UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE ADITIVOS ALIMENTARES COM PROPRIEDADES BIOATIVAS A PARTIR DA MICROALGA *Porphyridium purpureum*

GUILHERME SANTOS MARTINS

PROFA. DRA. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

DR. BRUNO GALLER KUBELKA
Coorientador

RIO GRANDE - RS
2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE ADITIVOS ALIMENTARES COM PROPRIEDADES BIOATIVAS A PARTIR DA MICROALGA *Porphyridium purpureum*

GUILHERME SANTOS MARTINS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

PROFA. DRA. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

DR. BRUNO GALLER KUBELKA
Coorientador

RIO GRANDE - RS
2026

M386o
Martins, Guilherme Santos
Obtenção de aditivos alimentares com propriedades bioativas a partir da microalga *Porphyridium purpureum*/ Guilherme Santos Martins. -- 2026.
107f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, 2026.

Orientadora: Dra.Vilásia Guimarães Martins
Coorientador: Dr. Bruno Galler Kubelka

1. Engenharia e Ciências de Alimentos. 2. Conservante.3. Antioxidante. 4. Antimicrobianos. 5. Segurança alimentar I. Martins, Vilásia Guimarães. II. Kubelka, Bruno Galler. III. Título.

CDU 664

Catalogação na fonte: Bibliotecária Brenda Sequeira CRB10/1979

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Guilherme Santos Martins, com orientação da Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins e coorientação do Dr. Bruno Galler Kubelka, aprovada em 3 de março de 2026, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

gov.br
Documento assinado digitalmente
VILASIA GUIMARAES MARTINS
Data: 03/03/2026 13:36:31-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG

GOV.BR
Documento assinado digitalmente
ROBERTO BIANCHINI DERNER
Data: 04/03/2026 18:24:43-0300
CPF: ***.081.319-**
Verifique as assinaturas em https://v.ufsc.br

Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner – UFSC

gov.br
Documento assinado digitalmente
ELIANA BADIALE FURLONG
Data: 03/03/2026 14:24:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Adriana, que sempre me apoiou e me incentivou em todos meus voos e objetivos. Obrigado por ser minha base e fazer o possível e o impossível por mim.

À minha irmã Mariana, ao meu pai Orley e aos meus avós, Adelina, José, Gleni e Luiz. Obrigado por todo apoio carinho que vocês sempre me deram durante toda a minha vida.

Ao meu namorado, Kevem. Obrigado por ser meu maior incentivador e companheiro de vida. Obrigado pelas conversas e por todos "5 minutos sem filtro". Obrigado também por toda compreensão mesmo nos momentos que eu queria ficar quietinho. Obrigado por todas partidas de Fortnite. Obrigado por todos "o que a gente vai jantar hoje". Obrigado por ser tu.

À minha mestranda em dupla Gabriela. Obrigado por me aguentar, por me ouvir e por me dar o apoio necessário quando era nítido na minha cara que tudo tinha dado errado naquele dia. Obrigado por todos "quer ir ali passear", "vamos tomar café" e "vem aqui quero te contar um negócio rapidinho" que nos davam 20 minutos de respiro no dia.

Às minhas ICs, carinhosamente apelidadas de as Helenas das microalgas. Obrigado, por todo apoio nos experimentos, pelas milhares de extrações ouvindo o barulho insuportável do ultrassom e pelos ajustes intermináveis de pH.

À minha amiga e também IC Helena Belmonte. Obrigado por toda compreensão e horas de laboratório que a gente trabalhava y trabalhava (a língua e o projeto). Se nem essa dissertação terminou com a nossa amizade mais nada termina.

À Bruna, técnica do LTA, obrigada por toda ajuda quando precisei. Obrigado por todos "Bruna, consegue me ajudar a pensar num negócio aqui rapidinho".

Aos membros da AlgaSul, especialmente a Bruna e a Cynthia, por todo apoio durante o projeto e principalmente durante o cultivo da problemática Porphy.

À minha Orientadora, Prof Vilásia, e ao meu co-orientador, Bruno. Sou imensamente grato por toda paciência e confiança que tiveram em mim durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao LMB, LAMCA e BIFOA pelo apoio às análises necessárias.

Aos membros da banca, pelo aceite ao convite e por contribuírem para o trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

Beware,
the chaos in your heart will never cease, until you
find another way to harness what you seek.
(Lady Gaga)

RESUMO

Aditivos sintéticos, como antioxidantes, conservantes, emulsificantes e corantes são muito utilizados em alimentos, devido ao seu baixo custo, alta disponibilidade e facilidade de uso. No entanto, o uso desses aditivos em alimentos pode levar a reações adversas, como alergias e sintomas gastrointestinais e neurológicos ou serem potencialmente mutagênicos. Com isso, diversos são os esforços no sentido de se encontrar fontes naturais de compostos que atuem como aditivos alimentares que possam substituí-los. Entre os recursos naturais que já estão sendo estudados destacam-se as microalgas, micro-organismos unicelulares que tem rápida multiplicação e produção compacta, e que têm demonstrado grande potencial na aplicação em alimentos, seja *in natura* ou de extratos de seus compostos. A microalga vermelha *Porphyridium purpureum* é capaz de produzir compostos intracelulares valiosos como proteínas solúveis (dentre elas a ficobiliproteina ficoeritrina, um pigmento proteico que atua na fotossíntese), ácidos graxos (dentre eles, os ácidos araquidônico (ARA), docosahexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA)) e polissacarídeos (especialmente os sulfatados). Assim, o uso de seus extratos aquosos e alcoólicos são uma possibilidade interessante na substituição dos aditivos sintéticos. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi obter aditivos alimentares com propriedades bioativas a partir da microalga *Porphyridium purpureum*. Para a obtenção de 3 extratos da biomassa da microalga *P. purpureum* ricos em proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos, foi conduzida extração seriada, assistida por ultrassom (600 W; 30 s; 5 s intervalo; 10 min) onde se utilizou de maneira sequencial água destilada (0,8 g:40 mL m/v), etanol (32 mL), e agitador magnético e banho aquecido (32 mL de água destilada; 80 ºC; 2 h), obtendo cada extrato por centrifugação (4650 ×g; 5 min).Água destilada (pH 4,2; 5,5; 6,8) e tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 5,5) foram utilizados para a obtenção do primeiro extrato, e diferentes álcoois (etanol, metanol e isopropanol) foram avaliados para a segunda etapa de extração. No extrato rico em proteínas, que apresentou uma intensa coloração rosa, foi recuperado 16,6±1,1 $mg_{PE}/g_{biomassa}$ (mg de ficoeritrina por g de biomassa), 87,5±3,9% das proteínas (g proteína recuperada/g de proteína presente na biomassa), conteúdo fenólico de 33,5±3,0 mg $eag/g_{biomassa}$ (mg eq. ácido gálico/g biomassa), e apresentou a melhor atividade antioxidante, verificada nos ensaios de ABTS (432,3±35,9 µmol $Trolox/g_{proteína}$), DPPH (236,9±28,8 µmol $Trolox/g_{proteína}$) e FRAP (1481,4±14,3 µmol Fe $II/g_{proteína}$). No extrato rico em ácidos graxos foram recuperados 8,3±0,4% dos lipídios, com uma pureza de 78,6±2,1%, e apresentou a melhor capacidade emulsificante (EAI = 168,4±11,0 $m^2/g_{lipídio}$) e estabilidade da emulsão (ESI = 73,6±10,4 min). No extrato rico em polissacarídeos foram recuperados 49,3±3,6% dos carboidratos da biomassa e após a liofilização, este apresentou a melhor capacidade de retenção de água (CRA = 13,0±1,2 $g/g_{polissacarídeo}$) e de óleo (CRO = 7,2±0,2 $g/g_{polissacarídeo}$). A extração sequencial assistida por ultrassom utilizada nesse estudo permitiu o fracionamento dos compostos da biomassa, viabilizando a obtenção e direcionamento específico de proteínas, lipídios e polissacarídeos como aditivos alimentares com diferentes aplicações.

Palavras-chave: Conservante. Antioxidante. Antimicrobianos. Segurança alimentar.

ABSTRACT

Synthetic additives such as antioxidants, preservatives, emulsifiers, and colorants are widely used in foods due to their low cost, high availability, and ease of use. However, these additives use in food products may lead to adverse reactions, such as allergies and gastrointestinal or neurological symptoms, and some are potentially mutagenic. That way, significant efforts have been made toward finding natural sources of compounds that can act as substitutes for these artificial food additives. Among natural resources currently being studied, microalgae, single-celled microorganisms with rapid multiplication and compact production, stand out, having demonstrated great food application potential, either in natura or as their compound's extracts. The red microalga *Porphyridium purpureum* is capable of producing valuable intracellular compounds, such as soluble proteins (including the phycobiliprotein phycoerythrin, a protein pigment that acts on photosynthesis), fatty acids (including arachidonic (ARA), docosahexaenoic (DHA), and eicosapentaenoic (EPA) acids), and polysaccharides (especially sulfated ones). Thus, the use of its aqueous and alcoholic extracts represents an interesting possibility for replacing synthetic additives. The aim of this work was to obtain food additives with bioactive properties from the microalga *P. purpureum*. To obtain three extracts from the biomass rich in proteins, fatty acids, and polysaccharides, a serial ultrasound-assisted extraction was conducted (600 W; 30 s; 5 s interval; 10 min), were used sequentially distilled water (0.8 g:40 mL w/v), ethanol (32 mL), and heated bath with a magnetic stirrer (32 mL distilled water; 80°C; 2 h), obtaining each extract through centrifugation (4650 ×g; 5 min). Distilled water (pH 4.2, 5.5, 6.8), and phosphate buffer (0.1 mol/L; pH 5.5) were evaluated for the first extract obtention, while different alcohols (ethanol, methanol, and isopropanol) were evaluated for the second extraction step. The protein-rich extract, with an intense pink color, had a recovery of 16.6 ± 1.1 $mg_{PE}/g_{biomass}$ (mg of phycoerythrin per g of biomass), 87.5±3.9 % of the proteins (g recovered protein per g of biomass protein), a phenolic content of 33.5±3.0 mg $GAE/g_{biomass}$ (mg eq. gallic acid equivalent per g of biomass), and exhibited the highest antioxidant activity, verified by ABTS (432.3±35.9 µmol $TE/g_{protein}$), DPPH (236.9±28.8 µmol $TE/g_{protein}$) and FRAP (1481.4±14;3 µmol Fe $II/g_{protein}$) assays. In the fatty acid-rich extract, 8.3±0.4% of lipids were recovered with a purity of 78.6±2.1% and showed the best emulsifying capacity (EAI = 168.4±11.0 m^2/g_{lipid}) e emulsion stability (ESI = 73.6±10.4 min). In the polysaccharide-rich extract, 49.3±3.6% carbohydrates of the microalgae were recovered and, after freeze-drying, it showed the highest water (WHC = 13.0±1.2 $g/g_{polysaccharide}$) and oil (OHC = 7.2±0.2 $g/g_{polysaccharide}$) holding capacity. The sequential ultrasound-assisted extraction used in this study allowed the biomass compounds fractionation, enabling efficient recovery and specific targeting of proteins, lipids, and polysaccharides as food additives for various applications.

Keyword: Preservative. Antioxidant. Antimicrobial. Food safety.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de extração e purificação de compostos em algas e microalgas 24
Tabela 2 - Composição centesimal da biomassa liofilizada da microalga *P. purpureum* PPL25, em base seca. 45
Tabela 3 - Teores de ficoeritrina (mg/mL) e proteína solúvel (mg/mL) obtidos através de diferentes tratamentos para a microalga PPL24. 48
Tabela 4 - Característica do extrato para diferentes tempos de tratamento com ultrassom 49
Tabela 5 - Características dos extratos aquosos ricos em proteínas 51
Tabela 6 - Análise de cor dos extratos T55 e A55 53
Tabela 7 - Características dos extratos T55 e A55 53
Tabela 8 - Perfil de fenólicos ($\mu g/g_{biomassa}$) 55
Tabela 9 - Características dos extratos liofilizados T55L e A55L 57
Tabela 10 - Análise de cor dos extratos T55L e A55L 58
Tabela 11 - Perfil de fenólicos ($\mu g/g_{liofilizado}$) 59
Tabela 12 - Características do extrato A55 antes e após a filtração 60
Tabela 13 - Características dos extratos EtOH, MetOH e IsoOH, comparado ao Folch 61
Tabela 14 - Teores de Lipídios obtidos na biomassa liofilizada e no resíduo de extração de ficoeritrina 64
Tabela 15 - Características do extrato rico em polissacarídeos (PS)..... 66
Tabela 16 - Características dos polissacarídeos secos..... 68
Tabela 17 - Teor proteico e de carboidratos dos polissacarídeos secos. 69
Tabela 18 - Características do Resíduo (RE). 70
Tabela 19 - Proporções de compostos bioativos dos extratos T55L, A55, T55L e A55L. 71
Tabela 20 - Capacidade Antioxidante dos extratos 72
Tabela 21 - Avaliação do halo de inibição (mm) dos extratos (1 mg/mL). 74
Tabela 22 - Capacidade de retenção de água (CRA) e de óleo (CRO) dos extratos. 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ficobilissoma 19
Figura 2 - Comprimento de onda da luz visível das ficobiliproteínas 19
Figura 3 - Mecanismo da Transferência de Átomo de Hidrogênio. 26
Figura 4 - Metodologia experimental 31
Figura 5 - Metodologia experimental 32
Figura 6 - Metodologia experimental 33
Figura 7 - Extrato obtido no tempo de 10 min para a biomassa PPL24 (a) e PPL25 (b). 49
Figura 8 - Extratos (a) T55 (b) A42 (c) A55 (d) A68 52
Figura 9 - Extratos (a) T55 e (b) A55 53
Figura 10 - Extratos liofilizados (a) T55L e (b) A55L 58
Figura 11 - Filtração do extrato A55 em papel filtro 60
Figura 12 - Extratos EtOH (a), MetOH (b) e IsoOH (c) secos 62
Figura 13 - Lipídios da biomassa descolorida (a; c; e) e íntegra (b; d; f); Extraídos por Folch (A) Secos em estufa (25 ºC) (B); e Ressuspensos em Clorofórmio (C) 64
Figura 14 - Biomassa descolorida, utilizando Etanol 100% e NaOH 1% (1:4; v/v) com sobrenadante rico em clorofila 65
Figura 15 - Extrato aquoso rico em polissacarídeos 66
Figura 16 - Polissacarídeos secos PSImdt, PS12h e PSL. 68
Figura 17 - Agregados de polissacarídeos (PSImdt). 69
Figura 18 - Composição em cada etapa de extração sequencial. 71
Figura 19 - Halo de inibição formado pelo antibiótico Cloridrato de Ciprofloxacino (1 mg/mL) - Controle positivo. (a) *Bacillus cereus* (b) *Escherichia coli.* 74
Figura 20 - Halo de inibição, falso positivo, formado pelos extratos (a) EtOHs e (b) EtOH na *Bacillus cereus*. 75
Figura 21 - Capacidade emulsificante dos extratos. 76
Figura 22 - Emulsão estável após 10 min (a) EtOHS (b) PSL. 77
Figura 23 - (a) T55L após centrifugação (b) T55L após remoção da água livre (c) PSL após remoção da água livre. 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

2. OBJETIVOS 15
2.1. OBJETIVO GERAL 15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15

3. REVISÃO DA LITERATURA 16
3.1. MICROALGAS 16
3.1.1. *Porphyridium purpureum* 16
3.1.1.1. Cultivo 17
3.1.1.2. Ficoeritrina 18
3.1.1.3. Ácidos Graxos 20
3.1.1.4. Polissacarídeos 21
3.1.2. Métodos de extração e purificação 22
3.2. ADITIVOS ALIMENTARES 25
3.2.1. Antioxidantes 26
3.2.2. Corantes 27
3.2.3. Conservadores 28
3.2.4. Emulsificantes 29

4. MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1. BIOMASSA 30
4.2. COMPOSIÇÃO PROXIMAL 34
4.3. EXTRAÇÃO FRACIONADA POR RUPTURA OSMÓTICA 35
4.4. EXTRAÇÃO FRACIONADA ASSISTIDA POR ULTRASSOM 35
4.5. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO RICO EM FICOERITRINA 37
4.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FICOERITRINA 37
4.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS 37
4.8. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS 38
4.9. CONTEÚDO FENÓLICO 38
4.10. PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS 39
4.11. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS E MINERAIS DO EXTRATO AQUOSO RICO EM FICOERITRINA 39
4.12. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS 40
4.13. COR 40
4.14. REMOÇÃO DA CLOROFILA 41
4.15. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA E DE CAROTENOIDES 41
4.16. ATIVIDADES ANTIOXIDANTES 42
4.16.1. DPPH 42
4.16.2. $ABTS^{\cdot+}$ 42
4.16.3. FRAP 43

4.17. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 43
4.18. CAPACIDADE EMULSIFICANTE 43
4.19. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E ÓLEO 44
4.20. ANÁLISE ESTATÍSTICA 44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL 45
5.2. EXTRAÇÃO FRACIONADA 47
5.2.1. Extração de ficoeritrina 47
5.2.1.1. Estudo Preliminar 47
5.2.1.2. Extração pelo tratamento com ultrassom 49
5.2.1.3. Influência do pH 50
5.2.2. Secagem do extrato aquoso rico em ficoeritrina 56
5.2.3. Purificação do extrato rico em ficoeritrina 60
5.3. EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS 61
5.3.1. Extração alcoólica 61
5.3.2. Lipídios Descoloridos 63
5.4. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS 66
5.4.1. Secagem do extrato aquoso rico em polissacarídeos 67
5.5. CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO 70
5.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 71
5.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 73
5.8. CAPACIDADE EMULSIFICANTE 76
5.9. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E ÓLEO 78

6. CONCLUSÃO 80

7. RESÍDUOS GERADOS E DESTINO 81

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 81

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

APÊNDICES 102

1. INTRODUÇÃO

É essencial que os alimentos destinados ao consumo humano permaneçam frescos e seguros, especialmente diante do tempo de transporte que estes são submetidos desde o local de produção até os centros urbanos e locais de consumo (Carocho; Morales; Ferreira, 2015). Estes alimentos também necessitam proporcionar experiência sensorial agradável aos consumidores e apresentar estabilidade, textura homogênea e agradável, e apelo visual atrativo (Cox *et al*., 2021; Sezgin; Ayyildiz, 2017). A indústria alimentícia utiliza de forma ampla os aditivos, como os antioxidantes, corantes, conservantes e emulsificantes para atingir essas demandas, optando pelo uso dos produzidos sinteticamente devido ao baixo custo, facilidade de uso e alta disponibilidade (Amit *et al*., 2017; Pașca; Coroian; Socaci, 2018). No entanto, em razão dos possíveis riscos atrelados a estes insumos sintetizados artificialmente, existe uma busca constante por alternativas oriundas de fontes naturais (Bertsch *et al*., 2021).

Uma das fontes alternativas para estes aditivos são as microalgas, e estudos indicam o potencial do seu uso em alimentos. O enriquecimento com a biomassa íntegra proporciona uma melhora do perfil de ácidos graxos e proteico, além de aumentar a vida útil dos alimentos devido às suas propriedades bioativas, antioxidantes e antimicrobianas (De Oliveira; Bragotto, 2022; Su *et al*., 2023). Os compostos responsáveis por estas propriedades podem ser isolados, permitindo seu uso de forma individualizada. Esse uso direcionado e específico, além de possibilitar a utilização em diferentes tipos de alimentos, traz melhor aproveitamento das suas propriedades bioativas e tecnológicas (Martínez-Ruiz *et al*., 2022; Su *et al*., 2023).

A microalga vermelha *P. purpureum* vem se tornando um foco de interesse, por ser capaz de produzir compostos intracelulares valiosos como a ficoeritrina (pigmento proteico atuante na fotossíntese), ácidos graxos, como o ácido araquidônico (ARA), docosahexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA), e polissacarídeos (especialmente os sulfatados) (Silva-Núñez; Donoso-Quezada; González-Valdez, 2023). Estudos com a ficoeritrina indicam sua capacidade antioxidante e antimicrobiana, além da sua intensa cor vermelha permitir seu uso como corante (Ali *et al*., 2024; García *et al*., 2021; Nowruzi *et al*., 2024).

Os ácidos graxos possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, com destaque para o araquidônico que age inibindo a síntese da adenosina trifosfato (ATP) em bactérias, podendo ser considerado um antibacteriano de amplo espectro (Chamlagain *et al*., 2024; Mackieh *et al*., 2023). Os polissacarídeos sulfatados possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas, emulsificantes e de retenção de água e óleo (Hlima *et al*., 2021; Ismail; Amer, 2021). Essas propriedades permite o uso deles como uma alternativa aos aditivos sintéticos

(Nguyen *et al*., 2024; Silva-Núñez; Donoso-Quezada; González-Valdez, 2023).

Dessa maneira, o presente trabalho tem como objetivo produzir três extratos distintos da microalga *P. purpureum*, ricos em proteínas, ácidos graxos poliinsaturados e polissacarídeos sulfatados, visando direcionar a aplicação deles como aditivos em formulações alimentícias. Para isso, foi utilizada uma extração assistida por ultrassom (600 W; 30 s; 5 s intervalo; 10 min) e, de maneira sequencial, foram utilizados os solventes renováveis, água destilada (0,8 g:40 m/v) e etanol 95% (32 mL), seguido de agitador magnético e banho aquecido (32 mL de água destilada; 80 ºC; 2 h), em que o resíduo sólido obtido por centrifugação (4650 ×g; 5 min) após cada etapa foi utilizado na etapa seguinte. Os extratos obtidos apresentam diferentes aplicações na área de alimentos, na forma de aditivos alimentares com atividades antioxidantes, antimicrobianas e emulsificantes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Extrair frações ricas em proteínas, lipídios e polissacarídeos da microalga *P purpureum,* visando direcionar a aplicação delas como aditivos em alimentos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente a biomassa da microalga *P. purpureum*, cultivada em biorreatores externos de 240 L;
- Definir protocolo para extrações aquosas e etanólicas assistida por ultrassom e aquosa a quente para recuperação de proteínas solúveis, ficoeritrina, compostos fenólicos, ácidos graxos e polissacarídeos da microalga;
- Avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano, capacidade de emulsificação, retenção de óleo e água das frações recuperadas;
- Determinar a cor dos extratos;
- Utilizar técnica de filtração e precipitação para aumentar o grau de pureza da ficoeritrina e de polissacarídeos sulfatados das respectivas frações aquosas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. MICROALGAS

Uma das grandes vantagens do ponto de vista ambiental da utilização das microalgas autotróficas é a sua capacidade de biofixação de dióxido de carbono da atmosfera como fonte de carbono para seu metabolismo. Fato que as tornam uma eficiente alternativa para diminuir os impactos ambientais de suas indústrias regulamentando cadeias de produção conforme as medidas governamentais (Camacho; Macedo; Malcata; 2019).

Existem mais de 50 mil espécies de algas, com destaque para a classe Porphyridiophyceae, de algas vermelhas. Os compostos de interesse da microalga são: ficocianina, peptidoglicano, astaxantina, betacaroteno, ficoeritrina, ácidos graxos poliinsaturados e fucoxantina produzidos em resposta às condições externas em que são submetidas. Em função disto estes compostos possuem bioatividades de interesse para aplicações alimentícias, nutracêuticas, cosméticas e farmacêuticas (Guiry, 2024; Vieira; Pastrana; Fuciños, 2020).

As algas vermelhas pertencem ao filo *Rhodophyta* e possuem mais de 6100 espécies conhecidas. Uma dessas espécies é a *P. purpureum*, uma microalga autótrofa anteriormente conhecida como *Porphyridium cruentum* (Bhattacharya *et al*., 2013). Estudos indicam a segurança do seu uso em produtos cosméticos e para consumo como alimento (Kavitha *et al*., 2016b; Liu *et al*., 2025; Murbach *et al*., 2024).

3.1.1. *Porphyridium purpureum*

Porphyridium purpureum é uma microalga vermelha esférica que possui diâmetro médio entre 6 e 15 μm. Suas paredes celulares possuem polissacarídeos compostos majoritariamente por D-xilose, D- e L lactose, D-glicose, D-ácido glicurônico e um teor variável (1 ~ 14%) de sulfato. Elas podem acumular internamente componentes de interesse como ficobiliproteínas, ácidos graxos poliinsaturados e os próprios polissacarídeos sulfatados (PS). Esses compostos apresentam capacidade antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antitumoral e propriedades reológicas diversas (Hammel, 2024).

Assunção, Varejão e Santos (2017) encontraram na biomassa seca da *P. purpureum* 8,5% de umidade, 18,6% de cinzas, 1,7% de lipídios, 0,9% de fibra, 15,1% de proteína e 63,7% de carboidratos. No entanto, Li *et al*. (2021) encontraram 7,0% de lipídios para a biomassa liofilizada. Isso demonstra a variabilidade da composição dessa microalga. Apesar de não serem

encontrados estudos que demonstrem o valor de mercado da *P. purpureum*, estima-se que o setor das microalgas para fins alimentares alcance 1,298 bilhão de dólares até o ano de 2023 (Schneider *et al*., 2025), o que demonstra o potencial mercadológico que a exploração dos compostos dessa microalga pode viabilizar.

Diversos estudos indicam o potencial do uso dessa microalga. Vieira *et al*. (2021) ao pesquisarem as atividades antioxidantes, antienvelhecimento, antidiabéticas e antiobesidades das microalgas *P. purpureum*, *Chlorella vulgaris*, *Arthorspira platensis* e *Nannochloropsis oculata* encontraram resultados interessantes para todas as microalgas. No entanto, destacaram o notável potencial da primeira, pois além de possuir alta ação antioxidante e alto teor de conteúdo fenólico, demonstrou alta inibição enzimática *in vitro*, o que enfatiza seu grande potencial de uso como ingrediente funcional e tecnológico em alimentos.

Apesar do potencial da biomassa microalgal íntegra, é o uso das frações que têm destaque. Estudos indicam o potencial da ficoeritrina, ácidos graxos, polissacarídeos, proteínas e peptídeos por possuírem propriedades antioxidantes, antimicrobianas (Tsvetanova; Yankov, 2022), emulsificantes e de retenção de água e óleo (Hlima *et al*., 2021). A importância do estudo e valorização dos compostos de maneira separada é reforçada por alguns desafios impostos na exploração em larga escala dessa microalga. Essa dificuldade se deve a pequenas modificações no meio de cultivo, que mesmo não intencionais, podem modificar as concentrações dos compostos produzidos (Kavitha *et al*., 2016a) e tentativas para aumento de rendimento de compostos específicos que resultam na redução do rendimento de biomassa seca. Consequentemente, sua utilização ocorre em pequena escala sem alcançar um significativo cultivo a nível mundial (Li *et al*., 2019).

3.1.1.1. Cultivo

As microalgas possuem rápido crescimento, sendo possível obter compostos de interesse já com 10 dias de cultivo (Tao *et al*., 2019). Sua alta eficiência fotossintética faz que estas sejam fontes interessantes de insumos industriais, especialmente na área de alimentos. Seu cultivo é compacto quando comparado com a agricultura e pecuária, utiliza um volume reduzido de água doce e terra, sem explorar os recursos naturais de forma massiva. Além de não ser necessário o uso de herbicidas e pesticidas (Tan *et al*., 2020). No entanto, mudanças no meio de cultivo da *P. purpureum* causam estresse na microalga que podem modificar sua composição bioquímica e levar ao acúmulo de compostos secundários de interesse. Assim, é necessário entender quais os compostos possuem maior interesse e potencial de uso para que esse cultivo

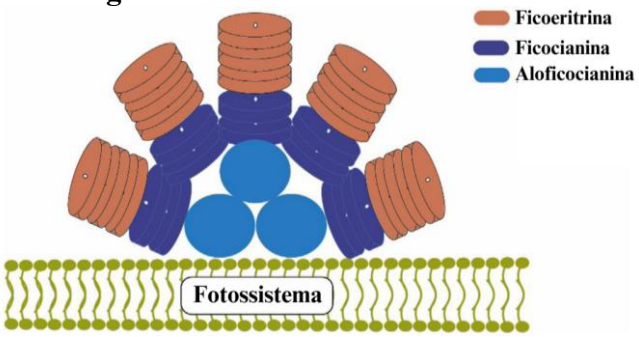
rápido e com poucos impactos ambientais seja melhor aproveitado.

O nitrogênio é um componente essencial para síntese de enzimas, pigmentos fotossintéticos, material genético e demais compostos nitrogenados da microalga, assim, limitar a sua concentração no meio de cultivo pode estimular o acúmulo de lipídios e carboidratos, e diminuir o acúmulo de proteínas (Novoveská *et al*., 2023). Tao *et al*. (2019) ao modificar a concentração de nitrato de potássio (KNO_3) no meio de cultivo da *P. purpureum* obtiveram rendimento significativo de ficoeritrina (0,193 g/L) e de ácidos graxos poliinsaturados (0,072 g/L) ao utilizar 17,6 mM. Nesse mesmo estudo, mudanças no tempo de cultivo também resultaram em oscilações nas concentrações dos compostos. Esse estudo aplicado a *P. purpureum*, aliado aos resultados encontrados em outras espécies (Chowdury; Nahar; Deb, 2020; Coêlho *et al*., 2020; Varshney, *et al*., 2018) demonstram a necessidade de se conhecer quais são as frações de maior interesse e seus potenciais usos, pois dessa forma é possível direcionar a produção de compostos de interesse desde o cultivo. Estudos indicam que os rendimentos de biomassa de microalga seca por litro do meio de cultivo de até 1,94 g/L da microalga *P. purpureum* podem ser alcançados dependendo das condições de cultivo (Schoeters, Floris *et al*., 2023). Apesar do rendimento menor que o encontrado na *Spirulina platensis* (2,70 até 4,50 g/L) (Moraes *et al*., 2013; Saxena *et al*., 2022), seus compostos possuem grande valor agregado.

3.1.1.2. Ficoeritrina

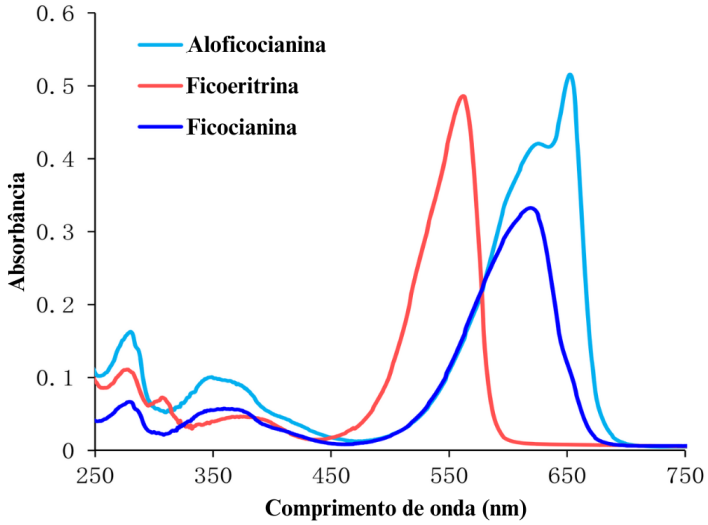
Ficoeritrina é uma proteína vermelha presente nas algas vermelhas e nas *cryptophytas*, de massa molar de 225 kDa. Este pigmento tem fluorescência de emissão máxima próximo a 578 nm, com pico de absorção da luz visível entre 540 e 570 nm (Hamouda; El-Naggar, 2021). A ficoeritrina está complexada juntamente às demais ficobiliproteínas, ficocianina e a aloficocianina, formando os ficobilissomas (Figura 1) que são complexos de captação de luz presentes no tilacoide dentro dos cloroplastos. Ela é a responsável por coletar energia luminosa e transferir para os centros de reação dos fotossistemas da fotossíntese (Nguyen *et al*., 2024). Por serem pigmentos que absorvem radiação eletromagnética em comprimentos de onda da luz visível que se sobrepõem na faixa entre 450 e 650 nm (Figura 2), para determinações utilizando técnicas espectrofotométricas é necessário quantificar o teor de ficocianina e aloficocianina para então estimar o teor de ficoeritrina (de Marsac; Houmard, 1988).

Figura 1 - Estrutura do ficobilissoma



Fonte: Wang *et al*. (2023) adaptado.

Figura 2 - Comprimento de onda da luz visível das ficobiliproteínas



Fonte: Singh *et al*. (2015) adaptado.

A ficoeritrina, quando purificada a nível analítico, possui um valor de mercado que pode chegar a 250 dólares/mg (Sigma-aldrich Cas 11016-17-4). Isso se deve à complexidade envolvida para purificação e remoção da aloficocianina e ficocianina presentes no complexo de ficobiliproteínas. No entanto, para o aproveitamento de suas bioatividades e uso em alimentos, não é necessária uma alta pureza e seu custo pode ser reduzido ao utilizar estratégias simplificadas de extração e purificação (Tan *et al*., 2022).

Há estudos que indicam que a ficoeritrina pode ser extraída de diversas microalgas, com diferentes rendimentos. Foi demonstrado rendimento de 4,2% de ficoeritrina para a *Pseudanabaena sp*., de 1,2% para a *Anabaena* e de 0,8% para a *Neopyropia yezoensis*. No entanto, o rendimento de ficoeritrina da *P. purpureum* pode chegar a 9,2% em relação a massa (m/m), segundo alguns estudos (Mishra; Shrivastav; Mishra, 2011; Khan *et al*., 2019; Nath *et al*., 2021, Zhang *et al*., 2012; Li C. *et al*., 2022).

Ali *et al*. (2024) produziram filmes inteligentes com ficoeritrina extraída por agitação (300 rpm; 4 h; 23 ºC) e purificada em membrana de polietersulfona (20 μm) para verificar frescor de pescados. Os filmes demonstraram ser sensíveis a mudança de pH e crescimento microbiológico de *Salmonella*, mudando sua coloração. García *et al*. (2021) testaram ficoeritrina extraída de *Porphyridium sp.* por choque osmótico em tampão fosfato (0,1 M; pH 5,5) como corante vermelho em alimentos lácteos. Neste estudo, foi destacada a estabilidade de cor para faixas de pH que variam entre 6 e 9 e que pequenas quantidades já eram suficientes para atingir coloração próxima ao de derivados lácteos disponíveis comercialmente.

Nowruzi *et al*. (2024) utilizaram as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da ficoeritrina, extraída da cianobactéria *Nostoc sp*. por ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugação (5000 rpm; 10 min) e diálise (membrana de 0,45 μm) para filés de truta resfriados que por até 14 dias e não sofreram degradação significativa, limitando também o crescimento de coliformes, *Staphylococcus spp.* e *Salmonella spp*. Estes estudos demonstram o potencial antioxidante, antimicrobiano e colorante da ficoeretrina, que poderia ser utilizada em alimentos em substituição a aditivos antioxidantes, conservantes e corantes sintéticos.

3.1.1.3. Ácidos Graxos

Os lipídios são um grupo de compostos solúveis em solventes orgânicos quimicamente diversos. Estes podem ser polares, possuindo uma parte hidrofílica ligada a uma parte hidrofóbica, ou apolares, possuindo somente a parte hidrofóbica. O principal componente dos lipídios são os ácidos graxos, que é um composto que contém uma cauda de cadeia alifática hidrofóbica e uma cabeça de ácido carboxílico (Damodaran; Parkin, 2018). Estudos indicam que a *P. purpureum* possui em sua composição de forma majoritária ácido araquidônico (ARA) (2,7 a 27,6 % do total de ácidos graxos), ácido eicosapentaenoico (EPA) (4,6 a 29,9%) e ácido docosahexaenoico (DHA) (5,5 a 26,8%) (Durmaz *et al*., 2007; Kavitha *et al*., 2016a; Kim *et al*., 2021). Nota-se a variabilidade do perfil de ácidos graxos em razão de mudanças nas condições de cultivo (temperatura, salinidade (NaCl e $NaNO_3$, g/L) e irradiância) o que demonstra a necessidade da caracterização dos lipídios obtidos das microalgas.

Um dos ácidos graxos de destaque na *P. purpureum* é o ácido araquidônico (ARA), de grande importância para a saúde e bem-estar. Markworth *et al*. (2018) indicaram que uma maior ingestão de ARA, que pode vir de fontes naturais ou em alimentos enriquecidos, é benéfica à saúde, principalmente para regeneração muscular, aumento de massa magra e força muscular,

sem efeitos negativos no nível de inflamação basal. Outros ácidos graxos majoritários na composição são o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA). Ambos são ácidos graxos que possuem insaturação no 3º carbono, sendo conhecidos também como ômega-3, e o consumo deste pela população em geral ajuda a diminuir e prevenir os riscos cardiovasculares (Swanson; Block; Mousa, 2012; Watanabe; Tatsuno, 2021).

Os ácidos graxos podem ser utilizados de maneira segura como aditivos alimentares (EFSA, 2017), possuindo atividades antioxidantes e antimicrobianas. Chamlagain *et al*. (2024) utilizando ácido araquidônico (50 mg/mL) encontraram uma forte inibição de crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) da bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*, além de limitar consideravelmente sua produção de adenosina trifosfato (ATP) (Mackieh *et al*., 2023). Dessa maneira, destaca-se a importância e potencial dos ácidos graxos de origem microalgal, especialmente o ARA, como conservante.

Na *P. purpureum*, a extração dos lipídios remove juntamente a clorofila (Li *et al*., 2021), o que limita a utilização dessa fração em formulações alimentares, visto que um dos grandes desafios para a utilização da maioria das microalgas em alimentos é a sua coloração verde que diminui a aceitação dos consumidores (Olsen; Olsen; Jensen, 2024). Assim, algumas estratégias podem ser adotadas para remoção da clorofila e clarificação dos lipídios. Li *et al*. (2016) em um estudo com *Scenedesmus sp*. compararam 4 métodos para remoção do pigmento em lipídios e 7 métodos para remoção do pigmento na biomassa, obtendo o melhor resultado de lipídio clarificado ao utilizar uma mistura de Etanol 100% + NaOH 1% (1:4; 70 ºC; 1 h).

3.1.1.4. Polissacarídeos

Os carboidratos são abundantes, amplamente disponíveis e de baixo custo. Estes são encontrados em alimentos, de maneira natural ou adicionados, e possuem diversas aplicações que podem ser melhoradas ou modificadas para o uso comercial (Damodaran; Parkin, 2018).

A parede celular das algas possui em sua estrutura polissacarídeos constituídos principalmente de celulose e hemicelulose. Com o objetivo de auxiliar as algas a resistir ao alto teor salino do mar, há a presença de grupos sulfatos nestes polissacarídeos que modificam a sua estrutura polimérica se tornando assim polissacarídeos sulfatados que possuem bioatividades e aplicações comerciais (Muthukumar; Chidambaram; Sukumaran, 2021). Estes polissacarídeos possuem potencial de inibir a proliferação viral e bacteriana, por competir pelo sítio ativo do ribossomo e impedindo que o RNA mensageiro seja lido, não permitindo assim a síntese proteica (Liyanage, *et al*., 2023), possuindo dessa maneira potencial de uso em alimentos como

conservante. Estes polissacarídeos produzidos pela *P. purpureum* são heteropolímeros similares a carragenana (Vos *et al*., 2008), um tipo de polissacarídeo sulfatado composto de galactanas e de uso comum na indústria de alimentos, principalmente em derivados cárneos devido às suas propriedades de formação de gel e capacidade de retenção de água e óleo, e que pode ser obtida de outras algas vermelhas por extração alcalina (Damodaran; Parkin, 2018).

Hlima *et al*. (2021) obtiveram polissacarídeos sulfatados oriundos do meio de cultivo da *P. purpureum* por centrifugação (10000 ×g; 30 min; 4 ºC), precipitação com etanol absoluto e diálise (12 kDa MWCO) e utilizaram as propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos polissacarídeos para prolongar o tempo de vida útil de carne moída bovina. Ismail e Amer (2021) obtiveram polissacarídeos sulfatados de parede das algas, *Corallina officinalis* e *Pterocladia capillacea,* por agitação e extração sequencial com solventes (etanol, HCl e Na_2CO_3) e ultrafiltração (100 kDa MWCO). Os polissacarídeos apresentaram propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias.

3.1.2. Métodos de extração e purificação

Para a extração de compostos de interesse da *P. purpureum* é necessário o rompimento da espessa parede de polissacarídeos que a envolve, sendo possível utilizar métodos de agitação mecânica, ultrassom, micro-ondas, hidrólise enzimática e ciclos de congelamento e descongelamento. A purificação também pode envolver tecnologias de filtração, ultrafiltração, adsorção, precipitação, entre outras estratégias a depender do resultado e pureza desejada (Li *et al*., 2021; Martínez *et al*., 2019; Tran *et al*., 2019; Yin *et al*., 2022).

Os métodos apresentados na Tabela 1 destacam o grande interesse na ficoeritrina, em detrimento dos outros compostos presentes e que apresentam bioatividades e propriedades tecnológicas, como os ácidos graxos e polissacarídeos. Outro ponto de destaque é que, apesar de métodos inovadores como o campo elétrico pulsado apresentarem alto rendimento, são métodos que devido ao alto custo e complexidade envolvidos, aumentam o custo de obtenção dessa fração e diminuem seu potencial uso em alimentos (Alkanan, *et al*., 2024). A extração seriada desenvolvida por Li *et al*. (2021), demonstrou o potencial de obtenção de diferentes compostos da microalga, utilizando solventes seguros e de baixo custo. No entanto, o tempo total de extração (14 h), tornou esse método inviável para exploração comercial dos compostos.

A utilização de técnicas como o ultrassom (Yin *et al*., 2022; Mittal; Sharma; Raghavarao, 2022), poderia facilitar a quebra da parede celular da microalga e obtenção dos compostos de interesse. No entanto, a cavitação ultrassônica, fenômeno caracterizado pela

liberação de energia devido a formação e rápido colapso de bolhas de gás (Shen *et al*., 2023), pode levar à degradação de corantes, moléculas orgânicas (Song *et al*., 2024) e mudanças do pH (Vikulin; Vikulina, 2020). Além disso, o alto grau de disrupção celular causado pelo método e baixa seletividade dos solventes utilizados pode levar a diminuição da pureza dos compostos de interesse (Shen *et al*., 2023).

Dessa maneira, são necessários estudos que verifiquem o impacto do tempo de sonificação, pH e o uso de diferentes solventes em extrações da *P. purpureum* assistidas por ultrassom, para que se compreenda os impactos de cada variável na pureza e característica dos extratos obtidos. Além disso, os compostos fenólicos presentes na *P. purpureum* apresentam solubilidade em diferentes solventes, além de provável atividade antioxidante (Goiris *et al*., 2014). Por essa razão, é necessário compreender e quantificar em qual fração de extração esses compostos estão presentes. Essa análise garante que as bioatividades encontradas não sejam incorretamente atribuídas às proteínas, lipídios e polissacarídeos.

Chen *et al*. (2024) compararam a extração por água quente e assistida por micro-ondas para extração de polissacarídeos presentes na parede celular da *P. purpureum*. Ao testar diferentes temperaturas (50~90 ºC), tempos (15~75 min) e proporção de biomassa e água (1:20~1:100 g/mL), no extrato obtido por centrifugação foram obtidos 22,6% da biomassa na forma de polissacarídeos na extração utilizando água quente a 80 ºC. Com extração assistida por micro-ondas, o rendimento foi de 25,5%. A combinação de técnicas de extração, como a seriada utilizando água e etanol, aliada a quebra da parede celular promovida pelo ultrassom, demonstra potencial para melhorar o rendimento da extração dos compostos de interesse da microalga.

Tabela 1 - Métodos de extração e purificação de compostos em algas e microalgas

Objetivo	Alga	Extração	Purificação	Resultados	Referência
Extração seriada de três compostos de interesse (Ficoeritrina, ácidos graxos e polissacarídeos)	*P. purpureum*	Agitação mecânica, utilizando água destilada (4º C, 6 h), etanol 95% (25 ºC, 6 h) e água destilada (80 ºC, 2 h)	Ficoeritrina: Sem purificação Ácidos graxos: remoção do solvente em rotoevaporador Polissacarídeos: precipitação com ácido tricloroacético	Ficoeritrina apresentou rendimento de 63,3%, e boa atividade antioxidante. Os ácidos graxos apresentaram lipídios de membrana. O uso de água como solvente apresentou bom rendimento (75,2%) na extração dos polissacarídeos e a não utilização de soluções ácidas ou alcalinas apresentou menor danos à sua estrutura.	Li *et al*., 2021
Extração de ficoeritrina	*P. purpureum*	Campo elétrico pulsado (2–10 kV/cm; 30–150 µs), em tampão citrato-fosfato (pH 7; 1 mS/cm)	-	O campo elétrico induziu a um processo de autólise que liberou o conteúdo de ficoeritrina ao longo de 24 h após o tratamento, com rendimento próximo a 100%, superior ao de métodos mecânicos.	Martínez *et al*., 2019
Extração de ficoeritrina	*P. purpureum*	Alta pressão hidrostática (50-500 MPa; 20 ºC, 5 min) em tampão Tris HCl (0,5 mol/L; pH 7)	-	O uso de alta pressão além de não ter melhor rendimento que outros métodos mecânicos, prejudicou a cor e fluorescência da ficoeritrina.	Tran *et al*., 2019
Extração de ficoeritrina	*P. purpureum*	Foram comparados os métodos de congelamento e descongelamento (3 ciclos; -20 ºC/25 ºC), moagem criogênica e banho ultrassônico (intervalos de 60 s; 4 min). Todos em água ultrapura	-	Todos os métodos apresentaram bom rendimento (82, 91 e 83%, respectivamente).	Yin *et al*., 2022
Extração de Ficoeritrina	*Gelidium pusillum*	Tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 6,8), maceração e ultrassom	Uso de adsorventes diversos	Aumento da concentração de ficoeritrina ao remover contaminantes e interferentes	Mittal; Sharma; Raghavarao, 2022

3.2. ADITIVOS ALIMENTARES

A nível mundial, os riscos atrelados à dieta alimentar são responsáveis por 22% das mortes em adultos, além disso, doenças relacionadas ao consumo de alimentos não seguros podem causar enfermidades em 600 milhões de pessoas por ano, especialmente em crianças e em consumidores em vulnerabilidade social, levando a um impacto econômico de 110 bilhões de dólares/ano (Nordhagen *et al*, 2022). Dessa forma, há a necessidade de se garantir que os alimentos não só cheguem à mesa da população, mas que sejam nutritivos, seguros e não causem prejuízos à saúde.

Os aditivos alimentares são amplamente utilizados na indústria alimentícia, sendo um dos métodos de conservação de alimentos preferencialmente utilizado devido ao seu baixo custo, alta disponibilidade, facilidade de uso e por garantirem um alimento mais seguro independente da ocorrência de falhas em outras barreiras como embalagem, temperatura e pH (Amit *et al*., 2017, Pașca; Coroian; Socaci, 2018). Outro uso de aditivos em alimentos é para torná-los sensorialmente atrativos à população, garantindo a sua estabilidade (sem separação dos seus compostos), proporcionando textura agradável e apelo visual atrativo (Cox *et al*., 2021; Sezgin; Ayyildiz, 2017). Estima-se que a população em geral consuma entre 3,6 e 4,5 Kg de aditivos anualmente, sendo que estes valores podem ser significativamente mais altos (Elshreif *et al*., 2023). Assim, há a necessidade de refletir o seu consumo e entender as consequências que ele pode ter na saúde da população e na qualidade dos alimentos em que estão inseridos.

A *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) (2019) define em seu *Codex Alimentarius* que aditivos alimentares são qualquer substância que usualmente não é utilizada como alimento, ou que é adicionada em um alimento, mas que normalmente não é empregada como ingrediente neste. Alguns autores (Ghany; Abdel, 2015) se referem aos aditivos como qualquer composto ou traço desse que possa melhorar o sabor, aparência ou qualquer outra característica de interesse ao consumidor, ou ainda contribuir para a segurança do alimento. A legislação brasileira (Brasil, 2023) une ambas as definições e será a utilizada por este texto para se referir a aditivos alimentares: “Todo 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”.

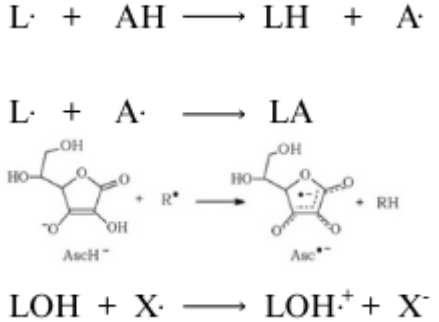
É a utilização de aditivos de baixo custo, abundantes e de fácil uso que melhora a acessibilidade da população em geral a alimentos seguros e sensorialmente agradáveis,

especialmente populações socialmente vulneráveis e que não possuem condições financeiras para consumir os produtos intitulados como *clean label*, que exigem técnicas de processamento mais específicas e de alto custo (Nordhagen *et al*, 2022). No entanto, mesmo entre esses consumidores, há uma crescente preocupação em relação aos aditivos artificiais. Assim, há a necessidade de se encontrar alternativas que sejam igualmente seguras, eficientes e de baixo custo (Lourenço; Moldão-Martins; Alves, 2019).

3.2.1. Antioxidantes

A IN Nº 211 define os antioxidantes como os aditivos capazes de retardar o aparecimento de alterações oxidativas em alimentos (BRASIL, 2023). A oxidação é um processo químico que está envolvido na remoção de um elétron de um átomo ou um grupo de átomos, numa reação que pode ou não envolver adição de uma molécula de oxigênio ou remoção de hidrogênio (Ma, 2023). Os antioxidantes são um dos compostos capazes de diminuir ou retardar esses efeitos negativos das espécies reativas de oxigênio, e são uma classe de compostos que estão associados a um grande número de efeitos benéficos à saúde humana (PRUTEANU *et al*, 2023). A ação antioxidante é baseada em uma reação de oxidação-redução e um dos mecanismos dessa ação é a Transferência de Átomo de Hidrogênio (Figura 3). A reação de neutralização de um oxidante é atribuída aos compostos fenólicos, ácidos graxos, polissacarídeos e complexos proteicos, que ocorre através desse mecanismo. Devido a sua forma de ação, previne a oxidação lipídica e proteica das matrizes alimentares, aumentando seu tempo de vida útil ao minimizar a formação de compostos indesejados prejudiciais à saúde ou que possuam perfis sensoriais desagradáveis (Lu *et al*., 2010; Geng; Liu; Zhang, 2023; Sanjay; Shukla, 2021).

Figura 3 - Mecanismo da Transferência de Átomo de Hidrogênio.



Fonte: SANJAY; SHUKLA, 2021. Adaptado. L• e LOH (radicais livres), AH, A•, X• e X^- (espécies antioxidantes), LH, LA e $LOH^{\bullet+}$ (radical livre neutralizado).

No entanto, o uso de antioxidantes artificiais pode trazer malefícios à saúde. Butil

hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT), possuem potencial carcinogênico (Inetianbor, *et al*., 2015) e testes em ratos induziram a formação de tumores no pulmão e de mama (Witschi, 1981; Rogers *et al*., 1986). Os galatos de propila aumentam o risco do desenvolvimento de metemoglobinemia (Garrido; Garrido; Borges, 2014). O ácido fosfórico pode capturar o cálcio e diminuir sua absorção (Takeda *et al*., 2014). Devido aos seus possíveis malefícios à saúde, já existem alternativas naturais aos antioxidantes aplicadas em alimentos, e outras estão em estudo (López-Pedrouso; Lorenzo; Franco, 2022).

O poder antioxidante de fontes naturais pode ser proveniente de compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides (Lourenço; Moldão-Martins; Alves, 2019), polissacarídeos (Fernandes; Coimbra, 2023), ácidos graxos (Aiello *et al*., 2024), proteínas e peptídeos (Zhu *et al*., 2011). A extração pode ocorrer por métodos e solventes distintos. Kaur *et al*. (2021) comparou o uso de água, metanol, etanol, metanol acidificado (HCl-Metanol; 1:99; v/v), benzeno e acetona sob agitação para produção de extratos antioxidantes de resíduos de centeio (*Secale cereale*), e obteve os melhores resultados com água.

Silva *et al*. (2021) utilizaram ultrassom para quebrar a parede celular da microalga *Scenedesmus obliquus* e hexano para extrair ácidos graxos com propriedades antioxidantes. Yuan e Macquarrie (2015) compararam micro-ondas e aquecimento tradicional em chapa aquecida para extrair polissacarídeos sulfatados da microalga *Ascophyllum nodosum*, e obtiveram a melhor atividade antioxidante para a extração assistida por ultrassom a 90 ºC e aquecimento tradicional.

Scaglioni *et al*. (2018) analisaram o potencial antioxidante (ABTS e DPPH) e de inibição da atividade da amilase, enzima chave no processo e obtenção de energia dos fungos, dos compostos fenólicos obtidos da cianobactéria *Spirulina sp.* e da microalga *Nannochloropsis sp.* obtidos por metanol, etanol e hexano. Neste estudo, foi destacada a alta capacidade de inibição oxidativa e antimicrobiana dos compostos fenólicos obtidos de ambas as espécies. Como já mencionado, o potencial antioxidante da ficoeritrina, extraída da cianobactéria *Nostoc sp*., também foi verificado por Nowruzi *et al*. (2024), e dos exopolissacarídeos, da *P. purpureum*, por Hlima *et al*. (2021).

3.2.2. Corantes

A IN Nº 211 define corantes como os aditivos capazes de conferir, intensificar ou restaurar a cor de um alimento (Brasil, 2023). A cor é um dos primeiros e mais significante fator a afetar a escolha dos consumidores e desejo por certos tipos de alimentos. Devido ao seu

apelo visual atrativo, há registros do uso de corantes naturais em alimentos desde 2600 A.C. No entanto, devido à sua instabilidade frente a variações de calor, luz, pH e custo elevado, a indústria de alimentos atualmente tende a preferir os corantes artificiais (Sezgin; Ayyildiz, 2017).

Alguns dos corantes artificiais utilizados hoje são a tartrazina, de cor amarela e muito associada ao desenvolvimento de alergias e intolerâncias alimentares, além de evidencias de sua neurotoxicidade em ratos (Silva; Reboredo; Lidon, 2022; Elhkim, *et al*., 2007). O amaranto, de cor vermelha, está associado ao desenvolvimento de reações alérgicas e asma e em ratos levou ao desenvolvimento de câncer, deformações fetais e esterilidade (Clode, S. A. *et al*., 1987; EFSA, 2010). O vermelho allura Ac, muito utilizado em doces, também pode levar ao desenvolvimento de alergias, especialmente em crianças, e em ratos promove o desenvolvimento de inflamações intestinais (Kwon *et al*., 2022; Silva; Reboredo; Lidon, 2022). Há uma forte correlação entre o consumo de corantes artificiais e desenvolvimento de alergias, especialmente em crianças.

Alternativas naturais também são utilizadas pela indústria. O corante carmim é extraído do inseto cochonilha e utilizado em alimentos como derivados cárneos e lácteos, doces e bebidas. E, apesar de raramente levar ao desenvolvimento de alergias, é relativamente atóxico. No entanto, por ser de origem animal, não é aceito por vegetarianos e veganos (Avallone *et al*., 2022; EFSA, 2015). Existem outras alternativas naturais em estudo para o uso de corantes. Andriamanantena e*t al*. (2021) utilizaram etanol (70% v/v; 65 ºC; 3 h) para extrair de plantas nativas de madagascar um corante vermelho estável a variações de pH, temperaturas e que também possui propriedades antioxidantes. Como já mencionado, García *et al*. (2021) destacou o potencial uso da ficoeritrina como corante alimentício.

3.2.3. Conservadores

A IN Nº 211 define conservadores como os aditivos capazes de impedir ou retardar a alteração provocada por enzimas ou micro-organismos em alimentos (Brasil, 2023). Estes podem inativar micro-organismos por sua ação antimicrobiana, seu mecanismo de ação pode ocorrer pela quebra da parede ou membrana celular, ataque a organelas ou enzimas internas ou não permitindo a formação de biofilmes (Li X. *et al*., 2022). Como exemplo de um dos mecanismos de ação podemos citar o propionato de cálcio, um tipo de conservador utilizado, que se converte em proprionil-CoA, inibindo o correto funcionamento de enzimas dependente da Coenzima A (Kagliwal *et al*, 2014). Devido ao mecanismo de ação diversificado dos

conservadores, estes necessitam ser individualmente testados para cada micro-organismo.

Mesmo sendo considerado o método mais eficiente para conservação a longo prazo de alimentos, diversos estudos indicam que seu uso prolongado em certos níveis pode ser prejudicial à saúde e potencialmente mutagênico. Os conservantes são aplicáveis a uma gama de produtos alimentares, desde pães, bolos, bebidas prontas, iogurtes, carnes e derivados, leites e derivados, molhos e alternativos cárneos. Com isso, há potencial de acumular no organismo devido às diversas fontes que estão inseridas, potencializando possíveis prejuízos à saúde humana (Elsheif *et al*., 2023). O ácido araquidônico, presente na *P. purpureum* (Silva-Núñez; Donoso-Quezada; González-Valdez, 2023), é capaz de inibir o crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) da bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*, além de limitar consideravelmente sua produção de adenosina trifosfato (ATP) (Chamlagain *et al*., 2024).

Como já mencionado, o potencial conservante da ficoeritrina, extraída da cianobactéria *Nostoc sp*., também foi verificado por Nowruzi *et al*. (2024), o dos exopolissacarídeos, da *P. purpureum*, por Hlima *et al*. (2021) e o dos compostos fenólicos, da cianobactéria *Spirulina sp.* e da microalga *Nannochloropsis sp*., por Scaglioni *et al*. (2018). Esses estudos apontam o potencial uso das microalgas para uso em alimentos em substituição aos conservantes sintéticos.

3.2.4. Emulsificantes

A IN Nº 211 define emulsificantes como os aditivos capazes de formação ou manutenção de uma mistura uniforme em fases imiscíveis em alimentos (Brasil, 2023). As emulsões presentes em alimentos podem ser caracterizadas por 4 tipos diferentes de emulsões: óleo em água (o/w), água em óleo (w/o) e 2 tipos de emulsões multicamadas, como a óleo em água em óleo (o/w/o) e a água em óleo em água (o/w/o). No entanto, por possuírem densidades e polaridades diferentes, os componentes das emulsões tendem a se separar podendo formar crema, sedimentar, flocular, aglomerar ou formar bicamadas. E, para a sua estabilização, há a necessidade de se utilizar compostos que possuam estrutura hidrofílica (chamada de cabeça) e hidrofóbica (cauda) que possam interagir com ambas as fases e diminuir a tensão interfacial entre as fases permitindo que não se separem (Cox *et al*., 2021). Emulsificantes como fosfato tripotássico, citrato sódico e DATEM (ésteres de ácido tartárico mono e diacetil de mono e diglicerídeos), apesar de comumente utilizados em alimentos, demonstraram potencial correlação com o desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2 em adultos (Salame *et al*., 2024).

É possível a obtenção e utilização de emulsificantes a partir de fontes naturais, sendo

possível a utilização de proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos. Guo *et al*. (20214) a partir da *Arthospira platensis* e *Spirulina platensis*, em uma extração assistida por ultrassom (300 W; 2 s; 1 s de intervalo; 10 min) em tampão fosfato (0,01 mol/L; pH 7), obteve isolados proteicos com potencial emulsificante, especialmente estáveis em pH ácidos (pH > 8). Sägesser *et al*. (2024) utilizou o potencial emulsificante da biomassa liofilizada de *Auxenochlorella protothecoides*, para obter análogos cárneos extrusados veganos a base de proteína de soja e ervilha. Youssouf *et al*. (2017) para obter de algas, alginato e carragena, polissacarídeos com alta capacidade emulsificante, utilizaram calor, ultrassom (150 W) e diferentes pHs (7~11) seguido de precipitação com etanol e lavagem em água gelada (4 ºC), e demonstraram maior rendimento quando comparado com aquecimento (90 ºC) sob agitação e pH > 10.

Todos os aditivos sintéticos citados no texto têm uso autorizado pela IN 211 no Brasil nas mais diversas matrizes alimentares, apesar de alguns disporem de limites máximos de utilização que têm de ser respeitados (Brasil, 2023). No entanto, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar já identificou em estudos (EFSA, 2010; EFSA, 2011; EFSA, 2014; EFSA, 2017) que os aditivos mesmo quando limitados à concentração máxima permitida por órgãos regulatórios, podem acumular no organismo por estarem inseridos em matrizes alimentares diversas e extrapolar a Ingestão Diária Aceitável, potencializando seus possíveis efeitos adversos, comprovando a necessidade de se explorar alternativas naturais para estes aditivos antioxidantes, conservantes, corantes e emulsificantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Um esquema da metodologia experimental empregada neste trabalho está ilustrado nas Figuras 4, 5 e 6, que contém, respectivamente, o cultivo e coleta da biomassa da *P. purpureum* juntamente com a extração proteica, a extração de lipídios e a extração de polissacarídeos.

4.1. BIOMASSA

A biomassa da microalga *P. purpureum* foi cedida pela empresa AlgaSul Biotecnologia de Microalgas. A microalga foi produzida em biorreatores externos de 240 L, em meio f/2, água marinha artificial com salinidade de 20 g/L, fotoperíodo de luz natural de 12 h. A microalga foi coletada e em seguida centrifugada (4000 ×g; 15 min), e a biomassa obtida foi homogeneizada, liofilizada (-54 ºC; 50 µHg; 48h) e armazenada a -18 ºC até a sua utilização nas análises (código único PPL25).

Figura 4 - Metodologia experimental

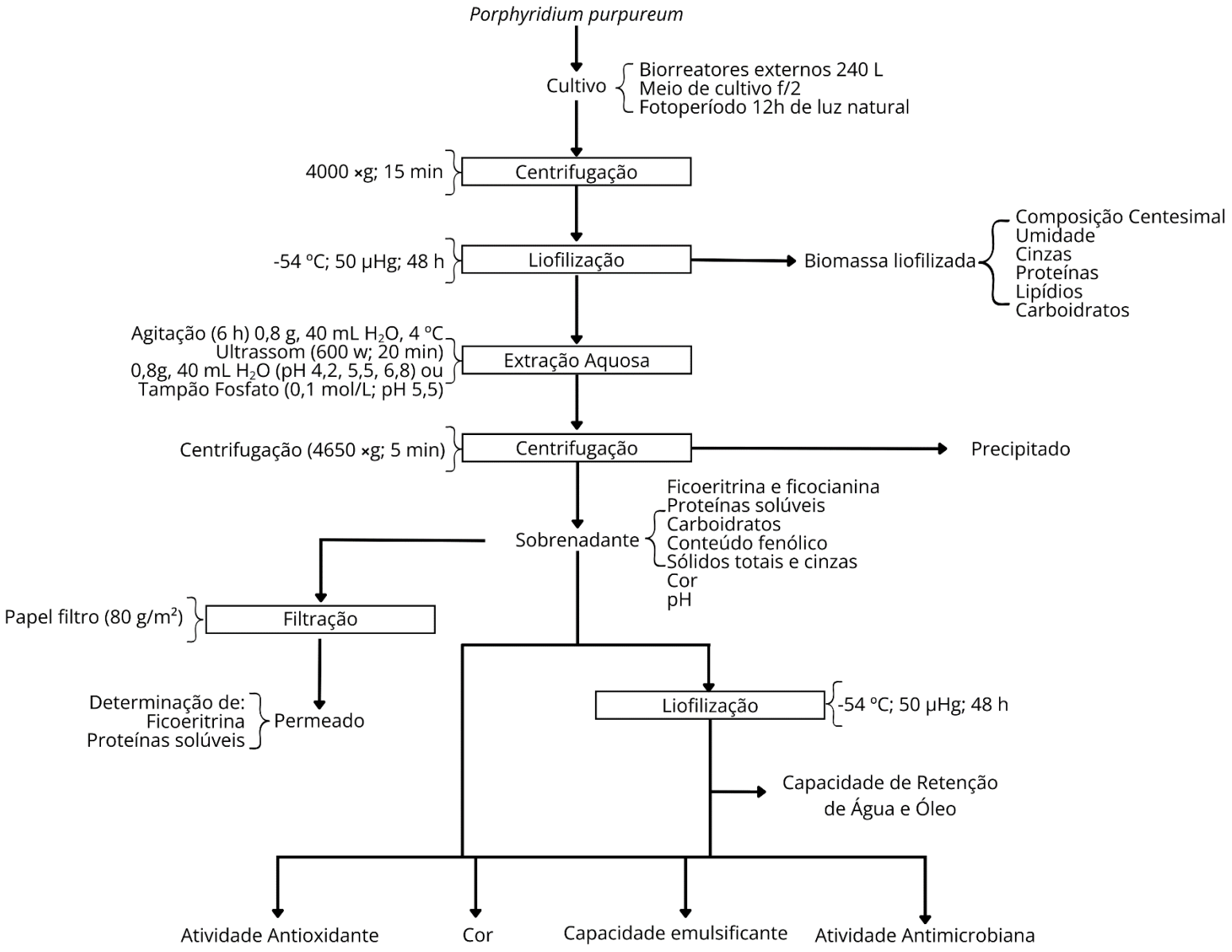


Figura 5 - Metodologia experimental

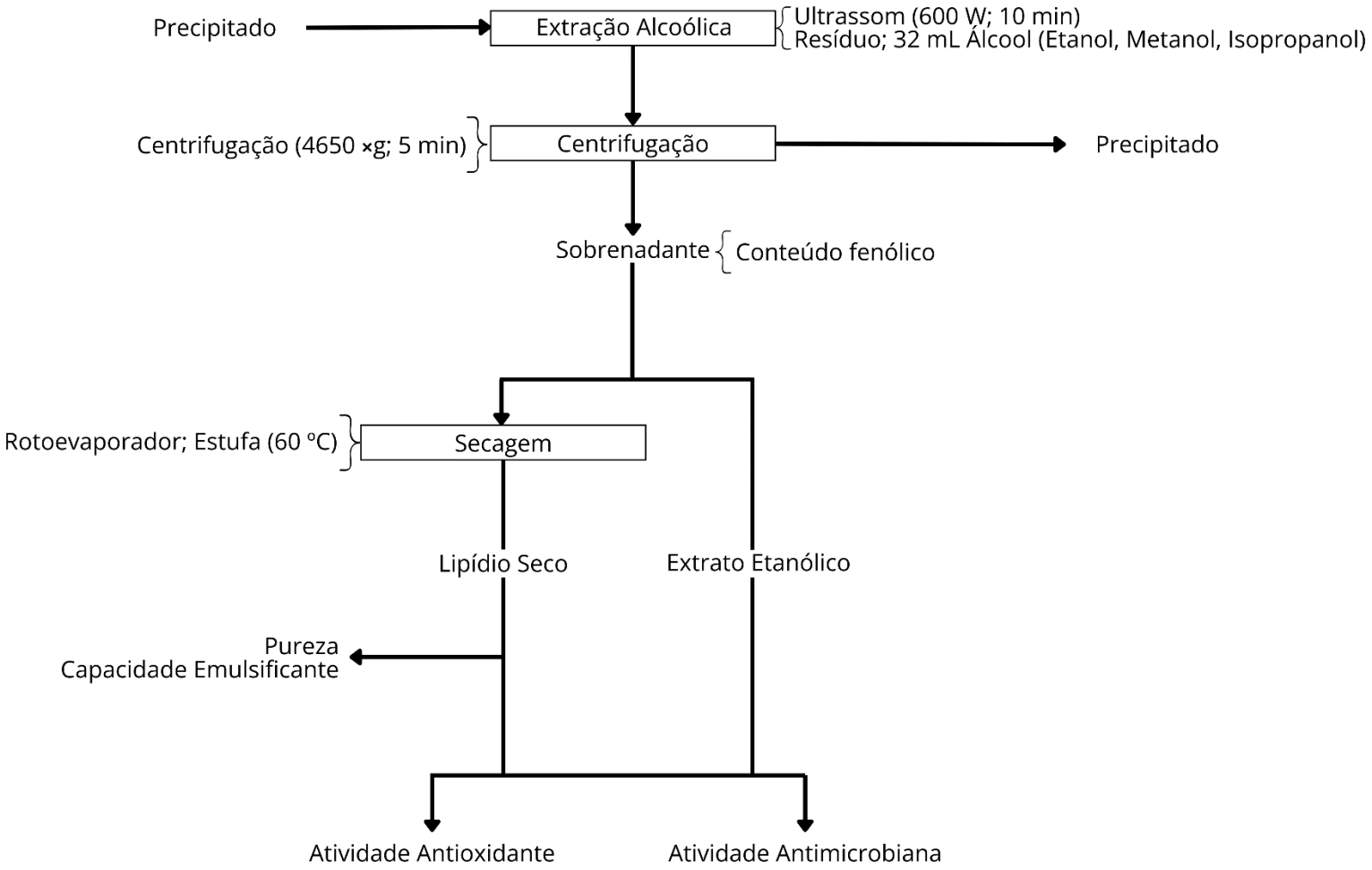
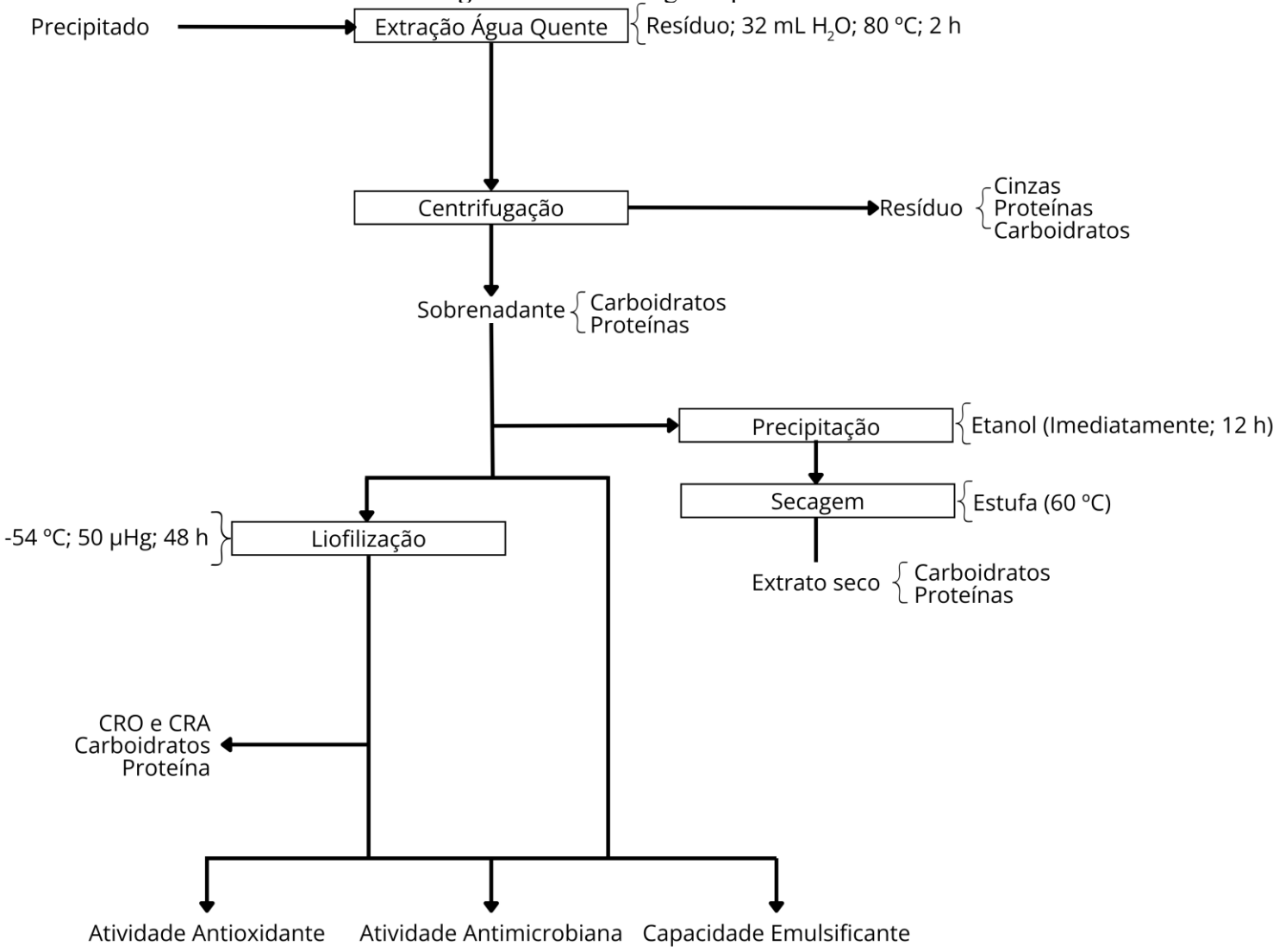


Figura 6 - Metodologia experimental



4.2. COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Foi determinada a composição proximal da biomassa liofilizada. A umidade foi determinada por secagem de 3 g de amostra em estufa (502/3-C. FANEM, Brasil) a 105 ºC até peso constante. Este ensaio foi realizado de acordo com o método nº 950.4613 da AOAC (2000). Cinzas foram determinadas por incineração de 1,5 g de amostra seca em mufla a 600 ºC até aparência branca (Liu, 2019). Carboidratos foram determinados através do método descrito por DuBois *et al*. (1956), com modificações propostas por Chen *et al*. (2023). Para a quebra da parede e remoção dos pigmentos da microalga, 10 mg de amostra foram adicionadas em tubos de centrífuga, seguido da adição de 0,5 mL de ácido acético glacial e incubação em banho maria (20 min; 80 ºC). Após, 10 mL de acetona foram adicionados e o tubo foi agitado em vórtex por 1 min com remoção do sobrenadante contendo os pigmentos por centrifugação (5 min; 1000 ×g). Após a hidrólise (5 mL TFA 4 mol/L; 4 h; 100 ºC; agitação em vórtex a cada 30 min) da biomassa descolorida, uma alíquota de 0,5 mL de amostra diluída foi adicionada em 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura reacional foi agitada em vórtex a cada 10 min e após 30 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Kasuaki IL-592, Brasil) a 490 nm. O teor de carboidratos foi determinado utilizando uma curva-padrão de D-glucose (0 a 1,25 mg/mL; Apêndice A), nas mesmas condições do método e a Eq. 1.

$$\text{Carboidratos (\%)} = \frac{(Absorbância - coeficiente\ linear)/coeficiente\ angular}{Massa\ da\ amostra\ (mg)/Volume\ da\ hidrólise\ (mL)} \text{ x } 100\% \qquad (1)$$

Lipídios foram extraídos como descrito por Folch; Lees; Stanley (1957), com as modificações propostas por Axelsson e Gentili (2014). Em 20 mg de amostra foram adicionados 7,9 mL de uma mistura de Clorofórmio/metanol (2:1; v/v) e agitadas em vórtex por no mínimo 1 min ou até completa homogeneização. Então, 2,1 mL de NaCl 0,73% foram adicionados para produzir um volume reacional total de 10 mL em uma proporção de 2:1:0,8 e a mistura foi novamente agitada em vórtex por 1 min. A separação das fases foi realizada por centrifugação (2 min; 350 ×g) e uma micropipeta foi cuidadosamente utilizada para remover uma alíquota da fase contendo os lipídios e adicionar em um béquer previamente tarado. O teor total de lipídios foi determinado gravimetricamente após secagem em estufa a 25 ºC até peso constante.

Proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al*. (1951) após a hidrólise (Papachristou *et al*., 2021).

4.3. EXTRAÇÃO FRACIONADA POR RUPTURA OSMÓTICA

A extração fracionada dos compostos ativos da microalga foi realizada seguindo a método descrito por Li *et al*. (2021), com modificações. Todas as etapas de extração foram realizadas em reatores encamisados sob agitação constante.

Para o primeiro extrato, que contém a ficoeritrina, 40 mL de água destilada (0,8:40; v/v) foi adicionada a 0,8 g da microalga liofilizada, e a extração foi realizada a 5 ºC por 6 h. O extrato bruto (sobrenadante) foi obtido pela remoção da massa sólida por centrifugação a 4650 ×g por 5 min a 25 ºC.

Na segunda etapa da extração foram recuperados os ácidos graxos. A massa residual resultante após a centrifugação da primeira etapa da extração, foram adicionados 32 mL de etanol que permaneceu em contato com ela por 6 h a 25 ºC. O extrato bruto (sobrenadante) foi obtido pela remoção da massa sólida por centrifugação a 4650 ×g por 5 min a 25 ºC.

Na terceira etapa de extração, à massa residual foram adicionados 32 mL de água destilada, que ficaram em contato por 2 h a 80 ºC. O extrato rico em polissacarídeos foi obtido por centrifugação a 4650 ×g por 5 min a 25 ºC, e o resíduo descartado.

4.4. EXTRAÇÃO FRACIONADA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A ruptura da parede celular da microalga foi baseada no método de Zheng *et al*. (2011) com modificações, usando sonda ultrassônica (600 W; 30 s; 5 s de intervalo) para produção do primeiro e segundo extrato.

O primeiro extrato, que contém a ficoeritrina, 40 mL de água destilada (0,8:40; v/v) foram adicionadas a 0,8 g da microalga liofilizada. A extração foi assistida por sonda ultrassônica (600 W; 30 s; 5 s de intervalo; 20 min). Alíquotas nos tempos de 2,5; 5;7,5 e 10 min foram retiradas para determinar proteínas solúveis (Lowry *et al*., 1951), e ficoeritrina (de Marsac; Houmard, 1988) para determinação do tempo ideal de tratamento. O extrato bruto (sobrenadante) foi obtido pela remoção da massa sólida por centrifugação a 4650 ×g por 5 min a 25 ºC.

Após determinação do melhor tempo de extração (10 min), foram avaliados diferentes solventes e pHs. 40 mL de água destilada (0,8:40; v/v) foi adicionada a 0,8 g da microalga liofilizada. O pH inicial foi ajustado utilizando pHmetro de bancada (QUIMIS, Q400AS, São Paulo, Brasil) com HCl (1 mol/L), sob agitação magnética, para valores de 4,2; 5,5 e 6,8,

obtendo os extratos A42, A55 e A68, respectivamente. Para obtenção do extrato T55 foi utilizado tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 5,5), com ajuste inicial do pH para 5,5 (HCl 1 mol/L). A extração foi assistida por sonda ultrassônica (600 W; 30 s; 5 s de intervalo; 10 min). Os extratos brutos (sobrenadante) foram obtidos pela remoção da massa sólida por centrifugação (4650 ×g; 5 min; 25 ºC). Os extratos T55 e A55 foram liofilizados (-54 ºC; 50 µHg; 48h), resultando nos extratos T55L e A55L, que após diluição a 1% (0,1 g/10 mL água destilada), foram avaliados em relação ao teor de proteínas, ficoeritrina, conteúdo de fenóis solúveis em água, e propriedades bioativas e biotecnológicas. O resíduo do extrato escolhido (A55) foi utilizado para seguimento da extração sequencial.

No segundo extrato, que contém os ácidos graxos, foram adicionados 32 mL de álcool à massa residual resultante após a centrifugação da primeira extração. A extração foi assistida por sonda ultrassônica (600 W; 30 s; 5 s de intervalo; 10 min). O extrato bruto (sobrenadante) foi obtido pela remoção da massa sólida por centrifugação (4650 ×g; 5 min; 25 ºC). Etanol, metanol e isopropanol foram avaliados como solventes, sendo obtidos os extratos EtOH, MetOH e IsoOH, respectivamente, e o resíduo do extrato escolhido (EtOH) foi utilizado para seguimento da extração sequencial. Este extrato foi concentrado e seco em rota evaporador (60 ºC) resultando nos lipídios EtOHS.

No terceiro e último extrato, foram adicionados 32 mL de água destilada à massa residual resultante após a centrifugação da segunda etapa, e a extração foi realizada a 80 ºC por 2 h. O extrato rico em polissacarídeos foi obtido por centrifugação (4650 ×g; 5 min; 25 ºC), gerando o extrato PS, e o resíduo final teve sua massa determinada gravimetricamente após secagem em estufa a 105 ºC, e caracterizado em termos de proteínas (Lowry *et al*., 1951; Papachristou *et al*., 2021), carboidratos (DuBois *et al*., 1956); Deamici *et al*. (2021) e minerais (Liu, 2019). Os polissacarídeos presentes no extrato foram precipitados utilizando etanol (1:2; extrato:etanol; v/v) e os agregados de polissacarídeos intracelular foram coletados por centrifugação (4650 ×g; 25 min; 25 ºC), secos em estufa (60 ºC) e quantificados gravimetricamente. A coleta dos polissacarídeos precipitados pelo etanol ocorreu de maneira imediata e após um período de 12 h (Patel *et al*., 2013), resultando nos polissacarídeos codificados como PSImdt e PS12h, respectivamente. O extrato PS também foi liofilizado (-54 ºC; 50 µHg; 48h), sem precipitação dos polissacarídeos, resultando nos polissacarídeos PSL. O rendimento e teores de carboidratos (DuBois *et al*., 1956; Deamici *et al*., 2021) dos polissacarídeos foram utilizados para avaliar o melhor tratamento.

4.5. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO RICO EM FICOERITRINA

O extrato rico em ficoeretrina (A55) foi purificado por filtração em papel filtro (80 g/m²). Os teores de proteína solúveis (mg/mL) (Lowry *et al*., 1951) e ficoeritrina (mg/mL) (de Marsac; Houmard, 1988) do extrato A55 e do filtrado foram comparados, além do tempo de filtração (min).

4.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FICOERITRINA

O teor de ficobiliproteínas nos primeiros extratos (A42, A55, A68, T55, T55L e A55L) foram estimados utilizando um espectrofotômetro, a 620, 650 e 565 nm. Os teores de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram estimados utilizando as Eq. 2, 3 e 4, respectivamente. O rendimento de ficoeritrina (R_{PE}; $mg_{ficoeritrina}/g_{biomassa}$, ou $mg_{PE}/g_{biomassa}$) foi calculado através da Eq. 5, e o de ficocianina (R_{PC}; $mg_{ficocianina}/g_{biomassa}$, ou $mg_{PC}/g_{biomassa}$) através da Eq. 6 (de Marsac; Houmard, 1988).

$$\text{PC (mg/mL)} = \frac{A_{620} - 0.7 \times A_{650}}{7{,}38} \quad (2)$$

$$\text{APC (mg/mL)} = \frac{A_{650} - 0{,}19 \times A_{620}}{5{,}56} \quad (3)$$

$$\text{PE (mg/mL)} = \frac{A_{565} - 2{,}8 \times PC - 1{,}34 \times APC}{12{,}7} \quad (4)$$

$$R_{PE}\ (mg_{PE}/g_{biomassa}) = \frac{A_{565} - 2{,}8 \times PC - 1{,}34 \times APC}{12{,}7}\ x\ \frac{V_{extração}(mL)}{m_{biomassa\ seca}(g)} \quad (5)$$

$$R_{PC}\ (mg_{PC}/g_{biomassa}) = \frac{A_{620} - 0.7 \times A_{650}}{7{,}38}\ x\ \frac{V_{extração}(mL)}{m_{biomassa\ seca}(g)} \quad (6)$$

Onde PC, APC e PE são, respectivamente, ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina, e A_{620}, A_{650} e A_{565} são as absorções das frações respectivas a 620, 650 e 565 nm. $V_{extração}$ é o volume da extração (mL) e $m_{biomassa}$ a massa de biomassa liofilizada de microalga utilizada (g). A pureza da ficoeritrina foi calculada dividindo o teor encontrado de Ficoeritrina (mg/mL) pelo de proteínas solúveis (mg/mL) (Silva-Núñez; Donoso-Quezada; González-Valdez, 2023).

4.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

O teor de proteína solúvel nos extratos (A42, A55, A68, T55, T55L e A55L) foi determinado através do método de Lowry *et al*. (1951). Uma reação colorimétrica que envolve

oxidação, catalisada por cobre, de aminoácidos aromáticos pelo reagente heteropolifosfato (fosfotúngstico-fosfomolíbdico) e desenvolve cor azul que pode ser lida por espectrofotômetro. Foi determinada a concentração de proteínas usando uma curva-padrão, construída com albumina sérica bovina nas mesmas condições do método (0 a 0,32 g/L; Apêndice B). O teor de proteína solúvel recuperado (%PSR) foi calculado pela Eq. 7, e indica o rendimento de proteínas obtidas (g de proteína solúvel/g de proteína na microalga, %), ao correlacionar o teor de proteínas solúveis do extrato (g/L), volume de extração ($V_{extração}$, L), massa de biomassa utilizada ($m_{biomassa}$, g) e teor de proteína na biomassa (teor de proteína na amostra seca, %).

$$\%\text{PSR} = proteína\ solúvel\ (g/L)\ x\ \frac{V_{extração}(L)}{m_{biomassa}(g)\ x\ teor\ de\ proteína\ na\ amostra\ seca\ (\%)}\ x\ 100\% \qquad (7)$$

4.8. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O teor de carboidratos dos extratos (A55, T55 e PS) foram determinados pelo métododescrito por DuBois *et al*. (1956), com modificações propostas por Deamici *et al*. (2021). Em 0,5 mL do extrato foram adicionados 4,5 mL de HCl 2 mol/L para realização de hidrólise (100 ºC; 2 h). Após centrifugação (10 min; 4650 ×g), uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante diluído foi adicionada em 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura reacional foi agitada em vórtex a cada 10 min e após 30 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Kasuaki IL-592, Brazil) a 490 nm. O teor de carboidratos foi determinado utilizando uma curva-padrão de D-glucose (0 a 1,25 mg/mL; Apêndice A). Para os extratos secos (PSImdt, PS12h e PSL), 10 mg de amostra foram hidrolisados (100 ºC; 2 h) em 5 mL de HCl 2 mol/L.

4.9. CONTEÚDO FENÓLICO

O conteúdo fenólico dos extratos (A42, A55, A68, T55, T55L e A55L) foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. 250 µL de amostra foram homogeneizadas em vortex com 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%), 500 µL de carbonato de sódio (7%) e 4,0 mL de água destilada e incubadas por 2 h à temperatura ambiente (21 ºC) protegidas da luz. Após, a absorbância da reação foi lida em espectrofotômetro (750 mm). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por g de amostra (mg EAG/g) calculados

a partir da curva-padrão de ácido gálico (0 a 0,15 mg EAG/mL; Apêndice C) (Boeing *et al*., 2014; Michiu *et al*., 2022).

4.10. PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos (gálico, protocatecóico, hidroxibenzóico, siríngico, cafeico, clorogênico, cumárico, ferúlico e vanilina) nos extratos A55, T55, A55L e T55L foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (Shimadzu, CLASS-M10A, Japão), e coluna Cis fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 um, Discovery, USA), metanol e água acidificada (ácido acético 1%; 20:80 v/v) foram utilizadas como fase móvel, à 0,7 mL/min e temperatura de 35 °C (Scaglioni *et al*., 2014). Os ácidos fenólicos foram identificados baseados em seu tempo de retenção, e comparados no espectro UV de cada composto em solução padrão com espectro no pico da amostra. Testes de pureza do pico também foram realizados. Curvas padrões individuais para cada ácido fenólico no comprimento de onda máximo de cada composto foram utilizados para quantificação. Os resultados foram expressos em $\mu g/g_{biomassa}$ (µg do composto por g de biomassa) e em $\mu g/g_{liofilizado}$ (µg do composto por g de extrato liofilizado).

4.11. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS E MINERAIS DO EXTRATO AQUOSO RICO EM FICOERITRINA

O teor de sólidos e minerais nos extratos (A55 e T55) foi determinado gravimetricamente (Sluiter *et al*., 2005; Sluiter *et al*., 2008). Para o teor de sólidos, uma alíquota de 10 mL do extrato aquoso foi colocada em um cadinho previamente calibrado e mantido em estufa a 105 ºC até o peso constante. O teor de sólidos foi determinado em mg/mL de amostra, em relação ao teor recuperado de biomassa através da Eq. 8. O teor de minerais foi determinado adicionando uma alíquota de 10 mL em um cadinho previamente calibrado, seco em estufa (105 ºC) e, após, mantido em mufla a 600 ºC até aparência branca e peso constante. O teor de minerais no extrato foi determinado em mg/mL de amostra, com o teor recuperado de minerais sendo calculado através das Eq. 9.

$$\text{Sólidos recuperados (\%)} = sólidos\ (mg/mL) x \frac{V_{extração}(mL)}{m_{biomassa\ seca}(mg)} x100\% \quad (8)$$

$$\text{Minerais recuperados (\%)} = minerais\ (mg/mL)\ x\ \frac{V_{extração}(mL)}{m_{biomassa\ seca}(mg)\ x\ teor\ de\ minerais\ na\ amostra\ seca\ (\%)}\ x\ 100\% \quad (9)$$

4.12. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS

O teor de lipídios brutos nos resíduos no extrato alcoólico (EtOHS) foi determinado gravimetricamente, após evaporação de todo o solvente de extração a 60 ºC até peso constante em béquer previamente tarado, e expresso como porcentagem em relação à massa seca de microalga (%). O teor de lipídios no extrato foi determinado como descrito por Folch; Lees; Stanley (1957), com as modificações propostas por Axelsson e Gentili (2014). O resíduo obtido (aproximadamente 50 mg) foi ressuspendido em solução clorofórmio/metanol (2:1; 7,9 mL), transferido para um tubo de centrífuga e agitado em vórtex (1 min). Após, 2,1 mL de NaCl 0,73% foram adicionados para produzir um volume reacional total de 10 mL em uma proporção de 2:1:0,8 e a mistura foi novamente agitada em vórtex por 1 min. A separação das fases foi realizada por centrifugação (2 min; 350 ×g) e uma micropipeta foi cuidadosamente utilizada para remover uma alíquota (3 mL) da fase contendo os lipídios e adicionar em um béquer previamente calibrado, e então foi seco em estufa até peso constante (25 ºC). O teor total de lipídios foi determinado gravimetricamente e expresso como porcentagem em relação à massa seca de microalga (%). A pureza foi calculada dividindo o teor de resíduo pelo teor de lipídios do resíduo. O rendimento foi calculado dividindo o teor de lipídios do resíduo pelo teor de lipídios na microalga

4.13. COR

Os parâmetros de cor e opacidade dos extratos (A42, A55, A68 e T55) e dos liofilizados (A55L e T55L) foram avaliados nas amostras dispostas em uma placa de petri, com 1 cm de altura, utilizando colorímetro (Konica Minolta CR-400, Tóquio, Japão) e padrão de iluminação D65. A escala CIELab foi aplicada para determinar o L* (luminosidade), a* (verde/vermelho) e b* (amarelo/azul) que foram utilizados para determinar a diferença de cor ΔE entre as amostras.

4.14. REMOÇÃO DA CLOROFILA

A remoção da clorofila na microalga foi realizada em dois momentos distintos, na biomassa liofilizada e no resíduo após a primeira etapa de extração aquosa, seguindo o método descrito por Li *et al*. (2016). Em 70 mg de biomassa liofilizada foram adicionados 7 mL de Etanol 100% + NaOH 1% (proporção 1:4) e a mistura foi incubada a 70 ºC por 1 h. A biomassa descolorida foi obtida após remoção do sobrenadante por centrifugação (4650 ×g; 5 min; 25 ºC) e os lipídios foram extraídos por Folch; Lees; Stanley (1957), com as modificações propostas por Axelsson e Gentili (2014), ajustando a proporção de solvente/biomassa (35 mL de solvente; 70 mg de biomassa). Também foi realizada a remoção da clorofila no resíduo de biomassa após a primeira etapa da extração seriada, antes da extração dos lipídios utilizando etanol 100%. Em 400 mg de resíduo foram adicionados 40 mL de Etanol 100% + NaOH 1% (1:4) e a mistura foi incubada a 70 ºC por 1 h. O resíduo descolorido foi obtido após remoção do sobrenadante por centrifugação (4650 ×g; 5 min; 25 ºC) e utilizado para extração de lipídios por ultrassom utilizando etanol 100%, como já descrito no item 4.3.

4.15. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA E DE CAROTENOIDES

O teor de clorofila e de carotenoides do extrato (EtOH) e o teor de clorofila removidos da biomassa e do resíduo foi estimado utilizando espectrofotômetro a 648,6, 664,2 e 470 nm, através das Eq. 10, 11, 12 e 13 (Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Chl}_a\ (\mu g/mL) = 13{,}36 \times A_{664{,}2} - 5{,}19 \times A_{648{,}6} \quad (10)$$

$$\text{Chl}_b\ (\mu g/mL) = 27{,}43 \times A_{648{,}6} - 8{,}12 \times A_{664{,}2} \quad (11)$$

$$\text{Chl}_{a+b}\ (\mu g/mL) = 5{,}24 \times A_{664{,}2} + 22{,}24 \times A_{648{,}6} \quad (12)$$

$$\text{Chl}_{x+c}\ (\mu g/mL) = \frac{1000 \times A_{470} - 2{,}13 \times Chl_a - 97{,}64 Chl_b}{209} \quad (13)$$

Onde Chl_a, Chl_b, Chl_{a+b} E Chl_{x+c} são os teores de Clorofila a, Clorofila b, Clorofila a + b e Carotenoides, e $A_{648,6}$, $A_{664,2}$ e A470 são as absorções a 646,8, 664,2 e 470 nm, respectivamente. Antes de cada medição o espectrofotômetro foi calibrado utilizando o solvente utilizado no extrato como branco.

4.16. ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

O potencial antioxidante dos extratos (A55, T55, A55L, T55L, EtOH, EtOHS, PS e PSL) foi verificado utilizando três métodos distintos: eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), captura do radical 2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($ABTS^{\cdot+}$) e Método de Redução do Ferro (FRAP). Para a análise dessa bioatividade, as concentrações de cada extrato foram padronizadas para 1 mg/mL do composto alvo, assegurando que as diferenças observadas sejam atribuídas às características do extrato, em vez do efeito da concentração. Assim, os extratos A55, T55, A55L e T55L foram padronizados para uma concentração de 1 mg de proteína por mL de solução (1 mg/mL), os extratos EtOH e EtOHS para 1 mg de lipídio/mL de solução (1 mg/mL) e PS e PSL para 1 mg de carboidrato/mL de solução (1 mg/mL).

4.16.1. DPPH

O método de captura do radical DPPH foi determinado utilizando o método descrito por Rufino *et al*. (2007b). 0,1 mL de amostra foram adicionadas em 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM) e homogeneizadas em vortex. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Kasuaki IL-592, Brazil) a 515 nm, respeitando o tempo de estabilização. Antes de cada medição o espectrofotômetro foi calibrado com o solvente utilizado como branco. A capacidade de inibição do radical DPPH foi calculada utilizando a Eq. 13, uma curva-padrão de Trolox foi elaborada (0 a 800 umol/L; Apêndice D), e a capacidade antioxidante foi expressa como equivalente de Trolox (TE) por grama de proteína, lipídio e/ou carboidrato (µmol TE/g).

4.16.2. $ABTS^{\cdot+}$

O método de captura do radical ABTS foi determinado utilizando o método descrito por Rufino *et al*. (2007a). 30 µL de amostra foram adicionadas em 3 mL do radical $ABTS^{\cdot+}$ (7 mM) e homogeneizadas em vortex. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Kasuaki IL-592, Brazil) a 734 nm, após 6 min. Antes de cada medição o espectrofotômetro foi calibrado com o solvente utilizado como branco. A capacidade de inibição do radical ABTS foi calculada utilizando a Eq. 13, uma curva padrão de Trolox foi elaborada (0 a 1000 µmol/L; Apêndices E e F), e a capacidade antioxidante foi expressa como equivalente de trolox (TEAC) por grama de proteína, lipídio e/ou carboidrato (µmol TE/g).

4.16.3. FRAP

A capacidade de redução do ferro foi avaliada de acordo com o método descrito por Rufino *et al*. (2006). 90 µL de amostra concentrações foram adicionadas em 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP e homogeneizadas em vortex. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Kasuaki IL-592, Brazil) a 595 nm, após incubação em banho-maria (37 ºC), por 30 min. Antes de cada medição o espectrofotômetro foi calibrado com o solvente utilizado como branco. Uma curva padrão utilizando sulfato ferroso foi elaborada (0 a 2000 µmol/L; Apêndice G), e a capacidade antioxidante foi expressa como equivalente de Fe^{2+} em µmol por grama de proteína, lipídio e/ou carboidrato (µmol Fe^{2+}/g).

4.17. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos (A55, T55, A55L, T55L, EtOH, EtOHS, PS e PSL) foi estimada utilizando o método de halo de inibição (CLSI, 2012). Foram verificadas as atividades contra *Bacillus cereus* (ATCC 10876) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os micro-organismos isolados foram transferidos para tubo contendo caldo *Brain Heart Infusion*, e a turbidez ótima foi ajustada até ser semelhante a solução-padrão de 0,5 McFarland (1,5 x 10^6 UFC/mL). As culturas obtidas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hilton. Discos estéreis foram impregnados com 20 µL das amostras, com concentrações variáveis (1~10 mg/mL em relação ao teor de proteína, lipídios ou carboidratos), secos em capela de fluxo laminar por 15 min, dispostos nas placas inoculadas e incubados (37 ºC, 24 h). Após, foi observado a olho nu o crescimento microbiano, e um paquímetro foi utilizado para a medição do halo de inibição, em mm.

4.18. CAPACIDADE EMULSIFICANTE

A capacidade emulsificante dos extratos (A55, T55, A55L, T55L, EtOHS, PS e PSL) foi determinada pelo método descrito por Lee; Lee (2025). Em um béquer contendo 30 mL do extrato em diferentes concentrações foram adicionados 10 mL de óleo de soja, e homogeneizados em ultra turrax (T 25 digital - IKA; 2 min; 24000 rpm). Alíquotas da emulsão (50 µL) foram coletadas do fundo do béquer logo após a homogeneização (tempo zero), e após 10 min, e diluídas 100x em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) (0,1 %; 5 mL). A leitura da absorbância das emulsões foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Kasuaki IL-

592, Brazil) a 500 nm, imediatamente após a diluição. A capacidade emulsificante, expressa em índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) foi determinada utilizando a leitura obtida na diluição realizada com a alíquota coletada imediatamente após a homogeneização, através da Eq. 14, onde Abs_0 é a absorbância lida na amostra coletada no tempo zero, D o fator de diluição da amostra na solução de SDS 0,1% (100), C a concentração de amostra em relação a fase aquosa (0,01 g/mL, para os extratos A55, T55, A55L, T55L, PS, PSL e 0,0006 mg/L para o EtOHS) e φ representa a fração volumétrica de óleo utilizada (0,25).

$$\text{EAI } (m^2/g) = \frac{2 \; x \; 2{,}303 \; x \; Abs_0 x D}{C \; x \; \varphi \; x \; 10000} \tag{14}$$

A estabilidade da emulsão (EE) foi determinada através da Eq. 15, onde Abs_0 é a absorbância na amostra coletada no tempo zero e Abs_{10} é a absorbância na amostra coletada após 10 min.

$$\text{EE (min)} = \frac{Abs_0}{Abs_0 - Abs_{10}} \text{ x } 10 \tag{15}$$

4.19. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E ÓLEO

A capacidade de retenção de água (CRA) e de óleo (CRO) dos extratos secos (A55L, T55L e PSL) foi determinada seguindo o método descrito por Wu *et al*. (2024). Uma massa de 0,1 g de amostra foi suspensa em tubos, previamente calibrados, com 5 mL de água destilada ou óleo de soja. A solução foi homogeneizada em vortex por 30 s a cada 5 min, por um tempo total de 30 min. Após, a mistura foi centrifugada (3500 ×g; 25 min), com descarte do sobrenadante e pesagem do resíduo. A capacidade de retenção foi calculada pela massa de água e óleo retido, expressa em grama de água ou óleo retido por grama de amostra, através da Eq. 16.

$$\text{CRA ou CRA } (g/g) = \frac{massa \; da \; água \; ou \; óleo \; retida}{massa \; de \; amostra} \tag{16}$$

4.20. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas através do teste de Tukey e teste t à 5% de significância. A análise de regressão linear foi utilizada para calcular os valores da curva padrão de D-glucose, curva padrão de albumina, o potencial de inibição da atividade antioxidante a 50% de concentração (IC_{50}) e o coeficiente de correlação de Pearson (R) foi usado para medir a força da dependência linear. As análises foram realizadas através do software STATISTICA 7 (StatSoft Inc.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Os valores encontrados para a composição proximal em base seca da microalga PPL25 (Tabela 2), permitem observar uma maior predominância dos teores de cinzas e carboidratos, em relação aos teores de proteínas e lipídios. Além disso, a biomassa liofilizada (Tabela 2) apresentou 3,4±0,1% de umidade.

Tabela 2 - Composição proximal da biomassa liofilizada da microalga *P. purpureum* PPL25, em base seca.

Composição	***P. purpureum* (%)**
Proteínas	13,5±0,5
Cinzas	57,8±0,8
Lipídios	9,1±1,0
Carboidratos	24,0±1,93

O alto teor de cinzas encontrados (57,8±0,8%), maior que os reportados por Ferreira *et al*. (2021) (19,8~24,9%) e por Agustina *et al*. (2020) (6,2~7,6%) para essa espécie de microalga pode indicar um acúmulo desses minerais na parte externa da sua parede celular (Liu *et al*., 2021). Um aumento do pH durante o cultivo, também pode ter contribuído para um maior acúmulo de minerais na microalga. Um estudo realizado por Beltrán-Rocha *et al*. (2021) utilizando 16 tipos diferentes de consórcios de microalgas, notou que um aumento do pH durante o cultivo (pH > 9) poderia levar não somente à uma auto floculação das microalgas, mas também a um maior acúmulo de minerais, passando de 21,4% da composição para até 35,9%, um aumento de 59%.

Este maior teor de minerais na microalga não necessariamente indica uma menor qualidade da biomassa obtida, somente demonstra uma diferente gama de aplicabilidades em seu uso. Estudos (Fuentes *et al*., 2000; Fithriani; Melanie; 2022) indicam, respectivamente, um

maior teor de Cálcio, Potássio, Sódio, Ferro e Magnésio, este último com 1080 mg/100g de biomassa, em relação aos demais minerais na *P. purpureum*.

Sabendo a importância dos minerais para a saúde humana, destacando o magnésio como um cofator importante para mais de 300 enzimas e presente no sistema de regulagem de um alto número de funções vitais como contração muscular, condução neuromuscular, controle glicêmico e controle do sistema cardiovascular (Al Alawi; Majoni; Falhammar, 2018), e que nem 80% da população atinge sua ingestão diária recomendada de 320~450 mg (Olza *et al*., 2017), há espaço para a utilização dessa microalga como forma de complementar a ingestão de minerais na alimentação, especialmente se este mineral está presente na forma de resíduo após a extração dos compostos de interesse da microalga.

O teor de polissacarídeos (24,0±1,9%) é próximo dos valores encontrados por Ferreira *et al*. (2021) (30,9~35%) e Li *et al*. (2021) (17,8%). Porém, é menor que o encontrado por Assunção, Varejão e Santos (2017) (64,0%). No entanto, os 3 estudos demonstraram uma maior presença de carboidratos quando comparados com os teores de lipídios e proteínas, resultado já esperado devido a espessa parede celular da microalga (Yin *et al*., 2022). Um maior teor de polissacarídeos é esperado para cultivos de *Porphyridium spp.* que utilizam salinidade menor que 32 g/L, como demonstrado por Hlima *et al*. (2019). O maior teor de polissacarídeos é oriundo não só de um espessamento da parede celular de polissacarídeos, mas também de uma maior produção de exopolissacarídeos pela microalga devido ao estresse induzido pelo meio, com estudos indicando uma possível modulação e estimulação dos mecanismos de produção de polissacarídeos de *Porphyridium spp.* em condições de baixa ou alta salinidade (Decamp *et al*., 2023). Além disso, Li *et al*. (2023) demonstrou que condições de baixa (5%) e alta (50%) salinidade não só estimulam a produção de exopolissacarídeos (EPS) mas também contribuem para que a capacidade antioxidante do EPS seja maior. Dada a semelhança na composição monossacarídica da parede celular da microalga e seu EPS (Bernaertsa *et al*., 2018) sugere-se que esse aumento da capacidade antioxidante, observado no EPS produzido em condições de estresse salino, também ocorra nos polissacarídeos da parede celular explorados neste trabalho.

O teor de proteínas (13,5±0,5%) é próximo ao encontrado por Assunção, Varejão e Santos (2017) (15,1%) e por Ferreira *et al*. (2021) (13,1~17,6%). Dentre as proteínas produzidas pela microalga, a de maior interesse comercial e científico é a ficoeritrina presente em seu fotossistema de captação de luz, onde está complexada juntamente da ficocianina e a aloficocianina, possuindo capacidade antioxidante e antimicrobiana e uma coloração vermelha fluorescente com alto potencial de uso para a indústria alimentícia (Nguyen *et al*., 2024; Wen *et al*., 2025). Dessa maneira, um maior teor proteico da microalga pode indicar um maior teor

de ficoeritrina. Um estímulo à produção de proteínas e ficoeritrina na microalga pode ser alcançado com um aumento do conteúdo de nitrogênio do meio de cultivo, como demonstrado por Li *et al*. (2019). No entanto, condições extremas de salinidade (NaCl = 50 g/L) prejudicam a síntese e diminuem o teor de proteínas na microalga (Ferreira *et al*., 2021).

O teor de lipídios (9,1±1,0%) é maior que o encontrado por Assunção, Varejão e Santos (2017) (1,7%), Ferreira *et al*. (2021) (0,9~1,4%) e Li *et al*. (2021) (7,0%). Ele é menor que os encontrados por Dubey *et al*. (2025) que chegou a 26,7% em uma produção em duas etapas, maximizando a produção de lipídios na segunda etapa ao induzir uma deficiência de nitrogênio, condições específicas de luminosidade (luz vermelha e branca), e adição no meio de cultivo de nanopartículas de óxido ferroso-férrico (Fe_3O_4) (35~150 mg/L) e melatonina (50 μM). Além disso, um tempo maior de cultivo leva ao acúmulo dos lipídios dentro da célula e um maior teor de ácidos graxos poliinsaturados (Li *et al*., 2019) que possuem alta capacidade antioxidante e antimicrobiana (Chamlagain *et al*., 2024; Tsvetanova; Yankov, 2022). Devido ao fato da coleta da microalga PPL25 ter sido realizada no momento da chegada da fase estacionária, há possibilidade de aumentar o teor de lipídios mantendo o cultivo da microalga nessa fase por alguns dias, levando também a um aumento do teor de polissacarídeos como já discutido. Porém, esse aumento de lipídios e polissacarídeos poderia diminuir a proporção de minerais e proteínas presente na microalga.

5.2. EXTRAÇÃO FRACIONADA

5.2.1. Extração de ficoeritrina

5.2.1.1. Estudo Preliminar

Foi realizado um estudo preliminar comparando a ruptura osmótica e o tratamento auxiliado por ultrassom para avaliar o poder de extração da ficoeritrina de cada método em uma biomassa da microalga (PPL24) cedida pela AlgaSul Biotecnologia de Microalgas antes do cultivo da biomassa PPL25. Os teores de ficoeritrina e proteína solúvel encontrados (Tabela 3) demonstram que há maior eficiência na extração dos compostos intracelulares hidrossolúveis pelo tratamento auxiliado por ultrassom, em relação a ruptura osmótica.

Tabela 3 - Teores de ficoeritrina (mg/mL) e proteína solúvel (mg/mL) obtidos através de diferentes tratamentos para a microalga PPL24.

Tratamento	Ficoeritrina (mg/mL)	Proteína Solúvel (mg/mL)
Ultrassom (2,5 min)	0,089±0,010^{f}	na
Ultrassom (5 min)	0,144±0,003^{e}	na
Ultrassom (7,5 min)	0,278±0,013^{d}	na
Ultrassom (10 min)	0,487±0,010^{a}	1,614±0,022^{a}
Ultrassom (20 min)	0,446±0,004^{b}	1,589±0,012^{a}
Ruptura Osmótica (6 h)	0,344±0,014^{c}	1,479±0,009^{b}

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). na = não avaliado

O menor tempo de extração aliado ao maior teor de ficoeritrina ($p<0,05$) no extrato confirma o potencial do ultrassom para a quebra da parede celular e obtenção dos compostos de interesse de maneira mais eficiente. No entanto, devido aos efeitos da cavitação ultrassônica que causam degradação em corantes e em compostos orgânicos (Song *et al*., 2024), há uma diminuição dos teores de ficoeritrina ($p<0,05$) do extrato quando o tempo de ultrassom atinge 20 min, apesar de não afetar o teor de proteínas solúveis ($p>0,05$). Simovic *et al*. (2022) observaram que a degradação de ficoeritrina inicia mesmo em temperaturas brandas (25 ºC), acarretando na perda do enovelamento e desnaturação da proteína, sugerindo assim que a degradação da ficoeritrina se deve ao aquecimento causado pela cavitação ultrassônica.

Há um rápido aumento do teor de ficoeritrina no extrato até o tempo de 10 min. Greenly e Tester (2015) verificaram a integridade da parede celular pela contagem de células intactas de diferentes espécies de microalgas ao longo de tratamento auxiliado por sonda de ultrassom. Nesse estudo, até 2 min de ultrassom foram suficientes para romper mais de 80% das células. Assim, um tempo prolongado de extração auxiliada por ultrassom além de desnecessário para uma extração eficiente da ficoeritrina, danifica o composto de interesse. Dessa maneira, foi determinado a utilização do ultrassom como metodologia para produção dos extratos, devido ao maior rendimento dos compostos de interesse e menor tempo de extração.

5.2.1.2. Extração pelo tratamento com ultrassom

Ao aplicar o mesmo tratamento por ultrassom (600 W; 30 s; 5 s de intervalo; até 10 min) na biomassa de microalga produzida especificamente para o experimento (PPL25), se obteve resultados diferentes dos observados anteriormente, como pode ser observado na Tabela 4. Não somente o comportamento esperado de rápido aumento do teor de ficoeritrina até o tempo de 10 min não foi observado, mas também houve uma mudança significativa na coloração do extrato obtido (Figura 7), que dificulta seu potencial uso como corante alimentar (Wen *et al*., 2025).

Tabela 4 - Característica do extrato para diferentes tempos de tratamento com ultrassom

Tratamento	Ficoeritrina (mg/mL)
Ultrassom (2,5 min)	0,1027
Ultrassom (5 min)	0,1297
Ultrassom (7,5 min)	0,1402
Ultrassom (10 min)	0,1519

Figura 7 - Extrato obtido no tempo de 10 min para a biomassa PPL24 (a) e PPL25 (b).



O pH do extrato aquoso obtido da PPL24 teve um valor de 4,22, enquanto que o obtido da PPL25 teve um valor de 10,88. Segundo Gonzanlez-Ramirez *et al*. (2014), é esperado uma variação na absorbância, fluorescência e coloração da ficoeritrina a depender o pH do meio,

sem afetar a estrutura da proteína na faixa de pH entre 4~10. No entanto, em valores extremos (pH < 4 e pH > 10) há perda da estrutura oligomérica da proteína, podendo ocorrer a desnaturação.

A não realização de uma etapa de lavagem da microalga após a coleta pode ter impactado no pH final. Durante o processo de coleta da microalga, pode ocorrer o acúmulo de minerais, utilizados no cultivo, e exopolissacarídeos na superfície de microalga (Khaw *et al*., 2021). Dessa maneira, foi demonstrada a necessidade de melhor compreensão dos efeitos dessa variação no rendimento do extrato aquoso rico em proteínas, e maneiras de contornar os possíveis efeitos negativos na cor, estrutura das proteínas, pigmentos fotossintéticos e rendimento dos lipídios na segunda etapa de extração.

5.2.1.3. Influência do pH

Diversos autores utilizam como solvente para extração de ficoeritrina em microalgas o tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 5,5) (Bermejo-Román *et al*., 2025; Castro-Varela *et al*., 2022; García *et al*., 2021) ou um tampão que mantenha o pH na faixa de 7, como Tris-HCl (0,5 mol/L; pH 7) (Tran *et al*., 2019) ou citrato-fosfato (0,15 mol/L; pH 7) (Martínez *et al*., 2019). Os resultados preliminares encontrados, especialmente o de cor para o extrato com pH 4,22, a predominância da extração utilizando pH 5,5 na literatura, e o pico máximo de fluorescência da ficoeritrina em pH 6,8 (Gonzanlez-Ramirez *et al*., 2014), nortearam o estudo para entender a importância do pH no processo de extração da ficoeritrina assistida por ultrassom. Três faixas de pH inicial foram utilizadas para extração com água destilada (4,2, 5,5, 6,8), e um para o tampão fosfato (0,1 M; pH 5,5), e o processo de extração foi avaliado em relação aos rendimentos de ficoeritrina $mg_{PE}/g_{biomassa}$ e %PSR (% de proteína solúvel recuperada; g de proteína solúvel no extrato, extrato/g de proteína da biomassa) nos extratos brutos. Os extratos foram denominados, respectivamente, A42, A55, A68 e T55.

Houve um aumento do pH ($p<0,05$) em todas as extrações, independente do solvente e pH inicial (Tabela 5). Além disso, o pH final dos extratos A55 e A68 foram iguais ($p>0,05$), com ele se aproximando de uma faixa entre 7,0~7,1. O pH do extrato T55 foi o que apresentou menor elevação, demonstrando que o uso da solução tampão foi eficiente para evitar a variação do pH alcançado. Esse aumento do pH já é esperado em processos de extrações aquosos utilizando ultrassom, independente do solvente e matriz utilizados na extração, devido ao fato que somente a ação de cavitação ultrassônica em água destilada em frequências próximas de 22

kHz ser suficiente para a liberação de hidroxilas (OH•) (Vikulin e Vikulina, 2020), tornando o pH mais básico.

Tabela 5 - Características dos extratos aquosos ricos em proteínas

Extrato	Solvente	pH antes da extração	pH do extrato bruto	Ficoeritrina ($mg_{PE}/g_{biomassa}$)	%PSR
T55	Tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 5,5)	5,50±0,01^{b}	5,85±0,14^{c}	13,3±1,7^{ab}	73,0±7,0^{b}
A42	Água destilada	4,23±0,06^{c}	6,75±0,06^{b}	14,9±0,4^{ab}	50,6±5,2^{c}
A55		5,50±0,04^{b}	7,12±0,05^{a}	16,6±1,1^{a}	87,5±3,9^{a}
A68		6,82±0,06^{a}	7,05±0,02^{a}	12,3±0,3^{b}	71,2±5,0^{b}

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A42 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 4,2); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); A68 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 6,8).

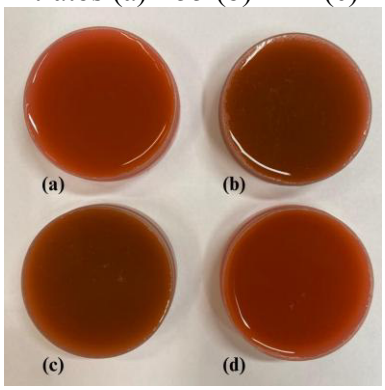
Estudos indicam resultados conflitantes quando correlacionadas propriedades tecnológicas de proteínas, como solubilidade, capacidade de retenção de água e capacidade emulsionante, com o pH. Na proteína do leite (*whey protein*) há uma melhora dessas características em pH neutro (6~7) (Lupki *et al*., 2019). Em proteínas vegetais, há uma melhora dessas características em valores ácidos (pH<4) ou básicos (pH>8) (Ghorbani *et al*., 2025). Na proteína de insetos, valores de pH>11 melhoraram essas características (Nissen *et al*., 2021). O menor %PSR encontrado no extrato bruto (sobrenadante) A42 é esperado, devido à menor solubilidade de proteínas obtidas de microalgas em pH ácido (pH<5), como foi observado em estudo de Wang *et al*. (2024) utilizando proteínas obtidas da microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

O teor máximo de ficoeritrina obtido (15,8±1,1 $mg_{PE}/g_{biomassa}$, ou 1,6% m/m) no extrato A55 é menor que o encontrado na literatura, onde Li *et al*. (2021) encontraram 4,9% ($g_{PE}/g_{biomassa}$), Martínez *et al*. (2019) 32 $mg_{PE}/g_{biomassa}$ e Tran *et al*. (2019) 73,8 $mg_{PE}/g_{biomassa}$. Esse baixo rendimento pode ser explicado pela composição da microalga utilizada, e não pelo método de extração, pois houve uma intensidade de luz solar média de 262,42 μmol/m²/s durante o cultivo, e como relatado por Sosa-Hernández *et al*. (2019) uma intensidade de luz acima de 100 μmol/m²/s durante a produção da *P. purpureum* diminui o teor de ficoeritrina presente. Comportamento similar foi encontrado por Xie *et al*. (2021) para a microalga

Rhodomonas salina, em que uma luminosidade acima de 100 µmol/m²/s diminuiu o teor de ficoeritrina e outros compostos fotossintéticos, como a Clorofila A. No entanto, ambos estudos destacaram a maior produtividade de biomassa (g/L) das microalgas em condições de maior luminosidade, resultando em um aumento do rendimento de ficoeritrina dos cultivos ($mg_{ficoeritrina}/L_{cultivo}$).

A Figura 8 ilustra o aspecto dos extratos brutos ricos em ficoeritrina obtidos. É possível notar, uma coloração mais escura dos extratos A42 e A55, em comparação com os T55 e A68. A mudança na coloração pode ser proveniente da sensibilidade da ficoeritrina ao pH do meio (Gonzanlez-Ramirez *et al*., 2014), no extrato A42, ou devido a presença de outros compostos no extrato que possam afetar a cor deles, como é o caso do alto teor proteico do extrato A55.

Figura 8 - Extratos (a) T55 (b) A42 (c) A55 (d) A68



T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A42 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 4,2); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); A68 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 6,8).

Por não serem encontrados estudos que indicam a influência do pH nas propriedades tecnológicas das proteínas obtidas de algas ou microalgas, a melhor solubilidade na faixa de pH 5~10 e os maiores teores de ficoeritrina ($mg_{PE}/g_{biomassa}$) e %PSR ($p>0,05$) nos extratos obtidos com pH inicial de 5,5, este foi considerado o ideal nesse estudo para recuperação de proteínas solúveis da microalga *P. purpureum* em tratamento auxiliado por ultrassom. Os extratos obtidos com este pH (T55 e A55; Figura 9) foram analisados em relação a sua cor, utilizando colorímetro (Tabela 6), e também em relação aos %Biomassa Recuperada (%; g sólidos no extrato/g de biomassa), Cinzas (g de cinzas no extrato/g de biomassa; %), Ficoeritrina ($mg_{PE}/g_{biomassa}$), %PSR (% de proteína solúvel recuperada; g de proteína solúvel no extrato extrato/g de proteína da biomassa; %), %CR (% de carboidrato recuperado; g de carboidrato no extrato extrato/g de carboidrato da biomassa; %) e conteúdo fenólico (mg equivalente de ácido

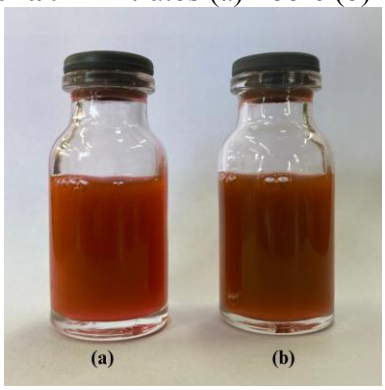
gálico por g de biomassa; mg eag/$g_{biomassa}$) (Tabela 7). Essa comparação é necessária porque a não utilização de tampão para a extração reduz o custo da operação, facilitando a sua aplicação como aditivo alimentar (Amit *et al*., 2017).

Tabela 6 - Análise de cor dos extratos T55 e A55

Extrato	L *	a *	b *	ΔE
T55	41,71±1,38[a]	30,30±0,95[a]	14,43±1,82[b]	12,10±1,68
A55	37,68±0,92[b]	20,58±1,40[b]	20,10±1,19[a]	

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios (p<0,05). T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5).

Figura 9 - Extratos (a) T55 e (b) A55



T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5).

Tabela 7 - Características dos extratos T55 e A55

Extrato	%Biomassa recuperada	Cinzas (%)	Ficoeritrina ($mg_{PE}/g_{biomassa}$)	%PSR	%CR	Compostos fenolicos (mg $eag/g_{biomassa}$)
T55	29,2±0,1[b]	21,2±0,2[b]	13,3±1,7[a]	73,0±7,0[b]	4,6±0,9[b]	32,9±0,7[a]
A55	48,8±0,2[a]	52,7±1,4[a]	16,6±1,1[a]	87,5±3,9[a]	10,7±0,7[a]	33,5±3,0[a]

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios (p<0,05). T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5).

A diferença ΔE (12,10±1,68) mostrou que houve diferença de cor facilmente perceptível entre as amostras. De acordo com os parâmetros de cor (L *, a *, b*) o extrato produzido com o tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 5,5) possui maior ($p<0,05$) luminosidade e uma coloração com mais intensidade no vermelho que o extrato produzido com água destilada (pH 5,5), que possui maior intensidade na cor azul. A diferença dos parâmetros de cor pode ser explicada pelo maior ($p<0,05$) teor de ficocianina no extrato A55 em relação ao T55 (6,9±0,7 e 4,5±1,2 $mg_{PC}/g_{biomassa}$, respectivamente). Justificado pelo fato que o pigmento fotobiliproteico de cor azul é extraído juntamente com a ficoeritrina, aumentando o %PSR. Apesar de modificar a cor do extrato e a aplicabilidade deste como corante alimentar, essa ficobiliproteína possui alto potencial antioxidante e antimicrobiano, tanto contra bactérias gram positivas e negativas (Hajiyeva *et al*., 2025; Yu *et al*., 2024), podendo melhorar essas propriedades no extrato aquoso rico em proteínas e aumentando seu potencial como aditivo alimentos, evitando a oxidação e degradação microbiológica de alimentos (Ghany; Abdel, 2015; Pașca; Coroian; Socaci, 2018)

Os maiores teores recuperados de sólidos, cinzas e carboidratos para o extrato A55, em relação ao T55 ($p<0,05$) demonstram a menor seletividade da água para obtenção da ficoeritrina em relação ao tampão fosfato (0,1 mol/; pH 5,5). O conteúdo fenólico de ambos os extratos foi estatisticamente igual ($p>0,05$). Apesar do potencial biotecnológico dos compostos fenólicos das microalgas (Cichoński; Chrzanowski, 2022), devido ao alto valor agregado da ficoeritrina, e do potencial dos ácidos graxos e polissacarídeos sulfatados, os estudos sobre o conteúdo fenólico da *P. purpureum* ainda são escassos (Nguyen *et al*., 2024).

Rudi *et al*. (2025), ao utilizarem micro-ondas e ciclos de congelamento e descongelamento em uma extração aquosa da *P. purpureum*, obtiveram conteúdos fenólicos entre 70,5 mg $eag/g_{biomassa}$ (micro-ondas; 300 W; 30 s) e 18,7 mg $eag/g_{biomassa}$ (congelamento e descongelamento). Tais valores são próximos aos encontrados neste estudo. No trabalho citado, os teores de proteína e carboidrato recuperados variaram em faixas próximas (4,2~16,2% e 4,0~9,3%, respectivamente). Por outro lado, para o extrato A55, o teor recuperado de proteínas foi 4 vezes superior ao de carboidratos (11,4±0,5% e 2,6±0,2%, respectivamente), enquanto para o T55 foi 8 vezes superior (9,5±0,9% e 1,1±0,2%, respectivamente). Ficou evidenciado a maior seletividade das extrações assistidas por ultrassom para as proteínas em relação aos carboidratos, quando comparadas às realizadas por micro-ondas ou ciclos de congelamento e descongelamento.

Os compostos fenólicos possuem propriedades de oxi-redução, com capacidade para absorver e neutralizar radicais livres, desativando espécies reativas como o oxigênio singleto e decompondo peróxidos (Agustina *et al*., 2020). Com mecanismos que envolvem disrupção

celular, desnaturação proteica e enzimática, dano oxidativo e inibição da comunicação bacteriana (*quorum sensing*), esse conteúdo fenólico também tem potencial para aumentar a atividade antimicrobiana (Dembińska *et al*., 2025). Há evidências que ocorre sinergia entre as ficobiliproteínas, peptídeos e conteúdo fenólico dos extratos, que poderia contribuir para a melhora das atividades antioxidantes individuais (Zhang *et al*., 2025).

O perfil de fenólicos observado para cada extrato (Tabela 8) demonstra que há uma maior extração dos ácidos cumárico e ferúlico em relação aos demais, e que há uma maior extração ao se utilizar tampão fosfato (0,1 mol/L), em relação à água destilada. No entanto, é possível observar a baixa concentração destes, com diversos compostos com concentrações menores que o limite de quantificação do método analítico A exemplo, o ácido ferúlico apresentou uma concentração de 0,681±0,006 µg/mL no extrato T55. Um aumento da concentração seria possível ao remover o solvente presente no extrato, como em processos de liofilização.

Tabela 8 - Perfil de fenólicos ($\mu g/g_{biomassa}$)

Fenólico	**T55**	**A55**
Ácido protocatecuico	$3,5\pm0,2^{C}$	<LD
Ácido clorogênico	$11,5\pm0,7^{B}$	<LD
Ácido hidroxibenzoico	$1,5\pm0,1^{D}$	<LD
Ácido cafeico	$4,2\pm0,2^{C}$	<LD
Ácido siríngico	$3,5\pm0,3^{C}$	<LD
Vanilina	<LD	<LD
Ácido cumárico	$33,6\pm0,3^{Aa}$	$31,0\pm0,2^{Ab}$
Ácido ferúlico	$34,0\pm0,3^{Aa}$	$28,3\pm0,0^{Bb}$

***** Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa na concentração entre os compostos do mesmo extrato ($p<0,05$), já letras minúsculas distintas nas mesmas linhas indicam que há diferença significativa na concentração do composto entre os extratos ($p<0,05$). T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5). <LD – Abaixo do limite de detecção, concentração do composto menor que limite de detecção do método.

O ácido ferúlico, abundante em grãos como trigo, milho e cevada, é um potente antioxidante e anti-inflamatório, que também possui ação anticarcinogênica, antimicrobiana e antiviral (Pyrzynska, 2024; Tang *et al*., 2025). Papadaki *et al.* (2024), em um estudo extraindo o composto a partir do farelo de trigo, obtiveram rendimentos que variaram entre valores próximos de 32,6 µg/g ou maiores de 2158,6 µg/g, utilizando etanol 60% a 90 ºC e hidrólise

alcalina (NaOH 2 mol/L; 40 ºC, 4 h), respectivamente. Essa variação dos rendimentos obtidos para a mesma matriz demonstra o potencial para melhora do rendimento de extração observado.

O ácido cumárico, também presente em frutas e ervas, possui além de uma alta capacidade antioxidante, um potencial anticarcinogênico comprovado em estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo um promissor nutracêutico (Tehami *et al*., 2023). Em um estudo com a microalga *Tisochrysis lutea*, Čmiková *et al.* (2024) obtiveram um rendimento de somente 0,36 μg/g para extração desse composto utilizando metanol 80%.

De maneira geral, o rendimento na extração de compostos fenólicos de microalgas é pequeno ou inexistente. Ainda no estudo de Čmiková *et al*. (2024), não foram identificadas a presença do ácido clorogênico em nenhuma das 5 espécies estudadas (*Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii* e *Tisochrysis lutea*). Vale salientar também que, para a microalga *Chaetoceros muelleri*, não foram detectados nenhum dos 8 fenólicos analisados no estudo. No entanto, o rendimento de ácido hidroxibenzoico variou entre 1,6 μg/g (*Tetraselmis chuii*) e 11,0 μg/g (*Thalassiosira weissflogii*), valores maiores que os observados nesse estudo. Os achados demonstram a variabilidade dos compostos fenólicos, que dependem de fatores de cultivo como a irradiância (Kepekçi e Saygideger, 2012). Além disso, demonstra a possibilidade da utilização de solventes aquosos para essa extração, com melhor rendimento sendo observado ao se utilizar o tampão fosfato, além do potencial da *P. purpureum* quando comparado a outras microalgas.

5.2.2. Secagem do extrato aquoso rico em ficoeritrina

A secagem do extrato aquoso rico em ficoeritrina foi realizada por congelamento (-80 ºC; 48h) seguido de liofilização (-54 ºC; 50 μHg; 72h). Esses liofilizados foram identificados como T55L (extrato aquoso obtido com tampão fosfato (0,1 mol; pH 5,5), liofilizado) e A55L (extrato aquoso obtido com água destilada, (pH inicial 5,5), liofilizado). Na Tabela 9 são apresentadas as características dos extratos liofilizados T55L e A55L.

Tabela 9 - Características dos extratos liofilizados T55L e A55L

Extrato	Umidade (%)	Proteína (%)	Ficoeritrina (mg PE/$g_{liofilizado}$)	Ficocianina (mg PC/$g_{liofilizado}$)	Fenólicos (mg eag/$g_{liofilizado}$)
T55L	7,8±1,2^{a}	13,6±0,3^{b}	7,5±0,2^{ab}	2,4±0,6^{b}	31,7±1,0^{a}
A55L	9,4±0,7^{a}	17,5±0,4^{a}	23,3±0,6^{a}	14,4±0,7^{a}	22,2±2,2^{b}

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado

Houve maior degradação das proteínas, da ficoeritrina e da ficocianina no extrato T55L quando comparado ao A55L. Especialmente a ficoeritrina, que nos extratos T55 e A55 era igual ($p>0,05$), acabou por apresentar um teor quase 3 vezes menor no T55L quando comparado ao A55L. A etapa de congelamento, presente no processo de liofilização, causa uma cristalização seletiva do agente tamponante, especialmente para o fosfato dissódico do tampão utilizado na extração (Thorat; Suryanarayanan 2020). Esse processo causa o aumento da proporção molar de $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}, diminuindo em até 4 unidades o pH. Essa mudança brusca, aliada ao estresse adicional do congelamento e de desidratação na matriz, levou a desnaturação irreversível do conteúdo proteico, mesmo após a reidratação (Du *et al*., 2024; Pikal-Cleland; Carpenter, 2001).

No entanto, esta diminuição do pH durante o congelamento não afetou o conteúdo fenólico, que se manteve estável. Essa estabilidade do conteúdo fenólico já era esperada, com estudos demonstrando não só a pouca sensibilidade desses compostos a pH ácidos (Friedman; Jürgens, 2000), mas também uma possível melhora das propriedades antioxidantes (Yu *et al*., 2022). Rudi *et al*. (2025) ao utilizar *spray-dryer* para secagem de um extrato aquoso da *P. purpureum* obteve perdas de até 25,1% do conteúdo fenólico, uma perda maior que a observada neste estudo. A preservação da ficoeritrina por liofilização carece de estudos, apesar de autores (Chamari *et al*., 2024; Silva-Núñez; Donoso-Quezada; González-Valdez, 2023) demonstrarem a eficiência na preservação do composto utilizando alginato em métodos como o *spray-dryer*. A conservação dos teores de ficoeritrina e de ficocianina também foram observadas neste estudo para o extrato A55L.

A diferença na coloração de ambos os extratos aquosos refletiu nos extratos liofilizados (Figura 10). Essa diferença visual foi comprovada pelo ΔE (13,62±1,39) obtido na análise de cor (Tabela 10). Novamente, assim como ocorreu com os extratos T55 e A55, o T55L apresentou maior luminosidade e cor vermelha em relação ao A55L. Apesar da degradação

durante o processo de liofilização da ficoeritrina, (Bermejo-Román *et al*., 2025), o T55L ainda possui uma pigmentação que o torna um potencial corante alimentício natural (Avallone *et al*., 2022).

Figura 10 - Extratos liofilizados (a) T55L e (b) A55L



T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado

Tabela 10 - Análise de cor dos extratos T55L e A55L

Extrato	L *	a *	b*	ΔE
T55L	46,85±1,74[b]	29,36±0,08[b]	5,60±0,21[a]	13,62±1,39
A55L	36,97±0,92[a]	21,12±1,05[a]	9,61±0,09[b]	

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado

A sensibilidade dos compostos do extrato aquoso ao pH, observados na extração (A42, A55, A68 e T55) e durante o processo de congelamento e liofilização (T55L) demonstrou a necessidade de estudos aprofundados sobre o uso deste extrato como aditivo alimentar. É necessário considerar não apenas o pH do alimento onde o composto será inserido, mas também as variações de pH que ocorrem no trato digestivo (pH 1~2), que podem reduzir sua biodisponibilidade (Wang *et al*., 2025). Além disso, deve-se observar a conservação dos compostos de interesse e da cor dos extratos durante o processo de liofilização. Nesse sentido, estratégias como a encapsulação dos compostos, utilizando como matriz transportadora os polissacarídeos provenientes da própria microalga *P. purpureum*, podem se tornam uma alternativa viável.

O perfil de ácidos fenólicos observado (Tabela 11) demonstra que a remoção da água dos extratos aquosos através da liofilização permitiu o aumento da concentração e quantificação dos fenólicos. Ainda é observada a maior presença dos ácidos cumárico e ferúlico em ambos extratos. O resultado encontrado é similar ao observado por Babaei Rad *et al.* (2025), que demonstraram a liofilização do extrato de alcaparra (*Capparis spinosa* L.) como a metodologia de secagem que proporciona o maior acúmulo de ácido cumárico e a que melhor preserva os compostos fenólicos quando comparado com métodos de aplicação de calor.

Tabela 11 - Perfil de fenólicos ($\mu g/g_{liofilizado}$)

Fenólico	T55L	A55L
Ácido protocatecuico	$21,0\pm0,3^{EFa}$	$20,5\pm0,1^{Ea}$
Ácido clorogênico	$31,1\pm0,2^{Ca}$	$30,4\pm0,8^{Ba}$
Ácido hidroxibenzoico	$21,0\pm0,4^{EFb}$	$24,1\pm0,2^{Da}$
Ácido cafeico	$26,5\pm0,1^{Db}$	$28,1\pm0,2^{Ca}$
Ácido siríngico	$22,2\pm0,2^{Ea}$	$18,9\pm0,0^{Fb}$
Vanilina	$19,9\pm0,4^{Fa}$	$19,5\pm0,3^{EFa}$
Ácido cumárico	$70,0\pm0,2^{Aa}$	$61,9\pm0,4^{Ab}$
Ácido ferúlico	$60,9\pm0,5^{Bb}$	$62,7\pm0,4^{Aa}$

***** Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa na concentração entre os compostos do mesmo extrato ($p<0,05$), já letras minúsculas distintas nas mesmas linhas indicam que há diferença significativa na concentração do composto entre os extratos ($p<0,05$). T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado.

No entanto, compostos como o ácido cafeico e o hidroxibenzoico, que sequer atingiram o limite de detecção do método no extrato A55, apresentam aqui maior concentração. Isso demonstra que o processo de liofilização pode ter degradado alguns dos compostos presentes, especialmente no extrato T55L. Skendi *et al.* (2023) ao secar resíduos de orégano, também encontrou a maior degradação do ácido cafeico na liofilização, em relação a métodos de secagem com aplicação de calor. De maneira geral, a menos que exista um interesse específico na obtenção do ácido cumárico ou siríngico, os resultados encontrados demonstram o maior rendimento na extração e preservação durante o processo de liofilização dos compostos fenólicos analisados ao utilizar água com pH inicial de 5,5 como solvente de extração.

Por fim levando em consideração os teores de ficoeritrina, de proteína solúvel e de conteúdo fenólico obtidos, além do menor custo da operação ao se utilizar água destilada ao

invés de um tampão, o extrato A55, obtido com água destilada e ajuste de pH inicial para 5,5, foi definido como o padrão para obtenção do extrato bruto rico em ficoeritrina deste trabalho, bem como o resíduo desta extração foi o escolhido para o restante da extração sequencial. No entanto, a fim de comparação, as bioatividades de todos os extratos (A55, T55, A55L, T55L) foram avaliadas.

5.2.3. Purificação do extrato rico em ficoeritrina

A separação da porção sólida do extrato rico em ficoeritrina foi realizada por filtração em papel filtro (80 g/m²) (Figura 11). Foram analisados (Tabela 12) os teores de ficoeritrina (mg PC/mL), ficocianina (mg PE/mL) e de proteínas solúveis antes e depois da filtração (fração alimentada e permeada, respectivamente). É possível notar que a filtração melhorou a razão ficoeritrina/proteína no extrato, dobrando a sua pureza. No entanto, esse aumento da pureza vem a custo de uma diminuição ($p<0,05$) não só do teor de proteína solúvel, mas também do teor de ficoeritrina. Além disso, a pureza da ficoeritrina em relação ao teor de proteínas somente pode ser considerada satisfatória com valores acima de 0,7 (Kovaleski *et al*., 2022). Por fim, foram necessárias 2 h para obter um volume de 10 mL de permeado, o que inviabilizaria este método sem o uso de pressão para impulsionamento da purificação.

Tabela 12 - Características do extrato A55 antes e após a filtração

Extrato	Fração	Ficoeritrina (mg PE/mL)	Proteína solúvel (mg/mL)	Razão ficoeritrina/proteína
A55	Alimentado	0,253±0,023[a]	2,09±0,05[a]	0,121±0,008[b]
	Permeado	0,207±0,005[b]	0,84±0,05[b]	0,248±0,009[a]

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5)

Figura 11 - Filtração do extrato A55 em papel filtro



Devido ao fato de a etapa de filtração não ter sido suficiente para aumentar a pureza da ficoeritrina para concentrações satisfatórias e do tempo elevado para a purificação do extrato, o extrato A55 não foi purificado, sendo utilizado de maneira bruta para avaliação da sua capacidade antioxidante, antimicrobiana, de retenção de água e óleo e emulsificante.

5.3. EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

5.3.1. Extração alcoólica

A extração alcoólica dos lipídios foi realizada utilizando etanol, metanol e isopropanol, o que resultou nos extratos EtOH, MetOH e IsoOH, respectivamente. O teor de lipídios recuperados em relação à biomassa (g/g; %), a pureza do resíduo (%) e o rendimento em relação ao teor de lipídios na biomassa (g/g, %), comparados com o teor de lipídios extraídos por Folch, estão na Tabela 13. Os extratos EtOH e MetOH, apesar de apresentaram os maiores teores de lipídios ($p>0,05$) recuperados na extração alcoólica, somente o EtOH apresentou teor semelhante ao obtido pelo método de Folch da microalga liofilizada. A menor concentração encontrada no IsoOH é justificada devido a menor polaridade dentre os três solventes utilizados, indicando uma menor afinidade com componentes polares (Kumar *et al*., 2015).

Tabela 13 - Características dos extratos EtOH, MetOH e IsoOH, comparado ao Folch

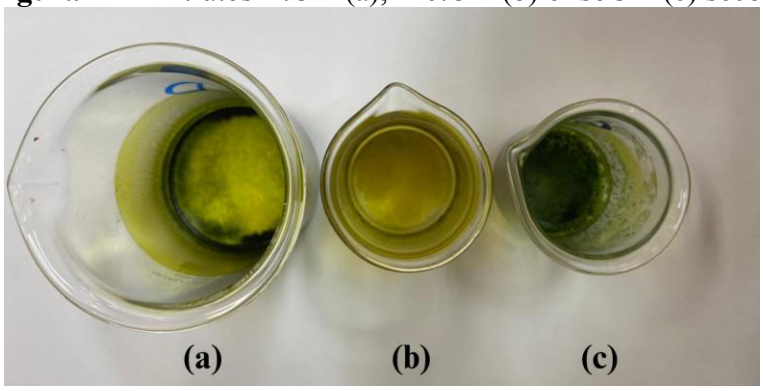
Extrato	Teor de lipídios (%)	Pureza dos lipídios (%)	Rendimento (%)
Folch	$9,1\pm1,0^{a}$	-	-
EtOH	$8,3\pm0,4^{ab}$	$78,6\pm2,1^{b}$	$71,7\pm1,9^{b}$
MetOH	$3,7\pm0,3^{c}$	$87,6\pm7,9^{b}$	$35,3\pm3,2^{c}$
IsoOH	$6,2\pm1,3^{b}$	$53,2\pm6,5^{c}$	$36,4\pm4,5^{c}$

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). EtOH - Extrato obtido com etanol; MetOH - Extrato obtido com metanol; IsoOH - Extrato obtido com isopropanol

A maior concentração de lipídios encontrada para EtOH e MetOH demonstrou a seletividade destes solventes para lipídios (Soderberg, 2016). No entanto, além do menor teor de lipídios brutos, a polaridade do metanol extrai uma parcela maior de alguns compostos como a clorofila, alterando a pureza e a coloração (Kumar *et al*., 2017), o que justificaria a diferença

de cor observada nos diferentes extratos (Figura 12). Além disso, esses solventes por possuírem uma maior polaridade, extraem não só lipídios, mas também outros compostos com maior polaridade (Soderberg, 2016). Dessa maneira, mesmo os lipídios brutos, que não passem por nenhum tipo de purificação, apresentam potencial aplicação na indústria alimentícia também como emulsificantes, contribuindo não só para a conservação, valor nutricional e menor degradação oxidativa, mas garantindo maior estabilidade das formulações alimentícias em que são empregados (Kavitha *et al*., 2016a; Mackieh *et al*., 2023).

Figura 12 - Extratos EtOH (a), MetOH (b) e IsoOH (c) secos



EtOH - Extrato obtido com etanol; MetOH - Extrato obtido com metanol; IsoOH - Extrato obtido com isopropanol

Porém, as bioatividades de interesse, como as capacidades antioxidante e antimicrobiana podem ser potencializadas pela presença desses compostos não lipídicos. A clorofila presente nas extrações de lipídios possui alta capacidade antioxidante, e pode contribuir para essa bioatividade no extrato (Martins *et al*., 2023) sem desvantagens em termos de qualidade nutricional ou riscos à saúde, apesar de diminuir a aceitabilidade dos consumidores a depender da matriz alimentar que será inserida devido a sua coloração (Olsen; Olsen; Jensen, 2024). O extrato EtOH apresentou um teor de clorofila (a+b) recuperada de 1,44±0,08 $mg_{clorofila}/g_{biomassa}$, um teor de carotenoides (x+c) recuperado de 0,61±0,03 $mg_{caratenoides}/g_{biomassa}$ e o conteúdo fenólico foi de 1,84±0,05 mg $eag/g_{biomassa}$. O conteúdo fenólico encontrado indica que a maioria dos compostos fenólicos presentes na *P. purpureum* foram extraídos na etapa de extração aquosa, devido ao seu caráter hidrofílico (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021).

O rendimento lipídico do extrato EtOH foi similar ao encontrado por Li *et al*. (2021) também para a *P. purpureum*, que obteve rendimento de 74,3% utilizando Etanol 95%. Kiyani *et al*. (2023) ao extrair lipídios da microalga *Pectinodesmus sp*. obtiveram um teor de lipídios similar (aproximadamente 23% em relação a massa utilizada) ao comparar extrações utilizando

etanol 100% e Folch (clorofórmio/metanol; 2:1). Apesar de não ter sido avaliado o teor de pureza dos lipídios obtidos, foram encontrados em análises fitoquímicas a presença de esteroides, cumarina, taninos, fenóis e carboidratos, indicando um menor grau de pureza dos lipídios obtidos por etanol em relação aos lipídios obtidos por misturas de clorofórmio/metanol. Marques *et al*. (2023), também utilizando um método de extração do resíduo por Folch para verificar a pureza, obteve 91% de pureza para os lipídios extraídos por etanol, em método assistido por ultrassom, na microalga *Chlorella vulgaris*.

Ao comparar a extração lipídica utilizando álcoois com métodos como Folch ou Bligh & Dyer, ficou comprovada a maior seletividade destes últimos para os lipídios em relação às extrações alcoólicas. Isso se deve a utilização de uma fase aquosa que remove contaminantes hidrossolúveis, como proteínas, açúcares, sais, dentre outros, (Saini *et al*., 2021). No entanto esta estratégia não pode ser utilizada para limpeza de extratos alcoólicos devido a solubilidade do solvente em água (Soderberg, 2016). A extração com solventes verdes de grau alimentício apresenta ampla variabilidade de resultados. Contudo, o rendimento e a pureza alcançados neste trabalho, se assemelha aos encontrados em trabalhos da literatura com microalgas.

Por fim, apesar da presença de outros compostos, além dos lipídios, obtidos no extrato alcoólico, sua aplicação em alimentos não requer uma maior pureza, e poderia ser utilizado diretamente o extrato bruto alcoólico, como demonstrado por Marques *et al*. (2023). Os autores demonstraram que os lipídios extraídos pelo etanol possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória similar aos obtidos por Folch, e um perfil de ácidos graxos com alta qualidade nutricional e potencial emulsificante. Devido aos maiores teores de lipídios extraídos, pureza, rendimento, e aplicabilidade sem a necessidade de remoção do solvente, pois devido ao seu grau alimentício, o etanol foi o solvente selecionado para a extração dos lipídios na segunda etapa de extração sequencial deste trabalho.

5.3.2. Lipídios Descoloridos

Na Tabela 14 é possível visualizar os resultados de teor de lipídios obtidos por Folch da biomassa liofilizada e da biomassa descolorida, além do teor de lipídios obtidos do primeiro resíduo e do primeiro resíduo descolorido.

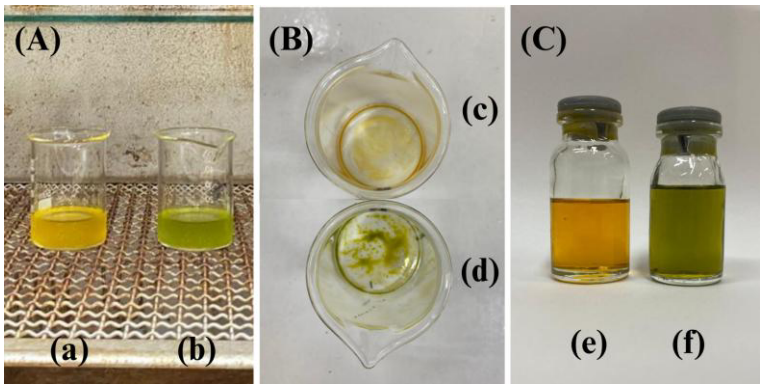
Tabela 14 - Teores de Lipídios obtidos na biomassa liofilizada e no resíduo de extração de ficoeritrina

Biomassa	Descolorida	Solvente	Lipídios obtidos (%)
Liofilizada	Não	Clorofórmio/Etanol (2:1)	9,1±1,0[a]
	Sim		8,2±1,4[a]
Resíduo	Não	Etanol 100%	8,3±0,4[a]
	Sim		3,0±0,6[b]

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$)

Após a etapa de descoloramento da biomassa, não houve diferença significativa ($p>0,05$) do teor de lipídios obtidos em relação à biomassa íntegra. Isso demonstrou a possibilidade de melhora da aplicabilidade em alimentos desses lipídios (Olsen; Olsen; Jensen, 2024), sem perdas significativas no rendimento. Essa melhora é devido a remoção da clorofila, pigmento responsável pela coloração verde, deixando os lipídios obtidos com uma cor amarelada (Figura 13).

Figura 13 - Lipídios da biomassa descolorida (a; c; e) e íntegra (b; d; f); Extraídos por Folch (A) Secos em estufa (25 ºC) (B); e Ressuspensos em Clorofórmio (C)



No entanto, a extração sequencial utilizada neste trabalho, causou uma perda significativa ($p>0,05$) do teor de lipídios recuperados utilizando etanol 100% em ultrassom. Parte dessa perda pode ser justificada pela remoção de compostos que diminuem a pureza do lipídio, como o próprio pigmento fotossintetizante, ou de outros compostos com polaridade similar a mistura utilizada de Etanol 100% e NaOH 1% (1:4; v/v) como foi observado por Li *et al*. (2016), onde esse tratamento removeu uma quantidade significativa de proteínas e carboidratos da biomassa de *Scenedesmus sp*. Devido ao processo de quebra de parede da microalga no tratamento auxiliado por ultrassom, que expõe o conteúdo intracelular e os

fragmentos da parede celular da microalga ao solvente utilizado para descoloramento, facilitando a remoção desses juntamente com a clorofila (Yin *et al*., 2022).

No entanto, o potencial antioxidante e corante alimentar natural dessa clorofila removida ainda poderia ser reaproveitada, como demonstrado por Li *et al*. (2016) que conseguiram recuperar, apesar da baixa pureza, a clorofila obtida no processo de remoção de pigmentos da microalga na forma de Clorofilina Cúprica Sódica, um composto com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias e que pode ser utilizado de maneira segura como suplemento alimentar em humanos (Suryavanshi *et al*., 2020).

Uma análise em espectrofotômetro permitiu estimar o teor de clorofila (Clorofila a + b) presente no sobrenadante (Figura 14), que foi recuperado ($mg_{clorofila}/g_{biomassa}$), sendo encontrados para o sobrenadante da biomassa liofilizada descolorida um teor igual ($p>0,05$) ao sobrenadante do resíduo descolorido, de 1,90±0,08 mg/g e de 2,08±0,25 mg/g, respectivamente, o que demonstrou que ambos os tratamentos removeram o mesmo teor de clorofila. Além disso, esse valor foi maior ($p<0,05$) que o teor de clorofila recuperado na extração etanólica de lipídios (1,44±0,08 mg/g), o que demonstra a eficiência para remoção desse pigmento ao se utilizar uma mistura de Etanol 100% e NaOH 1% (1:4; v/v).

Figura 14 - Biomassa descolorida, utilizando Etanol 100% e NaOH 1% (1:4; v/v) com sobrenadante rico em clorofila



Dessa maneira, os lipídios obtidos na extração sequencial deste trabalho foram extraídos sem a etapa de remoção de clorofila da biomassa, devido a diminuição do rendimento, apesar da menor aceitabilidade em consumidores.

5.4. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Na Tabela 15 é possível verificar as características do terceiro extrato (Figura 15), rico em polissacarídeos (PS), obtidos a partir do resíduo da extração de lipídios. O processo de extração dos polissacarídeos apresentou um pH inicial de 8,59±0,08 e o extrato bruto um pH de 8,96±0,24.

Tabela 15 - Características do extrato rico em polissacarídeos (PS)

	Teor no extrato (mg/mL)	**Teor recuperado (%)**
Biomassa	4,70±0,037	24,3±0,1
Cinzas	0,643±0,092	5,7±0,8
Polissacarídeos	2,87±0,21	49,3±3,6
Proteínas	0,25±0,01	7,9±0,2

Figura 15 - Extrato aquoso rico em polissacarídeos



Para as extrações de polissacarídeos, Chen *et al*. (2024) utilizando água quente (80 ºC; 45 min) recuperou 22,62% da biomassa da *P. purpureum*, já com uma extração assistida por micro-ondas (210 W; 5 min), o rendimento foi de 25,5%. Utilizando *Spirulina* e as microalgas *Tribonema minus* e *Chlorella* sp., os rendimentos para a extração utilizando água quente (80~88 ºC) em relação a biomassa foram de 9,5%, 27,2% e 9,6%, respectivamente (Wabg *et al*., 2018; Huo *et al*., 2022; Song *et al*., 2018). Os rendimentos encontrados neste estudo (24,3±0,1%) são menores ou próximos aos relatados neste trabalho. Vale destacar que tais resultados foram alcançados utilizando-se de resíduos como matéria-prima para a extração.

Há vantagens na utilização de um resíduo de microalga para a obtenção de polissacarídeos. A extração de polissacarídeos, especialmente de microalgas, ocorre em meio alcalino (pH>10), com auxílio de enzimas (Alcalase, Cellulase), ou em equipamentos como o

extrator Soxhlet ($CaCl_2$ 2%; Metanol/Oxalato de Amônio 5%), ultrassom (Etanol) e micro-ondas (Srivastava *et al*., 2025). Esses métodos e solventes além de degradar as ficobiliproteínas presentes na *P. purpureum* (Nguyen *et al*., 2024), por vezes necessitam de uma etapa anterior de descoloramento da microalga (Alboofetileh *et al*., 2019). Dessa maneira, a remoção prévia das ficobiliproteínas e da clorofila, além de descolorir a microalga, agrega valor à microalga através do aproveitamento desses pigmentos. Além disso, foi verificado um baixo teor de proteínas e cinzas no extrato. Isso é resultado das etapas anteriores de extração, que melhoram a pureza deste e poderiam remover a necessidade de etapas de precipitação de polissacarídeos, desproteinização e diálise (Patel *et al*., 2013), o que minimizaria os custos envolvidos na obtenção dos polissacarídeos facilitando seu uso na área de alimentos.

Os polissacarídeos das microalgas, divididos em polissacarídeos de reserva, como glicogênio e amido, ou estruturais, como a celulose (Srivastava *et al*., 2025), possuem aplicações em alimentos. Sua ação antioxidante e antimicrobiana está relacionada à presença de grupos funcionais, que capturam radicais livres e desestabilizam a parede celular e membranas dos micro-organismos (Coma, 2013; Lu *et al*., 2025). No entanto, apesar da baixa compreensão dos mecanismos antimicrobianos dos polissacarídeos, sabe-se que estes mecanismos podem ser potencializados com a presença de conjugados proteicos, de polifenóis, ácidos orgânicos e gorduras (Li *et al*., 2025). Já sua capacidade de modificar a textura dos alimentos está relacionada a sua estrutura, presença de grupos funcionais polares e capacidade de retenção de água e/ou óleo (Srivastava *et al*., 2025). Dessa maneira, os polissacarídeos obtidos neste estudo tendem a possuir maior capacidade de modificar a textura dos alimentos e menor atividade antioxidante e antimicrobiana, devido a remoção das proteínas, compostos fenólicos e ácidos graxos que ocorreram nas etapas anteriores de extração.

5.4.1. Secagem do extrato aquoso rico em polissacarídeos

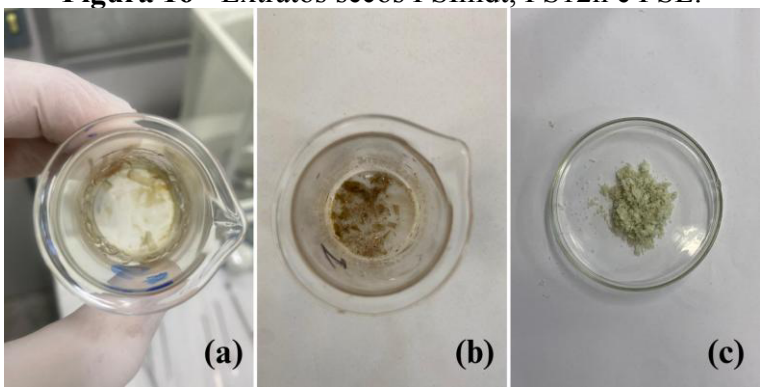
Na Tabela 16 podemos comparar os resultados encontrados tanto para a precipitação de polissacarídeos utilizando etanol 100% (1:2 v/v), seguido da coleta por centrifugação dos agregados de polissacarídeos de maneira imediata (PSImdt) ou após um período de 12 h (PS12h) e secagem em estufa (60ºC), e também a liofilização do extrato rico em polissacarídeos cru, sem a utilização de álcool para a precipitação dos polissacarídeos (PSL) (Figura 16).

Tabela 16 - Características dos extratos secos.

Extrato	Secagem	Polissacarídeos recuperados (%)	Pureza (%)
PSImdt	Estufa (60 ºC)	6,8±1,1[b]	40,4±1,2[ab]
PS12h		6,5±0,4[b]	34,2±2,4[b]
PSL	Liofilização (-54 ºC; 50 μHg; 48h)	21,7±3,8[a]	45,0±6,4[a]

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$).

Figura 16 - Extratos secos PSImdt, PS12h e PSL.



A etapa de precipitação diminui ($p>0,05$) o teor de polissacarídeos recuperados, resultando em perdas no rendimento final, sem aumento significativo da pureza dos polissacarídeos. A precipitação dos polissacarídeos utilizando etanol, apesar de visualmente eficaz (Figura 17), arrastou durante o processo um elevado teor de proteínas residuais (Tabela 17). Isso ocorre porque a precipitação com etanol também é um método de purificação possível para as proteínas, ao formar agregados proteicos facilmente coletáveis (Costa; Farinas; Miranda, 2018).

Importante salientar que o mecanismo para diminuição da solubilidade proteica e coleta dos agregados, através da adição de solventes orgânicos como o álcool, envolve a alteração da energia livre de transferência dos aminoácidos. Essa adição reduz a constante dielétrica do meio, desfavorecendo a interação de grupos polares, muda a conformação proteica, protege as cadeias peptídicas do solvente, expõem grupos hidrofóbicos e induz a formação de estruturas secundárias (α-hélice e β-folha), formando assim os agregados (Yoshikawa *et al*., 2012).

Figura 17 - Agregados de polissacarídeos (PSImdt).

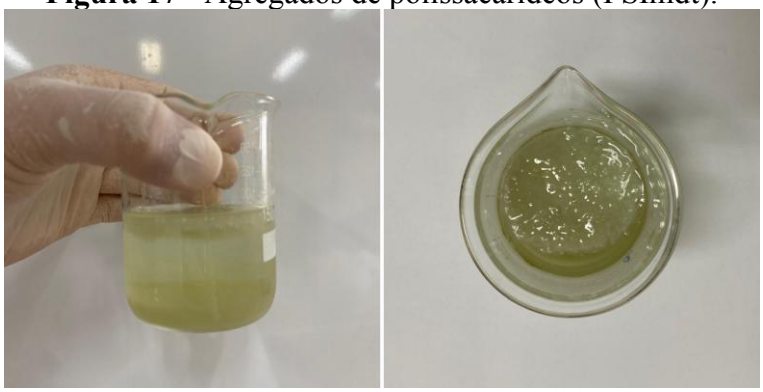


Tabela 17 - Teor de proteínas residuais e de carboidratos dos extratos secos.

Extrato	Proteína residual (%)	Carboidratos (%)
PSImdt	20,5±2,5[a]	40,4±1,2[ab]
PS12h	20,7±3,5[a]	34,2±2,4[b]
PSL	13,7±1,8[b]	45,0±6,4[a]

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$)

Os mecanismos de cavitação ultrassônica, causados pela extração assistida por ultrassom utilizada nas etapas anteriores, causam desnaturação parcial das proteínas e expõem seus grupos hidrofóbicos (Antunez-Medina *et al*., 2025). O solvente utilizado no extrato A55 (água destilada) indica que, apesar do alto teor de proteínas solúveis recuperadas (%PSR) (87,5±3,9%), estas possuem caráter hidrofílico (Wang *et al*., 2024). Assim, há presença de grupos hidrofóbicos e enovelamento nas proteínas presentes no resíduo utilizado para a extração de polissacarídeos. A temperatura (80 ºC) utilizada na etapa de obtenção do extrato PS age nos aminoácidos hidrofóbicos (Van Dijk; Hoogeveen; Abeln, 2015) e causa também desdobramento da estrutura da proteína (Sun; Fu, Y.; Wang, 2022), aumentando a solubilidade em água e permitindo a extração proteica.

Pode-se inferir que a diminuição da temperatura após a centrifugação retorna o caráter hidrofóbico dos aminoácidos presentes, e que a adição do etanol ocasiona o redobramento da estrutura proteica, resultando em uma convergência de fatores que facilita a agregação proteica e aumento da concentração destes nos polissacarídeos ao utilizar uma técnica de precipitação etanólica. Devido ao maior rendimento ($p<0,05$) e pureza semelhante ($p>0,05$), a liofilização foi a técnica escolhida neste estudo como forma de secagem do extrato aquoso rico em polissacarídeos.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO

Na Tabela 18 está apresentada a caracterização do resíduo (RE), após as etapas de extração sequencial de proteínas, lipídios e polissacarídeos. Teor remanescente (relativo à biomassa inicial; %) é composto pela parcela de cada componente da biomassa inicial que não foi recuperada em nenhuma das 3 etapas de extração sequencial. Os resultados encontrados demonstraram a eficiência da extração proposta, evidenciado pelo resíduo final predominantemente composto de minerais, com baixo teor remanescente de proteínas e polissacarídeos.

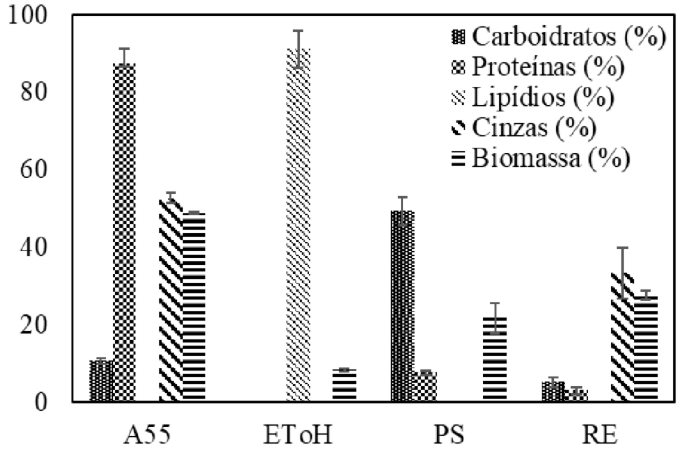
Tabela 18 - Características do Resíduo (RE).

Composto	**Composição proximal do resíduo (%)**	**Teor remanescente (%)**
Carboidratos	4,7±0,2	5,1±1,4
Proteínas	1,5±0,3	3,2±0,6
Cinzas	70,2±13,7	33,4±6,5
Biomassa	-	27,5±1,1

Estudos demonstraram a contribuição do uso de minerais provenientes de microalgas em importantes setores do agronegócio. Na suinocultura, o uso de minerais provenientes de *Chlorella vulgaris* e Spirulina melhoraram a resposta imunológica e densidade óssea de porcos (Prates, 2025). Na aquicultura, promoveram um aumento da retenção lipídica e melhora da qualidade dos filés de salmão (*Salmo salar* L.) (Kousoulaki *et al*., 2016). Assim, apesar de serem necessários maiores estudos sobre o perfil de minerais presentes no resíduo final, este ainda apresenta um potencial de uso que fortalece o objetivo de máximo reaproveitamento da microalga *P. purpureum* desse trabalho.

Vale destacar também a distribuição dos compostos extraídos entre os extratos (Figura 18), o que confirmam a eficiência na obtenção de 4 frações distintas, ricas em proteínas (A55), lipídios (EtOH), polissacarídeos (PS) e minerais (RF).

Figura 18 - Composição em cada etapa de extração sequencial.



A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); EtOH - Extrato obtido com etanol; PS - Extrato obtido com água destilada (T = 80 °C). RE - Resíduo

5.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A padronização dos extratos A55, T55, A55L e T55L para uma concentração de 1 mg/mL, modificou de maneira proporcional a concentração dos demais compostos (Tabela 19). A concentração proteica, o conteúdo fenólico (mg eag/mL) e de ficoeritrina (mg PE/mL) dos extratos T55L, A55, T55L e A55L se diferenciam ($p<0,05$).

A Tabela 20 apresenta a capacidade antioxidante dos extratos pelos métodos de ABTS e DPPH (µmol Trolox/g) e FRAP (µmol Fe II/g). Os resultados encontrados demonstram uma maior ($p<0,05$) capacidade antioxidante para os extratos proteicos T55 e T55L, seguido dos extratos proteicos A55 e A55L, os extratos etanólicos e EtOH e EtOHS e por fim dos polissacarídeos PS e PSL.

Tabela 19 - Proporções de compostos bioativos dos extratos T55L, A55, T55L e A55L.

Extrato	Conteúdo fenólico (mg eag/mL)	Ficoeritrina (mg PE/mL)
T55	0,346±0,007^{a}	0,134±0,018^{b}
A55	0,294±0,026^{b}	0,180±0,005^{a}
T55L	0,233±0,008^{c}	0,052±0,001^{d}
A55L	0,127±0,013^{d}	0,098±0,007^{c}

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado

Tabela 20 - Capacidade Antioxidante dos extratos

Fração rica em	Extrato	ABTS (µmol Trolox/g)	DPPH (µmol Trolox/g)	FRAP (µmol Fe II/g)
Proteína	T55	337,0±21,6^{b}	235,1±13,6^{a}	1552,0±6,7^{a}
	A55	248,6±29,5^{cd}	PRO	719,5±7,8^{b}
	T55L	432,3±35,9^{a}	236,9±28,8^{a}	1481,4±14,4^{a}
	A55L	276,9±10,5^{bc}	PRO	818,1±20,2^{b}
Ácidos Graxos	EtOH	162,2±7,1^{e}	71,6±4,2^{b}	450,4±11,6^{c}
	EtOHS	185,5±2,8^{de}	57,4±4,8^{c}	291,6±16,0^{d}
Polissacarídeo	PS	39,4±3,5^{g}	PRO	209,7±13,1^{d}
	PSL	55,2±1,5^{f}	PRO	63,8±6,6^{e}

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). PRO - Ação pro-oxidante (leitura abs amostra > controle). T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado; EtOH - Extrato obtido com etanol; EtOHS - Extrato obtido com etanol, seco em estufa (60 ºC); PS - Extrato obtido com água (80 ºC); PSL - Extrato obtido com água (80 ºC), liofilizado.

Apesar da mesma concentração proteica, ajustada para a análise, a diferença dos valores nos dos extratos obtidos com tampão fosfato (T55 e T55L) e água destilada (A55 e A55L) podem indicar que o tamanho molecular ou as características das proteínas são diferentes em cada solvente. Proteínas de menor massa molar apresentam maior atividade antioxidante devido à maior facilidade de interação com os radicais livres, como observado durante o fracionamento de hidrolisados proteicos por Liu *et al*. (2017). Além disso, a influência dos demais compostos (ficoeritrina e conteúdo fenólico) na capacidade antioxidante deve ser considerada.

A padronização dos ensaios para 1 mg/mL de compostos bioativos promoveu um aumento proporcional no conteúdo fenólico dos extratos T55 e T55L. Estudos com microalgas (Scaglioni *et al*., 2018) demonstraram a elevada capacidade antioxidante desses compostos, quando isolados. A maior seletividade do extrato T55, em detrimento às proteínas, pode justificar a maior atividade antioxidante promovido pelo conteúdo fenólico

O baixo conteúdo fenólico (1,84±0,05 mg eag/$g_{biomassa}$) e a alta pureza (78,6±2,1%) do extrato EtOH demonstrou que a atividade antioxidante dos extratos EtOH e EtOHS foram consequência do teor lipídico, e não de outros compostos. Vale ressaltar que esta atividade antioxidante poderia estar associada ao perfil de ácidos graxos (Beekrum; Amonsou, 2023).

Estudo de Wang *et al*. (2016) indica que polissacarídeos purificados apresentaram menor atividade antioxidante que polissacarídeos brutos, devido a remoção das proteínas, pigmentos e conteúdo fenólico, que contribuem para a neutralização dos radicais livres. Assim, os resultados observados nesse estudo comprovam esse comportamento, com o extrato A55 e A55L, com maior proporção de polissacarídeos (PS e PSL). Isto está alinhado aos resultados dos estudos (Chen; Zheng; Ouyang; 2023; Wang *et al*., 2009), em que a sulfatação dos polissacarídeos extraído de algas aumenta a capacidade antioxidante, pode-se concluir que as bioatividades dessas frações é resultado direto da presença de grupos sulfatados.

5.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Neste experimento, as concentrações de cada extrato também foram padronizadas para 1 mg/mL do composto alvo, e a capacidade antimicrobiana dos extratos avaliados estão na Tabela 21. Com uma concentração de 1 mg/mL, somente o controle positivo (cloridrato de ciprofloxacino) apresentou uma atividade antimicrobiana satisfatória, com um halo de inibição passível de quantificação na triplicata (Figura 19). Nessa concentração, os extratos contendo lipídios (EtOH e EtOHS) apresentaram, para a *B. cereus* (Figura 20), um halo de inibição mensurável (11 e 14 mm, respectivamente). No entanto, segundo a CLSI (2012), além da formação de somente um halo ser insuficiente para indicar suscetibilidade bacteriana, halos menores que 15 mm geralmente indicam resistência na concentração testada. Por ser uma bactéria gram positiva, a maior suscetibilidade da *B. cereus* em análises de atividade antimicrobiana é esperada (Jubeh; Breijyeh; Karaman, 2020).

Tabela 21 - Avaliação do halo de inibição (mm) dos extratos (1 mg/mL).

Fração rica em	Extrato	*B. Cereus* ATCC 10876 (mm)	*E. coli* ATCC 25922 (mm)
Controle	Positivo	44,0±2,0	38,7±1,5
	Negativo	-	-
Proteína	T55	-	-
	A55	-	-
	T55L	-	-
	A55L	-	-
Lipídios	EtOH	14	-
	EtOHS	11	-
Polissacarídeo	PS	-	-
	PSL	-	-

T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado; EtOH - Extrato obtido com etanol; EtOHS - Extrato obtido com etanol, seco em estufa (60 ºC); PS - Extrato obtido com água (80 ºC); PSL - Extrato obtido com água (80 ºC), liofilizado.

Figura 19 - Halo de inibição formado pelo antibiótico Cloridrato de Ciprofloxacino (1 mg/mL) - Controle positivo. (a) *Bacillus cereus* (b) *Escherichia coli.*

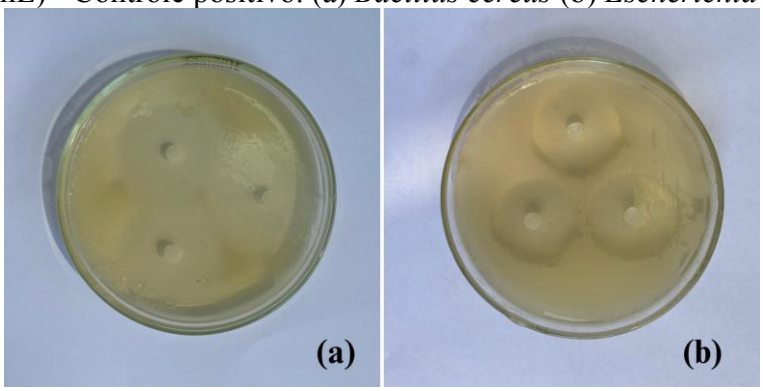
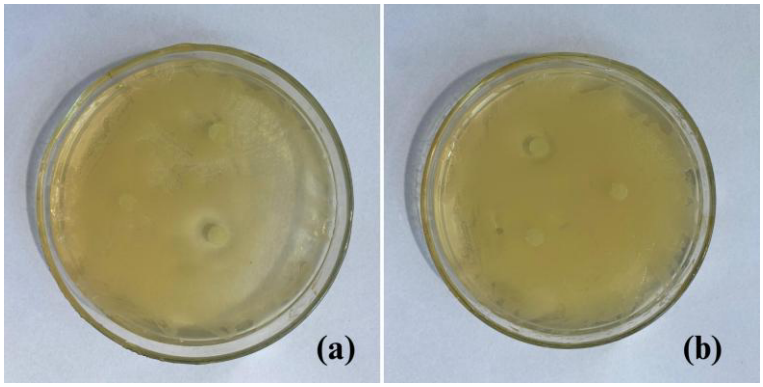


Figura 20 - Halo de inibição, falso positivo, formado pelos extratos (a) EtOHs e (b) EtOH na *Bacillus cereus*.



A atividade antimicrobiana foi novamente avaliada em uma maior concentração dos extratos secos (A55L, T55L, EtOHS e PSL, 10 mg/mL). No entanto, nenhum dos extratos na maior concentração demonstrou halo de inibição mensurável, inclusive o extrato EtOHS, o que comprova como falso-positivo o resultado encontrado no experimento com 1 mg/mL. A alta viscosidade dos extratos a uma concentração de 10 mg/mL impediu a realização de teste em maiores concentrações.

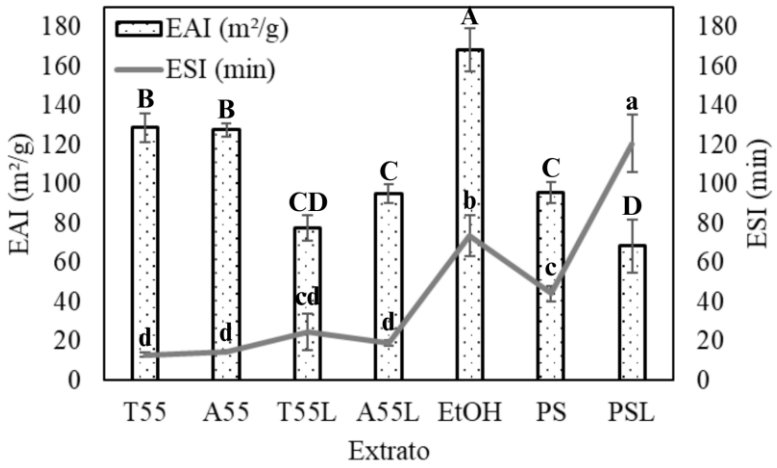
Fatores como tamanho da cadeia (< 100 aminoácidos), hidrofobicidade (~50% dos resíduos serem hidrofóbicos) e conformação específica das estruturas secundárias (α-hélice, folha-beta) afetam positivamente a atividade antimicrobiana de proteínas e peptídeos (Ma *et al*., 2024). O caráter hidrofílico dos extratos A55, T55, A55L e T55L, aliado a quebra proteica e mudança estrutural ocasionado pelo tratamento com ultrassom (Wang *et al*., 2024; Antunez-Medina et al., 2025) podem ter modificado essas características, nas proteínas de origem microalgal com atividade antimicrobiana (Rapp *et al*., 2025) diminuindo esta nestes extratos.

Como já mencionado, a capacidade antimicrobiana de polissacarídeos pode estar relacionada à presença de conjugados proteicos, de polifenóis, ácidos orgânicos e gorduras (Li *et al*., 2025). A remoção destes nas etapas anteriores de extração pode ter diminuído ou até eliminado o potencial antimicrobiano conforme o observado em estudos anteriores que utilizaram polissacarídeos sulfatados da *P. purpureum* (Hlima *et al*., 2021). A purificação de compostos fenólicos ou ácidos graxos específicos, poderia melhorar a capacidade antimicrobiana destes, ou até mesmo a utilização combinada dos extratos A55L, T55L, EtOHS e/ou PSL poderia resultar em um novo extrato com este potencial. No entanto, de maneira isolada e nas condições de extração utilizadas nesse trabalho, não foi verificada a atividade antimicrobiana significativa para nenhum dos extratos.

5.8. CAPACIDADE EMULSIFICANTE

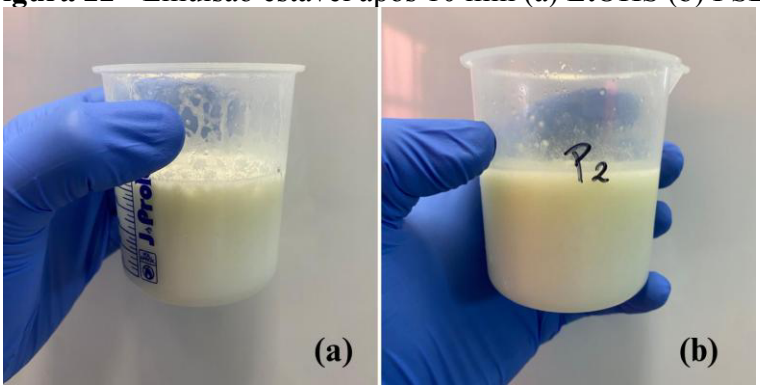
As concentrações de cada extrato foram padronizadas para 1 mg/mL do composto alvo, e o resultado das capacidades emulsificantes dos extratos estão apresentados na Figura 21. Os resultados encontrados indicam que as frações apresentam alta capacidade emulsificante, com destaque para os lipídios, com EAI de 168,4±11,0 m²/g. A estabilidade da emulsão (ESI) tem como destaque o extrato EtOH, rico em ácidos graxos e a PSL, rica em polissacarídeos liofilizados (73,6±10,4 e 120,6±14,7 min, respectivamente). Ambas as emulsões, mesmo com separação discreta das fases após o período de 10 min, ainda estavam visualmente estáveis (Figura 22).

Figura 21 - Capacidade emulsificante dos extratos.



*Letras maiúsculas nas colunas indicam que há diferença significativa entre os ensaios EAI (m²/g) ($p<0,05$), já letras minúsculas na linha indicam que há diferença significativa entre os ensaios ESI (min) ($p<0,05$), T55 - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5); T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55 - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5); A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado; EtOHS - Extrato obtido com etanol, seco em estufa (60 ºC); PS - Extrato obtido com água (80 ºC); PSL - Extrato obtido com água (80 ºC), liofilizado.

Figura 22 - Emulsão estável após 10 min (a) EtOHS (b) PSL.



EtOHS - Extrato obtido com etanol, seco em estufa (60 ºC); PSL - Extrato obtido com água (80 ºC), liofilizado.

Diversos são os estudos que verificam a capacidade emulsificante de proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos. Eskandari; Peighambardoust; Sarabandi (2025) estudaram a capacidade emulsificante de proteínas de nozes, com um EAI de 62,7 m²/g para a proteína da avelã e da proteína do leite concentrada (*whey protein*, 85,1 m²/g), com um ESI (min) de 62,7 e 70,8 (min), respectivamente. As proteínas extraídas da *C. vulgaris* em solução alcalina (NaOH 0,5 mol/L) apresentaram um EAI de 107,0 m²/g e um ESI de 16,8 min (Ng *et al*., 2024). As proteínas obtidas da *C. pyrenoidosa* e da *N. oceanica* apresentaram, em pH 3, um EAI de 63,6 e 59,5 m^2/g e um ESI de 17,5 e 15,8 min, respectivamente (Chen *et al*., 2019). Estes estudos indicam a importância do método de obtenção das proteínas e a matriz de origem.

Essa variação na capacidade emulsificante das proteínas, decorrente do processamento, pode ser observada ao comparar os pares A55/T55 e A55L/T55L. O processo de liofilização altera a conformação proteica e induz a sua desnaturação pela ausência de água ligada (Du *et al*., 2024; Pikal-Cleland; Carpenter, 2001), o que prejudica a capacidade emulsificante dos extratos A55L e T55L, embora não comprometa a estabilidade da emulsão. Nesse sentido, métodos alternativos de secagem podem ser vantajosos, caso o objetivo seja a obtenção de aditivos alimentares emulsificantes. Além disso, mesmo com teores distintos de ficobiliproteínas, polissacarídeos, minerais e conteúdo fenólico, os extratos (A55/T55 e A55L/T55L), quando ajustados na mesma concentração proteica, apresentaram EAI (m²/g) e ESI (min) estatisticamente iguais. Isso demonstra que o teor proteico é o fator determinante para esta bioatividade nestes extratos aquosos.

Fosfolipídios, sintetizados via acidólise enzimática com óleo de palma e ômega-3 extraídos de resíduos de atum, apresentaram um EAI de 265,6 m²/g e um ESI 124,6 min, valores maiores que o deste estudo. No entanto, os fosfolipídios empregados tinham tempo prolongado para síntese (>48 h) utilizando solventes e reagentes tóxicos (Estiasih; Marianty; Ahmadi,

2021). A obtenção de lipídios com um EAI elevado empregando solvente verde (etanol) sem nenhuma etapa posterior de síntese ou purificação é vantajosa para a segurança alimentar. Devido o foco na produção de biocombustíveis a partir de microalgas, ainda são escassos os estudos da capacidade emulsificante de seus lipídios. A composição de mono e diglicerídeos das microalgas, apesar de extremamente atrativa para a exploração e desenvolvimento de emulsificante alimentícios, tem como desafios a extração e purificação (Ferreira *et al*., 2021). O elevado potencial emulsificante dessa fração poderia ser intensificado com a aplicação de etapas de purificação em ácidos graxos específicos.

Até o momento, não constam estudos que verifiquem a capacidade emulsificante das proteínas e ácidos graxos obtidos da microalga *P. purpureum*. No entanto, seus exopolissacarídeos, precipitados por etanol e purificados por diálise, podem apresentar EAI de até 77,2 m²/g e um ESI de até 55,2 min (Hlima *et al*., 2021), valores próximos aos encontrados para os extratos PS (95,7±5,2 m²/g) e PSL (68,5±13,6) ricos em polissacarídeos. Esses resultados demonstram que tanto os polissacarídeos presentes na parede quanto os exopolissacarídeos expelidos no meio de cultivo possuem capacidade emulsificante semelhante. Os polissacarídeos obtidos nesse estudo que mostraram capacidade emulsificante na forma bruta apresentam potencial interessante pelo menor custo de produção e maior facilidade na aplicação em matrizes alimentares (Pan *et al*., 2022).

Por fim, apesar da boa capacidade emulsificante dos extratos, a baixa estabilidade apresentada pelos extratos proteicos T55, A55, T55L e A55L, pelo extrato polissacarídico PS e a menor capacidade emulsificante do extrato PSL, o extrato rico em lipídios acaba sendo o mais indicado para uso como emulsificante.

5.9. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E ÓLEO

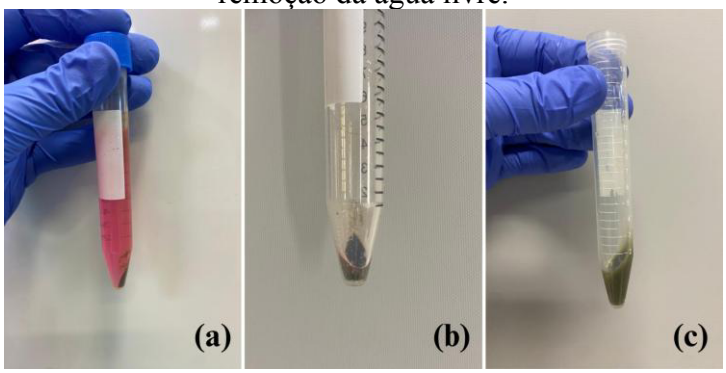
A capacidade de retenção de água (CRA) e de óleo (CRO) dos extratos liofilizados podem ser verificados na Tabela 22. Cabe destacar o maior CRA e CRO dos polissacarídeos da *P. purpureum*, em relação às suas proteínas, em especial para a capacidade de retenção de água do extrato PSL, que foi 9 vezes maior que o extrato proteico A55L e 59 vezes maior que o T55L. Além disso, o valor menor que 1 encontrado para o T55L indica perdas do material durante a análise. A coloração rosa, típica da ficoeritrina, do sobrenadante, e o baixo volume de material retido no tubo após a análise confirmam esta possibilidade de solubilização na água (Figura 23). O contrário foi observado no PSL, em que há um aumento de volume da massa retida, o que indica a absorção de água pelo material.

Tabela 22 - Capacidade de retenção de água (CRA) e de óleo (CRO) dos extratos.

Fração rica em	Extrato	CRA (g/g)	CRO (g/g)
Proteína	T55L	0,2±0,1^{c}	5,2±0,1^{b}
	A55L	1,4±0,1^{b}	4,5±0,4^{b}
Polissacarídeo	PSL	13,0±1,2^{a}	7,2±0,2^{a}

*Letras distintas na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os ensaios ($p<0,05$). T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; A55L - Extrato obtido com água destilada (pH inicial 5,5), liofilizado; PSL - Extrato obtido com água (80 ºC), liofilizado.

Figura 23 - (a) T55L após centrifugação (b) T55L após remoção da água livre (c) PSL após remoção da água livre.



T55L - Extrato obtido com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH inicial 5,5), liofilizado; PSL - Extrato obtido com água (80 ºC), liofilizado.

Isolados proteicos obtidos a partir da *Arthrospira.* (*Spirulina*) *platensis*, obtidas em tampão acetato (0,005 mol/L; pH 10) sob agitação e secos a temperatura ambiente em fluxo laminar, apresentaram uma CRA e uma CRO de 4,3 e 2,5 g/g, respectivamente em pH 10 (Benelhadj *et al*., 2016). As proteínas da *S. platensis* obtidas por micro-ondas e secas em estufa (60 ºC; 12 h) apresentaram um CRA de 1,6 g/g (Wulan *et al*., 2025). As proteínas descoloridas da *Haematococcus pluvialis*, obtidas em tampão fosfato (0,05 mol/L; pH 10) e liofilizadas tinham CRA e um CRO de 4,1 e 3,3 g/g, respectivamente (Zhu *et al*., 2019). Apesar de não terem sido encontrados estudos da CRA e CRO para polissacarídeos da *P. purpureum*, seus exopolissacarídeos do meio de cultivo obtidos por precipitação etanólica e liofilizados apresentaram CRA e CRO de 18,5 e 15,2 g/g, respectivamente, valores maiores que os observados neste estudo (Hlima *et al*., 2021).

A variação da CRA e CRO encontrados na literatura, foram controversos aos encontrados neste estudo, novamente reforçando a importância do pH e método de obtenção,

especialmente das proteínas para esta funcionalidade. Proteínas com menor massa molar não possuem uma estrutura que possa capturar a água ou óleo, se baseando apenas em interações hidrofílicas e hidrofóbicas de seus aminoácidos (Zheng *et al*., 2025). O tratamento auxiliado por ultrassom que causa uma desnaturação parcial das proteínas, diminui sua massa molar e expõem seus grupos hidrofóbicos (Antunez-Medina et al., 2025), e parece ter limitado especialmente a CRA das proteínas da *P. purpureum* (Ma *et al*., 2022). Apesar dos grupos hidrofóbicos expostos durante esta etapa garantirem CRO, ela ainda é menor ($p<0,05$) que a observada pelos polissacarídeos. Por fim, há uma melhor CRA e CRO em proteínas e polissacarídeos quando em pHs ácidos (pH<5) ou básicos (pH>9) (Benelhadj *et al*., 2016) o que resulta em uma desvantagem para os extratos proteicos T55L e A55L, que após a extração (T55 e A55) apresentaram pH de 5,85±0,14 e 7,12±0,05.

Uma alta CRA melhora a textura alimentar e garante maior viscosidade e estrutura nos alimentos e maior CRO resulta em uma melhora da palatabilidade dos alimentos, retendo sabor em produtos alimentícios, características que aumentam a aceitabilidade dos consumidores (Aurino *et al*., 2025). Dessa maneira, o extrato PSL é o mais adequado para a utilização com este fim em alimentos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo demonstraram a viabilidade técnica e o potencial bioativo e biotecnológico da microalga *P. purpureum* para a obtenção de aditivos alimentares naturais. O fracionamento permitiu maior compreensão da aplicabilidade de cada extrato, facilitando a proposição de cultivo direcionado a maximizar a fração adequada para aproveitamento em aditivos alimentares específicos.

Foi demonstrada a importância do controle do pH para a extração de compostos como as proteínas solúveis e a ficoeritrina. No extrato obtido a um pH de extração ideal de 5,5, foram recuperados 87,5±3,9% das proteínas da microalga, e foi verificada uma atividade antioxidante de 432,3±35,9 μmol Trolox/$g_{proteína}$, 236,9±28,8 μmol Trolox/$g_{proteína}$ e 1481,4±14,3 μmol Fe II/$g_{proteína}$, para os métodos de ABTS, DPPH e FRAP, respectivamente. No entanto, a atividade antioxidante foi atribuída a presença dos compostos fenólicos. O tipo de solvente utilizado nessa extração proteica pode influenciar a qualidade do extrato liofilizado final, afetando significativamente parâmetros de cor, e o liofilizado obtido com tampão fosfato (0.1 mol/L; pH 5,5) apresentou um conteúdo proteico e de ficoeritrina 22,3% e 67,8% menor, respectivamente.

Foi verificado um rendimento de 71,7±1,9% na extração de lipídios utilizando etanol, e que a utilização de temperatura branda (60 ºC) não afeta a sua capacidade antioxidante. Este extrato seco apresentou as melhores capacidade emulsificante (EAI = 168,4±11,0 $m^2/g_{lipídio}$) e de estabilidade de emulsão (ESI = 73,6±10,4 min).

O extrato rico em polissacarídeos recuperou 49,3±3,6% dos carboidratos da biomassa e, após liofilização, apresentou a melhor capacidade de retenção de água (CRA = 13,0±1,2 $g/g_{polissacarídeo}$) e de óleo (CRO = 7,2±0,2 $g/g_{polissacarídeo}$).

A extração sequencial proposta permitiu recuperar de forma satisfatória os componentes funcionais da microalga *P. purpureu*m em um curto período de tempo, e salientou os cuidados necessários com durante as etapas de extração e secagem não observados em estudos anteriores. Por fim, a pesquisa mostrou elementos que permitem validar a *P. purpureum* como um insumo versátil para a produção de aditivos alimentares naturais.

7. RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

O processo de extração das microalgas resultou em um resíduo sólido orgânico, que foi caracterizado e descartado em local apropriado. As análises de composição centesimal, proteínas solúveis totais, composição lipídica, carboidratos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e atividade emulsificante tiveram seus resíduos analíticos identificados e destinados ao local de descarte apropriado.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a modulação dos parâmetros de cultivo como irradiância, salinidade e níveis de nitrogênio a fim de maximizar a produtividade de compostos específicos, como a ficoeritrina, compostos fenólicos, ácidos graxos e polissacarídeos.

Investigar o uso dos próprios polissacarídeos da *P. purpureum* como matriz transportadora e agente encapsulante, com objetivo de proteger pigmentos e compostos fenólicos durante o processo de secagem.

Realizar ensaios de digestão *in vitro* para verificar como as variações de pH do trato digestivo podem afetar a estabilidade e absorção dos compostos bioativos.

Caracterizar o resíduo mineral final para validar seu potencial uso como fertilizante ou suplemento na nutrição animal ou humana.

Testar a incorporação dos extratos em alimentos para verificar a melhora das

propriedades sensoriais para validar a aceitação sensorial e garantir a estabilidade do alimento.

Testar a incorporação dos extratos em matrizes poliméricas para verificar a melhoria das propriedades mecânicas e bioativas de filmes biodegradáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTINA, S.; AIDHA, N.; OKTARINA, E.; SETIAWATI, I. Antioxidant activity of *Porphyridium cruentum* water extracts for cosmetic cream. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. **IOP Publishing**, 2020. p. 012042.

AIELLO, A.; MEDORO, A.; ACCARDI, G.; CALABRÒ, A.; CARRU, C.; CANNAVO, A.; CARUSO, C; CANDORE, G.; SCAPAGNINI, G.; CORBI, G.; DAVINELLI, S. Polyunsaturated fatty acid status and markers of oxidative stress and inflammation across the lifespan: A cross-sectional study in a cohort with long-lived individuals. **Experimental Gerontology**, v. 195, p. 112531, 2024.

AL ALAWI, Abdullah M.; MAJONI, Sandawana William; FALHAMMAR, Henrik. Magnesium and human health: perspectives and research directions. **International journal of endocrinology**, v. 2018, n. 1, p. 9041694, 2018.

ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current research in food science**, v. 4, p. 200-214, 2021.

ALBOOFETILEH, M.; REZAEI, M.; TABARSA, M.; RITTÀ, M.; DONALISIO, M.; MARIATTI, F.; YOU, S; LEMBO, D.; CRAVOTTO, G. Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinia zanardinii*. **International journal of biological macromolecules**, v. 124, p. 131-137, 2019.

ALI, M. S.; HO, T. C.; PARK, J. S.; HAN, J. M.; SURENDHIRAN, D.; LEE, H. J.; ZHANG,W.; CHUN, B. S. Fabrication of smart film based on fish gelatin incorporating phycoerythrin and cellulose nanofibrils to monitor fish freshness. **Food Bioscience**, v. 59, p. 104111, 2024.

ALKANAN, Z. T.; ALTEMIMI, A. B.; YOUNIS, M. I.; Ali, M. R.; CACCIOLA, F.; ABEDELMAKSOUD, T. G. Trends, Recent Advances, and Application of Pulsed Electric Field in Food Processing: A Review. **ChemBioEng Reviews**, v. 11, n. 4, p. e202300078, 2024.

AMIT, S. K.; UDDIN, M. M.; RAHMAN, R.; ISLAM, S. R.; KHAN, M. S. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. **Agriculture & Food Security**, v. 6, p. 1-22, 2017.

ANDRIAMANANTENA, M.; RAZAFIMBELO, F. F.; RAONIZAFINIMANANA, B.; CARDON, D.; DANTHU, P.; LEBEAU, J.; PETIT, T.; CARO, Y. Alternative sources of red dyes with high stability and antimicrobial properties: towards an ecological and sustainable approach for five plant species from Madagascar. **Journal of Cleaner Production**, v. 303, p. 126979, 2021.

ANTUNEZ-MEDINA, J. R.; SUÁREZ-JIMÉNEZ, G. M.; OCANO-HIGUERA, V. M.; TOLANO-VILLAVERDE, I. D. J. ORNELAS-PAZ, J. D. J.; TORRES-ARREOLA, W.; MÁRQUEZ-RÍOS, E. Application of Ultrasound in Proteins: Physicochemical, Structural Changes, and Functional Properties with Emphasis on Foaming Properties. **Processes**, v. 13, n. 6, p. 1646, 2025.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of**

Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17 ed., Gaithersburg: AOAC, 2000.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American oil chemist's society. 7th, 2nd. **AOCS: Champaign**, 1200p, 2017.

ARRIEL, L. F. P.; COSTA, F. M. A. S.; SEOLATTO, A. A.; FREITAS, F. F. Adsorção do corante reativo azul BF-5G em bagaço de malte bruto e lavado. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18496-18503, 2019.

ASSUNÇÃO, Mariana F. G.; VAREJÃO, Jorge M.T.B.; SANTOS, Lília M.A. Nutritional characterization of the microalga *Ruttnera lamellosa* compared to *P. purpureum*. **Algal research**, v. 26, p. 8-14, 2017.

AURINO, E.; MORA, L.; MARZOCCHELLA, A.; KUCHENDORF, C. M.; ACKERMANN, B.; HAYES, M. Functional and Bioactive Benefits of Selected Microalgal Hydrolysates Assessed In Silico and In Vitro. **Marine Drugs**, v. 23, n. 2, p. 53, 2025.

AVALLONE, B.; ARENA, C.; SIMONIELLO, P.; DI LORENZO, M.; VITALE, E.; CAPRIELLO, T.; FERRANDINO, I.; RAGGIO, A; SASSO, M; NAPOLITANO, G.; DE BONIS, S.; GOFLIANO, C.; AGNISOLA, C. MOTTA, C. M. Comparative toxicity of Vegan Red, E124, and E120 food dyes on three rapidly proliferating model systems. **Environments**, v. 9, n. 7, p. 89, 2022.

AXELSSON, Martin; GENTILI, Francesco. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89643, 2014.

BABAEI RAD, S.; MUMIVAND, H.; MOLLAEI, S.; KHADIVI, A. Effect of drying methods on phenolic compounds and antioxidant activity of *Capparis spinosa* L. fruits. **BMC Plant Biology**, v. 25, n. 1, p. 133, 2025.

BHATTACHARYA, D.; PRICE, D. C.; CHAN, C. X.; QIU, H.; ROSE, N.; BALL, S.; WEBER, A.; ARIAS, M.; HENRISSAT, B; COUTINHO, P.; KRISHNAN, A.; ZÄUNER, S. MORATH, S.; HILLIOU, F; EGIZI, A. PERRINEAU, M.; YOON, H. S. Genome of the red alga *P. purpureum*. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2013.

BEEKRUM, Lamees Sharlynn; AMONSOU, Eric Oscar. Nutritional profile, bioactive compounds, and antioxidant activity of microalgal strain, *Amphora* sp., isolated from the Cape coastal waters, South Africa. **Food Science and Technology**, v. 43, 2023.

BEKASOVA, Olga. Properties and potential applications of bioconjugates of R-phycoerythrin with Ag° or CdS nanoparticle synthesized in its tunnel cavity: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 255, p. 128181, 2024.

BELTRÁN-ROCHA, J. C.; GUAJARDO-BARBOSA, C.; RODRÍGUEZ-FUENTES, H.; REYNA-MARTÍNEZ, G. R.; OSORNIO-BERTHET, L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M.; QUINTAL, I. D. ; LÓPEZ-CHUKEN, U. J. Some implications of natural increase of pH in microalgae cultivation and harvest by autoflocculation. **Latin american journal of aquatic research**, v. 49, n. 5, p. 836-842, 2021.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate. **Food chemistry**, v. 194, p. 1056-1063, 2016.

BERMEJO-ROMÁN, R.; MURILLO-CRUZ, M.; HURTADO, M. C.; VILLARÓ-COS, S.; LAFARGA, T.; ACIÉN, G. Simplified Two-Stage Method for the Recovery of B-Phycoerythrin from *Porphyridium Cruentum* and Evaluation as a Natural Food Grade Colourant. **Food and Bioprocess Technology**, v. 18, n. 7, p. 6743-6751, 2025.

BERNAERTS, T. M.; KYOMUGASHO, C.; VAN LOOVEREN, N.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate polymers**, v. 195, p. 542-550, 2018.

BERTSCH, P.; BÖCKER, L.; MATHYS, A.; FISCHER, P. Proteins from microalgae for the stabilization of fluid interfaces, emulsions, and foams. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 326-342, 2021.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; E SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; DE CINQUE ALMEIDA, V.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry centrali journal**, v. 8, n. 1, p. 48, 2014.

BRASIL. Decreto Nº 9.902, de 8 de Julho de 2019. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 9 de julho de 2019.

BRASIL. Instrução Normativa - IN Nº 211, de 1º de março de 2023. Dispõe sobre os princípios gerais, as funções tecnológicas e as condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 46, p. 108-109, de 8 de março de 2023.

CAI, Ting; PARK, Stephen Y.; LI, Yebo. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CAMACHO, Franciele; MACEDO, Angela; MALCATA, Francisco. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. **Marine drugs**, v. 17, n. 6, p. 312, 2019.

CAROCHO, Márcio; MORALES, Patricia; FERREIRA, Isabel C.F.R. Natural food additives: quo vadis?. **Trends In Food Science & Technology**, v. 45, p. 284-295, 2015.

CARRASCO, K. H., HÖFGEN, E. G., BRUNNER, D., BORCHERT, K. B., Reis, B., STEINBACH, C.; SCHWARZ, D. Removal of Iron, Manganese, Cadmium, and Nickel Ions Using Brewers' Spent Grain. **Polysaccharides**, v. 3, n. 2, p. 356-379, 2022.

CASTRO-VARELA, P.; CELIS-PLA, P. S.; FIGUEROA, F. L.; RUBILAR, M. Highly efficient water-based extraction of biliprotein R-phycoerythrin from marine the red-macroalga *Sarcopeltis skottsbergii* by ultrasound and high-pressure homogenization methods. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 877177, 2022.

CHAMARI, M.; ANVAR, S. A. A.; POURAHMAD, R.; NOWRUZI, B.; YOUSEFI, S. Study of alginate-encapsulated phycoerythrin in promoting the biological activity of synbiotic ice cream with *Lactobacillus casei*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 15471, 2024.

CHAMLAGAIN, M.; HU, J.; SIONOV, R. V.; STEINBERG, D. Anti-bacterial and anti-

biofilm activities of arachidonic acid against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1333274, 2024.

CHEN, W.; GAO, L.; SONG, L.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. An improved phenol-sulfuric acid method for the quantitative measurement of total carbohydrates in algal biomass. **Algal Research**, v. 70, p. 102986, 2023.

CHEN, Xue-Wu; ZHENG, Yu-Yun; OUYANG, Jian-Ming. Sulfated *Undaria pinnatifida* Polysaccharide Promotes Endocytosis of Nano-Calcium Oxalate Dihydrate by Repairing Subcellular Organelles in HK-2 Cells. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1015, 2023.

CHEN, Y.; CHEN, J.; CHANG, C.; CHEN, J.; CAO, F.; ZHAO, J.; ZHENG, Y.; ZHU, J. Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 510-517, 2019.

CHEN, Y.; LI, Q.; XU, B.; XIANG, W.; LI, A.; LI, T. Extraction optimization of polysaccharides from wet red microalga *P. purpureum* using response surface methodology. **Marine Drugs**, v. 22, n. 11, p. 498, 2024.

CHOWDURY, Kamrul Hasan; NAHAR, Nurun; DEB, Ujjwal Kumar. The growth factors involved in microalgae cultivation for biofuel production: a review. **Computational Water, Energy, and Environmental Engineering**, v. 9, n. 4, p. 185-215, 2020.

CICHOŃSKI, Jan; CHRZANOWSKI, Grzegorz. Microalgae as a source of valuable phenolic compounds and carotenoids. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8852, 2022.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eleventh Edition. **CLSI Document M02-A11**. Vol. 32, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2012.

CLODE, S. A.; HOOSON, J.; GRANT, D.; BUTLER, W. H. Long-term toxicity study of amaranth in rats using animals exposed in utero. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 12, p. 937-946, 1987.

ČMIKOVÁ, N.; KOWALCZEWSKI, P. Ł.; KMIECIK, D.; TOMCZAK, A.; DROŻDŻYŃSKA, A.; ŚLACHCIŃSKI, M.; KRÓLAK, J.; KAČÁNIOVÁ, M. Characterization of selected microalgae species as potential sources of nutrients and antioxidants. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 2160, 2024.

COÊLHO, D. D. F.; TUNDISI, L. L.; CERQUEIRA, K. S.; RODRIGUES, J. R. D. S.; MAZZOLA, P. G., TAMBOURGI, E. B.; SOUZA, R. R. D. Microalgae: cultivation aspects and bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180343, 2019.

COMA, Véronique. Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. **Polímeros**, v. 23, p. 287-297, 2013.

COOREY, Ranil; TJOE, Audrey; JAYASENA, Vijay. Gelling properties of chia seed and flour. **Journal of food science**, v. 79, n. 5, p. E859-E866, 2014.

COSTA, MAX AL; FARINAS, CRISTIANE S.; MIRANDA, EVERSON A. Ethanol precipitation as a downstream processing step for concentration of xylanases produced by submerged and solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 477-488, 2018.

COX, S. SANDALL, A. SMITH, L.; ROSSI, M.; WHELAN, K. Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. **Nutrition reviews**, v. 79, n. 6, p. 726-741, 2021.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed editora, 2018.

DE MARSAC, N. TANDEAU; HOUMARD, J.Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1988. p. 318-328.

DE OLIVEIRA, Ana Paula Ferreira; BRAGOTTO, Adriana Pavesi Arisseto. Microalgae-based products: Food and public health. **Future Foods**, v. 6, p. 100157, 2022.

DECAMP, A.; MARTINEAU, E.; GRIZEAU, D.; PRUVOST, J.; GONCALVES, O. Effects of the salinity on the biosynthesis of the polysaccharides of the marine microalgae *Porphyridium cruentum*. **Algal Research**, v. 71, p. 103089, 2023.

DEMBIŃSKA, K.; SHINDE, A. H.; PEJCHALOVÁ, M.; RICHERT, A.; SWIONTEK BRZEZINSKA, M. The application of natural phenolic substances as antimicrobial agents in agriculture and food industry. **Foods**, v. 14, n. 11, p. 1893, 2025.

DU, Y.; LI, J.; SURYANARAYANAN, R.; SU, Y. Probing chemical equilibrium in frozen sodium phosphate buffer solution by 31P solid-state NMR. **The Journal of Physical Chemistry** Letters, v. 15, n. 21, p. 5714-5720, 2024.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURMAZ, Y.; MONTEIRO, M.; BANDARRA, N.; GÖKPINAR, Ş.; Işik, O. The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 223-227, 2007.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS) et al. Re-evaluation of fatty acids (E 570) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 15, n. 5, p. e04785, 2017.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of Amaranth (E 123) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 8, n. 7, p. 1649, 2010.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 2392, 2011.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 13, n. 11, p. 4288, 2015.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 12, n. 4, p. 3642, 2014.

ELHKIM, M. O. HÉRAUD, F. BEMRAH, N. GAUCHARD, F. LORINO, T.; LAMBRÉ, C.; FRÉMY, J. M.; POUL, J. M. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 308-316, 2007.

ELSHREIF, H. M.; ELKHOUDARY, M.; MOUSTAFA, R.; HADAD, G.; EL-GENDY, A. A review on food additives from the definition, and types to the method of analysis. **Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 48-64, 2023.

ESKANDARI, BAHAREH; PEIGHAMBARDOUST, SEYED HADI; SARABANDI, KHASHAYAR. Effect of plant protein emulsifiers and carriers on the physicochemical, structural, and oxidative stability of spray-dried pomegranate seed oil emulsions. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 23456, 2025.

ESTIASIH, Teti; MARIANTY, Renita; AHMADI, Kgs. Characteristics and emulsifying properties of structured phospholipids from palm pressed fiber and omega-3 fatty acid concentrates from by-products of fish processing by enzymatic acidolysis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 10, p. 3689-3700, 2021.

FERREIRA, G. F.; PESSOA, J. G. B.; PINTO, L. F. R.; MACIEL FILHO, R.; FREGOLENTE, L. V. Mono-and diglyceride production from microalgae: Challenges and prospects of high-value emulsifiers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 589-600, 2021.

FERREIRA, A.S; MENDONÇA, I.; PÓVOA, I.; CARVALHO, H.; CORREIA, A.; VILANOVA, M.; COIMBRA, M; SILVA, T; NUNES, C. Impact of growth medium salinity on galactoxylan exopolysaccharides of *P. purpureum*. **Algal Research**, v. 59, p. 102439, 2021.

FERNANDES, Pedro A. R.; COIMBRA, Manuel A. The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 314, p. 120965, 2023.

FITHRIANI, D.; MELANIE, S. Vitamin and mineral content of microalgae Phorpyridium and Chlorella and development prospects for food raw materials in Indonesia. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **IOP Publishing**, 2022. p. 012043.

FOLCH, Jordi; LEES, Mark; STANLEY, G. H. Sloane. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), W. H. O. (WHO). General Standard For Food Additives CODEX STAND 192-1995. **Codex Alimentarius International Food Standards**, 1–480. 2019.

FRIEDMAN, Mendel; JÜRGENS, Hella S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101-2110, 2000.

FUENTES, M. R.; FERNÁNDEZ, G. A.; PÉREZ, J. S.; GUERRERO, J. G. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 345-353, 2000.

GARCÍA, A. B.; LONGO, E.; MURILLO, M. C.; BERMEJO, R. Using a B-phycoerythrin extract as a natural colorant: Application in milk-based products. **Molecules**, v. 26, n. 2, p.

297, 2021.

GARRIDO, Jorge; GARRIDO, E. Manuela; BORGES, Fernanda. Studies on the food additive propyl gallate: synthesis, structural characterization, and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Chemical Education**, v. 89, n. 1, p. 130-133, 2012.

GHANY, T. M; ABDEL. Safe Food Additives. A Review. **Journal of Biological and Chemical Research**, 32, 402-437, 2015.

GHORBANI, A.; RAFE, A.; HESARINEJAD, M. A.; LORENZO, J. M. Impact of pH on the Physicochemical, Structural, and Techno-Functional Properties of Sesame Protein Isolate. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 1, p. e4760, 2025.

GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; VOORSPOELS, S.; NOTEN, B.; DE PAEPE, D., E BAART, G. J.; DE COOMAN, L. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. **Journal of phycology**, v. 50, n. 3, p. 483-492, 2014.

GONZALEZ-RAMIREZ, E.; ANDUJAR-SANCHEZ, M.; ORTIZ-SALMERON, E.; BACARIZO, J.; CUADRI, C.; MAZZUCA-SOBCZUK, T.; IBÁÑEZ, M. J.; CÁMARA-ARTIGAS, A. MARTINEZ-RODRIGUEZ, S. Thermal and pH stability of the B-phycoerythrin from the red algae *Porphyridium cruentum*. **Food Biophysics**, v. 9, n. 2, p. 184-192, 2014.

GREENLY, J. M.; TESTER, J. W. Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 276-279, 2015.

GUIRY, Michael D. How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. **Journal of Phycology**, v. 60, n. 2, p. 214-228, 2024.

GUJAR, A.; CUI, H.; JI, C.; KUBAR, M. S.; LI, R. Optimizing culture system to promote cell growth and polysaccharides contents of *Porphyridium cruentum*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 6738-6747, 2020.

GUO, X.; WANG, Q.; YANG, Q.; GONG, Z.; WU, Y.; LIU, X. Effects of molecular structure and charge state on the foaming and emulsifying properties of Spirulina protein isolates. **Food Research International**, v. 187, p. 114407, 2024.

HAJIYEVA, S.; CANKILIC, M. Y.; KILIC, V.; GORGULU, S.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R. An insight into the potential antioxidant, anticancer and antimicrobial activities of *Geitlerinema sp.* C-phycocyanin extracts. **Algal Research**, v. 85, p. 103836, 2025.

HAMOUDA, Ragaa A.; EL-NAGGAR, Noura El-Ahmady. Cyanobacteria-based microbial cell factories for production of industrial products. In: **Microbial cell factories engineering for production of biomolecules**. Academic Press, 2021. p. 277-302.

HAMMEL, Alexander. **Establishing the red microalga *P. purpureum* as a novel platform for the production of recombinant proteins**. 2024. Tese de Doutorado. Universität Potsdam.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from li-pids. **Lab. Pract**., v. 22, n. 8, p. 494-495, 1973.

HLIMA, H. B.; DAMMAK, M.; KARKOUCH, N.; HENTATI, F.; LAROCHE, C.;

MICHAUD, P.; FENRI, I.; ABDELKAFI, S. Optimal cultivation towards enhanced biomass and floridean starch production by *Porphyridium marinum*. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 152-161, 2019.

HLIMA, H. B.; SMAOUI, S.; BARKALLAH, M.; ELHADEF, K.; TOUNSI, L.; MICHAUD, P.; FENDRI, I.; ABDELKAFI, S. Sulfated exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*: A useful strategy to extend the shelf life of minced beef meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1215-1225, 2021.

HUO, S.; WANG, H.; CHEN, J.; HU, X.; ZAN, X.; ZHANG, C.; QIAN, J.; ZHU, F.; MA, H.; ELSHOBARY, M. A preliminary study on polysaccharide extraction, purification, and antioxidant properties of sugar-rich filamentous microalgae *Tribonema minus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 6, p. 2755-2767, 2022.

INETIANBOR, J. E.; YAKUBU, J. M.; EZEONU, S. C. Effects of food additives and preservatives on man-a review. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 1118-1135, 2015.

ISMAIL, Mona Mohamed; AMER, Mohamed Saleh. Characterization and biological properties of sulfated polysaccharides of Corallina officinalis and Pterocladia capillacea. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 623-632, 2021.

JUBEH, Buthaina; BREIJYEH, Zeinab; KARAMAN, Rafik. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2888, 2020.

KAGLIWAL, L. D. JADHAV, S. B. SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. PRESERVATIVES. Permitted Preservatives–Propionic Acid. 2014.

KAUR, P.; SANDHU, K. S.; BANGAR, S. P.; PUREWAL, S. S.; KAUR, M.; ILYAS, R. A.; ASYRAF, M. R.; RAZMAN, M. R. Unraveling the bioactive profile, antioxidant and dna damage protection potential of rye (*Secale cereale*) flour. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1214, 2021.

KAVITHA, M. D.; KATHIRESAN, S.; BHATTACHARYA, S.; SARADA, R. Culture media optimization of *P. purpureum*: production potential of biomass, total lipids, arachidonic and eicosapentaenoic acid. **Journal of food science and technology**, v. 53, p. 2270-2278, 2016a.

KAVITHA, M. D.; SEEMA SHREE, M. H.; VIDYASHANKAR, S.; SARADA, R. Acute and subchronic safety assessment of *P. purpureum* biomass in the rat model. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 2, p. 1071-1083, 2016b.

KEPEKÇI, Remziye Aysun; SAYGIDEGER, Saadet Demirörs. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. **Journal of applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 897-905, 2012.

KHAN, Z., MAZNAH; W. W., MERICAN; M. F., CONVEY, P.; NAJIMUDIN, N.; ALIAS, S. A. A comparative study of phycobilliprotein production in two strains of *Pseudanabaena* isolated from Arctic and tropical regions in relation to different light wavelengths and photoperiods. **Polar Science**, v. 20, p. 3-8, 2019.

KHAW, Y. S.; TAN, H. T.; SOPAWONG, A.; SHAHARUDDIN, N. A.; OMAR, A. R.; YUSOFF, F. M. A recommendation for a pre-standardized marine microalgal dry weight determination protocol for laboratory scale culture using ammonium formate as a washing

agent. **Biology**, v. 10, n. 8, p. 799, 2021.

KIM, S. H.; LEE, U. H.; LEE, S. B.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Improvement of unsaturated fatty acid production from *Porphyridium cruentum* using a two-phase culture system in a photobioreactor with light-emitting diodes (LEDs). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 456, 2021.

KIYANI, D. A.; MARYAM, S.; AMINA, S. J.; AHMAD, A.;CHATTHA, M. W. A.; JANJUA, H. A. Lipid extraction and analysis of microalgae strain *pectinodesmus* PHM3 for biodiesel production. **BMC biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 20, 2023.

KOUSOULAKI, K.; MØRKØRE, T.; NENGAS, I.; BERGE, R. K.; SWEETMAN, J. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 451, p. 47-57, 2016.

KOVALESKI, G.; KHOLANY, M.; DIAS, L. M.; CORREIA, S. F.; FERREIRA, R. A.; COUTINHO, J. A.; VENTURA, S. P. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 1065355, 2022.

KUMAR, R.; DUSHENDRA, B. R.; KEBERT, J.; SCHENK, P. M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 1–9, 2015.

KWON, Y. H.; BANSKOTA, S.; WANG, H.; ROSSI, L.; GRONDIN, J. A.; SYED, S. A.; YOUSEFI, Y.; SCHERTZER, J. D.; MORRISON, K. M.; WADE, M. G.; HOLLOWAY, A. C.; SURETTE, M. G.; STEINBERG, G. R.; KHAN, W. I. Chronic exposure to synthetic food colorant Allura Red AC promotes susceptibility to experimental colitis via intestinal serotonin in mice. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 7617, 2022.

LEE, Dohyoung; LEE, Kwang-Geun. Emulsifying properties of Maillard reaction products formed using spirulina (*Arthrospira maxima*) protein extract coupled with various saccharides. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 107397, 2025.

LI, C.; WU, H.; XIANG, W.; WU, H.; WANG, N.; WU, J.; LI, T. Comparison of production and fluorescence characteristics of phycoerythrin from three strains of *Porphyridium*. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2069, 2022.

LI, Q.; CHEN, Y.; LIU, X.; LI, Y.; XU, J.; LI, T.; XIANG, W.; LI, A. Effect of salinity on the biochemical characteristics and antioxidant activity of exopolysaccharide of *P. purpureum* FACHB 806. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 1097200, 2023.

LI, S.; ZHAO, Z.; WANG, Y.; HE, B.; MA, K.; ZHENG, Y.; WANG, M.; WANG, Z.; LI, L. Recent advance on the antibacterial activity of polysaccharide-based conjugates. International **Journal of Biological Macromolecules**, p. 144760, 2025.

LI, T.; XU, J.; WANG, W.; CHEN, Z.; LI, C.; WU, H.; WU, H.; XIANG, W. A novel three-step extraction strategy for high-value products from red algae *P. purpureum*. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2164, 2021.

LI, T.; XU, J.; WU, H.; JIANG, P.; CHEN, Z.; XIANG, W. Growth and biochemical composition of *P. purpureum* SCS-02 under different nitrogen concentrations. **Marine drugs**, v. 17, n. 2, p. 124, 2019.

LI, T.; XU, J.; WU, H.; WANG, G.; DAI, S.; FAN, J.; HE, H.; XIANG, W. A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. **Marine drugs**, v.

14, n. 9, p. 162, 2016.

LI, X.; ZUO, S.; WANG, B.; ZHANG, K.; WANG, Y. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2675, 2022.

LICHTENTHALER, Hartmut K. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 1987. p. 350-382.

LIYANAGE, N. M.; NAGAHAWATTA, D. P.; JAYAWARDENA, T. U.; SANJEEWA, K. K. A.; JAYAWRDHANA, H. H. A. C. K.; KIM, J. I.; JEON, Y. J. Sulfated polysaccharides from seaweeds: A promising strategy for combatting viral diseases - A review. **Marine Drugs**, v. 21, n. 9, p. 461, 2023.

LIU, Keshun. Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. **Algal Research**, v. 40, p. 101486, 2019.

LIU, LONGFEI; LIU, Y.; WANG, W.; WANG, Y.; LI, G.; HU, C. Pyrolysis of high-ash natural microalgae from water blooms: effects of acid pretreatment. **Toxins**, v. 13, n. 8, p. 542, 2021.

LIU, R.; XUE, W.; LING, X.; LI, L.; HE, Y.; GUO, M. *P. purpureum* culture extract as an ecologically safe agent against PM2. 5-induced skin toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 303, p. 119034, 2025.

LÓPEZ-PEDROUSO, María; LORENZO, José M.; FRANCO, Daniel. Advances in natural antioxidants for food improvement. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1825, 2022.

LOURENÇO, Sofia C.; MOLDÃO-MARTINS, Margarida; ALVES, VÍTOR D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132, 2019.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LU, S.; WANG, J.; MA, Q.; YANG, J.; LI, X.; YUAN, Y. J. Phospholipid metabolism in an industry microalga *Chlorella sorokiniana*: the impact of inoculum sizes. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70827, 2013.

LU, Z.; HE, B.; WU, X. L.; ZHANG, X.; SIDIQUE, F.; CHENG, S. Potential of antibacterial polysaccharides to serve as a promising alternative to conventional antibiotics: challenges and future prospects. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 146960, 2025.

LUPKI, F. B.; DIAS, P. A.; SILVA, M. R.; MORAIS, H. A. Efeito do PH nas propriedades tecnológicas de concentrado proteico de soro de leite. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 23036-23059, 2019.

MA, K. K.; GROSSMANN, L.; NOLDEN, A. A.; MCCLEMENTS, D. J.; KINCHLA, A. J. Functional and physical properties of commercial pulse proteins compared to soy derived

protein. **Future Foods**, v. 6, p. 100155, 2022.

MA, Lingjun. A preface for the special issue: Oxidation in food. **Food Chemistry: X**, v. 18, 2023.

MA, X.; WANG, Q.; REN, K.; XU, T.; ZHANG, Z; XU, M.; RAO, Z.; ZHANG, X. A review of antimicrobial peptides: Structure, mechanism of action, and molecular optimization strategies. **Fermentation**, v. 10, n. 11, p. 540, 2024.

MACKIEH, R.; AL-BAKKAR, N.; KFOURY, M.; ROUFAYEL, R.; SABATIER, J. M.; FAJLOUN, Z. Inhibitors of ATP synthase as new antibacterial candidates. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 650, 2023.

MARKWORTH, J. F.; MITCHELL, C. J. D'SOUZA, R. F.; AASEN, K. M.; DURAINAYAGAM, B. R.; MITCHELL, S. M.; CHAN, A. H. C; SINCLAIR; A. J.; GARG, M. CAMERON-SMITH, D. Arachidonic acid supplementation modulates blood and skeletal muscle lipid profile with no effect on basal inflammation in resistance exercise trained men. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 128, p. 74-86, 2018.

MARQUES, F.; PINHO, M.; GUERRA, I. M.; CONDE, T. A.; SILVA, J.; CARDOSO, H.; MARTINS M.; ABREU, M. H.; CERQUEIRA, M. A.; DOMINGUES, M. R. Unlocking functional lipid ingredients from algae by food-grade biosolvents and ultrasound-assisted extraction for nutritional applications. **Lwt**, v. 200, p. 116136, 2024.

MARTÍNEZ, J. M. DELSO, C.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Pulsed electric field permeabilization and extraction of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. **Algal Research**, v. 37, p. 51-56, 2019.

MARTÍNEZ-RUIZ, M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C. A.; KIM, D. H.; SANTIESTEBAN-ROMERO, B.; REYES-PARDO, H.; VILLASEÑOR-ZEPEDA, K. R.; MELÉNDEZ-SÁNCHEZ, E. R.; RAMÍREZ-GAMBOA, D.; DÍAZ-ZAMORANO, A. L.; SOSA-HERNÁNDE, J. E.; CORONADO-APODACA, K. G.; GÁMEZ-MÉNDEZ, A. M.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDIVAR, R. Microalgae bioactive compounds to topical applications products - a review. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3512, 2022.

MARTINS, T.; BARROS, A. N.; ROSA, E.; ANTUNES, L. Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-food: A comprehensive review. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5344, 2023.

MATTSON, M. G.; SOZZI, A.; CORFIELD, R.; GAGNETEN, M.; FRANCESCHINIS, L.; SCHEBOR, C.; COLORANT, D. S. Antioxidant properties of freeze-dried extracts from wild berries: Use of ultrasound-assisted extraction method and drivers of liking of colored yogurts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 3, p. 944-955, 2022.

MICHIU, D.; SOCACIU, M. I.; FOGARASI, M.; JIMBOREAN, A. M.; RANGA, F.; MUREŞAN, V.; SEMENIUC, C. A. Implementation of an analytical method for spectrophotometric evaluation of total phenolic content in essential oils. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1345, 2022.

MISHRA, Sanjiv K.; SHRIVASTAV, Anupama; MISHRA, Sandhya. Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Pseudanabaena sp*. **Protein expression and purification**, v. 80, n. 2, p. 234-238, 2011.

MITTAL, Rochak; SHARMA, Richa; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Novel adsorption

approach for the enrichment of R-Phycoerythrin from marine macroalga *Gelidium pusillum*. **Algal Research**, v. 62, p. 102605, 2022.

MORAES, I. D. O.; ARRUDA, R. D. O. M.; MARESCA, N. R.; ANTUNES, A. D. O.; MORAES, R. D. O. *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 179-183, 2013.

MURBACH, T. S.; GLÁVITS, R.; ENDRES, J. R.; HIRKA, G.; VÉRTESI, A.; BÉRES, E.; SZAKONYINÉ, P. I. An evaluation of the genotoxicity and 90-day repeated dose oral toxicity in rats of *P. purpureum*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1616-1632, 2024.

MUTHUKUMAR, Janani; CHIDAMBARAM, Ramalingam; SUKUMARAN, Sivaramakrishnan. Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries - A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 2453-2466, 2021.

Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. 2024. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/sdgs. Acesso em: 25 nov. 2024

NATH, P. C.; TIWARI, O. N.; DEVI, I.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Biochemical and morphological fingerprints of isolated *Anabaena sp*.: a precious feedstock for food additives. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 2723-2733, 2021.

NG, J. W.; TEH, T. M.; TAN, C. F., BI, X.; LOW, Z. E.; TALUKDER, M. M. R. Alkaline solubilization of microalgal protein and its impact on the functional properties of protein extract. **Future Foods**, v. 9, p. 100368, 2024.

NGUYEN, A. Q.; MOHAMMADI, M.; ALIAN, M.; MURALITHARAN, G.; CHAUHAN, V. S.; BALAN, V. Exploring the versatility of *Porphyridium sp*.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction, purification, and characterization techniques. **Biotechnology Advances**, p. 108471, 2024.

NISSEN, S. H.; SCHMIDT, J. M.; GREGERSEN, S.; HAMMERSHØJ, M.; MØLLER, A. H.; DANIELSEN, M.; STØDKILDE, L.; NEBEL, C.; DALSGAARD, T. K. Increased solubility and functional properties of precipitated Alfalfa protein concentrate subjected to pH shift processes. **Food Hydrocolloids**, v. 119, p. 106874, 2021.

NORDHAGEN, S.; LAMBERTINI, E.; DEWAAL, C. S; MCCLAFFERTY, B.; NEUFELD, L. M. Integrating nutrition and food safety in food systems policy and programming. **Global Food Security**, v. 32, p. 100593, 2022.

NOVOVESKÁ, L.; NIELSEN, S. L.; EROLDOĞAN, O. T.; HAZNEDAROGLU, B. Z.; RINKEVICH, B.; FAZI, S.; ROBBEN, J.; VASQUEZ, M.; EINARSSON, H. Overview and challenges of large-scale cultivation of photosynthetic microalgae and cyanobacteria. **Marine drugs**, v. 21, n. 8, p. 445, 2023.

NOWRUZI, B., AHMADI, M., BOUAÏCHA, N., KHAJERAHIMI, A. E., e ANVAR, S. A. A. Studying the impact of phycoerythrin on antioxidant and antimicrobial activity of the fresh rainbow trout fillets. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 2470, 2024.

OLZA, J.; ARANCETA-BARTRINA, J.; GONZÁLEZ-GROSS, M.; ORTEGA, R. M.; SERRA-MAJEM, L.; VARELA-MOREIRAS, G.; GIL, Á. Reported dietary intake, disparity between the reported consumption and the level needed for adequacy and food sources of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D in the Spanish population: findings from the

ANIBES study. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 168, 2017.

OLSEN, Malene Lihme; OLSEN, Karsten; JENSEN, Poul Erik. Consumer acceptance of microalgae as a novel food-Where are we now? And how to get further. **Physiologia Plantarum**, v. 176, n. 3, p. e14337, 2024.

PAN, F.; LI, S.; ZHU, X.; YANG, J.; WEN, J.; SONG, C.; LUO, X.; RUAN, G.; LIU, Y. Purification and the effects on structure and bioactivity for polysaccharide from *Actinidia valvata* Dunn. using macroporous adsorption resin. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e99721, 2022.

PAPACHRISTOU, I.; AKABERI, S.; SILVE, A.; NAVARRO-LÓPEZ, E.; WÜSTNER, R.; LEBER, K.; NAZAROVA, N.; MÜLLER G.; FREY, W. Analysis of the lipid extraction performance in a cascade process for *Scenedesmus almeriensis* biorefinery. **Biotechnology for biofuels**, v. 14, n. 1, p. 20, 2021.

PAPADAKI, E.; GRIGORAKIS, S.; PALAIOGIANNIS, D.; LALAS, S. I.; MITLIANGA, P. Hydrothermal treatment of wheat bran under mild acidic or alkaline conditions for enhanced polyphenol recovery and antioxidant activity. **Molecules**, v. 29, n. 6, p. 1193, 2024.

PAȘCA, Claudia; COROIAN, Aurelia; SOCACI, Sonia. Risks and benefits of food additives-review. **Animal science and biotechnologies**, v. 75, n. 2, 2018.

PATEL, A. K.; LAROCHE, C.; MARCATI, A.; URSU, A. V.; JUBEAU, S.; MARCHAL, L.; PETIT, E.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. **Bioresource technology**, v. 145, p. 345-350, 2013.

PIKAL-CLELAND, Katherine A.; CARPENTER, John F. Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric β-galactosidase. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 9, p. 1255-1268, 2001.

PRATES, José A.M. The role of microalgae in providing essential minerals for sustainable swine nutrition. **Frontiers in Animal Science**, v. 6, p. 1526433, 2025.

PRUTEANU, L. L.; BAILEY, D. S.; GRĂDINARU, A. C.; JÄNTSCHI, L. The biochemistry and effectiveness of antioxidants in food, fruits, and marine algae. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 860, 2023.

PYRZYNSKA, Krystyna. Ferulic acid - a brief review of its extraction, bioavailability and biological activity. **Separations**, v. 11, n. 7, p. 204, 2024.

RAPP, D.; SCHELVIS, D.; FRENCH, N. P.; PLOUVIEZ, M. Unlocking antimicrobial potential of microalgae on food-borne bacteria: A standardized framework and future directions. **Current Research in Biotechnology**, p. 100362, 2025.

ROGERS, A. E. CONNER, B. BOULANGER, C.; LEE, S. Mammary tumorigenesis in rats fed diets high in lard. **Lipids**, v. 21, p. 275-280, 1986.

RUDI, L.; VALUȚA, A.; CHIRIAC, T.; DJUR, S. Effect of microwave-assisted treatment on the composition of spray-dried *Porphyridium cruentum* extract. **One Health & Risk Management**, v. 6, n. 4, p. 23-32, 2025.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO,

C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. 2006.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+**. 2007a.

RUFINO, M. D. S. M. ALVES, R. E. DE BRITO, E. S. DE MORAIS, S. M. SAMPAIO, C. D. G. PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. 2007b.

SADEWO, B. R.; DEWAYANTO, N.; ROCHMADI, R.; JUNIAWAN, A. S.; BUDIMAN, A. Optimization study of Phycocyanin ultrasound-assisted extraction process from Spirulina (*Arthospira platensis*) using different solvent. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 589-608, 2024.

SÄGESSER, C.; KALLFELZ, J. M.; BOULOS, S.; DUMPLER, J.; BÖCKER, L.; MAIR, T.; NYSTRÖM, L. MATHYS, A. Structurability of microalgae, soy and pea protein for extruded high-moisture meat analogues. **Food Hydrocolloids**, v. 156, p. 110290, 2024.

SAINI, R. K.; PRASAD, P.; SHANG, X.; KEUM, Y. S. Advances in lipid extraction methods - a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 2021.

SALAME, Clara *et al*. Food additive emulsifiers and the risk of type 2 diabetes: analysis of data from the NutriNet-Santé prospective cohort study. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 12, n. 5, p. 339-349, 2024.

SALES, R.; LOPES, R. G.; DERNER, R. B.; TSUZUKI, M. Y. Concentrated microalgal biomass as a substitute for fresh microalgae produced on site at hatcheries. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 17, p. 5771-5786, 2022.

SANJAY, Sharda Sundaram; SHUKLA, Ashutosh Kumar. **Potential therapeutic applications of nano-antioxidants**. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2021.

SAXENA, R.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; CHÁVEZ-GONZALEZ, M. L.; AGUILAR, C. N.; QUIJANO, G.; RUIZ, H. A. Strategy development for microalgae Spirulina platensis biomass cultivation in a bubble photobioreactor to promote high carbohydrate content. **Fermentation**, v. 8, n. 8, p. 374, 2022.

SCAGLIONI, P. T.; QUADROS, L.; DE PAULA, M.; FURLONG, V. B.; ABREU, P. C.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of enzymatic and oxidative processes by phenolic extracts from *Spirulina sp*. and *Nannochloropsis sp*. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 344, 2018.

SCAGLIONI, P. T.; SOUZA, T. D.; SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 526-532, 2014.

SCHNEIDER, A. T.; MACHADO, R. L. S.; DUTRA, D. A.; MACHADO, E. F.; DIAS, R. R.; DEPRÁ, M. C.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Microalgae biotechnology and its role in sustainable and healthy food design. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.

13, p. 1716473, 2025.

SCHOETERS, F.; SPIT, J.; SWINNEN, E.; DE CUYPER, A.; VLEUGELS, R.; NOYENS, I.; VAN MIERT, S. Pilot-scale cultivation of the red alga *P. purpureum* over a two-year period in a greenhouse. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, n. 5, p. 2095-2109, 2023.

SEZGIN, Aybuke Ceyhun; AYYILDIZ, Sibel. Food additives: colorants. **Science within Food: Up-to-Date Advances on Research and Educational Ideas**, p. 87-94, 2017.

SHEN, L.; PANG, S.; ZHONG, M.; SUN, Y.; QAYUM, A.; LIU, Y.; RASHID, A.; XU B; LIANG Q.; MA H.; REN, X. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 101, p. 106646, 2023.

SILVA, Maria Manuela; REBOREDO, Fernando Henrique; LIDON, Fernando Cebola. Food colour additives: A synoptical overview on their chemical properties, applications in food products, and health side effects. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 379, 2022.

SILVA, M. E. T. D.; MARTINS, M. A.; LEITE, M. D. O.; MILIÃO, G. L.;COIMBRA, J. S. D. R. Microalga *Scenedesmus obliquus*: extraction of bioactive compounds and antioxidant activity. **Revista Ciência Agronômica**, v. 52, p. e20196848, 2021.

SILVA-NÚÑEZ, Arisbe; DONOSO-QUEZADA, Javier; GONZÁLEZ-VALDEZ, José. **Phycoerythrin from *P. purpureum*: Highly Efficient Extraction, Purification, and Microencapsulation for Food Applications**. In: Biology and Life Sciences Forum. MDPI, 2023. p. 13.

SIMOVIC, A.; COMBET, S.; VELICKOVIC, T. C.; NIKOLIC, M.; MINIC, S. Probing the stability of the food colourant R-phycoerythrin from dried Nori flakes. **Food Chemistry**, v. 374, p. 131780, 2022.

SINGH, N. K.; SONANI, R. R.; RASTOGI, R. P.; MADAMWAR, D. The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. **EXCLI journal**, v. 14, p. 268, 2015.

SKENDI, A.; BOULOUMPASI, E.; CHATZOPOULOU, P.; BILIADERIS, C. G.; IRAKLI, M. Comparison of drying methods for the retention of phenolic antioxidants in post-distillation solid residues of aromatic plants. **Lwt**, v. 189, p. 115463, 2023.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. L. A. P. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Lab. Anal. Proced**, v. 1617, n. 1, p. 1-16, 2008.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. J. L. A. P. Determination of extractives in biomass. **Laboratory analytical procedure (LAP)**, v. 1617, n. 4, p. 1-16, 2005.

SODERBERG, T. **Organic chemistry with a biological emphasis**. Morris: University of Minnesota, 2016. v. 1.

SONG, H.; HE, M.; GU, C.; WEI, D.; LIANG, Y.; YAN, J.; WANG, C. Extraction optimization, purification, antioxidant activity, and preliminary structural characterization of crude polysaccharide from an arctic *Chlorella* sp. **Polymers**, v. 10, n. 3, p. 292, 2018.

SONG, T.; WANG, Z.; JIANG, Y.; YANG, S.; DENG, Q. Research Progress on the Degradation of Organic Pollutants in Wastewater via Ultrasound/Periodate Systems: A Review. **Molecules**, v. 29, n. 11, p. 2562, 2024.

SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; RODAS-ZULUAGA, L. I.; CASTILLO-ZACARÍAS, C.; ROSTRO-ALANÍS, M.; DE LA CRUZ, R.; CARRILLO-NIEVES, D.; SALINAS-SALAZAR C.; GRUNEWALD, C. F.; LLEWELLYN C. A.; OLGUÍN, E. J.; LOVITT, R. W.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Light intensity and nitrogen concentration impact on the biomass and phycoerythrin production by *P. purpureum*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, p. 460, 2019.

SRIVASTAVA, H.; BISHT, B.; JAMES, J.; MALHOTRA, R. K.; KURBATOVA, A.; DABRAL, A.; UPADHYAY, S.; KUMAR, V. Advanced extraction technologies and functional applications of algal polysaccharides in modern food systems. **Discover Food**, v. 5, n. 1, p. 272, 2025.

SU, M.; BASTIAENS, L.; VERSPREET, J.; HAYES, M. Applications of microalgae in foods, pharma and feeds and their use as fertilizers and biostimulants: Legislation and regulatory aspects for consideration. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 3878, 2023.

SUN, Qiang; FU, Yanfang; WANG, Weiqi. Temperature effects on hydrophobic interactions: Implications for protein unfolding. **Chemical Physics**, v. 559, p. 111550, 2022.

SURYAVANSHI, Sachin V.; GHARPURE, Milind; KULKARNI, Yogesh A. Sodium copper chlorophyllin attenuates adenine-induced chronic kidney disease via suppression of TGF-beta and inflammatory cytokines. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 11, p. 2029-2041, 2020.

SWANSON, Danielle; BLOCK, Robert; MOUSA, Shaker A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

TAN, H. T.; YUSOFF, F. M.; KHAW, Y. S.; NOOR MAZLI, N. A. I.; NAZARUDIN, M. F.; SHAHARUDDIN, N. A.; KATAYAMA, T; AHMAD, S. A. A review on a hidden gem: Phycoerythrin from blue-green algae. **Marine drugs**, v. 21, n. 1, p. 28, 2022.

TAN, J. S.; LEE, S. Y.; CHEW, K. W.; LAM, M. K.; LIM, J. W.; HO, S. H.; SHOW, P. L. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 116-129, 2020.

TANG, Y.; JI, W.; NAN, Z.; JU, Z.; LI, X.; LI, M.; XONG, Y.; WU, B.; JIANG, Y. Ferulic Acid: Bioavailability, Metabolism, and Strategies for Enhancing Health Benefits. **Food Reviews International**, v. 41, n. 9, p. 3530-3551, 2025.

TEHAMI, W.; NANI, A.; KHAN, N. A.; HICHAMI, A. New insights into the anticancer effects of p-coumaric acid: focus on colorectal cancer. **Dose-Response**, v. 21, n. 1, p. 15593258221150704, 2023.

TRAN, T., DENIMAL, E., LAFARGE, C., JOURNAUX, L., LEE, J. A., WINCKLER, P.; PERRIER-CORNET, J. PRADELLES, R.; LOUPIAC, C.; CAYOT, N. Effect of high hydrostatic pressure on extraction of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*: Use of confocal microscopy and image processing. **Algal Research**, v. 38, p. 101394, 2019.

THORAT, ALPANA A.; SURYANARAYANAN, RAJ. Characterization of Phosphate Buffered Saline (PBS) in Frozen State and after Freeze-Drying. **Pharmaceutical research**, v.

36, n. 7, 2019.

TSVETANOVA, Flora; YANKOV, Dragomir. Bioactive compounds from red microalgae with therapeutic and nutritional value. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2290, 2022.

ULAGESAN, Selvakumari; NAM, Taek-Jeong; CHOI, Youn-Hee. Extraction and Purification of R-Phycoerythrin Alpha Subunit from the Marine Red Algae *Pyropia yezoensis* and its Biological Activities. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6479, 2021.

VAN DIJK, Erik; HOOGEVEEN, Arlo; ABELN, Sanne. The hydrophobic temperature dependence of amino acids directly calculated from protein structures. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 5, p. e1004277, 2015.

VARSHNEY, P.; BEARDALL, J.; BHATTACHARYA, S.; WANGIKAR, P. Isolation and biochemical characterisation of two thermophilic green algal species-Asterarcys quadricellulare and Chlorella sorokiniana, which are tolerant to high levels of carbon dioxide and nitric oxide. **Algal research**, v. 30, p. 28-37, 2018.

VIEIRA, M. V.; TURKIEWICZ, I. P.; TKACZ, K.; FUENTES-GRÜNEWALD, C.; PASTRANA, L. M.; FUCIÑOS, P.; WOJDYŁO, A.; NOWICKA, P. Microalgae as a potential functional ingredient: evaluation of the phytochemical profile, antioxidant activity and in-vitro enzymatic inhibitory effect of different species. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7593, 2021.

VIEIRA, Marta V.; PASTRANA, Lorenzo M.; FUCIÑOS, Pablo. Microalgae encapsulation systems for food, pharmaceutical and cosmetics applications. **Marine drugs**, v. 18, n. 12, p. 644, 2020.

VIKULIN, Pavel; VIKULINA, Vera. Influence of ultrasound on the concentration of hydrogen ions in water. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. **IOP Publishing**, 2020. p. 042007.

VOS, M. J.; HAGEMAN, J., CARRA, S.; KAMPINGA, H. H. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. **Biochemistry**, v. 47, n. 27, p. 7001-7011, 2008.

WANG, B.; LIU, Q.; HUANG, Y.; YUAN, Y.; MA, Q.; DU, M.; CAI, T.; CAI, Y. Extraction of polysaccharide from *Spirulina* and evaluation of its activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 3425615, 2018.

WANG, M.; ZHOU, J.; TAVARES, J.; PINTO, C. A.; SARAIVA, J. A.; PRIETO, M. A.; CAO, H.; XIAO, J.; SIMAL-GANDARA, J.; BARBA, F. J. Applications of algae to obtain healthier meat products: A critical review on nutrients, acceptability and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 26, p. 8357-8374, 2023.

WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n. 1, p. 5692852, 2016.

WANG, Y.; ZHU, L.; ZHU, Z.; LIU, M.; ZHAO, X. Effects of Different pH Levels on the Structural and Functional Properties of Proteins of *Phaeodactylum tricornutum*. **Molecules**, v. 29, n. 13, p. 3139, 2024.

WANG, Z.; XU, W.; LIU, D.; LI, X.; LIU, S.; WU, X.; WANG, H. Impact of food physical

properties on oral drug absorption: A comprehensive review. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 267-280, 2025.

WATANABE, Yasuhiro; TATSUNO, Ichiro. Omega-3 polyunsaturated fatty acids focusing on eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the prevention of cardiovascular diseases: a review of the state-of-the-art. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 79-93, 2021.

WEN, Y.; SHAN, S.; YE, F.; LIAO, W.; WU, X.; CHEN, W.; ZHAO, C. Prospects of phycoerythrin: Structural features, antioxidation and applications in food. **Food Chemistry**, v. 463, p. 141425, 2025.

WITSCHI, Hanspeter P. Enhancement of tumor formation in mouse lung by dietary butylated hydroxytoluene. **Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 95-104, 1981.

WU, M.; PAKROO, S.; NADAI, C.; MOLINELLI, Z.; SPECIALE, I.; DE CASTRO, C.; TARRAH, A.; YANG, J.; GIACOMINI, A.; CORICH, V. Genomic and functional evaluation of exopolysaccharide produced by *Liquorilactobacillus mali* t6-52: technological implications. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 158, 2024.

WULAN, S. N.; NURRACHMAN, S. D.; JAYADININGRAT, R. S. M. W.; HARIJONO, H. Characterization of protein concentrate from *Spirulina platensis* microalgae using microwave and alkaline-acid extraction methods. **Journal of Nutrition and Food Security**, v. 10, n 4,p. 553-561, 2025.

XIE, Jiahui; CHEN, Si; WEN, Zhiyou. Effects of light intensity on the production of phycoerythrin and polyunsaturated fatty acid by microalga Rhodomonas salina. **Algal Research**, v. 58, p. 102397, 2021.

YIN, H. C.; SUI, J. K.; HAN, T. L.; LIU, T. Z.; WANG, H. Integration bioprocess of B-phycoerythrin and exopolysaccharides production from photosynthetic microalga *Porphyridium cruentum*. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 836370, 2022.

YOSHIKAWA, H.; HIRANO, A.; ARAKAWA, T.; SHIRAKI, K. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 865-871, 2012.

YOUSSOUF, L.; LALLEMAND, L.; GIRAUD, P.; SOULÉ, F.; BHAW-LUXIMON, A.; MEILHAC, O.; D'HELLENCOURT, C.; JHURRY, D.; COUPRIE, J. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 55-63, 2017.

YU, L.; WU, Y.; LIU, D.; SHENG, Z.; LIU, J.; CHEN, H.; FENG, W. The kinetic behavior of antioxidant activity and the stability of aqueous and organic polyphenol extracts from navel orange peel. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e90621, 2022.

YU, Z., ZHAO, W., SUN, H., MOU, H., LIU, J., YU, H., DAI, L.; KONG Q.; YANG, S. Phycocyanin from microalgae: A comprehensive review covering microalgal culture, phycocyanin sources and stability. **Food Research International**, v. 186, p. 114362, 2024.

YUAN, Yuan; MACQUARRIE, Duncan. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from Ascophyllum nodosum and its antioxidant activity. **Carbohydrate polymers**, v. 129, p. 101-107, 2015.

ZHANG, T.; SHEN, Z.; XU, P.; ZHU, J.; LU, Q.; SHEN, Y.; WANG, Y.; YAO, C.; LI, J.; WANG, Y.; Jiang, H. Analysis of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics of different strains of *Porphyra yezoensis*. **Journal of applied phycology**, v. 24, p. 881-886, 2012.

ZHANG, X.; ZHENG, Y.; WANG, X.; YAN, J.; LIU, J.; ZHANG, H. Plant protein-phenolic acids as novel food-grade synergistic modulators of neuronal function: A review. **Food Chemistry**: X, p. 103230, 2025.

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, p. 1215-1224, 2011.

ZHU, J.; WAKISAKA, M.; OMURA, T.; YANG, Z.; YIN, Y.; FANG, W. Advances in industrial harvesting techniques for edible microalgae: Recent insights into sustainable, efficient methods and future directions. **Journal of Cleaner Production**, p. 140626, 2024.

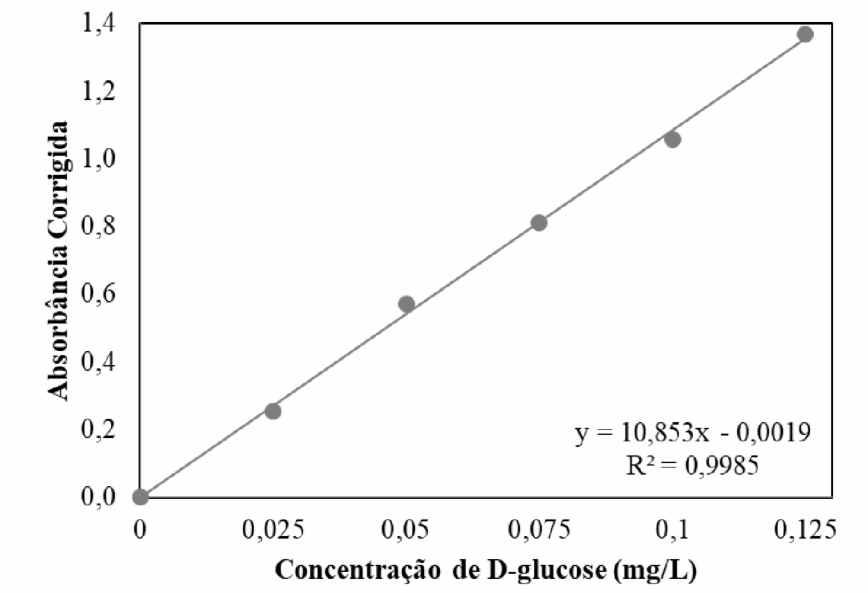
ZHU, Y.; LAO, F.; PAN, X.; WU, J. Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability. **Biomolecules**, v. 12, n. 11, p. 1622, 2022.

ZHU, Y.; ZHAO, X.; ZHANG, X.; LIU, H. Extraction, structural and functional properties of *Haematococcus pluvialis* protein after pigment removal. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 1073-1083, 2019.

APÊNDICES

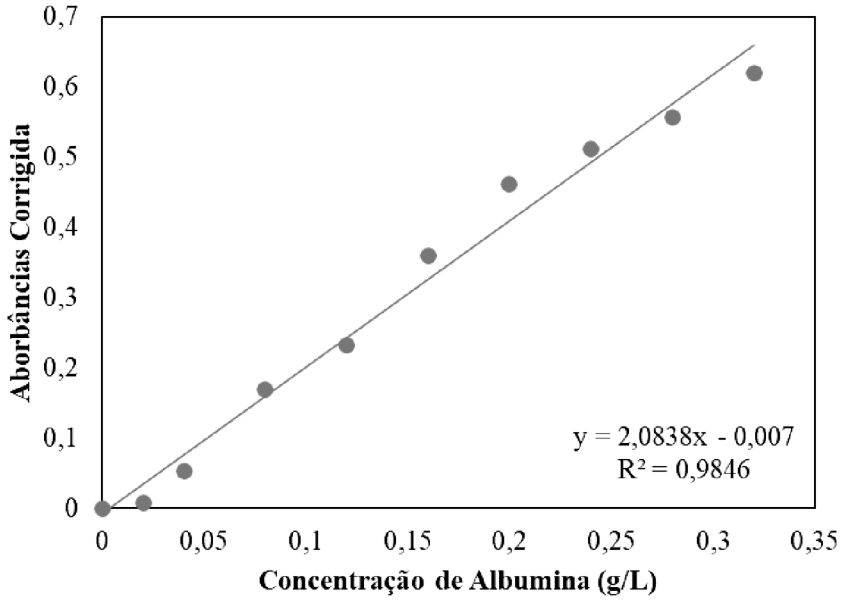
Apêndice A - Curva Padrão de D-glucose

Amostra	Concentração de D-Glucose (mg/L)	Absorbância Corrigida
A	0	0
B	0,025	0,256
C	0,05	0,575
D	0,075	0,814
E	0,1	1,063
F	0,125	1,372



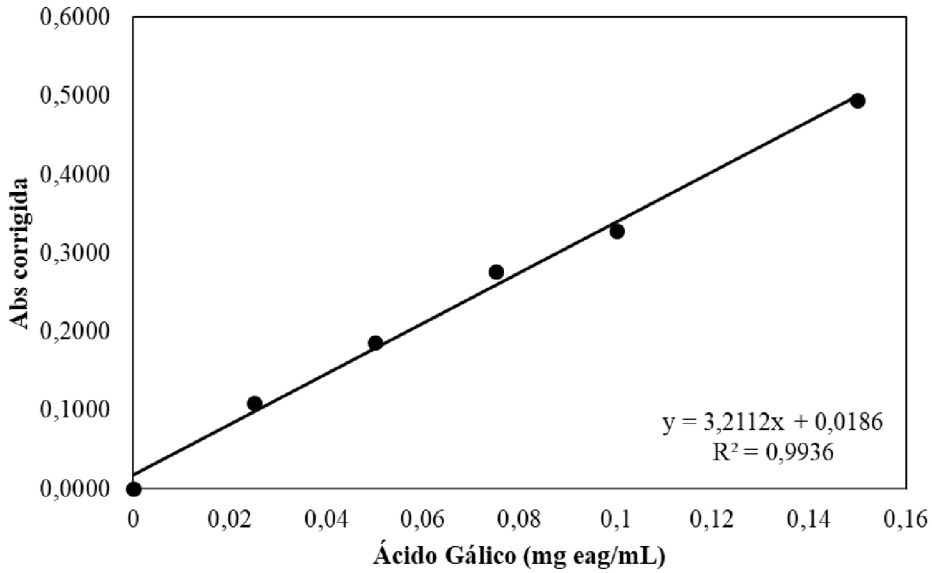
Apêndice B - Curva Padrão de Albumina

Amostra	Concentração de Albumina (g/L)	Absorbância Corrigida
Branco	0	0,000
A	0,02	0,008
B	0,04	0,052
C	0,08	0,169
D	0,12	0,233
E	0,16	0,359
F	0,2	0,462
G	0,24	0,512
H	0,28	0,557
I	0,32	0,620



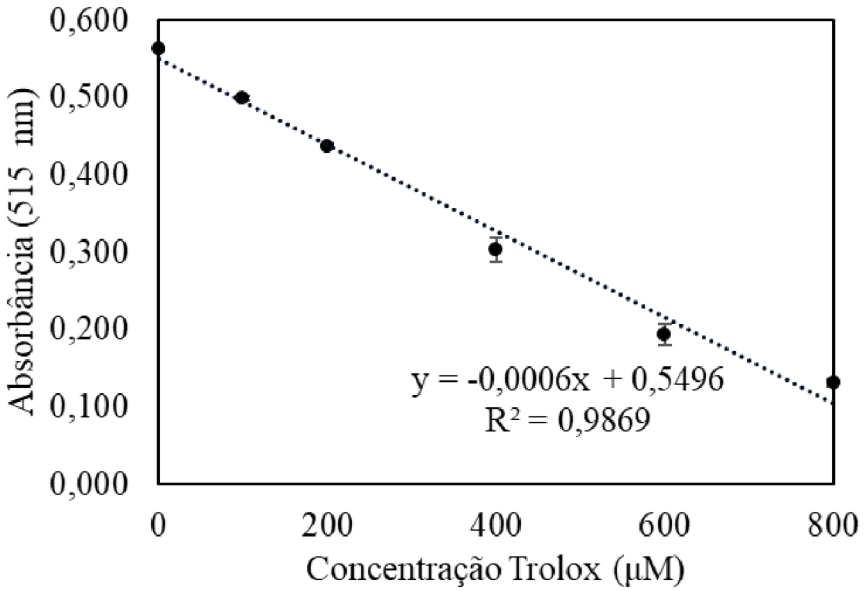
Apêndice C - Curva Padrão de Ácido Gálico

Amostra	Concentração de Ácido Gálico (mg EAG/mL)	Absorbância Corrigida
Branco	0	0,000
A	0,025	0,1096
B	0,05	0,1864
C	0,075	0,2770
D	0,1	0,3285
E	0,15	0,4949



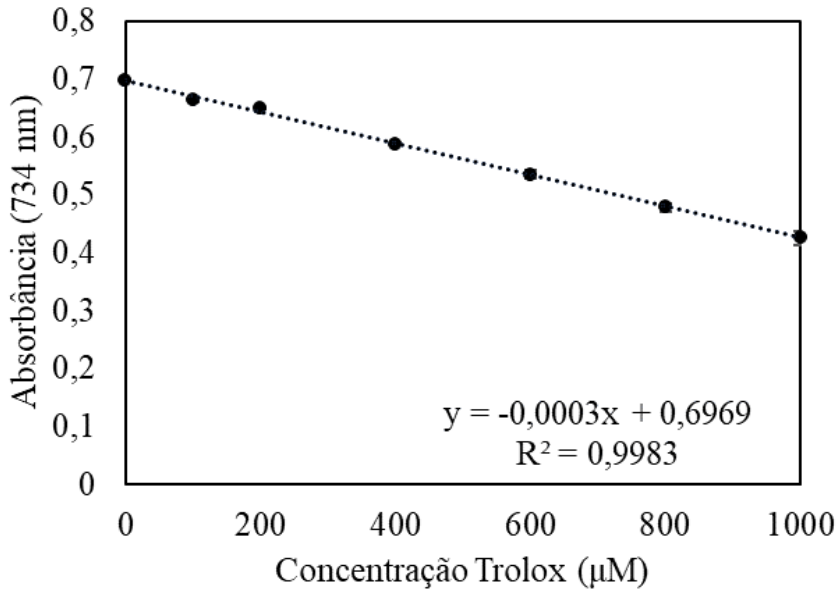
Apêndice D - Curva Padrão de Trolox para DPPH

Amostra	Solução padrão Trolox (µM)	Absorbância (515 nm)
A	0	0,563
B	100	0,499
C	200	0,437
D	400	0,303
E	600	0,193
F	800	0,131



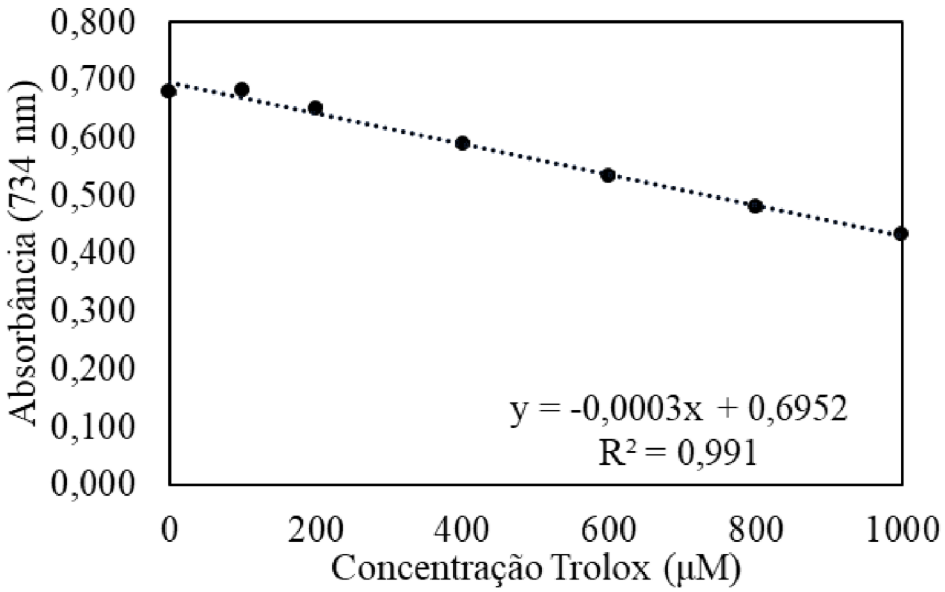
Apêndice E - Curva Padrão de Trolox para ABTS (água)

Amostra	Solução padrão Trolox (µM)	Absorbância (734 nm)
A	0	0,697
B	100	0,664
C	200	0,650
D	400	0,587
E	600	0,535
F	800	0,478
G	1000	0,425



Apêndice F - Curva Padrão de Trolox para ABTS (Etanol)

Amostra	Solução padrão Trolox (µM)	Absorbância (734 nm)
A	0	0,678
B	100	0,682
C	200	0,650
D	400	0,590
E	600	0,535
F	800	0,481
G	1000	0,432



Apêndice G - Curva Padrão de Sulfato Ferroso para FRAP

Amostra	Solução Sulfato Ferroso (µM)	Absorbância (734 nm)
A	0	0
B	500	0,380
C	1000	0,675
D	1500	0,918
E	2000	1,194

