto, atributo sensorial e finalidades de estudos a serem realizados. O resultado, que deve ser expresso de forma específica conforme o teste aplicado, é estudado estatisticamente concluindo assim a viabilidade do produto (BARBOSA; FREITAS; WASZCZYNSKYJ, 2003; TEIXEIRA, 2009).

Segundo Benedetti (2008), Reed e Rocha (2014) e Rodrigues (2015), os corantes naturais mais usados pela indústria de alimentos são: extrato de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, betalaínas e antocianinas. Suas características estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Origem, propriedades físico-químicas e aplicações dos corantes naturais mais utilizados pela indústria de alimentos

Nome	Origem	Solubilidade	Estabilidade			Tonalidade de cor	Aplicação em alimentos	Referência
			pH	T (°C)	Luz			
Urucum	<i>Bixa orellana L.</i>	Lipossolúvel (Bixina) Hidrossolúvel (Sal de Norbixina)	Sensível a variações de pH	< 125	Sensível	Vermelho ao amarelo	Colorau, queijos.	CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; ALMEIDA, 2007; LEONARDO, 2007; EMBRAPA, 2009; GARCIA <i>et al.</i> , 2012.
Carmim de cochonilha	<i>Dactylopius coccus</i>	Hidrossolúvel	4 – 10	< 135	Estável	Vermelho	Iogurte, sorvetes, <i>petit suisse</i> , etc.	CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; SPELLMEIER; STÜLP, 2009; BOTH <i>et al.</i> , 2014.
Curcumina	<i>Cúrcuma longa L.</i>	Lipossolúvel	4 – 7	< 100	Sensível	Amarelo brilhante ao laranja escuro	Caril	PEREIRA, A. S.; STRINGHETA, P. C., 1998; CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; ZANELLA, 2014.
Betalaina	Centrospermeae (<i>Beta vulgaris L.</i>)	Hidrossolúvel	Excelente: 4 – 5 Razoável: 3 – 4 e 5 – 7	-	Sensível	Vermelho	Balas, confeitos, iogurte, sorvetes, etc.	CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; DRUNKLER; FETT; LUIZ, 2006; SHIOZER; BARATA, 2007. ZABOTTI; GENEMA, 2013.
Antocianina	Flores e frutos	Hidrossolúvel	Excelente: 4 – 5 Razoável: 3 – 4 e 5 – 7	-	Estável	Azul, violeta, vermelha ou rosa dependendo do pH	Balas, confeitos, pó para preparo de xaropes, etc.	CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; SHIOZER; BARATA, 2007; LATADO <i>et al.</i> , 2008; GUIMARÃES; ALVES; ANTONIOSI-FILHO, 2012.

Legenda: T = temperatura; os espaços preenchidos com um traço indicam que não foi encontrado informações precisas. **Fonte:** Elaborado pela autora.

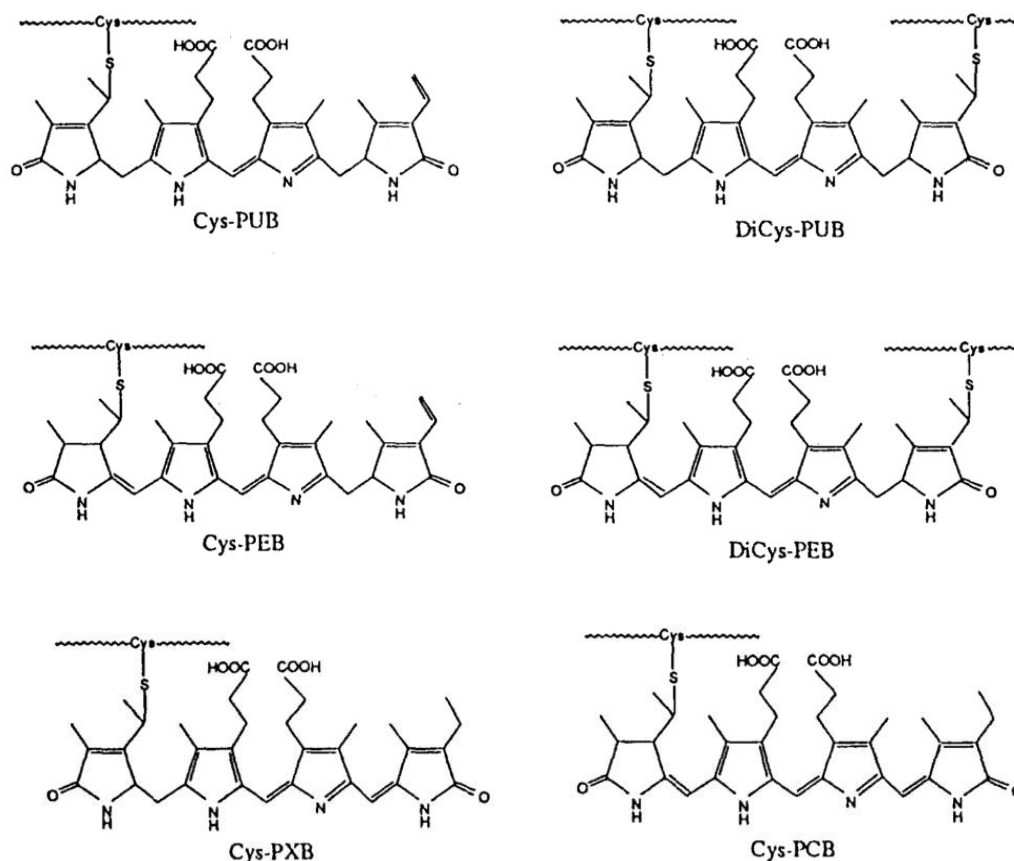
Outra classe de pigmentos naturais que, recentemente, tem sido usada na indústria de alimentos é a das ficobiliproteínas que, segundo Glazer (1981;1984;1985), é uma família de proteínas pigmentadas com alta capacidade de fluorescência e solúveis em água, conhecidas como proteínas acessórias fotossintéticas das cianobactérias e algas vermelhas.

2.2.1.1. Pigmentos Proteicos de Algas: Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas, ou biliproteínas são pigmentos que compõem o aparato fotossintéticos das cianobactérias e algas vermelhas. Apresentam alta capacidade de fluorescência e características espectroscópicas e pigmentações específicas. Essas pigmentações e características espectrais são devido à presença de grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadeia aberta, ficobilinas ou bilinas, ligados covalentemente por ligações do tipo tioéster a resíduos de cisteína.

Quatro tipos de bilinas se encontram presentes nas ficobiliproteínas: a ficocianobilina com coloração azul (PCB), ficoeritrobilina com coloração vermelha (PEB), ficoviolobilina que apresenta coloração púrpura (PXB) e a ficourobilina com coloração amarela (PUB). As suas diferentes combinações, posição e número levam a existência de diferentes propriedades e conseqüentemente diferentes tipos de ficobiliproteínas (O’CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980; GLAZER, 1994; SUN *et al.*, 2003). As estruturas químicas dessas bilinas estão representadas na Figura 3.

Figura 3: Estrutura química das bilinas e suas ligações a resíduos de cisteína nas ficobiliproteínas.

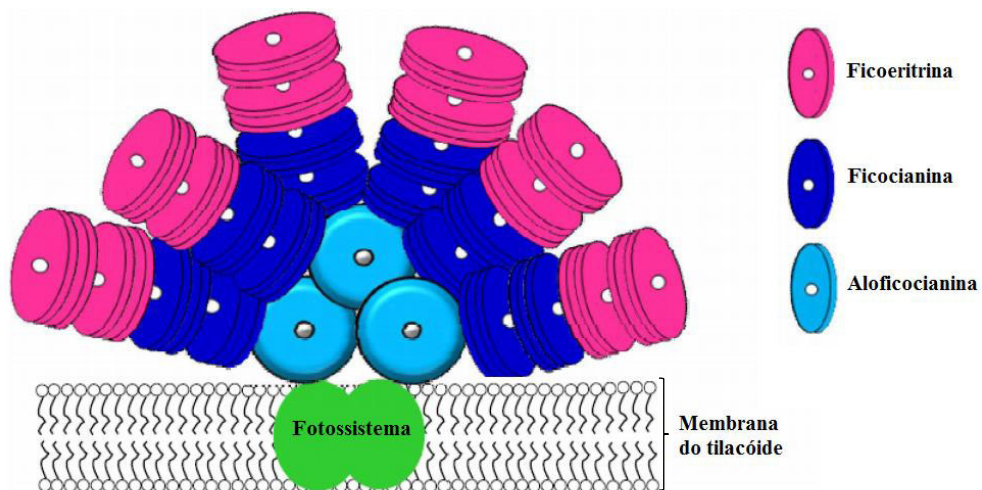


Legenda: Cys-PUB, Cys-PEB, Cys-PXB e Cys-PCB: ficourobilina, ficoeritrobilina, ficoviolobilina e ficocianobilina, respectivamente, ligados a um resíduo de cisteína (Cys); DiCys-PUB e Di-Cys-PEB: ficourobilina e ficoeritrobilina, respectivamente, ligados a dois resíduos de cisteína (DiCys). **Fonte:** Adaptado Glazer (1994).

De acordo com as suas propriedades espectroscópicas de absorvância, essas ficobiliproteínas são classificadas em quatro grupos principais: ficoeritrina (FE, $\lambda=495-570$ nm), ficoeritrocianina (FEC, $\lambda = 575$ nm), ficocianina (FC, $\lambda = 610-620$ nm) e aloficocianina (AFC, $\lambda = 650-655$ nm). Em relação à sua cor, as biliproteínas são classificadas em dois grandes grupos: as ficoeritrinas, que são os pigmentos vermelhos com fluorescência dourada/laranja e, as ficocianinas que são azuis com fluorescência vermelha (DE MARSAC; COHEN-BAZIRE, 1977; O’CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980; COLLIER *et al.*, 2016).

As ficobiliproteínas se encontram agregadas a um complexo denominado de ficobilissomo (PBS) como representado na Figura 4.

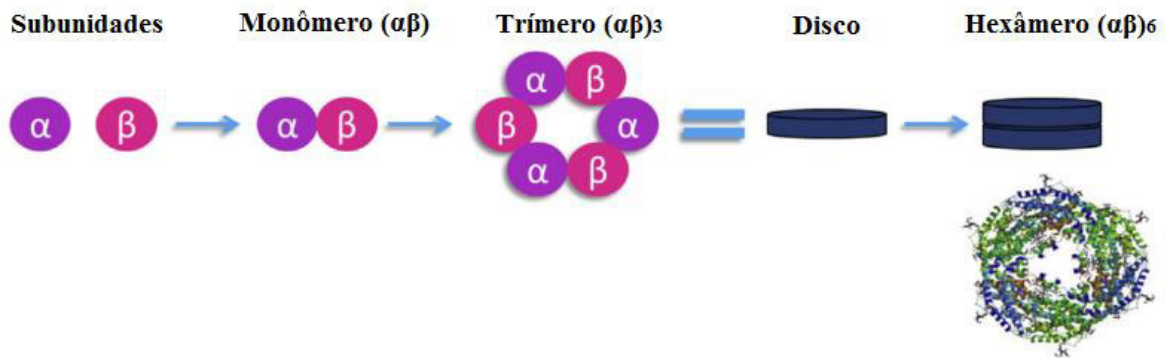
Figura 4: Estrutura do ficobilissomo encontrado em cianobactérias e algas vermelhas.



Fonte: Adaptado Sonani *et al* (2016)

O ficobilissomo é um complexo multimérico de proteínas (cerca de 85% da sua massa é ocupada pelas ficobiliproteínas), localizado na superfície externa da membrana dos tilacóides. Segundo Glazer (1985), elas são constituídas basicamente por subunidades polipeptídicas do tipo alfa (α , ~18-20 kDA) e beta (β , ~20 kDA). Uma terceira subunidade, γ , de ~30-33 kDA é encontrada exclusivamente nas ficoeritrinas, proporcionando uma maior estabilidade. As subunidades α e β juntas formam um monômero ($\alpha\beta$) que se unem para formar uma estrutura trimérica em forma de disco ($\alpha\beta$)₃. As ficoeritrinas, devido à presença da subunidade γ , também se encontram em estruturas hexâmeras ($\alpha\beta$)₆ γ , sendo dois trímeros ligados um de frente para o outro pela subunidade γ que se posiciona no centro das estruturas discoides, como esquematizado na Figura 5 (KIRK, 1995; SUN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005).

Figura 5: Organização das subunidades proteicas α e β das ficobiliproteínas de cianobactérias e algas vermelhas.



Fonte: Adaptado DUMAY (2014)

A agregação e a distribuição das bilinas nas subunidades proteicas α , β e γ das ficobiliproteínas de cianobactérias e algas vermelhas são apresentadas na Tabela 4.

As ficoeritrinas (FE) apresentam coloração vermelha e, portanto, contêm uma boa absorção de luz na faixa de 450 a 570 nm, representando as ficobiliproteínas mais abundantes das algas vermelhas. Essa capacidade de absorção da luz das ficoeritrinas permite a sobrevivência dessas algas em águas profundas (KAWSAR *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015). Assim como as ficobiliproteínas, as ficoeritrinas também são divididas de acordo com as características espectrais de absorção. Atualmente sabe-se que existem cinco tipos de ficoeritrinas (Figura 6), nomeadamente: R-Ficoeritrina (R-FE, $\lambda_{\text{máx}}$: 495, 564 e um ombro/pico a 545 nm), C-Ficoeritrina (C-FE, $\lambda_{\text{máx}}$: 565 nm), B-Ficoeritrina (B-FE, $\lambda_{\text{máx}}$: 565, 543 e um ombro a 499 nm), b-Ficoeritrina (b-FE, $\lambda_{\text{máx}}$: 545 e um ombro a 565 nm) e CU-Ficoeritrina (CU-FE, $\lambda_{\text{máx}}$: 498, 540 e/ou 565 nm) (GLAZER; HIXSON, 1977; KIRK, 1995; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000 TAN *et al.*, 2016). A CU-ficoeritrina por possuir cromóforos e características de absorção semelhante à R-Ficoeritrina, é geralmente classificada como R-FE (WANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

Tabela 4: Agregação e distribuição das bilinas nas subunidades proteicas das ficobiliproteínas de cianobactérias e algas vermelhas.

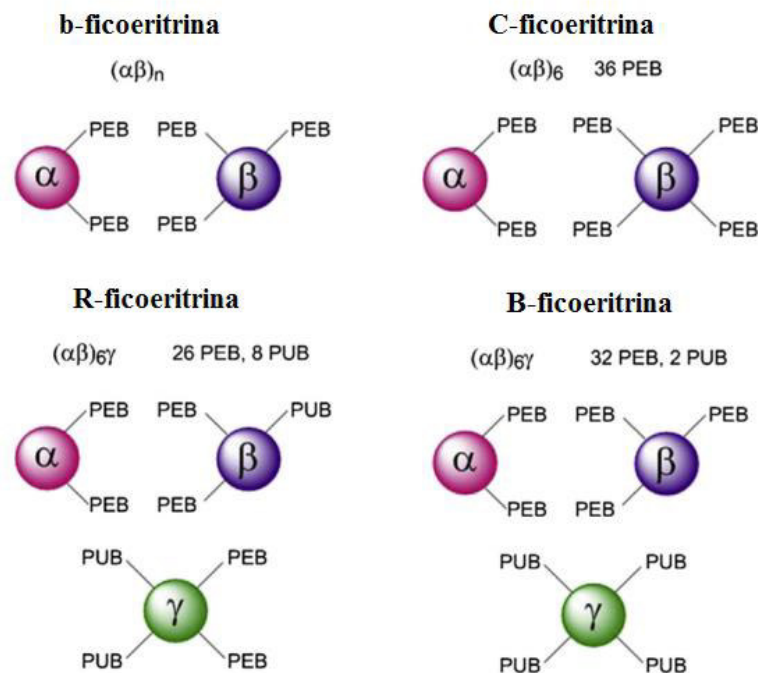
Ficobiliproteína	Tipo de Agregação	Bilinas/Subunidade		
		α	β	γ
Aloficocianina	$(\alpha\beta)_3$	1 PCB	1 PCB	-
C-ficocianina	$(\alpha\beta)_n$ (n = 1 a 6)	1 PCB	2 PCB	-
R-ficocianina	$(\alpha\beta)_3$	1 PCB	1PCB 1 PEB	-
Ficoeritrocianina	$(\alpha\beta)_3$	1 PXB	2 PCB	-
C-ficoeritrina	$(\alpha\beta)_n$ (n = 1 a 6)	2 PEB	3 PEB	-
B-ficoeritrina	$(\alpha\beta)_6\gamma$	2 PEB	3 PEB	2 PEB 2 PUB
R-ficoeritrina	$(\alpha\beta)_6\gamma$	2 PEB	2 PEB 1 PUB	1 PEB 3 PUB

Fonte: Modificado Glazer (1985)

Das quatro bilinas descritas na Tabela 4, apenas duas estão presentes nas estruturas das ficoeritrinas: PEB e PUB (ZHAO *et al.*, 2013), conforme representadas na Figura 6, sendo que a diferença nas características de absorção e fluorescência das ficoeritrinas é devido à presença dessas bilinas em diferentes quantidades para cada tipo de FE. O espectro de fluorescência delas indica intensidade máxima numa faixa de 575 a 590 nm (SONANI, 2016).

R-ficoeritrinas são as ficobiliproteínas de maior ocorrência nas Rodófitas (DUMAY; MORANÇAS; MUNIER, 2014). Elas são proteínas oligoméricas de massa molecular 240-260 kDa, sendo encontradas na forma hexâmera (6α , 6β e 1γ , $[(\alpha\beta)_6\gamma]$). Cada subunidade α contém duas ficoeritrobilinas (PEB) ligadas por ligações tioéster aos resíduos de cisteína (C82 e C139). Para cada subunidade β , além das duas ficoeritrobilinas ligadas aos resíduos C82 e C158, uma ficourobilina (PUB) também se liga a dois resíduos C50 e C61 (ROSSANO *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2009; SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015).

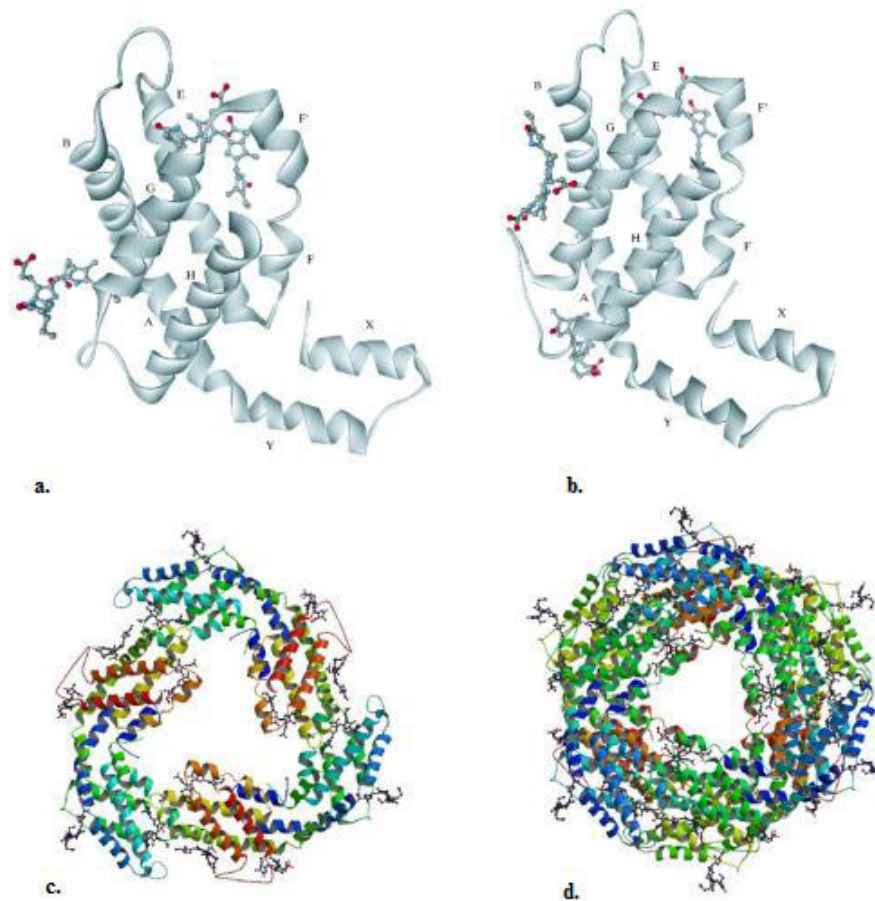
Figura 6: Representação esquemática da distribuição das bilinas nas subunidades proteicas α , β e γ das ficoeritrinas de cianobactérias e algas vermelhas.



Legenda: PUB = ficourobilina; PEB = ficoeritriobilina. **Fonte:** Adaptado Dumay (2014).

Chang *et al.* (1996) realizaram estudos sobre a estrutura tridimensional (3D) da R-ficoeritrina extraída de *Polysiphonia urceolata* e essas estruturas se encontram disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*) como mostrado na Figura 7.

Nesse estudo, eles mostraram que apesar da R-Ficoeritrina apresentar o mesmo número de resíduos e cromóforos que a B-Ficoeritrina, ela é mais evoluída por dois motivos: 1) A subunidade γ da R-FE liga a três PUB e um PEB enquanto que a da B-FE se liga a dois PEB e dois PUB; 2) na R-FE o cromóforo que se liga ao β 50-61 é o PUB enquanto que na B-FE é o PEB. Sabendo-se que o PUB consegue absorver maior quantidade de luz e energia que o PEB e por ela estar em maior quantidade nas R-ficoeritrinas do que nas B-ficoeritrinas sugere-se que a R-FE é mais avançada evolutivamente.

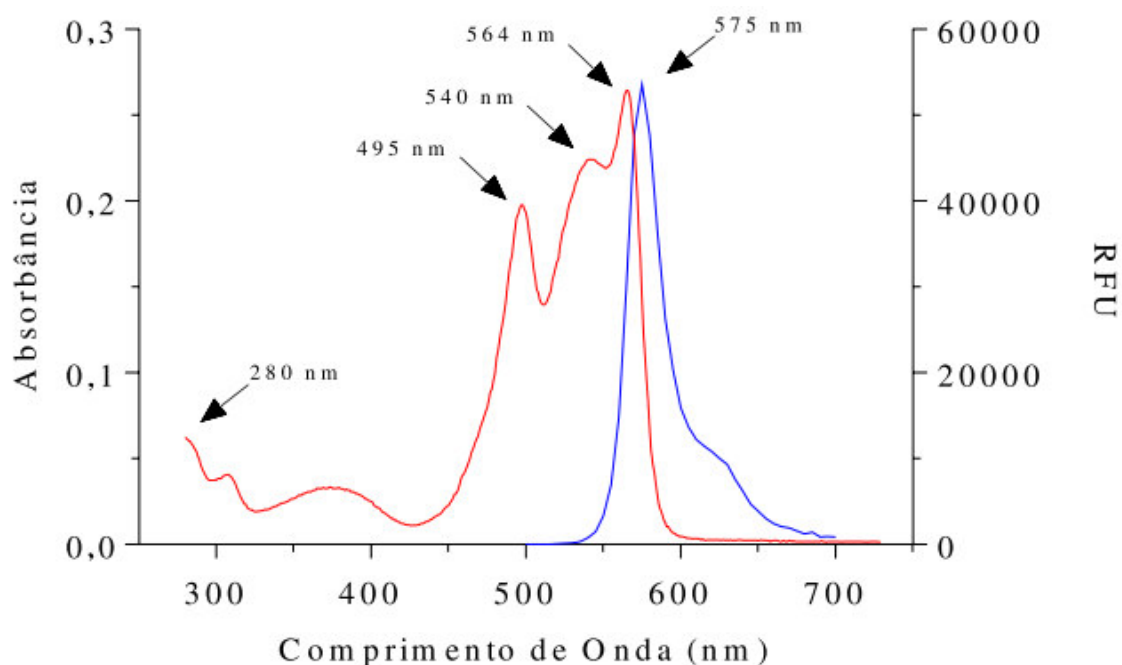
Figura 7: Estrutura tridimensional da r-Ficoeritrina extraída de *Polysiphonia urceolata*

Legenda: **a.** estrutura da subunidade α ligada às duas bilinas (PEB); **b.** estrutura da subunidade β ligada às duas PEB e uma PUB; **c.** estrutura trímica da R-ficoeritrina $(\alpha\beta)_3$; **d.** estrutura hexâmérica da R-ficoeritrina $(\alpha\beta)_6\gamma$.
Fonte: Adaptação de: a. e b.: Contreras-Martel *et al.* (2001); c. e d: adaptado de Chang *et al.* (1996), disponível no PDB ([10.2210/pdb1lia/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1lia/pdb)).

A fluorescência característica apresentada pela R-FE é devido à presença dos cromóforos PEB e PUB. A transferência de energia na R-FE na forma hexâmérica começa numa PUB ligada a um resíduo da subunidade γ para uma PEB e depois para uma PUB da subunidade β , e desta última para uma PEB da subunidade α . Existe uma saída eficiente de energia no hexâmetro dos doadores de absorção de energia mais alta (PUB) para os receptores de energia mais baixa (PEB). A subunidade γ desempenha importantes funções na estabilidade estrutural e na agregação da subunidades da R-FE, de forma que a interação entre as subunidades β e γ podem ser a razão desta estabilidade (SUN *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2013).

A presença de três subunidades na R-FE da macroalga vermelha *Solieria filiformis* também foi relatada por Bastos-Filho (2016). As características espectroscópicas da R-FE pura, extraída dessa espécie de macroalga, estão mostradas na Figura 8 e indicam 3 picos de absorção a 495, 540 e 564 nm e 1 de fluorescência a 575 nm quando excitada a 495 nm (BASTOS-FILHO, 2016).

Figura 8: Características espectroscópicas da R-ficoeritrina purificada da macroalga vermelha *Solieria filiformis*.



Legenda: Linha vermelha: Espectro de absorção; Linha azul: Espectro de fluorescência; RFU: Unidade Relativa de Fluorescência. **Fonte:** Bastos-Filho (2016).

2.3. Extração e purificação de R-Ficoeritrina e sua aplicação na indústria alimentícia

A R-ficoeritrina, por ser uma molécula intracelular, é extraída por meio de metodologias baseadas no rompimento da parede celular (FLEURENCE, 2003) através de maceração em nitrogênio líquido, ultrassom, maceração em moinhos ou então por métodos enzimáticos (SUN *et al.*, 2009; DUMAY *et al.*, 2013; LE GUILLARD *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

O choque osmótico também pode ser uma alternativa para extração da R-FE, porém como esse método demanda muito tempo (vários dias) de submersão do organismo em água,

há possibilidade de degradação do pigmento pela ação das proteases, o que é uma desvantagem já que o objetivo final seria a obtenção de um rendimento máximo desse pigmento (FLEURENCE, 2003; DUMAY; MORANÇAIS; MUNIER, 2014).

Na literatura são relatadas várias estratégias e protocolos de extração aquosa de R-FE, nos quais alguns autores usaram alga úmida (denominados por alguns de alga fresca) (D'AGNOLO *et al.*, 1994; DENIS *et al.*, 2009; KAWSAR *et al.*, 2011; MUNIER *et al.*, 2015a), alga congelada (WANG, 2002; LIU *et al.*, 2005a; NIU; WANG; TSENG, 2006a) e alga liofilizada (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; ROSSANO *et al.*, 2003; DENIS *et al.*, 2009; DUMAY *et al.*, 2013). O tampão fosfato é o mais utilizado nos diferentes protocolos de extração da R-FE, porém existem metodologia que usam água destilada e água do mar (SUDHAKAR *et al.*, 2015).

Após a extração, geralmente são usadas técnicas de fracionamento proteico por precipitação com sulfato de amônio em diferentes saturações, seguidas de cromatografias (troca iônica, filtração em gel, hidroxiapatita e exclusão molecular) para a purificação da R-FE (DENIS *et al.*, 2009). A eletroforese também é usada para acompanhar a purificação nos outros métodos, sendo descrita por Galland-irmouli *et al.* (2000), Liu *et al.* (2005), Kawsar *et al.* (2011) e Bastos-Filho (2016), entre outros, para *Palmaria palmata*, *Polysiphonia urceolata*, *Amphiroa anceps* e *Solieria filiformis*, respectivamente. Essas técnicas citadas acima, podem ser combinadas dependendo do índice de pureza da ficobiliproteína que se quer atingir. A Tabela 5 mostra os protocolos de extração e purificação de R-FE de diferentes espécies de macroalgas distribuídas ao redor do mundo, bem como seus rendimentos e índices de pureza.

Tabela 5: Protocolos de extração e purificação de R-ficoeritrinas de macroalgas vermelhas distribuídas pelo mundo.

Continua

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

<i>Grateloupia turuturu</i>	AA; AF; AN; AS; EU; IOP; OC	TI	1,41 ^a	2,89	MUNIER et al., 2015b.
-----------------------------	-----------------------------	----	-------------------	------	-----------------------

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

Fonte: BASTOS-FILHOS (2016).

Devido a estabilidade das suas características espectroscópicas frente a variações de pH e temperatura, a R-ficoeritrina tem sido utilizada para uma ampla gama de aplicações (FLEURENCE, 2003; MUNIER *et al.*, 2014) como sonda fluorescente em vários ensaios biológicos e clínicos, principalmente aqueles que usam citometria de fluxo (WILSON *et al.*, 1996; BRADFORD *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013). A sua cor combinada com o baixo peso molecular dos cromóforos responsáveis por suas características espectrais favorecem o uso dela como marcador de gel de eletroforese (FLEURENCE, 2003). Diferentes atividades biológicas também foram relatadas para R-ficoeritrinas, o que atrai a atenção da indústria farmacêutica e de cosméticos. Atividades antioxidante, anti-idade, anticâncer, anti-inflamatória e anti-tumoral também já foram relatadas e tornam esta molécula muito interessante para os pesquisadores e/ou indústrias de diversos setores (PAN *et al.*, 2013; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013; SONANI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015).

Na indústria alimentícia, a R-Ficoeritrina pode ser usada como corante natural em alimentos ou no preparo de bebidas sofisticadas tendo em conta a sua cor e fluorescência acopladas aos benefícios que ela traz para a saúde devido às suas atividades biológicas citadas acima, sendo usada com maior frequência em sobremesas e produtos lácteos (DUMAY; MORANÇAS; MUNIER, 2014; JAYASINGHE, P S; PAHALAWATTAARACHCHI, 2016). A R-FE tem sido testada como corante para produtos de confeitaria, doces e açúcares secos para decoração de bolo devido a sua fluorescência (SUDHAKAR; SARASWATHI; NAIR, 2014).

Sudhakar *et al* (2015) usaram o extrato bruto pigmentado extraído da macroalga *Gracilaria crassa*, onde a R-FE apresentou índice de pureza de 0,91 para colorir pudins adquiridos comercialmente. Eles usaram 3 mL desse extrato para colorir 70 g de pudim em condições estéreis e armazenaram o produto por 50 dias a $0 \pm 5^{\circ}\text{C}$. A coloração da R-FE se manteve estável por um período duradouro.

Em um outro trabalho Sudhakar, Saraswathi e Nair (2014), avaliaram a estabilidade do extrato bruto e da R-ficoeritrina pura da *Gracilaria corticata*, com índice de pureza 1,10, como corante natural para bebidas carbonatadas e observaram resultados favoráveis, ressaltando suas propriedades antioxidantes e seus benefícios nutracêuticos.

Fleurence (2003) também avaliou a estabilidade da R-ficoeritrina a fatores como temperatura e pH, mostrando ser favorável ao uso desse pigmento como corante na indústria alimentícia.

Assim sendo, diante dos poucos relatos sobre a aplicação de R-FE de macroalgas vermelhas encontradas no litoral brasileiro, do grande potencial de cultivo desses organismos, da crescente demanda da indústria alimentícia por corantes naturais e das propriedades físico-químicas e biológicas apresentadas por essas biomoléculas o presente trabalho objetivou extrair e purificar a R-FE de uma macroalga abundante no litoral cearense e avaliar a sua aplicação como corante em iogurte.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Otimizar o rendimento do processo de extração e purificação da R-Ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* e verificar seu uso como corante natural em alimentos.

3.2. Específicos

- Otimizar o rendimento de extração e purificação da R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *S. filiformis*;
- Caracterizar as propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de *S. filiformis* frente a variações de pH;
- Caracterizar os parâmetros colorimétricos de iogurtes naturais adicionados de frações proteicas pigmentadas obtidas em diferentes etapas do protocolo de extração e purificação da R-ficoeritrina de *S. filiformis*.
- Avaliar a aceitação de iogurtes adicionados de frações proteicas pigmentadas, através da análise sensorial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Macroalga Marinha *Solieria filiformis*:

A macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi coletada em cordas de cultivo a 200 metros da costa, situadas na praia de Fleicheiras (3°13'06" S; 39°16'47" W) no município de Trairí, a 130 Km de Fortaleza, no litoral oeste do Estado do Ceará, Brasil. Essa espécie de alga está depositada sob forma de exsicata no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob o número 35682 (Figura 9).

Quando coletada, a macroalga foi transportada para o Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas em sacos de plástico pretos, onde foi lavada exaustivamente com água corrente para retirada de sal, incrustantes, epífitas e grãos de areia. Depois foi lavada com água destilada e armazenada no freezer a -20°C até a sua utilização.

Figura 9: Macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* cultivada na Praia de Flecheiras, Trairi, CE.



Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Gênero: *Solieria*

Espécie: *Solieria filiformis*
(Kützinger) P. W.

Gabrielson

Fonte: HOLANDA-ARAÚJO (2007).

4.1.2. Reagentes Químicos

Tampões (fosfato de potássio (25 mM, pH 6,5), glicina-HCl (20 mM, pH 2 e 3), acetato de sódio (20 mM, pH 4 e 5), tris-HCl (20 mM, pH 7, 8 e 9), glicina-NaOH (20 mM, pH 10 e 11), fosfato de potássio (20 mM, pH 12)). Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), Matriz DEAE-Sephacel (GE Healthcare).

4.2. Métodos

4.2.1. Otimização do protocolo de extração e purificação da R-ficoeritrina de *S. filiformis*

Com o intuito de aumentar o rendimento da R-ficoeritrina extraída e purificada da macroalga *S. filiformis*, foi tomado como ponto de partida o protocolo proposto por Bastos-Filho (2016). A macroalga marinha *S. filiformis* foi lavada, triturada em moinho elétrico e em seguida submetida à extração em tampão fosfato de potássio (PB) 25 mM, pH 6,5 na proporção 1:3 (m/v). A extração foi realizada a frio (~ 4°C) sob constante agitação e protegida da luz, durante 6 horas. Após esse período, o homogenato obtido foi filtrado usando tecido de Nylon, onde o resíduo foi descartado e o filtrado foi centrifugado a 4°C, 17.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante, denominado de Extrato Bruto Proteico (EBP-Sf), foi submetido a precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e posteriormente congelado por 48 horas (etapa não executada no protocolo proposto por Bastos-Filho, 2016). Após descongelamento, o EBP-Sf foi centrifugado a 4°C, 8.000 x g por 10 minutos. O precipitado foi solubilizado em água destilada e submetido à diálise (*cutoff* 12 kDa) contra água destilada e PB para retirada do sal e reestabelecimento do pH de extração. A solução obtida, denominada de Fração 0-90 (F0-90) foi submetida à cromatografia de troca iônica (Matriz DEAE-Sephacel (GE Healthcare)), onde o pico não retido foi eluído isocriticamente. As proteínas adsorvidas na matriz, foram eluídas com PB contendo NaCl nas concentrações de 0,1; 0,5 e 2,0 M. O pico contendo a R-Ficoeritrina foi coletado e dialisado (*cutoff* 12 kDa) contra água destilada para retirada do sal e em seguida liofilizado.

4.2.2. Determinação dos Teores de Proteínas

Os teores de proteínas foram determinados em todas as etapas do protocolo de extração e purificação da R-FE de *S. filiformis* seguindo o método proposto por Bradford (1976). As absorvâncias foram mensuradas em espectrofotômetro UV-Vis (Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro) a 595 nm e os resultados foram expressos em concentração através de uma correlação construída com BSA (albumina sérica bovina) como padrão. A medida de absorvância a 280 nm também foi utilizada para estimar o teor de proteínas nos eluatos da coluna cromatográfica.

4.2.3. Determinação dos teores, rendimentos e índice de pureza da R-Ficoeritrina

Os teores de R-FE de *S. filiformis* foram mensurados em todas as etapas de extração e purificação através da Equação 1, proposta por Sampath-Wiley e Neefus (2007).

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

Onde:

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

A_{564} : Absorvância a 564 nm;

A_{730} : Absorvância a 730 nm;

A_{618} : Absorvância a 618 nm.

Já os rendimentos da R-FE de *S. filiformis* foram calculados segundo a Equação 2.

$$R_{R-FE} = \frac{R-FE}{Sf} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

R_{R-FE} : Rendimento da R-ficoeritrina (mg/g);

R-FE: Teor total de R-ficoeritrina no extrato bruto (mg);

Sf: massa da alga úmida (g).

Os índices de pureza da R-FE de *S. filiformis* foram avaliados em cada etapa do protocolo de purificação, segundo a Equação proposta por Senthilkumar *et al.* (2013).

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

Onde:

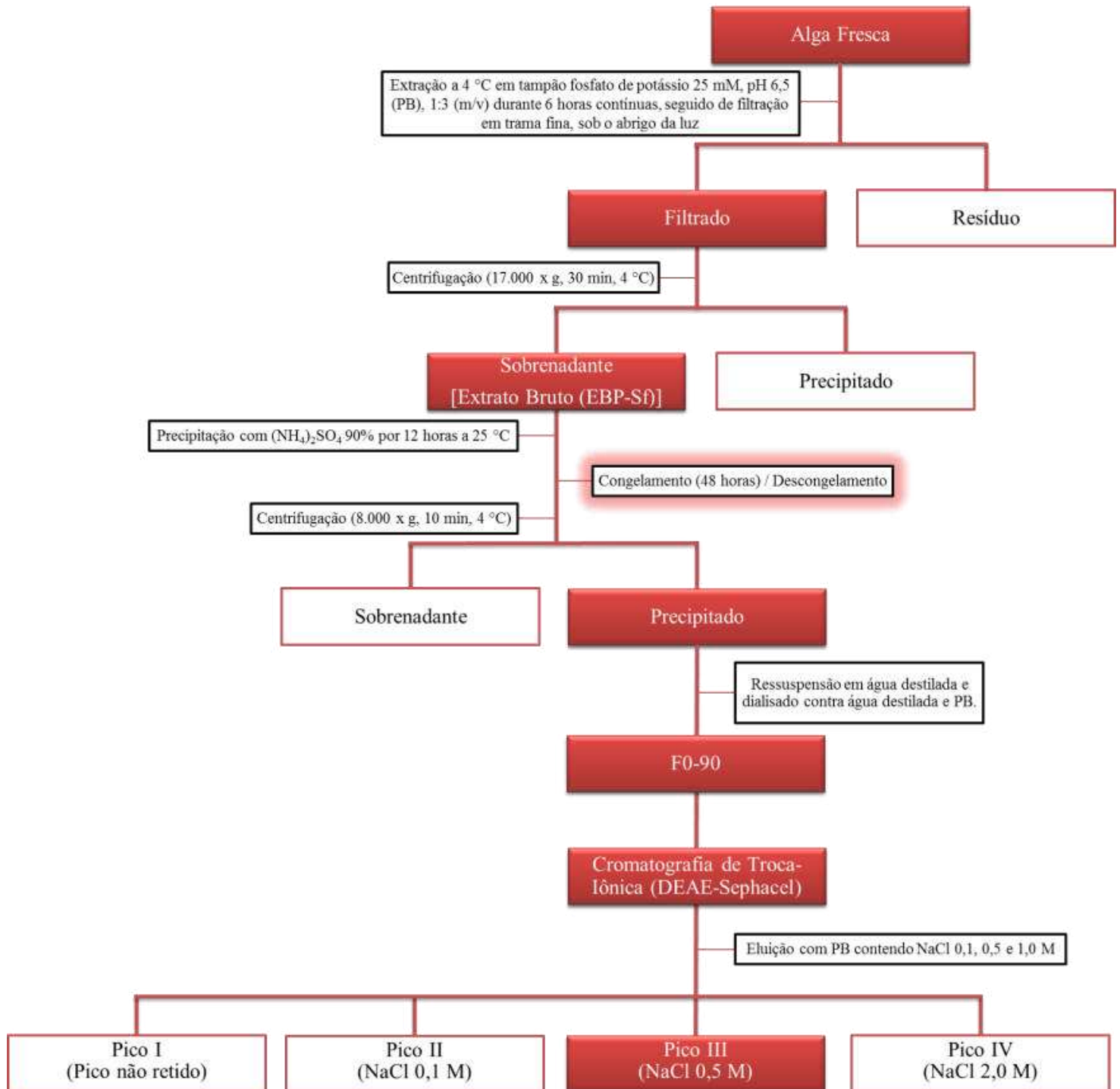
IP: Índice de pureza;

A_{564} : Absorbância a 564 nm;

A_{280} : Absorbância a 280 nm.

O protocolo de extração e purificação da R-ficoeritrina de *S. filiformis* está esquematizado na Figura 10.

Figura 10: Protocolo otimizado de extração e purificação da R-ficoeritrina da macroalga vermelha *Solieria filiformis*.



Fonte: Elaborado pela autora

4.2.4. Efeito do pH sobre as propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de *S. filiformis*

Para avaliar a estabilidade dos espectros de absorção e fluorescência da R-ficoeritrina purificada da macroalga vermelha *S. filiformis*, foram utilizados diferentes tampões: Glicina-HCl (20mM, pH 2), Acetato de Sódio (20mM, pH 4 e 5), Fosfato de potássio (25mM, pH 6,5), Tris-HCl (20mM, pH 7,1; 8 e 9), Glicina-NaOH (20mM, pH 10 e 11) e Fosfato de potássio (20mM, pH 12), sendo que o tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,5 (tampão de extração) foi usado como controle. Assim sendo, para avaliação do efeito do pH sobre a absorbância do pigmento foram preparadas soluções de 0,5 mg/mL de R-ficoeritrina com os diferentes tampões citados. Já para avaliar o efeito do pH sobre a fluorescência da R-ficoeritrina de *S. filiformis* foram preparadas soluções de 0,01 mg/mL do pigmento. Os espectros de absorbância e fluorescência foram obtidos em espectrofotômetro de multidetecção de microplaca Synergy Mx (Biotek, USA) em cinco tempos diferentes com intervalos de meia hora (30 min) entre cada leitura. A primeira leitura foi realizada assim que a R-ficoeritrina foi dissolvida nos tampões. Para a absorbância, utilizou-se uma faixa de comprimento de onda de 280 a 730 nm variando em 1 nm, enquanto que para a fluorescência a R-ficoeritrina foi excitada a 495 nm, sendo medido então a sua emissão na faixa de 500 a 700 nm variando em 5 nm. As leituras para cada pH foram realizadas em duplicatas.

4.2.5. Análises colorimétricas de iogurtes coloridos com R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

Foram avaliadas as colorimetrias de iogurtes naturais adicionados de concentrações diferentes de duas frações proteicas obtidas em etapas subsequentes do protocolo de purificação da R-ficoeritrina de *S. filiformis* (F0-90 e PIII-DEAE, respectivamente). A fração proteica F0-90 (0,124 mg/mL) foi diluída em iogurte natural (marca comercial), encerrando concentrações de 0,0124; 0,0248; 0,0372; 0,0496 e 0,062 mg de R-FE por mL de iogurte. Já o PIII-DEAE (0,135 mg/mL) foi dissolvido diretamente no iogurte natural (marca comercial) encerrando as concentrações de 0,0162; 0,0203; 0,0243; 0,0284 e 0,0324 mg de R-FE por mL de iogurte.

Foi usado iogurte sabor morango, da mesma marca, como um padrão para comparação. A leitura das intensidades das cores das diferentes amostras foram realizadas num colorímetro ColorQuest XE (HunterLab, USA).

4.2.6. Análise Sensorial de iogurtes adicionados de R-ficoeritrina de *S. filiformis*

A análise foi realizada no laboratório de análise sensorial da Universidade Federal do Ceará, sendo que para cada grupo participaram 60 julgadores não treinados. Os testes de aceitação foram de natureza monocráticas, sendo o teste de preferência realizado com todas as amostras numa determinada sequência. Todos os julgadores assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e preencheram um formulário do perfil do julgador, onde constava: sexo, faixa etária, estado civil, frequência de consumo de iogurte de morango, o grau de gosto pelo iogurte de morango, a marca preferida de iogurte de morango e a importância da cor para o consumo do iogurte. Cada julgador foi alocado a uma cabine isolada (sem barulho e sem contato com outros julgadores) e iluminada com luz branca. As amostras foram preparadas em placas de petri para uma melhor visualização, e estas foram codificadas com três dígitos aleatórios previamente atribuídos. Foram preparados dois grupos de amostras, um com a F0-90 e outro com o PIII-DEAE, de acordo com as concentrações descritas no item 4.2.5. Todos os formulários aplicados durante a análise sensorial estão disponíveis no Anexo deste documento.

Com o intuito de avaliar a aceitabilidade do atributo cor do iogurte adicionado da R-ficoeritrina de *S. filiformis* como corante natural, realizou-se a seguinte metodologia de análise:

- Teste de aceitação (escalas hedônica, de intenção de consumo e ideal):

Foi usado escala hedônica de nove pontos, sendo que o 1 correspondia a “Desgostei muitíssimo” e 9 a “Gostei muitíssimo”. Da pontuação 1 a 4 foi considerada região de rejeição, 5 indiferente e de 6 a 9 região de aceitação. Já para o teste de intenção de consumo foi utilizado escala de 5 pontos sendo que 1 e 2 foram considerados região de intenção negativa, 3 região de dúvida e 4 e 5 a região de intenção positiva. Para a escala do ideal foram usados nove pontos variando de -4 a +4, sendo que de -4 a -1 foi considerada região menos forte que o ideal, 0 correspondia à tonalidade ideal e de +1 a +4 região mais forte que o ideal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do protocolo de extração e purificação da R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

O protocolo otimizado de extração e purificação da R-Ficoeritrina, o qual incluiu a etapa de congelamento durante a precipitação proteica com sulfato de amônio, resultou em rendimento de R-FE no extrato bruto (EBP-Sf) de 1,628 mg por grama de massa seca, o que equivale a uma recuperação de 100% por ser a primeira etapa de extração. Já para a F0-90, etapa resultante da otimização, conseguiu-se 1,409 mg de R-FE por grama de massa seca, equivalendo a um rendimento de 86,55%. Para a última etapa, PIII-DEAE, obteve-se 0,605 mg de R-FE por grama de massa seca, o que correspondeu a uma recuperação de 42,91%. Os índices de pureza foram aumentando ao longo das etapas, chegando a 1,15 na etapa final, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Tabela de purificação da R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* utilizando o protocolo otimizado.

Etapas	Rendimento por massa de alga úmida (mg/g)		Rendimento por massa de alga seca (mg/g)	Recuperação (%)	Índice de Pureza
	Proteína Total	R-FE Total			
EBP-Sf	0,172	0,162	1,628	100,00	0,46
F0-90	0,148	0,1409	1,409	86,55	0,43
PIII-DEAE	0,072	0,0605	0,605	42,91	1,15

Legenda: EBP = Extrato Bruto Proteico; F0-90 = Fração 90% (NH₄)₂SO₄; PIII-DEAE. = Pico III cromatografia de troca iônica. **Fonte:** elaborada pela autora.

Esses resultados, se comparado com o que existe na literatura para a mesma espécie, apresenta melhora significativa de recuperação da R-FE, o que indica que a etapa de congelamento introduzida na precipitação do presente trabalho foi o fator responsável por esse aumento. Bastos-Filho (2016), utilizou a mesma espécie de alga, porém o rendimento

obtido nesse trabalho foi duas vezes maior que o obtido por ele. De 100g de alga, na primeira etapa para a obtenção da F0-90 ele conseguiu recuperar apenas 48,27%, que já é um rendimento bem inferior ao apresentado na tabela acima. No pico de cromatografia de troca iônica ele conseguiu uma recuperação de 12,78% que é quase quatro vezes menor que a apresentada na tabela 6, o que confirma que o congelamento realizado durante a precipitação proteica aumentou a quantidade de R-FE extraída.

O congelamento realizado nesse trabalho pode ter levado a formação de cristais de gelo (PRENTICE-HERNÁNDEZ & COLLA, 2003; EDODES *et al.*, 2014) que levam ao aumento do rendimento da R-ficoeritrina. Alguns pesquisadores, como foram os casos de Hayashi *et al.* (1997); Sloth, Wiebe, e Eriksen (2006); Patel *et al.* (2005) e Soni *et al.* (2006) extraíram outros tipos de ficobiliproteínas, também usando etapa de congelamento.

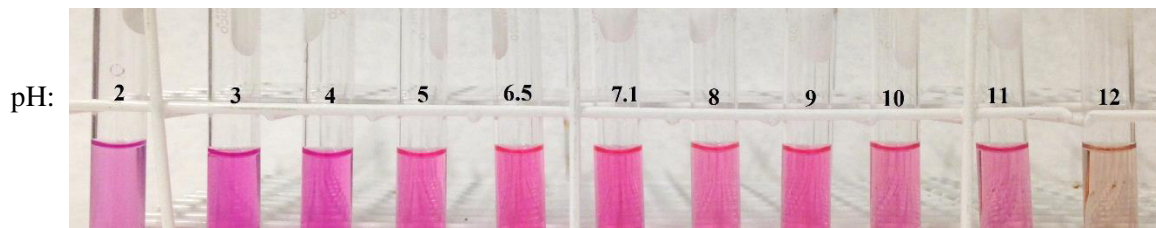
Associado ao fato do congelamento levar a formação de cristais de gelo, existe também a questão da precipitação proteica usando sulfato de amônio. Os sais sulfatos, à medida que suas concentrações aumentam, elas decrescem a solubilidade das proteínas progressivamente pelo processo de *salting out*, isso devido à preferência da água em se ligar com os íons oriundos da dissociação do sal. Quando isso acontece, as proteínas são forçadas a se ligarem entre elas mesmas o que acarreta a uma maior taxa de precipitação (FENNEMA, 2010). É sabido também que as proteínas, pelo menos a maioria, precipitam melhor a baixas temperaturas e, a presença do sal no meio leva a diminuição da temperatura de congelamento da água (NELSON; COX, 2014), o que quer dizer que o congelamento realizado nesse trabalho foi a uma temperatura muito baixa permitindo assim a obtenção de resultados bastante satisfatórios.

5.2. Efeito do pH sobre as propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de *S. filiformis*

O aspecto visual das soluções tamponadas de diferentes pH está mostrado na Figura 11. A percepção visual foi de uma leve diferença nas tonalidades de cores da R-FE quando dissolvida em soluções de diferentes pHs, onde as colorações tenderam ao roxo nos menores valores quando comparada a coloração rosa apresentada nas soluções de pHs de 5 a 11.

Em relação à fluorescência, caracterizada pela observação visual da tonalidade laranja, foi nítida a sua ausência nas soluções de pHs abaixo de 5 e no pH 12.

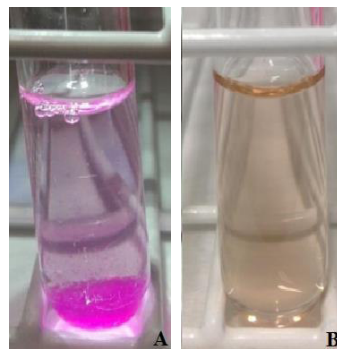
Figura 1: Aspecto visual das soluções tamponadas de R-ficoeritrina de *S. filiformis* (PIII-DEAE) em diferentes pHs no tempo zero



Fonte: Elaborado pela autora

Quando solubilizada nos tampões de pH 2 e 3 foi observada formação de precipitado após um período de 2 h (Figura 12A). Já no pH 12, a R-FE perdeu totalmente a sua coloração instantaneamente como mostrado na Figura 12B.

Figura 12: Aspecto visual das soluções tamponadas de R-Ficoeritrina de *S. filiformis* de pHs extremos. (A) Tampão Acetato de sódio, 20 mM, pH 2,0; (B) Tampão Fosfato de potássio 20 mM, pH 12,0.



Fonte: Elaborado pela autora

No tempo zero, o pH que apresentou maior teor de R-FE foi 7,1 (0,0585 mg R-FE/mL), seguido do pH 6,5 com uma diferença bem sutil (0,0582 mg R-FE/mL). O pH 12 que perdeu a cor no tempo zero, apresentou 0,0069 mg R-FE/mL, um valor bem abaixo da maior concentração obtida nesse tempo. Já o pH 3, apresentou 0,058 mg R-FE/mL, valor próximo à máxima concentração obtida, o que provavelmente se deve ao fato de formação de precipitados nesse pH como relato acima, causando um aumento nas absorvâncias e, conseqüentemente, do teor de R-FE. Após 2 horas, houve uma ligeira diminuição na

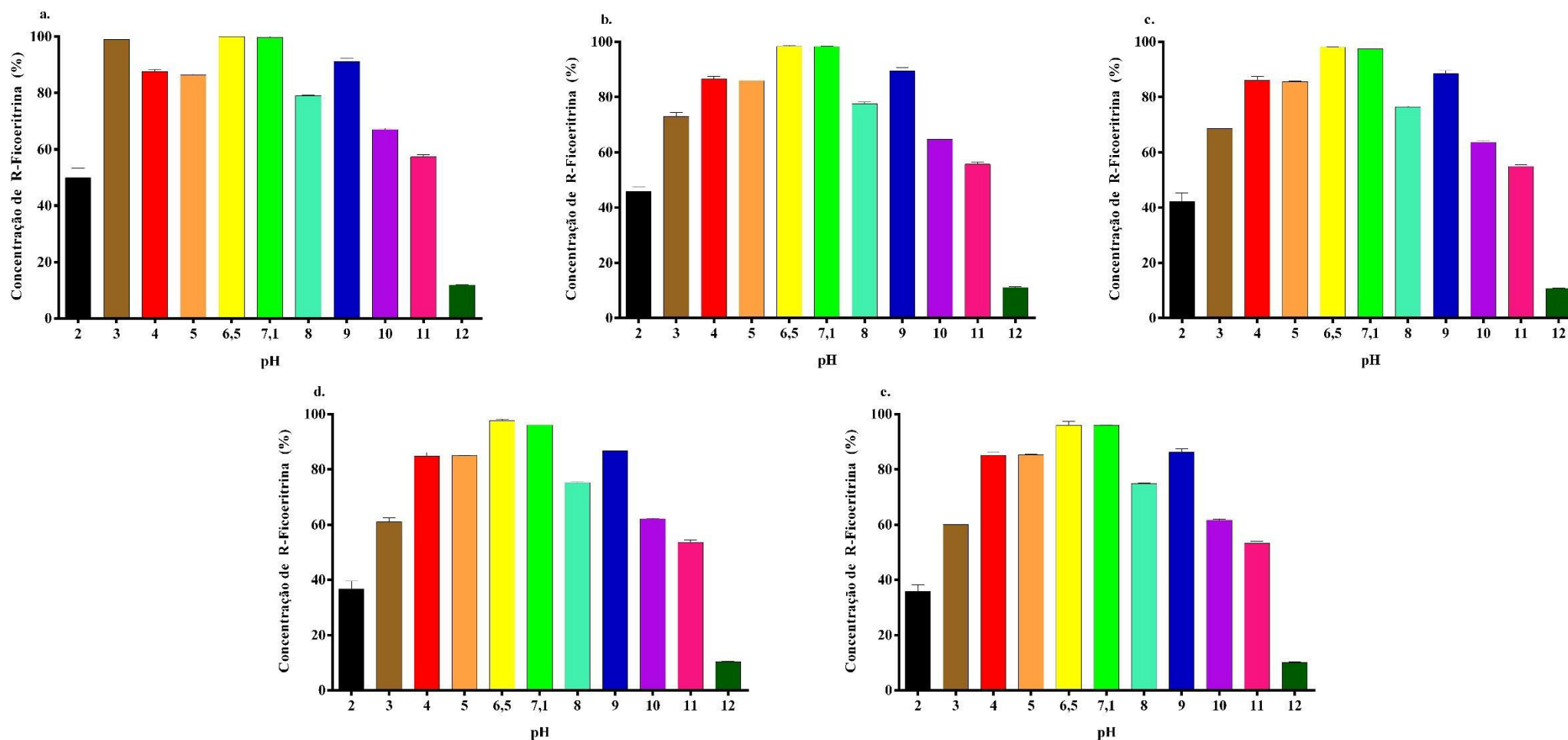
concentração de R-FE em praticamente todos os pHs, sendo que para o pH 7,1 houve uma perda de 3,76% de R-FE, sendo que para os demais pHs a perda foi aproximadamente na mesma escala, como é apresentado na Figura 13.

Em relação ao efeito do tempo sobre as propriedades espectroscópicas da R-FE de *S. filiformis* em diferentes pH, não foram observadas alterações significativas durante 2 h, em relação aos espectros de absorção do pigmento em cada pH no tempo zero (Figura 12). Porém, para os pHs 2 e 3 é possível visualizar que os dois picos correspondentes a PEB não estão bem definidos, permanecendo apenas o pico da PUB. Para o pH 12, tanto o espectro de absorção como o de fluorescência perdem totalmente as características da R-FE.

A propriedade de fluorescência do pigmento foi mais afetada pelo pH, sendo observada uma diminuição na intensidade dos espectros de fluorescência para algumas soluções, no tempo zero e ao longo do tempo. Após 30 min, foi verificada uma diminuição média da intensidade de fluorescência de 5,5% para todos os pHs, principalmente no pH 5, onde a perda foi de 13,37 %. Já após 2 h, as perdas de fluorescência do pigmento alcançaram 32,97 e 16,614% para os pHs 5 e 6, respectivamente (Figura 14) .

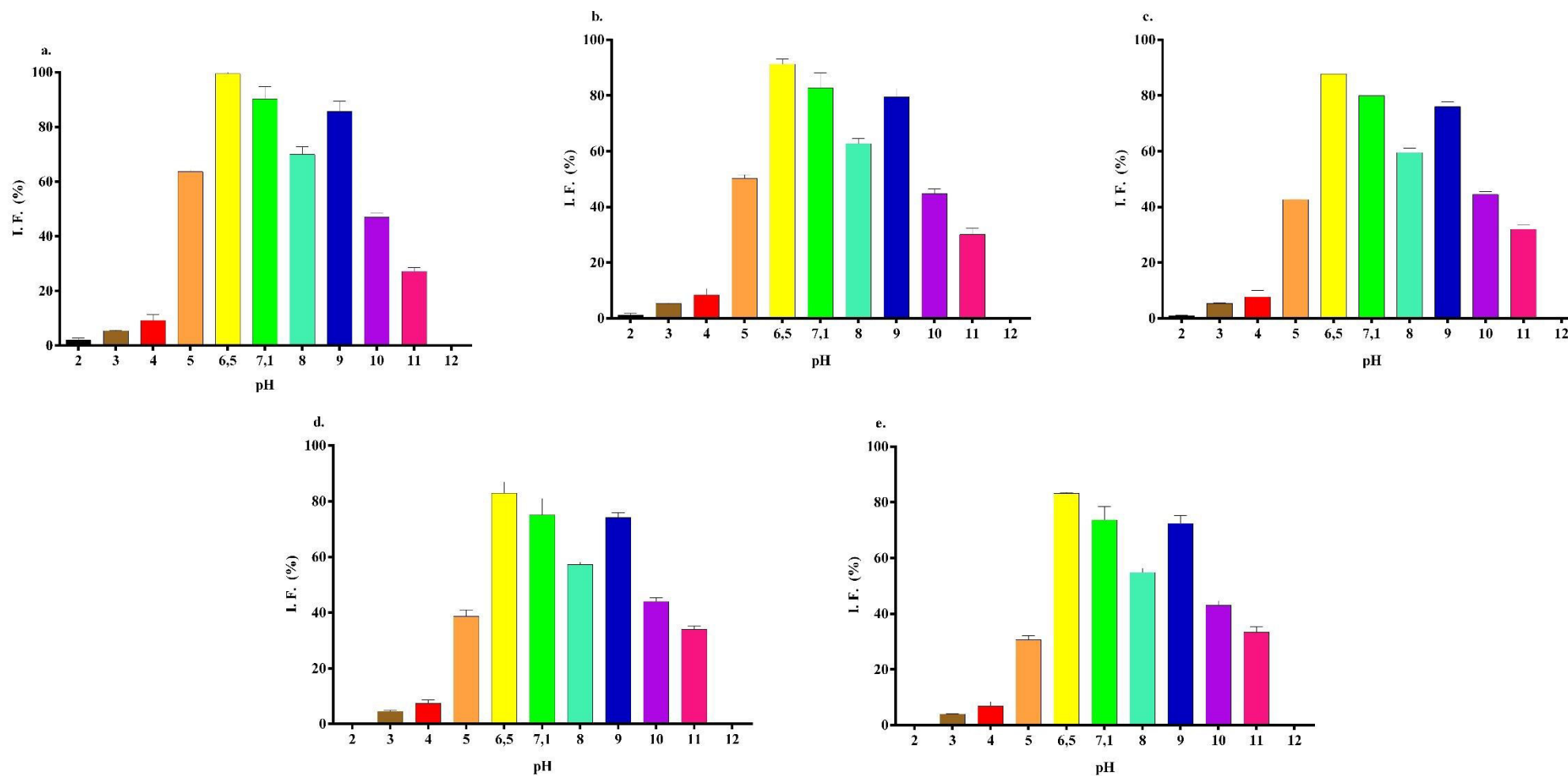
Assim sendo, pelo padrão dos espectros de absorção e fluorescência e pelas concentrações de R-FE e intensidade de fluorescência, pode-se dizer que as propriedades espectroscópicas da R-FE da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* são estáveis numa faixa de pH de 5 a 11.

Figura 13: Concentrações de R-ficoeritrina para cada pH. (a) tempo zero; (b) após 30 min.; (c) após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min.



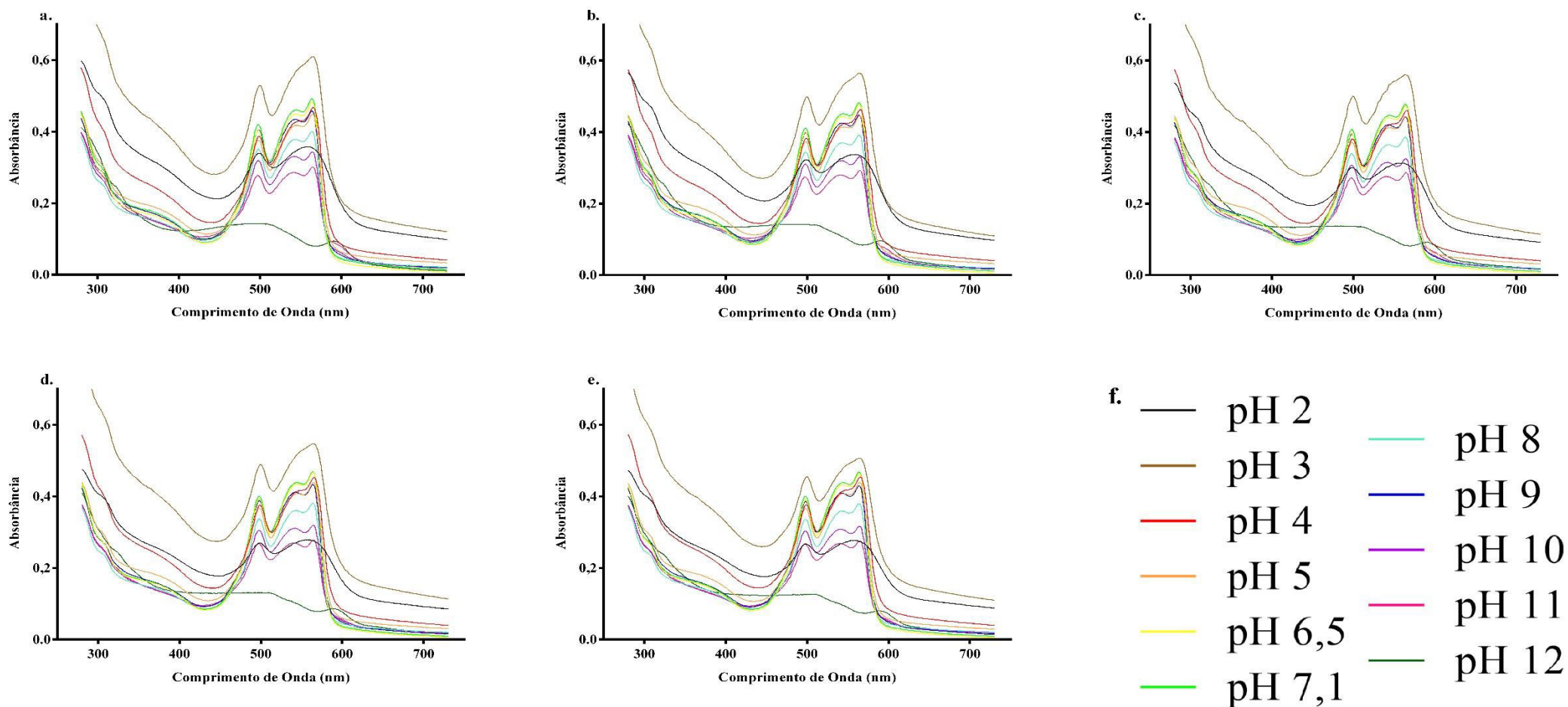
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 14: Intensidade de fluorescência para cada pH. (a) tempo zero; (b) após 30 min.; (c) após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min.



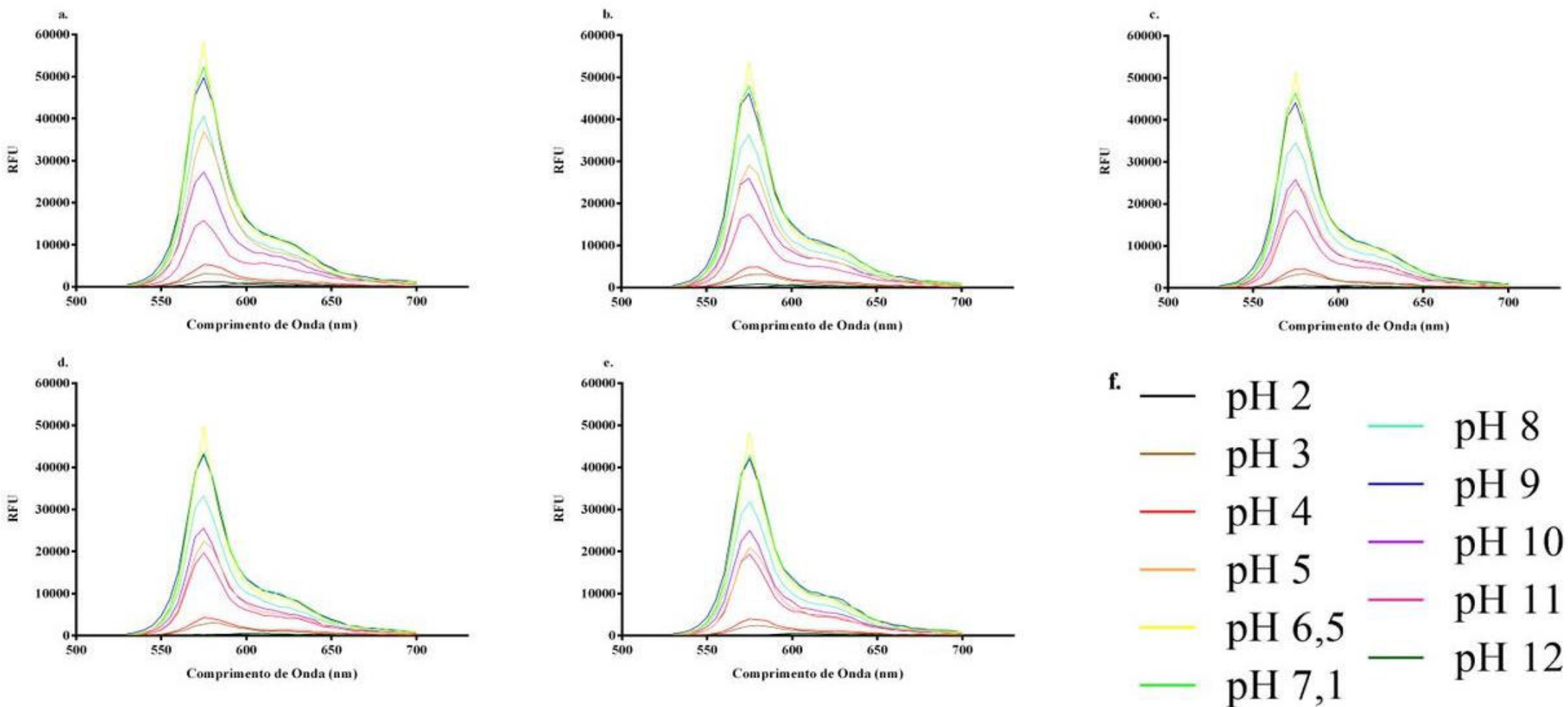
Legenda: IF = Intensidade de Fluorescência. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Figura 15: Efeito do pH e estabilidade do espectro de absorção da R-ficoeritrina de *S. filiformis* (PIII-DEAE). (a) Tempo zero; (b) após 30 min.; (c) após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 16: Efeito do pH e estabilidade do espectro de fluorescência da R-ficoeritrina de *S. filiformis* (PIII-DEAE). (a) Tempo zero; (b) após 30 min.; (c) após 60 min.; (d) após 90 min.; (e) após 120 min.



Legenda: RFU = Unidades relativa de fluorescência; **Fonte:** Elaborado pela autora.

Nos pH 2 e 3, os picos correspondentes às ficoeritobilinas PEB ($\lambda = 545$ nm e 564 nm), sofrem alterações, ou seja, não apresentaram um pico definido de acordo com o perfil de absorção da R-FE, indicando degradação das PEB e estabilidade da PUB, cujo o pico é a 495 nm. Além disso, nos valores de pH onde foram observadas degradação dos picos relacionados às PEBs, as absorbâncias a 280 nm foram bem maiores do que naqueles pHs onde a R-FE se mantinha estável. Isso se deve, provavelmente, a mudanças na conformação proteica dos pigmentos decorrentes da desnaturação, expondo as subunidades peptídicas que contém aminoácidos aromáticos, aumentando a absorção a 280 nm.

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, Munier *et al.*, (2014) avaliaram a estabilidade ao pH da R-ficoeritrina extraída de *Grateloupia turuturu* onde ela foi estável numa faixa de pH de 4 a 10. Eles observaram uma mudança de coloração de rosa para roxa nos pH mais ácidos (2 a 4 no caso) e uma leve precipitação bem como a perda total de coloração para o pH 12. Wu *et al.* (2015a) avaliando a estabilidade da R-ficoeritrina da *Bangia fusco-purpurea*, também observaram estabilidade espectroscópica numa faixa de pH de 5 a 9.

5.3. Análises colorimétricas de iogurtes coloridos com R-Ficoeritrina de *S. filiformis*

A colorimetria dos iogurtes naturais adicionados da R-FE de *S. filiformis* em diferentes concentrações foi realizada com intuito de avaliar quais as concentrações das amostras F-090 e PIII-DEAE se aproximariam mais da coloração do iogurte de morango comercial. As amostras que continham 0,0243 mg de R-FE por mL de iogurte (PIII-DEAE) e 0,062 mg de R-FE por mL de iogurte (F0-90) apresentaram uma maior semelhança com a amostra comercial (Tabela 7).

Tabela 7: Análise colorimétrica de iogurte natural adicionado de diferentes concentrações das frações F0-90 e PIII-DEAE contendo R-ficoeritrina de *S. filiformis* e iogurte de morango comercial.

Fração	Concentração de R-FE (mg/mL)	Parâmetros Colorimétricos		
		L*	a*	b*
F0-90	0,0124	83,23	6,66	3,02
	0,0248	80,37	9,16	1,6
	0,0372	78,33	11,42	-0,03
	0,0496	77,33	12,99	-1,02
	0,062	76,22	13,96	-1,69
	0,0162	83,06	10,81	2,69
PIII-DEAE	0,0203	82,83	11,73	2,27
	0,0243	80,52	14,19	1,23
	0,0284	80,75	14,38	1,1
	0,0324	81,11	15,41	0,81
Iogurte de morango Comercial	Colorido com azorrubina	78,23	14,21	0,09

Legenda: L* = Luminosidade; a* = coordenada vermelho/verde (+a indica vermelho e -a indica verde); b* = coordenada amarelo / azul (+b indica amarelo e -b indica azul). **Fonte:** Elaborado pela autora

Em relação à luminosidade, as amostras PIII-DEAE com 0,0243 mg R-FE/mL de iogurte e F0-90 com 0,0372 mg R-FE/mL de iogurte foram as que mais se aproximaram da luminosidade (L*) do iogurte de morango comercial. Vale ressaltar, que o parâmetro luminosidade foi mais afetado pela adição de diferentes volumes da solução de F0-90, do que as amostras que receberam o pigmento em pó, dissolvido diretamente no iogurte natural. A luminosidade da amostra preparada com 3 mL de solução de F0-90 (0,0124 mg R-FE/mL de iogurte) foi de 83,26, enquanto a que recebeu 15 mL (0,062 mg R-FE/mL de iogurte) foi bem menor (76,22). Já o iogurte natural que recebeu 3,6 mg do pó (0,0162 mg R-FE/mL de iogurte) apresentou luminosidade de 83,06, o que foi preparado com 7,2 mg (0,0324 mg R-FE/mL de iogurte) apresentou luminosidade de 81,11. Para a coordenada vermelho/verde (a*)

as amostras PIII-DEAE de concentração 0,0243 mg/mL e F0-90 de concentração 0,062 mg/mL foram as que mais se aproximaram da comercial, porém a amostra preparada com o PIII-DEAE apresentou uma diferença discreta (0,02) no valor desse parâmetro quando comparada a comercial. Ainda com relação a esse parâmetro, os valores variaram de 6,66 a 13,96 para as amostras contendo a menor e a maior concentração de F0-90, respectivamente e de 10,81 a 15,41 para as que continham PIII-DEAE, mostrando assim colorações com vermelho mais intenso para amostras com o pigmento com maior índice de pureza. Quando avaliada a coordenada amarelo/ azul (b^*) a amostra PIII-DEAE 0,0324 mg/mL (0,81) foi a que mais se aproximou da comercial (0,09). Em relação às amostras contendo a F0-90 foram observados valores negativos para o parâmetro b^* nas amostras contendo as maiores concentrações do pigmento (0,0372, 0,0496 e 0,062 mg/mL), mostrando uma tendência para a cor azul. Valores negativos não foram observados nas amostras preparadas com PIII-DEAE, os quais variaram de 2,69 a 0,81. A coloração azulada apresentada pelas amostras preparadas com a F0-90 corrobora com o baixo índice de pureza dessa fração proteica, onde é possível detectar uma contaminação com a ficocianina (ficobiliproteína de coloração azul) mostrada no espectro de absorção a 618 nm dessa fração e ausente no espectro de absorção do PIII-DEAE.

5.4. Análise Sensorial de iogurte natural adicionados de frações proteicas ricas no pigmento natural R-FE de *S. filiformis*

5.4.1. Perfil dos julgadores

A análise sensorial foi realizada com um total de 60 julgadores, sendo que todos eles avaliaram tanto as amostras de iogurte preparadas com a F0-90, quanto as com o PIII-DEAE. A Tabela 8 traz informações sobre os perfis dos julgadores que participaram dessa análise.

Tabela 8: Perfil dos julgadores participantes da análise sensorial de iogurtes naturais adicionados da F0-90 e PIII-DEAE contendo a R-FE de *S. filiformis*.

		Continua
Características	Enquadramento	%
Sexo	Feminino	75
	Masculino	25
Faixa etária	Menor ou igual a 18 Anos	3,33
	19 – 25 Anos	65
	26 – 35 Anos	26,67
	36 – 45 Anos	3,33
	45 – 55 Anos	0
	Mais de 56 Anos	1,67
Estado civil	Casado	11,67
	Solteiro	88,33
	Separado ou Divorciado	0
	Outros	0
Grau de instrução (%)	Fundamental	0
	Médio	0
	Superior incompleto	65
	Superior completo	6,67
	Pós-graduação	28,33
	Outros	0
Frequência de consumo de iogurte de morango (%)	Diariamente	3,33
	1 vez na semana	21,67
	2 a 3 vezes na semana	20
	4 a 5 vezes na semana	0
	Quinzenalmente	20
	1 vez no mês	35
Grau de gosto pelo iogurte de morango (%)	Gosto muitíssimo	26,67
	Gosto muito	46,67
	Gosto moderadamente	16,67
	Gosto ligeiramente	10
Marca preferida de iogurte sabor	Betânia	8,33

morango (%)	Danone	55,00
	Itambé	1,67
	Nestlé	26,67
	Vigor	6,67
	Outras	3,33
Importância da cor no consumo de iogurte (%)	Extremamente importante	26,67
	Muito importante	48,33
	Importante	23,33
	Pouco importante	1,67
	Sem importância	0

Fonte: Elaborado pela autora

Dos julgadores que participaram da análise sensorial 75% eram mulheres e 15% homens, sendo que a maioria, 65%, tinha 19 a 25 anos. Pelo fato da análise ter sido realizada numa universidade, 65% dos julgadores estão cursando o ensino superior, o que levou a uma predominância de “ensino superior incompleto” no grau de instrução, seguido da pós-graduação, 28,33%.

Dos 60 julgadores, 35% consomem iogurte de morango uma vez no mês, 67% consomem uma vez na semana, 20% de duas a três vezes por semana e 20% quinzenalmente, sendo que um total de 46,67% gosta muito de iogurte de morango e 26,67% gostam muitíssimo.

O levantamento das marcas de iogurte de morango preferidas entre os julgadores apontou a Danone, 55% das indicações, seguido das marcas Nestlé (26,67 %) e Betânia (8,33 %). Além do levantamento dessas marcas, os julgadores também avaliaram a importância do atributo cor no consumo de iogurte, onde 48,33% consideraram a cor como um atributo muito importante.

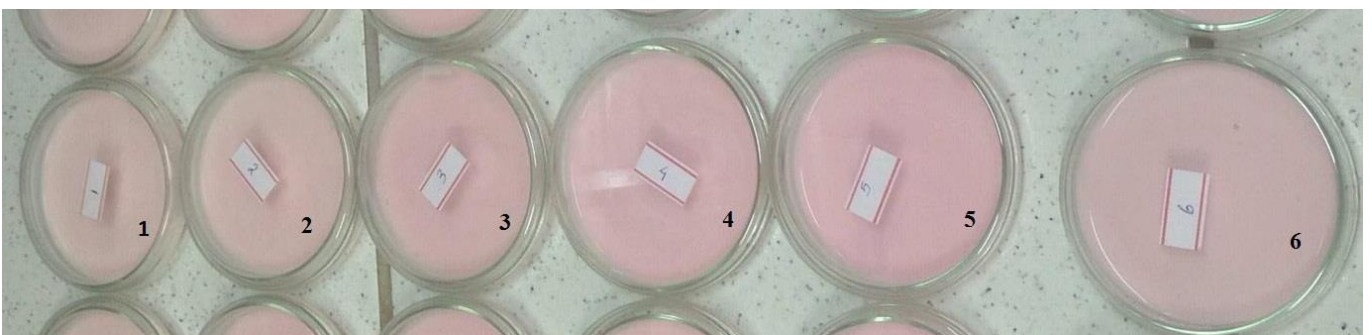
A apresentação das amostras usadas na análise encontra-se representada nas figuras 17 e 18 abaixo.

Figura 17: Apresentação das amostras de iogurtes adicionados de F0-90 rico no pigmento natural R-FE de *S. filiformis* submetidos a análise sensorial. (1) 0,0124 mR-FE/mL; (2) 0,0248 mg R-FE/mL; (3) 0,0372 mg R-FE/mL; (4) 0,0496 mg R-FE/mL; (5) 0,062 mg R-FE/mL; (6) iogurte comercial.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 18: Apresentação das amostras de iogurtes adicionados de PIII-DEAE rico no pigmento natural R-FE de *S. filiformis* submetidos a análise sensorial. (1) 0,0162 mR-FE/mL; (2) 0,0203 mg R-FE/mL; (3) 0,0243 mg R-FE/mL; (4) 0,0284 mg R-FE/mL; (5) 0,0324 mg R-FE/mL; (6) iogurte comercial.

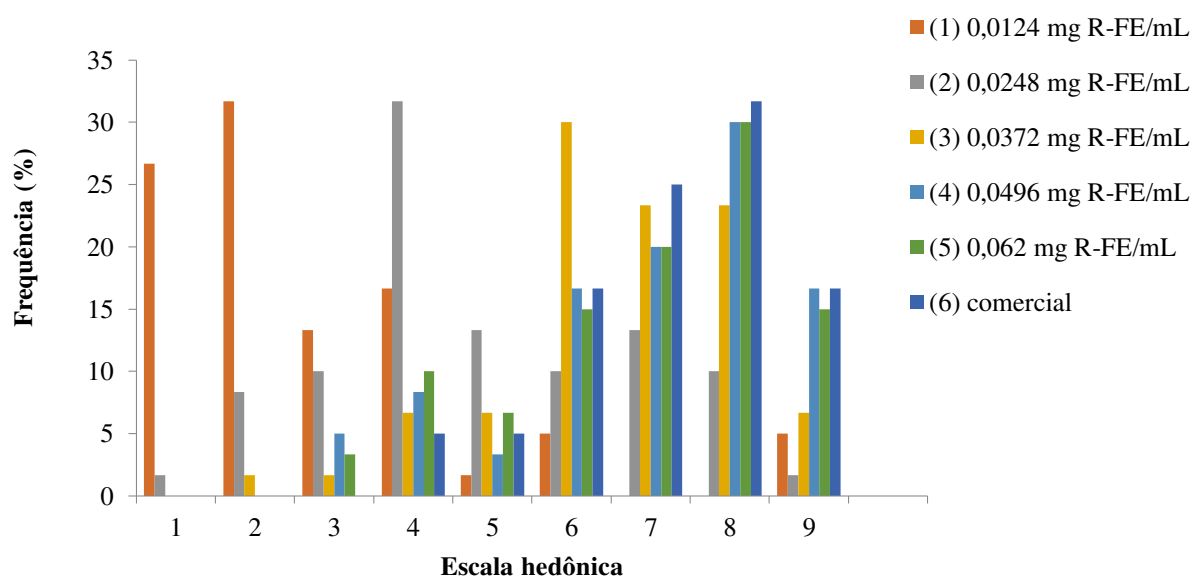


Fonte: Elaborado pela autora

5.4.2. Teste de escala hedônica para a F0-90

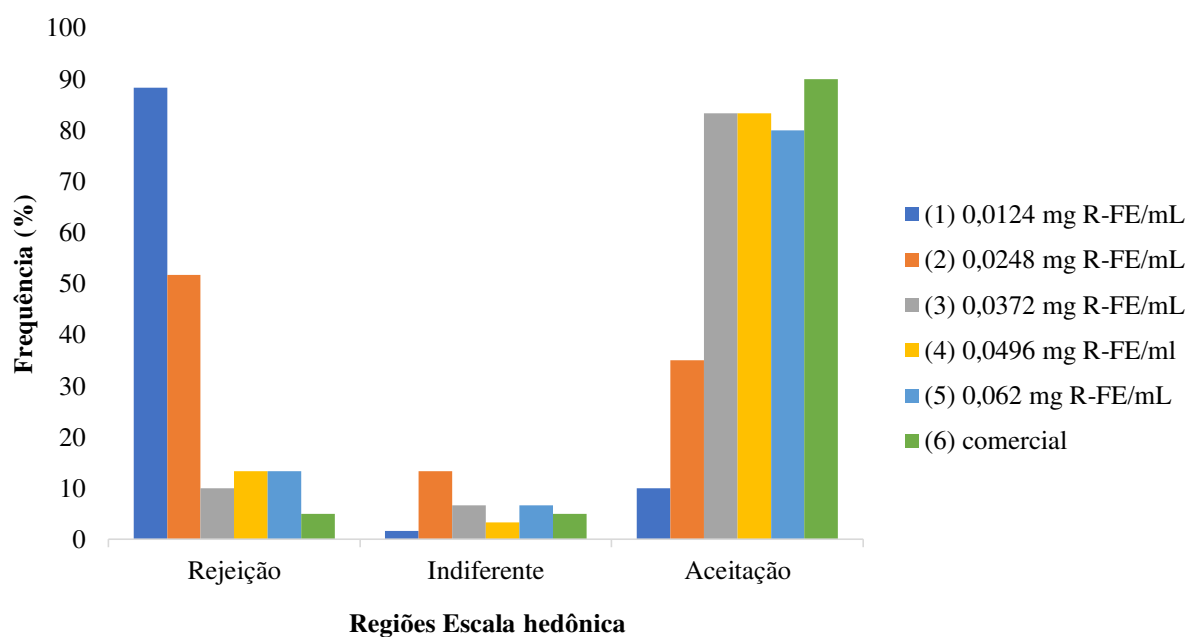
Os resultados do teste de escala hedônica para os iogurtes naturais preparados com a F0-90 contendo R-FE de *S. filiformis* estão apresentados nas Figuras 19 e 20. Dentre as amostras avaliadas, a amostra comercial (amostra 6) foi a que obteve maior porcentagem na região de aceitação. As amostras 4 e 5 foram classificadas pela maioria dos julgadores na região de aceitação por 83,33 e 80%, respectivamente, tendo aceitação aproximada da amostra comercial. As amostras 1 e 2, amostras de menores concentrações de R-FE, foram classificadas, predominantemente, na região de rejeição como mostrado nas Figuras abaixo.

Figura 19: Frequência das notas hedônicas para a cor de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de *S. filiformis*.



Legenda: 1 = Desgostei muitíssimo; 2 = Desgostei muito; 3 = Desgostei moderadamente; 4 = Desgostei ligeiramente; 5 = Indiferente; 6 = Gostei ligeiramente; 7 = Gostei moderadamente; 8 = Gostei muito e 9 = Gostei muitíssimo. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Figura 20: Frequência das notas hedônicas para a cor de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de *S.filiformis* distribuídas pelas regiões de aceitação e rejeição.

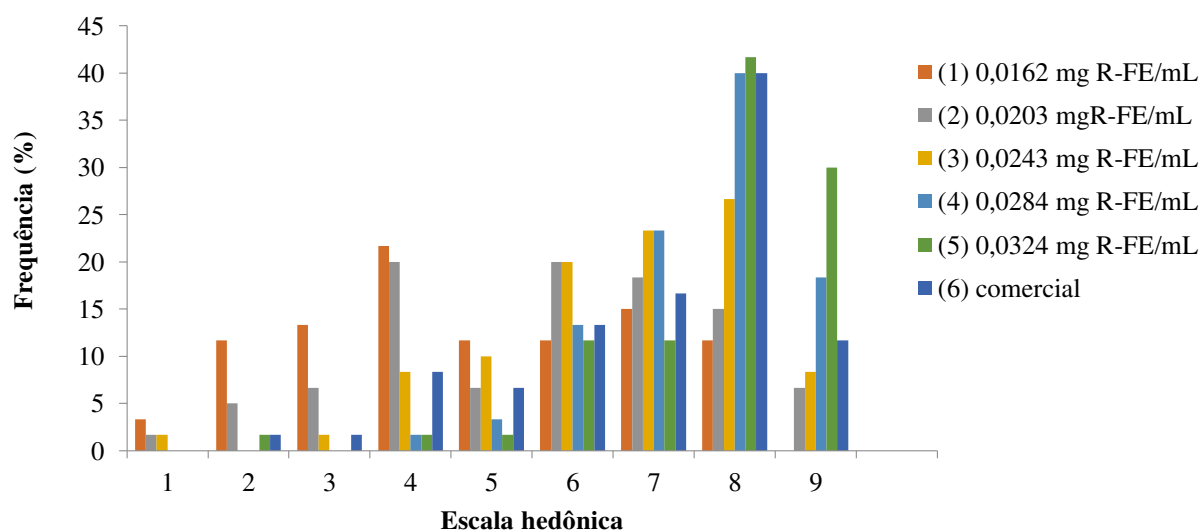


Fonte: Elaborado pela autora

5.4.3. Teste de escala hedônica para o PIII-DEAE

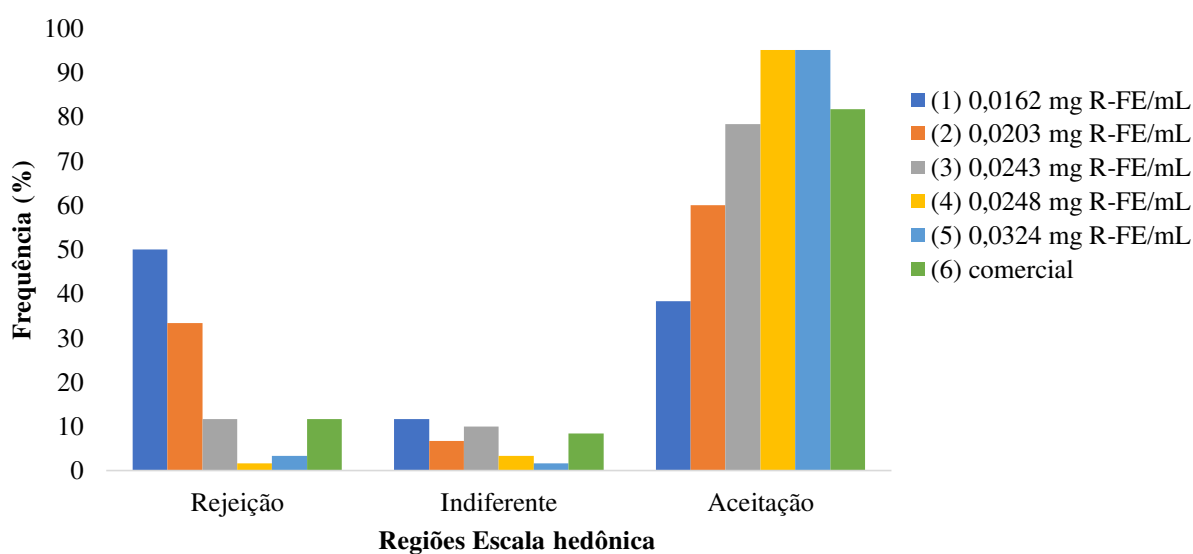
Para as amostras de iogurtes coloridos como PIII-DEAE, as amostras 4 e 5 (amostras de maiores concentrações de R-FE) foram as que obtiveram maiores níveis de aceitação, ficando ambas com 95% de classificação na região de aceitação ultrapassando a porcentagem de aceitação da amostra comercial colorido com corante artificial, como mostrado nas Figuras 21 e 22. A amostra 1 obteve 50% de classificação na região da rejeição, sendo então a amostra de iogurte colorido com PIII-DEAE com menor nível de aceitação entre os julgadores.

Figura 21: Frequência das notas hedônicas para a cor de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de *S. filiformis*.



Legenda: 1 = Desgostei muitíssimo; 2 = Desgostei muito; 3 = Desgostei moderadamente; 4 = Desgostei ligeiramente; 5 = Indiferente; 6 = Gostei ligeiramente; 7 = Gostei moderadamente; 8 = Gostei muito e 9 = Gostei muitíssimo. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Figura 22: Frequência das notas hedônicas para a cor de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de *S. filiformis*, distribuídas nas regiões de rejeição e aceitação.



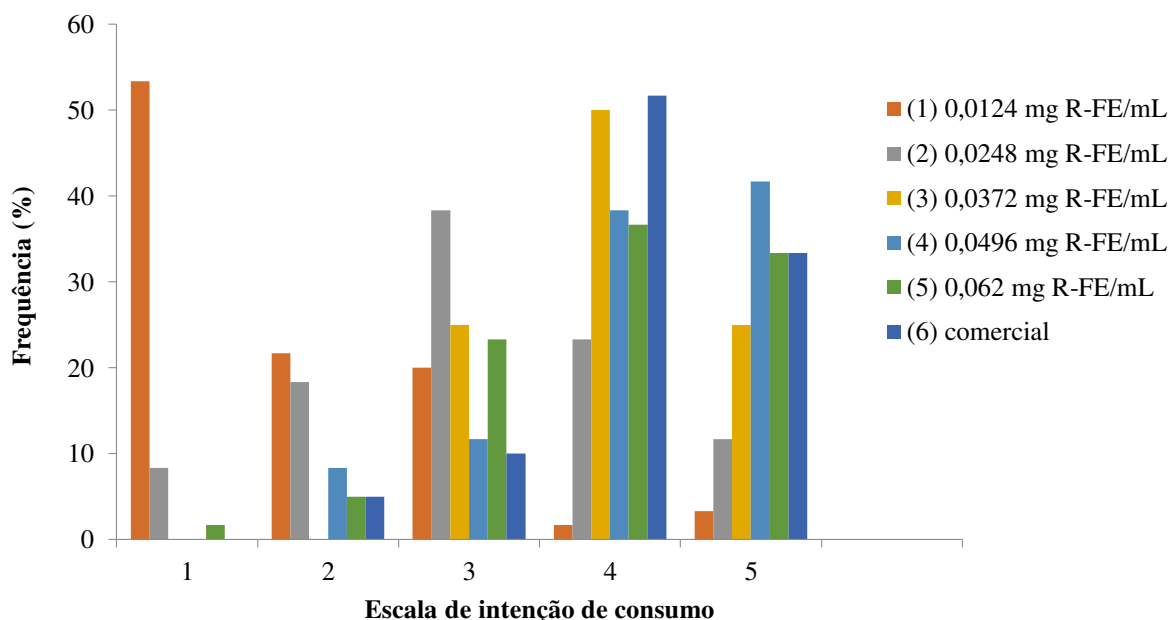
Fonte: Elaborado pela autora.

Pelo resultado deste teste, vê-se que os julgadores avaliaram as amostras com maiores intensidades de cor como as mais atrativas, e as de menores intensidade como menos atrativas. O iogurte natural não foi a amostra que recebeu maiores classificações, o que indica que o iogurte adicionado de R-ficoeritrina apresenta coloração mais atrativa do que a do iogurte de morango comercial, aos olhos dos julgadores.

5.4.4. Teste de escala de intenção do consumo para F0-90

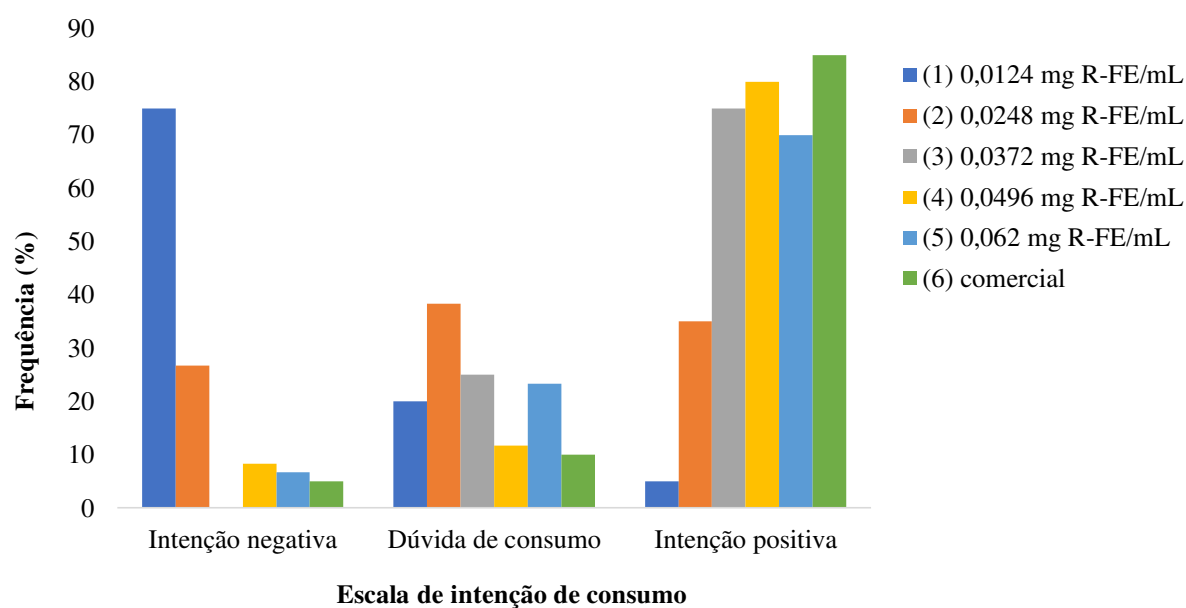
Os resultados para a intenção de consumo de iogurte coloridos com a F0-90 contendo R-FE de *S. filiformis* estão apresentados nas Figuras 23 e 24. As amostras de maiores concentrações de R-FE, 3, 4 e 5 foram classificadas pela maioria com classificações na região de intenção positiva, com porcentagens próximas à classificação do iogurte comercial. Já a amostra 1, a de menor concentração de R-FE foi classificada por 75% dos julgadores na região de intenção negativa, como mostrado abaixo.

Figura 23: Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de *S. filiformis*.



Legenda: 1 =Certamente não consumiria; 2 = Provavelmente não consumiria; 3 = Tenho dúvidas se consumiria; 4 = Provavelmente consumiria; 5 = Certamente consumiria. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Figura 24: Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de *S.filiformis*, distribuídas nas regiões de intenção negativa e positiva.

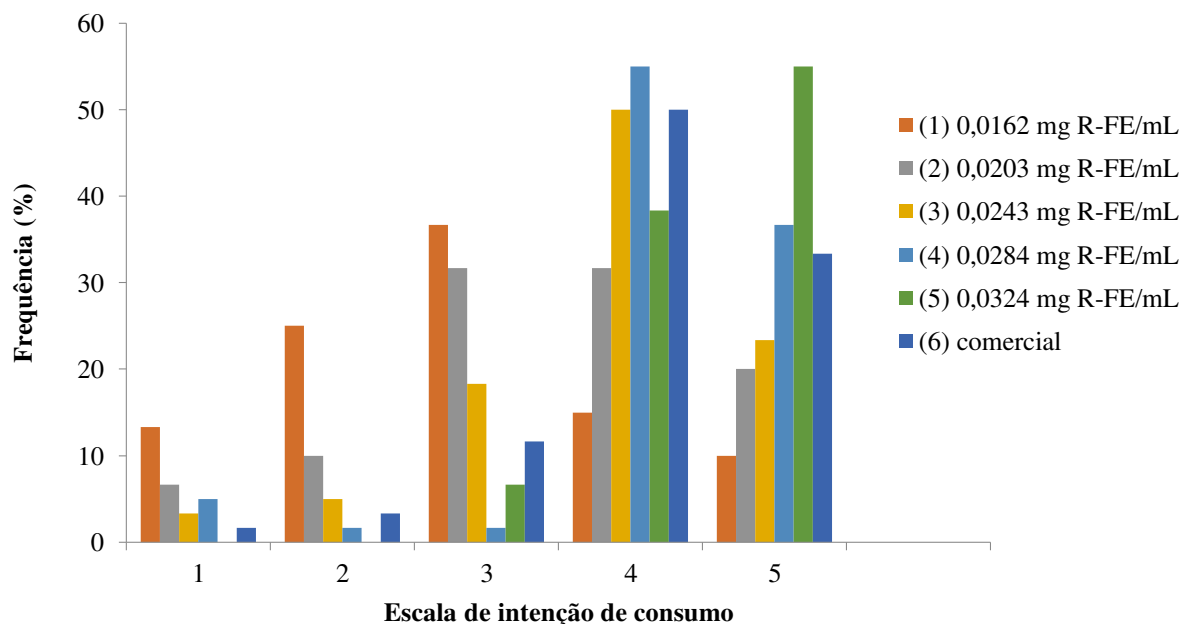


Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.5. Teste de escala de intenção do consumo para o PIII-DEAE

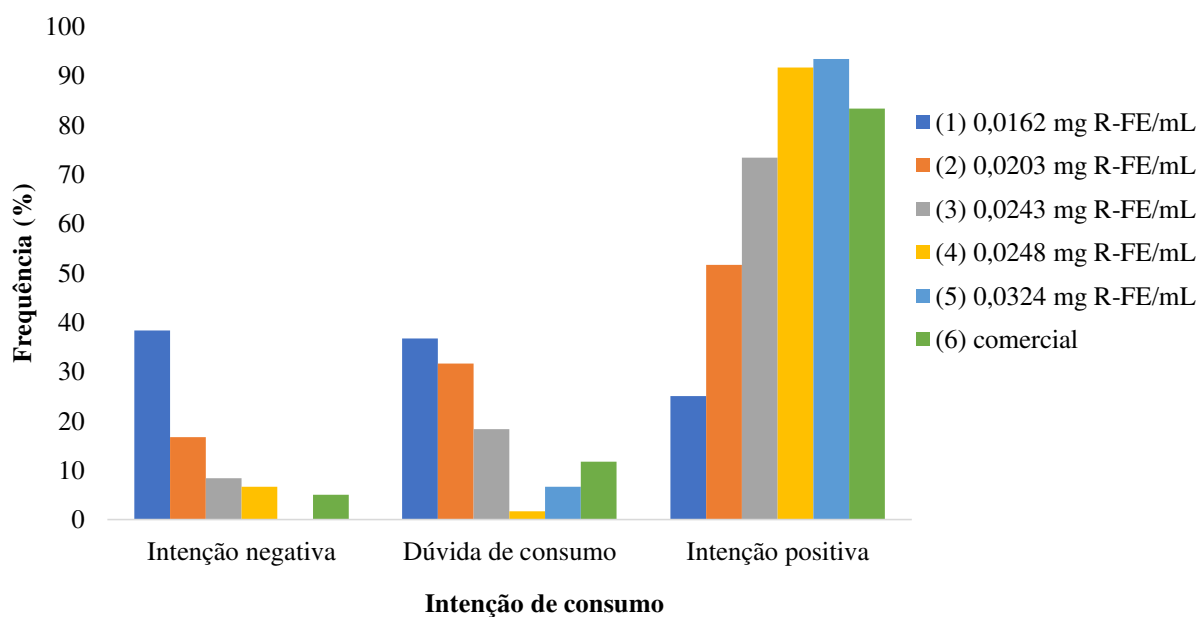
Nesse teste, as amostras 4 e 5 obtiveram mais classificações na região de intenção positiva do que a amostra comercial, sendo classificadas por 91,67 e 93,33%, respectivamente, nessa região como mostrado nas Figuras 25 e 26. A amostra 1, obteve 38,33% das classificações na região de intenção negativa, porém o restante do percentual dos julgadores ficaram entre dúvida se consumiriam ou não tal amostra e intenção positiva, o que mostra que para alguns julgadores a amostra não estavam com coloração ruim.

Figura 25: Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de *S. filiformis*.



Legenda: 1 = Certamente não consumiria; 2 = Provavelmente não consumiria; 3 = Tenho dúvidas se consumiria; 4 = Provavelmente consumiria; 5 = Certamente consumiria. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Figura 26: Frequência das notas de intenção de consumo de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de *S. filiformis*, distribuídas nas regiões de intenção negativa e positiva.



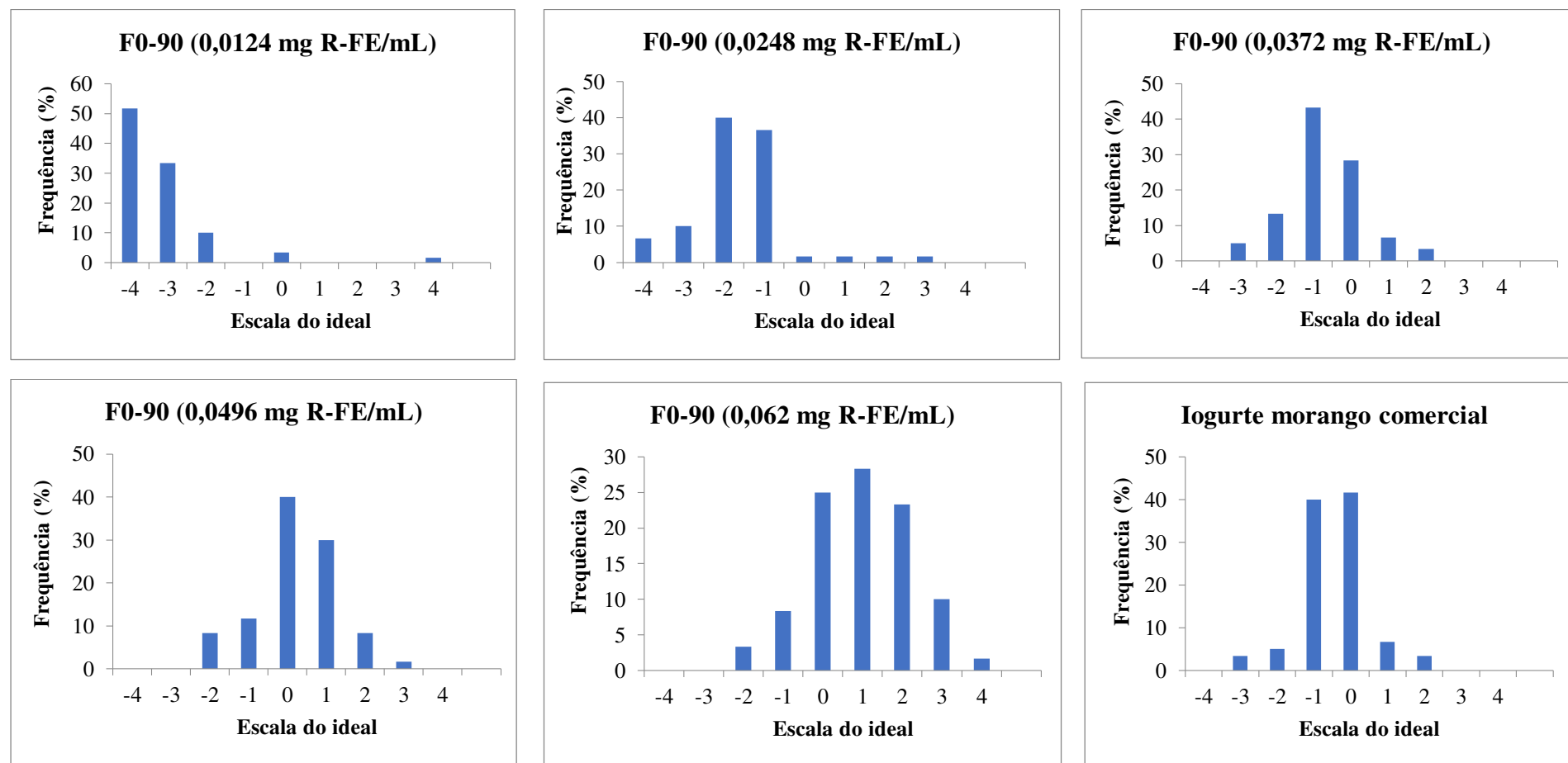
Fonte: Elaborado pela autora

Assim como no teste de escala hedônica, foi atribuída classificações mais altas para as amostras de maiores intensidades de cor. As amostras de concentrações intermediárias, no caso a 2 e 3, geraram dúvidas por parte dos julgadores se consumiriam ou não, o que fortalece a ideia de que quanto mais intenso era a cor, melhor era a classificação.

5.4.6. Teste da escala do ideal para a F0-90

No teste de escala ideal de cor para iogurtes pigmentados com a F0-90 rica em R-FE de *S. filiformis*, nenhuma amostra obteve 70% de classificações como sendo ideal (0) porém as amostras 4 e 6 (comercial) obtiveram maiores frequências de classificações como sendo ideais, mostrando que pelo menos uma amostra de iogurte colorido com F0-90 obteve classificação bem próxima à do iogurte comercial. A única amostra que não agradou os julgadores, obtendo mais de 20% de classificações nas extremidades, no caso com classificação -4, foi a amostra 1 classificada por 51,67% como sendo extremamente menos forte que o ideal. Isso indica que a cor nessa amostra não estava no seu nível ótimo. Esses dados estão representados da Figura 27.

Figura 27: Frequência das notas da escala do ideal atribuídas a cor de iogurte natural colorido com F0-90 contendo o pigmento natural R-FE de *S.filiformis*



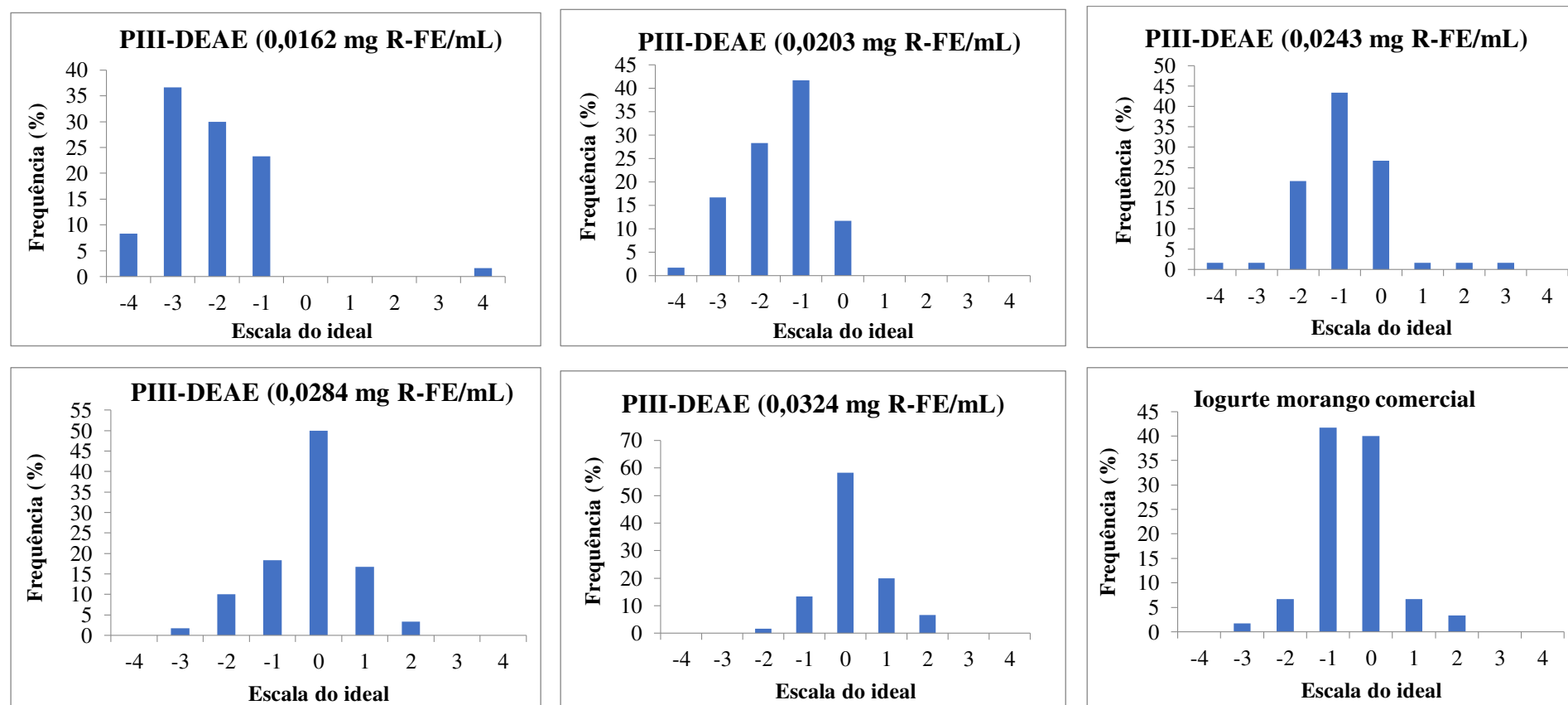
Legenda: -4 = Extremamente menos forte que o ideal; -3 = Muito menos forte que o ideal; -2 = Moderadamente menos forte que o ideal; -1 = Ligeiramente menos forte que o ideal; 0 = Ideal; +1 = Ligeiramente mais forte que o ideal; +2 = Moderadamente mais forte que o ideal; +3 = Muito mais forte que o ideal e +4 = Extremamente mais forte que o ideal. **Fonte:** Elaborado pela autora.

5.4.7. Teste de escala do ideal para o PIII-DEAE

Nenhuma amostra de iogurte colorido com PIII-DEAE atingiu 70% de classificação como sendo ideal, porém a amostra 4 (0,0284 mg R-FE/mL) foi a que obteve maior frequência de classificação ideal, sendo classificada como tal por 50% dos julgadores, o que indica que essa amostra, aos olhos dos julgadores, apresentava coloração melhor que a amostra comercial que foi classificada como ideal por 40% dos julgadores.

Já em relação às extremidades (-4 e +4), nenhuma amostra atingiu 20% de classificação nas extremidades, o que indica que as amostras coloridas com PIII-DEAE não estavam extremamente menos ou mais fortes que amostras ideais. Os dados estão representados na Figura 28.

Figura 28: Frequência das notas da escala do ideal atribuídas a cor de iogurte natural colorido com PIII-DEAE contendo o pigmento natural R-FE de *S.filiformis*



Legenda: -4 = Extremamente menos forte que o ideal; -3 = Muito menos forte que o ideal; -2 = Moderadamente menos forte que o ideal; -1 = Ligeiramente menos forte que o ideal; 0 = Ideal; +1 = Ligeiramente mais forte que o ideal; +2 = Moderadamente mais forte que o ideal; +3 = Muito mais forte que o ideal e +4 = Extremamente mais forte que o ideal. **Fonte:** Elaborado pela autora.

5.4.8. Análise geral dos resultados obtidos na análise sensorial

Para as amostras de iogurte coloridas com a F0-90, a amostra comercial se destacou, porém houve amostras que obtiveram níveis de aceitação próximas à amostra comercial. A F0-90, por ser uma amostra menos pura que o pico de cromatografia, contém várias moléculas contaminantes, inclusive a ficocianina, um pigmento de coloração azul que misturada a R-FE, de coloração vermelha, gera uma tonalidade com tendência ao roxo. Além disso, pelo fato do iogurte sofrer diluição pela adição de diferentes volumes de solução da F0-90, gerou uma textura do iogurte um pouco diferente do iogurte comercial, o que pode ter influenciado nas decisões dos julgadores, apesar dos testes terem sido somente para o atributo cor, e não para a textura. A F0-90 por ser menos pura, dificulta o seu uso como pó. Quando liofilizada, devido à presença dos carboidratos da alga, ela ganha um aspeto esponjoso de difícil solubilização, o que justifica o fato de ter sido aplicada em solução e não liofilizada como o pico de cromatografia de troca iônica.

Nos testes realizados para as amostras de iogurte natural adicionadas do pico de cromatografia (PIII-DEAE), todas as amostras em gerais obtiveram um bom nível de aceitação, com destaque para as amostras 4 e 5 que obtiveram níveis de aceitação superiores ao da amostra comercial, o que mostra que as amostras coloridas com o PIII-DEAE se mostraram mais atrativas para os julgadores do que o iogurte de morango comercial colorido com um corante artificial.

Durante toda a análise sensorial, foi possível verificar que a intensidade da cor foi muito importante na decisão dos julgadores em relação à aceitação das amostras, sendo que as amostras de maiores intensidades receberam maiores níveis de aceitação.

6. CONCLUSÃO

O rendimento da extração da R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi duplicado ao se utilizar congelamento associado ao método de precipitação por sulfato de amônio. Além disso, as propriedades espectroscópicas da R-ficoeritrina de *S. filiformis* foram estáveis na faixa de pH de 5 a 11 e, quando frações proteicas com diferentes índices de pureza do pigmento foram adicionadas em iogurte natural a coloração foi muito aproximada ao iogurte de morango comercial. Os iogurtes adicionados do corante de origem natural apresentaram boas classificações para aceitação global, principalmente quando foi utilizado o pigmento com maior índice de pureza, chegando a níveis de aceitação superiores a do iogurte comercial sabor morango.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERO, S.; TABAR, A. L.; ALVAREZ, M.J.; GARCIA, B. E.; OLAGUIBE, J. M.; MONEO, I. Occupational asthma and food allergy due to carmine. **European journal of allergy and clinical immunology**, v. 53, p. 897–901, 1998.
- ALBERTSSON, P. Å. The contribution of photosynthetic pigments to the development of biochemical separation methods: 1900-1980. **Photosynthesis Research**, v. 76, n. 1-3, p. 217–225, 2003.
- ALBUQUERQUE, M. V. Educação Alimentar: Uma Proposta de Redução do Consumo de Aditivos Alimentares. **Química nova**, v. 34, p. 51–57, 2012.
- ALMEIDA, N. G. Corantes naturais: uso e aplicação industrial. **Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB)/ Departamento de economia rural (DERAL)**, Campinas, p 1-6, 2007.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 81–88, 2000.
- ANVISA. Informe Técnico nº. 68/2015 – GEARE/GGALI/ANVISA - Pag 1 de 7 Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia para Alegações - **GEARE Gerência Geral de Alimentos - GGALI**. p. 1–7, 2015.
- APARECIDA, N.; DIAS, A.; LARA, S. B.; MIRANDA, L. S.; SCORZI, I.; PIRES, C.; PIRES, C. V.; HALBOTH, N. V. Influence of color on acceptance and identification of flavor of foods by adults. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 296–301, 2012.
- BARBOSA, L. M. V.; FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N. Desenvolvimento de produtos e análise sensorial. **Brasil Alimentos**, Paraná, n. 18, 2003.
- BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding Molecules to Food , Pros and Cons : A Review on Synthetic and Natural Food Additives. **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 377–399, 2014.
- BASTOS-FILHO, A. J. U. Purificação e caracterização do pigmento vermelho R-Ficoeritrina da macroalga marinha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, 2016.
- BENEDETTI, I.; SILVA, E. L. A química dos corantes naturais : uma alternativa para o

ensino da química. p. 1–24, 2008.

BISSACOTTI, A. P.; ANGST, C. A.; SACCOL, A. L. F. Implicações dos aditivos químicos na saúde do consumidor. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 6, n. 1, p. 43–59, 2015.

BOTH, M. A., FARIAS, S., FRANZOI JUNIOR, R. E., TODESCATO, D., GUELLI U. SOUZA, S. M. A., ULSON DE SOUZA, A. A. Degradação Enzimática do Corante de Cochonilha. **COBEQ 2014 – Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Anais em CD, Florianópolis, Outubro de 2014.

BRADFORD, J. A.; BULLER, G.; SUTER, M.; IGNATIUS, M.; BEECHEM, J. M. Fluorescence-intensity multiplexing: Simultaneous seven-marker, two-color immunophenotyping using flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 61, n. 2, p. 142–152, 2004.

BRANDON, K.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; SILVA, J. M. C. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 7–13, 2005.

BRASIL. Portaria n. 540, 1997.

BRASIL. Resolução n. 44, 1978

CARNEIRO, J. G.; RODRIGUES, J. A. G.; TELES, F. B.; CAVALCANTE, A. B. D.; BENEVIDES, N. M. B. Analysis of some chemical nutrients in four Brazilian tropical seaweeds. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 137, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84900464281&partnerID=tZOtx3y1>>.

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

CHUNER, C.; LI, C.; WU, S.; WANG, Q.; GUO, Z.; HE, P. Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. **Natural Science**, v. 04, n. 08, p. 536–543, 2012.

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

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203–220, 2002.

Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1248>>.

CONTRERAS-MARTEL, C.; MARTINEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M.; LEGRAND, P.; PIRAS, C.; VERNEDE, X.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Crystallization and 2.2° resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: A case of perfect hemihedral twinning. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 57, n. 1, p. 52–60, 2001.

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

DE MARSAC, N. T.; COHEN-BAZIRE, G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 4, p. 1635–1639, 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.4.1635>>.

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

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5–22, 2000.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. Avaliação da estabilidade de betalaínas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris L.*) com α -, β - e γ -ciclodextrinas. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 259-276, 2006.

DUMAY, J.; CLÉMENT, N.; MORANÇAIS, M.; FLEURENCE, J. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 21–27, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.146>>.

DUMAY, J.; MORANÇAIS, M.; MUNIER, M. Author 's personal copy Phycoerythrins : Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. **Botanical research**, v. 71, p. 321–344, 2014.

DUTCOSKY, S. D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 1996.

EDODES, L.; SOUZA, N. B. De; CONTESSA, C. R.; ALMEIDA, L.; MANERA, P.; MORAES, C. C. Purificação por congelamento e descongelamento de compostos com ação antimicrobiana extraídos de *lentinula edodes*. **Anais do VII Salão internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Rio Grange do Sul, n. 1, p. 1–2, 2014.

- EMBRAPA. A cultura do Urucum. **Coleção Plantar**, Brasília, 2ª edição, 2009.
- FERREIRA, M. M.; ZAMITH, H. P. S.; ABRANTES, S. Astaxantina : seu uso como corante natural alimentício. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 1–8, 2014.
- FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, 2006. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-530X2006000300011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- FESTIN, R.; BJÖRKLUND, B.; TÖTTERMAN, T. H. Detection of triple antibody-binding lymphocytes in standard single laser flow cytometry using colloidal gold, fluorescein and phycoerythrin as labels. **Journal of Immunological Methods**, v. 101, n. 1, p. 23–28, 1987.
- FLEURENCE, J. R-Phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in Biotechnology. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n. 1, p. 63–68, 2003.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê corantes. **Food Ingredients Brasil**, p 40-59, 2009.
- FUTURE MARKET INSIGHTS. Natural food colours market: Demand for clean label products growing: Global industry Analysis and Opportunity assessment, 2016-2016. **Future Market Insights**. Disponível em <<http://www.futuremarketinsights.com/reports/global-natural-food-colours-market>>.
- GAIGALAS, A.; GALLAGHER, T.; COLE, K. D.; SINGH, T.; WANG, L.; ZHANG, Y.-Z. A Multistate Model for the Fluorescence Response of R-Phycoerythrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 635–644, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1562/2005-05-26-RA-544>>.
- 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.
- GARCIA, C. E. R.; Bolognesi, V. J.; Dias, J. F. G.; Miguel, O. G.; Costa, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana L.*) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1510-1517, 2012.

GLAZER, A. N. Light harvesting by phycobilisomes. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 14, n. 64, p. 47–77, 1985.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105–112, 1994.

GLAZER, A. N.; HIXSON, C. S. Subunit Structure and Chromophore Rhodophytan Phycoerythrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 1, p. 32–42, 1977.

GUIMARÃES, W.; ALVES, M. I. R.; ANTONIOSI-FILHO, N. R. Antocianinas em extratos vegetais: aplicação em titulação ácido-base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1673-1679, 2012

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. **World-wide electronic publication, National University of Ireland**, Galway, 2014.

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

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 394–420, 2013.

HAYASHI, N. R.; TERAZONO, K.; HASEGAWA, N.; KODAMA, T.; IGARASHI, Y. Identification and Characterization of Phycobiliprotein from a Thermophilic cyanobacterium, *Chroococcidiopsis* sp. Strain TS-821. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 5, p. 475–477, 1997.

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

JAYASINGHE, P S; PAHALAWATTAARACHCHI, V. ; R. k. K. D. S. Seaweed Extract As a Natural Food Coloring Agent in Jelly Desserts on Chemical , Microbial and Sensory Quality. **Academy of Agriculture Journal**, p. 65–69, 2016. Disponível em: <<http://innovativejournal.in/aaj/index.php/aaj>>.

KAWSAR, S. M. a; FUJII, Y.; MATSUMOTO, R.; YASUMITSU, H.; OZEKI, Y. Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps* : extraction , purification and characterization. **Phytologia Balcanica**, v. 17, n. 3, p. 347–354, 2011.

KIRK, J. T. O. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. **Cambridge University Press**, 3ª Edição, v. 50, 2010.

KONICA MINOLTA. Entendendo o espaço da cor L*a*b*. Disponível em <<http://sensing.konicaminolta.com.br/2013/11/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>>.

LATADO, R. R.; TOGNATO, P. C.; SILVA-STENICO, M. E.; NASCIMENTO, L. M.; SANTOS, P. C. Acúmulo de antocianinas e características físicas e químicas de frutos de laranjas sanguíneas durante o armazenamento a frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, 2008

LE GUILLARD, C.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BRUZAC, S.; RAGON, J. Y.; FLEURENCE, J.; BERGÉ, J. P. Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. **Algal Research**, v. 12, p. 522–528, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.002>>.

LEONARDO, S. B. Extração de pigmentos de urucum e estabilidade de seus extratos e de sementes. **Dissertação** (Mestrado Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Centro Universitário do Instituto Mauá Tecnologias, São Caetano do Sul, 2007.

LIMA, T. D. B. Cultivo da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (Kutzing) P.W. Gabrielson: Textura de Géis e Lácteos. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, 2012. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/18339>>.

LIN, Y. H.; HORI, Y.; HOSHINO, S.; MIYAZAWA, C.; KOHNO, Y.; SHIBATA, M. Fluorescent colored material made of clay mineral and phycoerythrin pigment derived from seaweed. **Dyes and Pigments**, v. 100, n. 1, p. 97–103, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.08.022>>.

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

- LIU, L. N.; CHEN, X. L.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1708, n. 2, p. 133–142, 2005b.
- LUANA, P. Corantes e Pigmentos. **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - Dossiê técnico**, Paraná, 2012.
- LÚCIA, M.; POLÔNIO, T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde : desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, 2009.
- MCCANN, D.; BARRET, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, L.; PRINCE, E.; SONUGA-BARKE, E.; WARNE, J. O.; STEVENSON, J. Food additives and hyperactivity in 3 year old and 8/9 year old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **The Lancet**, 2007.
- MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H. A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 83–96, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>>.
- MUNIER, M.; JUBEAU, S.; WIJAYA, A.; MORANÇAIS, M.; DUMAY, J.; MARCHAL, L.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 150, p. 400–407, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.113>>.
- MUNIER, M.; MORANÇAIS, M.; DUMAY, J.; JAOUEN, P.; FLEURENCE, J. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 992, p. 23–29, 2015a.
- MUNIER, M.; MORANÇAIS, 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, 2015b.
- NASCIMENTO, G.; PRATO, S. Influência da cor e do odor na discriminação do sabor de um produto. **Anais XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos** Gramado, 2016.

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

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, 2006a.

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

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

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

<https://www.researchgate.net/publication/15801952_The_native_forms_of_the_phycobilin_chromophores_of_algal_biliproteins_A_clarification>.

OLIVEIRA, C. H. De; BINOTTI, R. S.; QUAGLIARA, P. C.; REBECHI, M. Substâncias químicas presentes em sucos de frutas em pó comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e imunopatologia**, 2006.

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

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 248–255, 2005.

PEREIRA, A. S.; STRINGHETA, P. C. Considerações sobre a cultura e processamento do açafraão. **Horticultura Brasileira**, v.16, n.2, p.102-105, 1998.

PINHEIRO, M. C. de O.; ABRANTES, S. de M. P. Avaliação da exposição aos corantes artificiais presentes em balas e chicletes por crianças entre 3 e 9 anos estudantes de escolas particulares da Tijuca / Rio de Janeiro, **Revista Analytica**, Artigo 1, 2012.

- PINHEIRO, S.; SCHUMANN, A.; LUCIA, M.; POLÔNIO, T. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Food Science ad Technology**, Campinas, v. 28, n.3, p. 534–539, 2008.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentação e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003.
- PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; COLLA, L. M. Congelamento e Descongelação - Sua Influência sobre os Alimentos. **Vetor**, v. 13, p. 53–66, 2003.
- REED, E.; ROCHA, D. S. Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde*. **Estudos**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 76–85, 2014.
- RODRIGUES, P. da S. Estudo do uso de corantes artificiais em alimentos e estimativa de ingestão de tartrazina pela população brasileira. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, 2015.
- ROSSANO, R.; UNGARO, N.; D'AMBROSIO, A.; LIUZZI, G. M.; RICCIO, P. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 289–293, 2003.
- SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D. An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phyococyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 2, p. 123–129, 2007.
- SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; DE CARVALHO, F. C.; NETO, A. N.; MARQUES, S. A. Market trends for food colours in the food industry. **Agricultura em São Paulo**, v. 39, p. 1–50, 1992.
- SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos**, v. 3, p. 6-24, 2007. Disponível em: <<http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/download/71/70>>.
- 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, n. August, p. 107–116, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.004>>.

SENTHILKUMAR, N.; SURESH, V.; THANGAM, R.; KURINJIMALAR, C.; KAVITHA, G.; MURUGAN, P.; KANNAN, S.; RENGASAMY, R. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 150–160, 2013b.

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

SLOTH, J. K.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 168–175, 2006.

SONANI, R. R. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 100, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v7/i1/100.htm>>.

SONANI, R. R. aghav; SINGH, N. K. umar; AWASTHI, A.; PRASAD, B.; KUMAR, J.; MADAMWAR, D. Phycoerythrin extends life span and health span of *Caenorhabditis elegans*. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 36, n. 5, p. 9717, 2014.

SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006.

SPELLMEIER, J. G.; STÜLP, S. Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fotoquímico. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 6, n.1, 2009.

SU, C. H. U. N. H.; ANG, C. H. I. I. N. G. Y.; HEN, C. H. I. N. G. C.; HAO, P. I. U. C.; U, S. H. I. N. H. Effects of Chlorophyll-Related Compounds on Hydrogen Peroxide Induced DNA Damage within Human Lymphocytes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, p. 2746–2750, 2005.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.011>>.

SUDHAKAR, M. P.; SARASWATHI, M.; NAIR, B. B. SHORT COMMUNICATION

Extraction , purification and application study of R-Phycoerythrin from *Gracilaria corticata* (J . Agardh) J . Agardh var . corticata. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 5, n. December 2014, p. 371–374, 2014.

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

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

SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; ZHAO, M.; FU, X.; WANG, L. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 2, p. 146–154, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2008.09.013>>.

TAN, H.; GAO, S.; ZHUANG, Y.; DONG, Y.; GUAN, W.; ZHANG, K.; XU, J.; CUI, J. R-Phycoerythrin induces SGC-7901 apoptosis by arresting cell cycle at S Phase. **Marine Drugs**, v. 14, n. 9, 2016.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, 2009.

TEIXEIRA, V. L. Marine natural products from seaweeds. **Produtos naturais de algas marinhas bentônicas**, v. 5, n. 3, p. 343–362, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880521818&partnerID=40&md5=b1f3ce7f6f780a41ac346ec82d962603>>.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 1, p. 157–166, 2009.

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

WANG, L.; WANG, S.; FU, X.; SUN, L. Characteristics of an R-phycoerythrin with two ?? subunits prepared from red macroalga *Polysiphonia urceolata*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–

15, 2015.

WARD, N. I. Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. **Jornal of Nutritional & Environmental Medicine**, v. 7, p. 333-342, 1997.

WILSON, K. M.; MORRISON, I. E.; SMITH, P. R.; FERNANDEZ, N.; CHERRY, R. J. Single particle tracking of cell-surface HLA-DR molecules using R-phycoerythrin labeled monoclonal antibodies and fluorescence digital imaging. **J Cell Sci**, v. 109 (Pt 8, p. 2101–2109, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8856506>>.

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 and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1445–1451, 2015a.

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, 2015b.

WÜTHRICH, B; KÄGI, M. K.; STÜCKER, W. Anaphylactic reactions to ingested carmine. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p. 1133–1137, 1997.

YAMAZAKI, H.; AKIEDA, S.; TANAKA, Y.; YOKOI, T.; YAMAGUCHI, T. Effect of food additives (yellow colors) on rabbit platelet function. **Proceedings oh the 22nd Symposiun on Toxicology and Environmental Health**, Japão, 1997. .

YAMAZAKI, H.; ITO, M.; FUJIWARA, M.; YAMAGUCHI, T. Effect of food additives on rabbit platelet function (II), **Proceedings oh the 19th Symposiun on Toxicology and Environmental Health**, Japão, 1994.

ZABOTTI, C.; GENENA, A. K. Avaliação do potencial antioxidante do extrato obtido a partir da beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*) por meio do uso da água como solvente de extração. **Cultivando o Saber**, v.6, p.195-200, 2013.

ZANELLA, W. C. Efeito da temperatura e do pH na estabilidade de corantes naturais utilizados em alimentos, **Trabalho de conclusão do Curso** (Bacharelado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Alfenas (UniFal), Poços de Caldas, MG, 2014. .

ZHANG, F.; LI, J.; ZOU, M.; CHEN, Y.; WANG, Y.; QI, X. Simultaneous detection of

Clavibacter michiganensis subsp. *nebraskensis* and *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* based on microsphere immunoreaction. **Journal of biomolecular screening**, v. 18, n. 4, p. 474–80, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23169888>>.

ZHAO, M.; SUN, L.; SUN, S.; GONG, X.; FU, X.; CHEN, M. The 42.1 and 53.7kDa bands in SDS-PAGE of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 405–411, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.009>>.

ZHAO, M.; SUN, L.; SUN, S.; GONG, X.; FU, X.; CHEN, M. Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, n. 1, p. 58–64, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.004>>.

ZION MARKET RESEARCH. Global Natural Food Color Market expected to reach USD 1.77 Billion by 2021: **Zion Market Research**. Disponível em: <<https://globenewswire.com/news-release/2016/11/28/893080/0/en/Global-Natural-Food-Color-Market-expected-to-reach-USD-1-77-Billion-by-2021-Zion-Market-Research.html>>.

8. ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Julgador nº:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar da pesquisa **Iogurte adicionado de Corante Natural** sob a responsabilidade da pesquisadora **Márjory Lima Holanda Araújo**, a qual pretende desenvolver um corante natural a ser utilizado no iogurte.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da observação visual do iogurte e expressão da sua opinião de acordo com as orientações dos testes sensoriais. Se você aceitar participar, estará contribuindo para desenvolvimento de um novo aditivo.

Se depois de consentir em sua participação o Sr. (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (A) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. A sua identidade será preservada e a divulgação das informações obtidas nos testes só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Av. Mister Hull, 2977, Bloco 907, Alagadiço, pelo telefone (85) 3366-9826.

Consentimento pós-informação:

Eu _____ fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ser remunerado por isso e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

Fortaleza, _____

Assinatura do Participante:

Assinatura do Pesquisadora Responsável:

Assinatura do Profissional que aplicou o TCLE:
--

2. Baseando-se na **cor**, indique sua **intenção de consumo** de acordo com a escala abaixo:

ESCALA	AMOSTRA	VALOR
1 - Certamente não consumiria	_____	_____
2 - Provavelmente não consumiria	_____	_____
3 - Tenho dúvidas se consumiria	_____	_____
4 - Provavelmente consumiria	_____	_____
5 - Certamente consumiria	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

3. Avalie o **QUÃO IDEAL** você acha a **COR** de cada amostra codificada, utilizando a escala abaixo:

ESCALA	AMOSTRA	COR
+4 - Extremamente mais forte que o ideal	_____	_____
+3 - Muito mais forte que o ideal	_____	_____
+2 - Moderadamente mais forte que o ideal	_____	_____
+1 - Ligeiramente mais forte que o ideal	_____	_____
0 - Ideal	_____	_____
-1 - Ligeiramente menos forte que o ideal	_____	_____
-2 - Moderadamente menos forte que o ideal	_____	_____
-3 - Muito menos forte que o ideal	_____	_____
-4 - Extremamente menos forte que o ideal	_____	_____

Anexo 3. Perfil do julgador

Julgador n°:

Sexo: () Feminino () Masculino

Faixa etária: () menor/ igual 18 () 19 – 25 () 26 – 35 () 36 – 45 () 46 – 55 () mais de 56

Estado civil: () Casado () Solteiro () Separado ou Divorciado () Outros

Grau de instrução: () Fundamental () Médio () Superior incompleto
() Superior completo () Pós-graduação () Outros

1. Qual sua frequência de consumo de iogurte de morango?

() Diariamente

() 1 vez na semana

() 2 a 3 vezes na semana

() 4 a 5 vezes na semana

() Quinzenalmente

() 1 vez no mês

2. Quanto você gosta de iogurte de morango?

() Gosto Muitíssimo

() Gosto Muito

() Gosto Moderadamente

() Gosto Ligeiramente

3. Qual a sua marca preferida de iogurte sabor morango?

() Betânia

() Danone

() Itambé

() Nestlé

() Vigor

() Outros: _____

4. O quanto você considera a cor importante para o consumo de iogurte?

() Extremamente importante

() Muito importante

() Importante

() Pouco importante

() Sem importância
