



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

**REJANE MARIA MOREIRA DE LIMA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS FRAÇÕES**  
**PROTEICAS DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus***

**FORTALEZA**

**2016**

REJANE MARIA MOREIRA DE LIMA

AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS FRAÇÕES PROTEICAS  
DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva

FORTALEZA

2016

REJANE MARIA MOREIRA DE LIMA

AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS FRAÇÕES PROTEICAS  
DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

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

---

Prof. Dr. Francisco Sávio Macambira  
Instituto Federal de Educação do Ceará – IFCE

---

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho  
Universidade Federal do Ceará – UFC

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

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

---

- L71a Lima, Rejane Maria Moreira de.  
Ação Antimicrobiana e antioxidante in vitro das frações proteicas da microalga *Scenedesmus obliquus* /  
Rejane Maria Moreira de Lima. – 2017.  
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.  
Coorientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. Compostos bioativos. 2. *Scenedesmus obliquus*. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade  
antimicrobiana. I. Título.

CDD 664

---

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida.

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao professor Carioca por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança e por sempre ter demonstrado solicitude quando mais foi preciso para a condução da pesquisa.

Ao professor André Luís, por suas grandes contribuições no desenvolvimento da pesquisa, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela paciência e orientação.

A Wanessa Abreu que tanto me ajudou em todas as fases da condução dos experimentos, sempre atenciosa e disposta a ajudar, independentemente do que fosse e da hora que fosse.

A Eveline, Natália e Celma pelo apoio nos primeiros experimentos realizados no PADETEC.

Aos colegas Mário, Tanimara, Cássia, Samara, Thalita, Vinícius, Wallady, Eldo, Túlio, Elke e Seu Manuel pelo apoio e carinho.

Aos membros da banca pela receptividade, compreensão e colaboração.

À CAPES pelo apoio financeiro que tanto contribuiu para esta etapa da minha vida profissional.

Às minhas irmãs Rafaela e Raquel pelas grandes contribuições nos momentos decisivos para a conclusão deste trabalho.

À minha família que tanto amo, agradeço pela força e compreensão em todos os momentos.

## RESUMO

O aumento de pesquisas envolvendo a extração de compostos biologicamente ativos de microalgas se deu recentemente em todo o mundo, graças ao avanço de estudos que comprovam o seu potencial biotecnológico, nutricional e medicinal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produtividade de clorofila *a*, a taxa de crescimento celular e o teor de proteínas solúveis da microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada em fotobiorreator plano vertical em meio de cultivo W.C. (Water Culture) modificado sob condições controladas de temperatura e luminosidade. Além disso, avaliou-se as frações proteicas submetidas à precipitação com sulfato de amônio em diferentes níveis de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%), quanto a atividade antifúngica, empregando o método de disco difusão, e a atividade antioxidante, utilizando o método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Fez-se a quantificação do teor de aminoácidos essenciais presentes na fração que apresentou maior atividade. Os resultados demonstraram uma produção de clorofila *a* de 8,5 mg/ L, a Densidade Celular Máxima (DCM) foi de  $130 \times 10^5$  cel/ mL e a concentração de proteínas nas frações proteicas avaliadas variou entre 0,485 a 1,042 mg/ mL. O perfil eletroforético das frações proteicas delineou-se por uma ampla faixa de peso molecular que variou entre 14,4 kDa e 116 kDa, predominando uma maior concentração de proteínas na faixa entre 21,5 e 45 kDa. As frações proteicas testadas (FrP<sub>0-20%</sub>, FrP<sub>20-40%</sub>, FrP<sub>40-60%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub>) apresentaram efeito antimicrobiano contra os fungos *C. kefyr*, *A. niger* e *A. fumigatus*, porém somente a fração FrP<sub>40-60%</sub> e o tratamento controle apresentaram halo de inibição para *C. albicans*. Nenhum tratamento teve efeito inibidor do crescimento das bactérias *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Apenas as frações FrP<sub>40-60%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub> apresentaram inibição do crescimento da bactéria *S. aureus*. A fração FrP<sub>40-60%</sub> apresentou resultados superiores em todas as análises com um efeito antioxidante máximo de 85% na concentração de 0,8 mg/ mL. A análise quantitativa de aminoácidos essenciais revelou a presença de Cis, Lis, Leu, Fen, Tre, Tir, Val, Met, Ile e Trp. Os resultados evidenciaram que *Scenedesmus obliquus* é uma fonte promissora de biocompostos que podem ser utilizados na fabricação de suplementos alimentares para humanos e animais, elaboração cosméticos e de medicamentos.

**Palavras-chave:** Compostos bioativos. *Scenedesmus obliquus*. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The increase in research involving the extraction of biologically active compounds microalgae has recently around the world, thanks to the advancement of studies that demonstrate its potential biotechnology, and medical nutrition. The aim of this study was to evaluate the productivity of chlorophyll a, the rate of cell growth and the soluble protein content of microalgae obliquus *Scenedesmus* grown in vertical photobioreactor amid toilet cultivation (Water Culture) modified under controlled conditions of temperature and light. In addition, we evaluated the protein fractions subjected to precipitation with ammonium sulfate at different levels of saturation (0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%), as the antifungal activity, using the disk diffusion method, and the antioxidant activity using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). There was the quantification of the essential amino acid content present in the fraction with the highest activity. The results showed a production of 8.5 mg chlorophyll a / L Cell density Maximum (DCM) was  $130 \times 10^5$  cells / ml and the protein concentration measured in protein fractions ranged from 0.485 to 1.042 mg / ml. The electrophoretic pattern of protein fractions delineated by a wide range of molecular weight ranging from 116 kDa and 14.4 kDa, predominantly greater concentration of proteins in the range between 21.5 and 45 kDa. The protein fractions tested (FrP0-20% FrP20-40% FrP40-60% and FrP60-80%) had antimicrobial effect against *C. kefyr* fungus, *A. niger* and *A. fumigatus*, but only a fraction FrP40-60 % and the control treatment showed inhibition zone for *C. albicans*. No treatment had inhibitory effect of growth of bacteria *S. epidermidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Only FrP fractions 40-60% and FrP60-80% showed growth inhibition of *S. aureus*. The FrP40-60% fraction showed superior results in all analyzes with a maximum of 85% antioxidant effect at a concentration of 0.8 mg / mL. Quantitative analysis of essential amino acids revealed the presence of Cys, Lys, Leu, Phe, Thr, Tyr, Val, Met, Ile and Trp. The results showed that *Scenedesmus obliquus* is a promising source of biocompounds that can be used in the manufacture of food supplements for humans and animals, cosmetics and medicines preparation.

**Keywords:** Bioactive compounds. *Scenedesmus obliquus*. Antioxidant activity. Antimicrobial activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Quadro com as principais características das condições de cultivo de microalgas.....	15
Figura 2 -	Vista aérea de cultivo de microalgas em sistema aberto.....	18
Figura 3 -	Foto de cultivo feito em Turf Scrubber. Tela de fixação no final do escoamento do efluente.....	18
Figura 4 -	Foto de cultivo feito em fotobiorreator.....	19
Figura 5 -	Fluxograma de produção de microalgas.....	22
Figura 6 -	Intervenção dos carotenoides na prevenção de doenças crônicas.....	27
Figura 7 -	Exemplo de reação de auto-oxidação de lipídeos, tradicionalmente descrita como uma reação em cadeia.....	28
Figura 8 -	<i>Scenedesmus ecornis</i> .....	30
Figura 9 -	<i>Scenedesmus obliquus</i> .....	30
Figura 10 -	<i>Scenedesmus dimorphus</i> .....	30
Figura 11 -	<i>Scenedesmus quadricauda</i> .....	30
Figura 12 -	Exemplo de arranjos celulares observados no gênero <i>Scenedesmus</i> ....	32
Figura 13 -	Curva de crescimento da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivada em fotobiorreator durante quatorze dias.....	46
Figura 14 -	Quantidade de clorofila a avaliada durante os diferentes dias de crescimento da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> em fotobiorreator....	49
Figura 15 -	Monitoramento do pH do meio de cultivo durante os diferentes dias de crescimento da microalga.....	52
Figura 16 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%) das diferentes frações proteicas obtidas com extrato bruto da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> precipitado com sulfato de amônio. MM – marcadores moleculares; 1) Fração 0-20%; 2) Fração 20-40%; 3) Fração 40-60% e 4) Fração 60-80%.....	55
Figura 17 -	Atividade antioxidante das frações proteicas da microalga <i>S. obliquus</i> usando o ácido ascórbico como controle positivo.....	61



Figura 18 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%) das diferentes frações proteicas obtidas com extrato bruto da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> precipitado com sulfato de amônio. MM – marcadores moleculares; 1) Fração 0-20%; 2) Fração 20-40%; 3) Fração 40-60% e 4) Fração 60-80%.....	59
Figura 19 -	Atividade antioxidante das frações proteicas da microalga <i>S. obliquus</i> usando o ácido ascórbico como controle positivo.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio W.C., modificado por Guillard e Lorenzen (1972) para cultivo de microalgas.....	17
Tabela 2 -	Composição e concentração das soluções-estoque do meio BBM...	18
Tabela 3 -	Determinação da concentração e da quantidade de proteínas solúveis totais presentes no extrato bruto e nas frações proteicas precipitadas com sulfato de amônio obtidas da microalga <i>S. obliquus</i> .....	53
Tabela 4 -	Atividade antifúngica das frações proteica de microalga <i>S. obliquus</i> avaliada pelo método de difusão em disco.....	57
Tabela 5 -	Atividade antibacteriana das frações proteicas de microalga <i>S. obliquus</i> contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliada pelo método de difusão em disco.....	58
Tabela 6 -	Quantificação dos aminoácidos essenciais presentes na fração proteica FrP40-60% obtida do extrato total da microalga <i>S. obliquus</i> .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE - Acetil colinesterase

ATP - Adenosina trifosfato

BBM - Bold's Basal Medium

B.O.D - Biochemical Oxygen Demand

BSA - Bovine Serum Albumin

DCM - Densidade Celular Máxima alcançada

DM - Degeneração macular

DM – Detmer's Medium

EACC - Ascitic Ehrlich Carcinoma Cells

EB - Extrato Bruto

EPA - Eicosapentaenoic acid

GAE - Equivalente em Ácido Gálico

Hep G2 - Liver Hepatocellular Cells

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

ITS-2 - Internal Transcribed Spacer

LabBMol - Laboratório de Biotecnologia Molecular

MC – Medium for *Chlorella ellipsoidea*

MDL - Mecanismo de Desenvolvimento Limpo

MM – Marcadores Moleculares

P.A - Para Análise

PBS - Phosphate Buffered Saline

PGE - Prostaglandina E

rDNA - Recombinante DNA

ROS - Reative Oxigen Specie

SDS-PAGE - Sódio dodecilsulfato - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SGR - Specific Growth Rate

TSB - Tryptic Soy Broth

UV - Ultra Violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\geq$  Maior que

= Igualdade

$\pm$  Mais ou menos

$\mu$  Micro

/ Divisão

$\alpha$  Alfa

x Multiplicação

$\gamma$  Gama

% Percentual

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	17
2.1.	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	Microalgas: uma visão geral.....	18
3.2	Cultivo de microalgas.....	20
3.3	Benefícios da produção de microalgas.....	26
3.4	Atividade antimicrobiana das microalgas.....	30
3.5	Atividade antioxidante dos compostos microalgas.....	32
3.6	Características das microalgas do gênero <i>Scenedesmus</i> .....	36
3.7	A espécie <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	39
4	MATERIAIS.....	41
4.1	Microrganismos.....	41
4.1	Meios de cultura e reagentes.....	41
5	METODOLOGIA.....	42
5.1	Cultivo da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	42
5.2	Avaliação da densidade celular.....	43
5.3	Análise da taxa de crescimento específico das microalgas.....	43
5.4	Análise da clorofila <i>a</i> .....	43
5.5	Análise de pH do meio durante o cultivo das microalgas.....	44
5.6	Extração de proteínas das microalgas.....	44
5.7	Precipitação das proteínas com sulfato de amônio.....	44
5.8	Dosagem de proteínas solúveis.....	45
5.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	45
5.10	Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana das frações proteicas da microalga <i>S. obliquus</i> .....	46
5.10.1	Condições de cultivo dos fungos e das bactérias.....	46

5.10.2	Avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o método de difusão em disco.....	48
5.11	Avaliação da atividade antioxidante das frações proteicas da microalga <i>S. obliquus</i> .....	48
5.12	Determinação do perfil de aminoácidos essenciais presentes na fração proteica da microalga <i>S. obliquus</i> .....	49
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
6.1	Resultados da avaliação da densidade celular.....	50
6.2	Resultados da análise da clorofila <i>a</i> .....	52
6.3	Resultados da análise da taxa de crescimento específico da <i>S. obliquus</i> .....	54
6.4	Resultados da avaliação de pH do meio durante o cultivo das microalgas.....	55
6.5	Resultados da precipitação das proteínas com sulfato de amônio e dosagem de proteínas solúveis.....	57
6.6	Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)...	58
6.7	Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana das frações proteicas da microalga <i>S. obliquus</i> .....	60
6.8	Avaliação da atividade antioxidante das frações proteicas da microalga <i>S. obliquus</i> .....	64
6.9	Resultado da determinação do perfil de aminoácidos essenciais presentes na fração proteica da microalga.....	67
	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem contribuído para a elucidação de muitos elementos envolvidos em processos biológicos naturais relevantes para a manutenção da vida. Processos naturais como o mecanismo de defesa e as respostas inatas na aclimação dos seres vivos a um novo ambiente são capazes de surpreender com seus mecanismos complexos e precisos, despertando nos pesquisadores a curiosidade para tentar compreender como isso ocorre e como controlá-las. Este trabalho constitui uma contribuição ao estudo das aplicações farmacêuticas de componentes ativos de microalgas, como atividade antioxidante e antimicrobianas de frações proteicas da microalga *Scenedemus obliquus* cultivada em fotobiorreator plano vertical realizado na Universidade Federal do Ceará – UFC, numa parceria entre o Laboratório de Desenvolvimento de Processos, coordenado pelo Professor Dr. José Osvaldo Beserra Carioca e o Laboratório de Biotecnologia Molecular, LabBMol, coordenado pelo Professor Dr. André Luís Coelho da Silva. No entanto, faz-se necessário colocar, de antemão, algumas considerações sobre pesquisas já realizadas nesta instituição acerca dos grandes benefícios da produção de microalgas e suas aplicações. Entre eles a tese de doutorado desenvolvida na UFC em 2009, sob a orientação do Professor Carioca, tendo como autor o Professor Sávio Macambira do Instituto Federal de Educação do Ceará - IFCE. Em seu trabalho foi abordado amplamente as inúmeras aplicações clássicas possíveis com as microalgas, como o uso em rações para peixes e camarões, muito praticado nos países da Ásia. Além disso, tratou da produção de biodiesel e mostrou também a importância dessa fonte alternativa capaz absorver o grande volume de CO<sub>2</sub> gerado nas suas termoelétricas.

O Professor Alexandre Costa Araújo da Universidade Estadual do Ceará - UECE em seu trabalho publicado como um capítulo nos Anais do "International Microalgae and Biofuels Workshop" realizado na UFC, coordenado pelo Professor Carioca em 2010, observou as condições climáticas favoráveis a produção de microalgas, percebendo no Nordeste do Brasil, mais precisamente no Ceará, o seu grande potencial para a produção de microalgas. Isso se deve ao fato de que as regiões tropicais recebem um grande volume de radiação solar na atmosfera, a qual é praticamente constante durante todo o ano, observando-se uma pequena variação na intensidade desta radiação entre as quatro estações do ano, o que é um fato de enorme importância aplicada para o cultivo de microalgas nesse estado.

As microalgas são organismos que podem ser cultivadas em águas doce ou salgada no nordeste brasileiro em face da sua elevada insolação e pouca disponibilidade de terras adequadas para a agricultura tradicional. Microalgas planctônicas (fitoplâncton) desempenham um relevante papel nos ambientes aquáticos os quais são fundamentais para o desenvolvimento dos ciclos biogeoquímicos, que servem como base para a cadeia alimentar aquática. A fotossíntese é o mais importante processo disseminado na superfície da terra capaz de reduzir o carbono inorgânico (CO<sub>2</sub>) para formar matéria orgânica, base da vida na terra. Os organismos capazes de realizar esta fascinante atividade são chamados de *produtores primários*, uma vez que eles fornecem a matéria orgânica para todos os outros organismos do ecossistema terrestre. A fotossíntese aeróbica em células eucarióticas tem origem em eventos endosimbióticos nos quais cianobactérias são incorporadas como agentes simbiotes. As cianobactérias são organismos vitais e possivelmente foram os primeiros organismos nos oceanos, nas primeiras etapas da vida na terra, cuja função primordial é transformar energia luminosa em energia química. Vale salientar que apesar das suas inúmeras aplicações, na atualidade, ainda é muito pouco estudada a biodiversidade das microalgas brasileiras, notadamente, as existentes na região Nordeste, a qual é rica em tipos e espécies destes organismos (KRUSE *et al.* 2005).

O cultivo de microalgas em ambiente confinado foi desenvolvido na Alemanha, como necessidade de produzir alimentos após as grandes guerras. O Nordeste brasileiro é um ambiente ideal para o cultivo de microalgas, pelo fato desta região apresentar uma temperatura anual média praticamente constante durante quase todo o ano. Particularmente, o Nordeste apresenta um grande volume de água armazenada nos açudes construídos nos últimos séculos para prover água para a sobrevivência da sua população rural, embora este volume apresente grande variação anual em face da alta taxa de evaporação observada. Desde a década de 1940, as microalgas vem sendo estudadas como meio para o tratamento biológico de águas residuais domésticas e/ou industriais visando a produção de água de reuso e biomassa algal, de acordo com os trabalhos pioneiros desenvolvidos pelo grande sanitarista Americano, Oswaldo W. G (OSWALD e GOLUEKE, 1960). Nestes estudos, o potencial de utilização dos lipídeos foi proposto como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel. A aluna Herivanda Gomes de Almeida, recentemente concluiu uma dissertação de mestrado no Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental – DEHA/ UFC, sobre as potencialidades do cultivo de dois tipos de microalgas para esta finalidade sob a orientação do Professor Francisco Suetônio Bastos Mota e Coorientação do Prof. Carioca. Convém salientar



também que esta tecnologia pode ser usada para tratar o grande volume de esgotos domésticos não tratados que são lançados em rios, açudes e mesmo no mar. Considerando o potencial poluidor destes tipos de efluentes e a necessidade de eliminar os impactos ambientais associados a produção simultânea de biocompostos de valor agregado, tem-se proposto o emprego de biorrefinarias. Nesse sentido, elas se tornaram instrumentos que podem conjugar estas finalidades na construção de mapas tecnológicos de grande importância ecológica e produtiva. Atualmente este é um recurso base da economia verde, uma nova economia de plena sustentabilidade social, ambiental e econômica promovida pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente - PNUMA, como também o Banco Mundial para ser aplicada em países tropicais emergentes como o Brasil.

O Professor Carioca, seus colaboradores acadêmicos e os estudantes de pós-graduação da UFC publicaram no Anais do 16thIBS2014, dois trabalhos científicos em que um modelo de biorrefinaria de segunda geração foi proposto. O objetivo é utilizá-lo como instrumento para eliminar a poluição causada pelos resíduos e efluentes da aquicultura praticada no açude do Castanhão no Ceará, visando a produção de Tilápia, como alimento proteico para as populações de baixa renda. Uma nova tese de doutorado está em pleno desenvolvimento no Departamento de Tecnologia de Alimentos - DETAL, sob a orientação desse mesmo professor pesquisador visando o cultivo de três espécies de microalgas *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* usando o efluente de um digestor anaeróbico que converte a maior parte da matéria orgânica contida na vísceras das tilápias. O fato técnico importante para ser destacado é que a matéria orgânica residual, não convertida em biogás, é usada como nutriente para o cultivo das microalgas, o que constitui um fato de grande importância econômica no processo de reduzir os custos da sua produção.

Finalizando, vale ressaltar que a grande contribuição científica desses trabalhos fica por conta da iniciativa da UFC em produzir conhecimento de grande relevância, não só para a academia, como também para o estado do Ceará. Com isso o Estado poderá se beneficiar amplamente com a implantação de projetos que envolvam o emprego de biorrefinarias utilizando microalgas.

À despeito do estudo do conteúdo de componentes ativos nas microalgas, vem como adicional os grandes benefícios que esses microrganismos promovem ao produzirem naturalmente biocompostos de alto valor biológico e comercial, tais como antioxidantes, aminoácidos e proteínas funcionais. Muitos estudos são feitos buscando avaliar a atividade biológica de extratos de microalgas, porém faz-se necessário continuar avançando, uma vez que muitas espécies em

potencial ainda continuam pouco exploradas. Neste estudo realizou-se uma revisão bibliográfica considerando os principais avanços nas pesquisas envolvendo a obtenção de compostos biológicos provenientes de microalgas, além disso, buscou-se avaliar o potencial da microalga *Scenedesmus obliquus* como fonte de compostos proteicos e os possíveis efeitos que essas moléculas exercem sobre microrganismos, além da sua capacidade de neutralizar a ação de radicais livres.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produtividade e a composição de clorofila *a* da microalga *Scenedesmus obliquus* durante o cultivo em fotobiorreator plano vertical com meio de W.C. (Water culture) Avaliar a atividade antimicrobiana e a atividade antioxidante das frações proteicas obtidas da biomassa microalgal a fim de observar a ocorrência de atividades biológicas nessas frações.

### 2.2 Objetivos Específicos

Definiu-se como objetivos específicos para este estudo:

- Avaliação da densidade celular e análise da taxa de crescimento específico das microalgas cultivadas em meio W.C;
- Análise da clorofila *a* durante a curva de crescimento;
- Análise do pH do meio durante o cultivo das microalgas;
- Extração, dosagem e fracionamento de proteínas solúveis da biomassa de *S. obliquus*;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações proteicas (SDS PAGE);
- Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana das frações proteicas da microalga *S. obliquus*;
- Avaliação da atividade antioxidante das frações proteicas da microalga *S. obliquus*;
- Determinação do perfil de aminoácidos essenciais presentes na fração proteica da microalga.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microalgas: uma visão geral

O termo microalgas é designado a organismos unicelulares, com a probabilidade de formar colônias ou filamentos, com variada composição de pigmentos e fotoautotróficos (OLAIZOLA, 2003). Sua classificação ainda gera discussões, no entanto, ferramentas da biologia molecular têm contribuído para o esclarecimento e novos agrupamentos filogeneticamente não relacionados tiveram que ser realocados em grupos taxonômicos distintos (filos, ordens, famílias, etc.), ou em novos grupos criados para acomodar organismos de origens filogenéticas diferentes. De acordo com a sua estrutura celular as microalgas podem ser classificadas em dois grupos: procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos. Estes últimos estão divididos em três grandes grupos: Chromalveolata, Archaeplastida e Excavata. Ao grupo Chromalveolata pertencem as algas Phaeophyceae (algas pardas ou marrons), e ao grupo Archaeplastida pertencem às Chlorophytas (algas verdes) e Rhodophytas (algas vermelhas) (ADL *et al.*, 2005; SILVA, 2010).

Esses organismos apresentam uma estrutura celular simples e são altamente eficientes na conversão de energia solar em energia química para exercer funções biológicas, sendo responsáveis pela maior parte do oxigênio molecular disponível no planeta (GRESSLER *et al.*, 2011). Além disso, sua biomassa é a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos, nelas são encontrados compostos como carboidratos, além de lipídeos, pigmentos e proteínas. Estão distribuídas na natureza ocorrendo em ambientes de água doce e salgada, sobre troncos de árvores, rochas, desertos, superfície de neves e geleiras, e fontes termais (RAVEN *et al.*, 2007).

Uma das mais antigas utilidades das microalgas remota dos tempos antigos, com o seu emprego na alimentação humana por povos que viviam próximo do Lago Texcoco, no México, além dos nativos do Lago Chade na África, e por povos da Ásia. Produtos feitos com biomassa da *Spirulina spp.* e outras algas do gênero *Nostoc*, eram empregados para o suprimento de proteínas na alimentação (BARROS, 2010; DERNER *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2013). Somente na década de 60 foi feita a primeira comercialização de microalgas como fonte nutricional pelo Japão, e só algum tempo depois, foi introduzido no mercado americano (AMBROSI *et al.*, 2008). As bases para implantar processos tecnológicos voltados para o cultivo de microalgas foram estabelecidas nesse mesmo período em outros países como Alemanha e Israel (MAGRO, 2010).

Nos últimos anos, o comércio e o cultivo de biomassa microalgal sofreu uma vasta expansão abrindo mercado também na França, Tailândia, China, México e Brasil, sendo que o Japão ainda é o maior consumidor e detentor de patentes envolvendo produtos e tecnologias de microalgas (MENDONÇA *et al.*, 2013; DUARTE, 2010).

O aumento exponencial da produção de microalgas no mundo todo só se deu recentemente, com o avanço de pesquisas de avaliação do seu potencial biotecnológico e nutricional, uma vez que são fontes de biomassa rica em compostos como carotenoides, lipídeos, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos, carboidratos, proteínas e vitaminas (AMBROSI *et al.*, 2008; DERNER *et al.*, 2006; RICHIMOND, 2004; SAMARAKON e JEON, 2012).

Entre as principais espécies de valor comercial estão a *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Porphyridium cruentum*, *Isochysis galbana*, *Scenedesmus almeriensis*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Anabaena* e *Dunaliella bardawil* (CHACÓN-LEE e GONZÁLEZ-MARINO, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Outros fatores têm chamado a atenção da comunidade acadêmico-científica e de vários segmentos industriais como as indústrias farmacêuticas, químicas, de alimentos e de biotecnologia, como as possíveis aplicações dos extratos de algas e microalgas para fins medicinais, graças às atividades biológicas comprovadas *in vitro*. Entre elas estão a atividade antioxidante (SHEIH, WU e FANG, 2007), a inibição da replicação viral (LOPES *et al.*, 2011), atividade anti-hipertensiva (MURRAY e FITZGERALD, 2007), imuno moduladora (MORRIS *et al.*, 2007), anticancerígena (SHEIH *et al.*, 2010) e anticoagulante (ATHUKORALA *et al.*, 2006), as quais estão associadas a presença de compostos fenólicos, proteínas, hidrolisados proteicos ou peptídeos presentes em sua estrutura celular. Tais características contribuem para a mostrar a relevância da exploração desses microrganismos a fim de consolidar o seu cultivo em escala comercial em regiões onde a produção ainda é emergente.

No Brasil, foi o sucesso no cultivo de microalgas para alimentação de animais aquáticos que inseriu o país no cenário internacional envolvendo esta temática (LOURENÇO, 2006). Atualmente a produção em escala comercial no país está relacionada com a alimentação desses organismos, sendo utilizada de forma direta, na larvicultura de camarões e moluscos marinhos, ou indireta, no enriquecimento nutricional de rotíferos e copépodos utilizados como alimento nos cultivos de peixes de importância econômica para a aquicultura brasileira. Os centros de cultivo de

microalgas são vinculados às empresas que estão localizadas principalmente na Região Nordeste, Sudeste e Sul, onde se concentram os maiores centros de cultivo (DANTAS, 2013).

A empresa Claeff Engenharia e Produtos Químicos Ltda., localizada em Pernambuco, possui uma unidade de produção instalada especialmente para o cultivo e extração de microalgas (*Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* e *Haematococcus*) adaptadas às condições da região Nordeste visando a produção de insumos úteis às indústrias de alimentos e cosméticos. Cápsulas de *Chlorella* e *Spirulina* e *Haematococcus* (Astaxantina), assim como extratos glicólicos destas espécies, são produtos já desenvolvidos por esta empresa (produtos com patente depositada) (DANTAS, 2013).

A empresa Algae Biotecnologia tem foco na produção de biodiesel e potencial de sequestro de carbono pelas microalgas, incluindo os projetos dentro do âmbito do Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL). Além disso, há especial preocupação com a minimização de uso de água e valorização de resíduos agrícolas. De acordo com Dantas (2013) a empresa americana Solazyme, que desenvolve produtos biotecnológicos a partir de microalgas (biocombustíveis, químicos, alimentos funcionais e cosméticos) recentemente vem investindo no Brasil na produção de biodiesel de alga em parceria com empresas nacionais (SOLAZYME, 2012; DANTAS, 2013).

### **3.2 Cultivo de microalgas**

Alguns fatores devem ser levados em consideração antes de se iniciar um cultivo de microalgas. De acordo com Dantas (2012; 2013) ao determinar a espécie que se deseja cultivar e o objetivo da aplicação desta, alguns parâmetros importantes precisam ser analisados para a viabilidade do cultivo e a obtenção da biomassa como facilidades que permitam o seu cultivo em larga escala, adaptação da espécie ao sistema de cultivo (condições artificiais de crescimento), condições que permitam a síntese do composto de interesse, elevada taxa de crescimento, baixo custo de produção, entre outros. Comumente, o ciclo de vida das microalgas é estabelecido em poucas horas, o que permite que a população seja duplicada em um curto espaço de tempo. Esta alta produtividade é um dos pontos principais para determinar a viabilidade do cultivo, assim como a obtenção da biomassa algal e dos produtos de interesse.

As principais formas de cultivos de microalgas são: fototrófica, heterotrófica, mixotrófica e foto-heterotrófica. No quadro 1 estão as características de cada uma de acordo com a fonte de energia e a fonte de carbono utilizada.

Figura 1 – Quadro com as principais características das condições de cultivo de microalgas.

	Fototrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Fotoheterotrófico
Fonte de energia	Luz	Orgânica	Luz e orgânica	Luz
Fonte de carbono	Inorgânica	Orgânica	Inorgânica e orgânica	Orgânica
Densidade celular	Baixa	Alta	Média	Média
Tipo de reator	Aberto ou fotobiorreator	Fermentador convencional	Fotobiorreator fechado	Fotobiorreator fechado
Custo	Baixo	Médio	Alto	Alto
Principais desvantagens	Baixa densidade Contaminação em sistema aberto	Alto custo de substrato Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação

Fonte: Hakalin, 2014.

Essas condições variam de acordo com cada espécie cultivada e têm influência direta na composição bioquímica da biomassa, que não é determinada somente pela natureza de cada espécie algal, mas também por fatores como intensidade e qualidade da luz (fluorescente ou de LED), temperatura, pH, nutrientes e agitação (MIAO e WU, 2004; BERTOLDI, SANT'ANNA e OLIVEIRA, 2008). Esses fatores ambientais e o seu monitoramento podem contribuir para a otimização do cultivo. Assim sendo, a indução da acumulação de metabólitos (tais como de carotenoides, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados e lipídeos) pode ser realizada facilmente por meio da manipulação dessas condições (MATA, ALMEIDA e CAETANO, 2013). Essa prática é eficiente uma vez que microalgas de uma mesma espécie podem apresentar diferentes composições de proteínas, carboidratos e lipídeos, quando cultivadas em meios nutricionalmente distintos (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2014).

Para o crescimento ótimo das microalgas é necessária uma série de nutrientes, que dependendo das espécies requerem variações. Quanto aos macronutrientes as microalgas requerem carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K). Como micronutrientes, geralmente requerem ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e cobalto (Co), enquanto algumas microalgas também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2014; MAGRO *et al.*, 2016).

Os macronutrientes são essenciais por serem constituintes estruturais abundantes de biomoléculas, de membranas e do meio intracelular, por participarem de processos de troca de energia, por regularem atividades metabólicas, dentre diversas outras funções relevantes. O carbono é o componente mais importante para síntese de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídeos. O nitrogênio é um componente fundamental dos pigmentos e o fósforo é responsável por transferir energia (ATP) e constituir moléculas estruturais. O principal papel dos micronutrientes é participar da estrutura e da atividade de diversas enzimas, que por sua vez são envolvidas em diferentes vias metabólicas das algas, e organelas celulares (como os ribossomos) (LOURENÇO, 2006; DANTAS, 2013).

O cultivo pode ser feito empregando meios de cultura sintéticos como, por exemplo, o meio Conway, o W.C., Guillard f/2, W.C. modificado, BBM, entre outros, de custo mais elevado, ou meios alternativos como água do mar, água de estuários, águas residuais das operações agrícolas e industriais, ou águas residuais domésticas. Nas tabelas 1 e 2 são descritas as composições de dois meios empregados em cultivos de algas do grupo Chlorophyceae.

Tabela 1 – Composição do meio W.C., modificado por Guillard e Lorenzen (1972) para cultivo de microalgas.

Reagentes	Solução estoque (g/L)	Meio de cultura (mL)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36.80	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	37.00	1
NaHCO <sub>3</sub>	12.60	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	11.40	1
NaNO <sub>3</sub>	85.00	1
Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si.5H <sub>2</sub> O	21.20	1
<b>Solução de ferro</b>		
EDTANa <sub>2</sub>	4.36	1
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15	
<b>Solução de micronutrientes</b>		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01	1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.022	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.01	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.18	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.006	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.00	
<b>Solução de vitaminas</b>		
Tiamina HCl	0.1	1
Biotina	0.0005	
Água destilada		1000
Correção de pH para 6,5 com solução de HCl 10% (aproximadamente 2mL)		

Fonte: Adaptado de Ohse *et al.*, (2009) e Guillard; Lorenzen (1972).



Tabela 2 – Composição e concentração das soluções-estoque do meio BBM.

	Estoque	Solução estoque	mL/Litro
Solução 1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,75 g/500mL	10
Solução 2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,25 g/500mL	10
Solução 3	Mg.SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,75 g/500mL	10
Solução 4	NaNO <sub>3</sub>	12,5 g/500mL	10
Solução 5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,75 g/500mL	10
Solução 6	NaCl	1,25 g/500mL	10
Solução 7	Na <sub>2</sub> EDTA	10 g/L	1
Solução 8	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98 g/L	1
Solução 9	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1
Elementos traços			
Solução 10	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g	1 mL
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 g	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222 g	
	NaMoO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,390 g	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079 g	
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494 g	
Solução 11	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,75 g/500 mL	0,7 mL

Fonte: Adaptado de Stein (1973).

Os principais sistemas de cultivos empregados são o sistema aberto *race way*, em águas naturais (lagos, lagoas), em lagoas artificiais, tanques, sistema *turf scrubber* ou sistemas fechados como fotobiorreatores, ambos com volumes e características diferentes (BJERK, 2012).

No sistema aberto os tanques podem ser cavados no solo e revestidos com materiais impermeáveis ou podem ser construídos com paredes, e normalmente é utilizado um sistema de pás para realizar a agitação. Os tanques abertos são adequados para um pequeno número de espécies de algas que podem tolerar as condições ambientais extremas. É um sistema consolidado, bastante utilizado no cultivo em larga escala.

De acordo com Borowitzka (1999) uma das vantagens é a facilidade de sua construção, operação (se comparado aos sistemas fechados) e a redução do custo com energia, uma vez que são utilizados tanques de pouca profundidade (30cm, por exemplo) que ficam expostos ao sol. No entanto, alguns fatores devem ser considerados antes da escolha do sistema de cultivo a ser implantado como a espécie de microalga, área de implantação do sistema, energia, água, nutrientes, clima e tipo de produto final desejado (BOROWITZKA, 1999).

Embora seja uma forma mais barata, uma das limitações do sistema aberto é que a produção comercial de biomassa de microalgas pode ser limitada devido aos riscos de contaminação por fungos, bactérias, protozoários e competição por outras microalgas que tendem a dominar a espécie original usada como inóculo; os mecanismos de agitação são menos eficientes, resultando em uma baixa produtividade de biomassa (UGWU, AOYAGI e UCHIYAMA, 2008). Além

disso, essa forma de condução do cultivo é mais vulnerável a fatores climáticos (RICHMOND, 2004).

Figura 2 – Vista aérea de cultivo de microalgas em sistema aberto.



Fonte: [www.visionmaritima.com.uy](http://www.visionmaritima.com.uy)

O Sistema *Turf Scrubber* consiste na utilização de uma comunidade de espécies de algas filamentosas, bactérias, fungos entre outras associadas, que se desenvolvem sobre uma tela por onde flui uma solução com excesso de nutrientes. Este permite o tratamento de diversos tipos de efluentes como água de escoamento agrícola, esgoto doméstico e efluente industrial. Pode ser construído em distintas conformações e tamanhos, e deve ter uma inclinação para que o efluente escorra sobre a tela de fixação da comunidade de microrganismos, sendo feita a recirculação do meio através de uma bomba. (PIZARRO *et al.*, 2006; BJERK, 2012).

Figura 3 – Foto de cultivo feito em *Turf Scrubber*. Tela de fixação no final do escoamento do efluente.



Fonte: Berjek, 2012.

Outro sistema de cultivo é o fotobiorreator, definido como um recipiente fechado (ou parcialmente fechado) que visa de maneira fototrópica, fornecer energia a partir de iluminação solar ou artificial, como lâmpadas fluorescentes ou de LED (ANDERSEN, 2005). Se comparados com os sistemas de cultivo aberto, os fotobiorreatores apresentam características mais vantajosas, pois permitem maior controle de pH e temperatura, fornecem melhor proteção da cultura contra contaminações, a agitação é mais eficiente, há menor perda por evaporação e a densidade celular atingida é maior. (BJERK, 2012; CHRISTENSON e SIMS, 2011; SELVAKUMAR e UMADEVI, 2016).

Podem ser construídos com vidro ou plástico transparente, ser horizontal, vertical, cônico e inclinados. Permitem a concentração de células muito mais elevadas do que o sistema tanques abertos, devido à grande área de iluminação, e menores problemas de contaminação. As desvantagens são gradientes de pH, oxigênio dissolvido e CO<sub>2</sub> ao longo dos tubos, o crescimento de incrustações nas paredes e estresse hidrodinâmico (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008; MAGRO *et al.*, 2016).

Figura 4 – Foto de cultivo feito em fotobiorreator.



Fonte: [www.algaenergy.es](http://www.algaenergy.es)

Esse tipo de sistema é utilizado visando a produção de biomassa e extratos microalgais para posterior produção de compostos de interesse comercial. É considerado um dos mais bem aceitos para produção de culturas em larga escala, permitindo maior estabilidade do cultivo (CHISTI, 2007; SELVAKUMAR e UMADEVI, 2016).

### 3.3 Benefícios da produção de microalgas

A biotecnologia de microalgas tem demonstrado a versatilidade do emprego dessa matéria prima biológica em vários setores. Seu emprego pode ser visto na produção de suplementos alimentares de humanos e de ração animal, podem atuar no tratamento de efluentes, biorremediação de metais pesados, nitrogênio e fósforo que causam eutrofização quando descartados diretamente nos rios. Sua biomassa serve como fonte de matéria prima para produção de biofertilizantes, biocombustíveis, até mesmo na indústria química fina (DECLEVA, 2012).

Do ponto de vista produtivo as microalgas apresentam vantagens comerciais, uma vez que são facilmente cultiváveis, sendo um sistema produtivo sem prejuízos ao meio ambiente, utilizando substratos de baixo custo e espaços pequenos, se comparado às áreas de cultivo agrícola. (DENER *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2013).

Quando comparada a processos convencionais a produtividade por área destes organismos é muito elevada, e de acordo com Brown *et al.* (1989), pode chegar de 90 a 95% de biomassa seca constituída por proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais, e no restante os ácidos nucléicos, constituindo uma importante reserva de proteínas e outras substâncias celulares que podem ser utilizadas, desde que bem exploradas tecnologicamente (LOPES, 2007; RICHMOND, 2004).

Outras vantagens sobre as culturas convencionais incluem altas taxas de crescimento e produção de óleo por unidade de área, podem ser cultivadas em regiões de solo não arável, evitando assim concorrência com as culturas alimentares. Para o seu cultivo utiliza-se menos água do que em culturas oleaginosas tradicionais, além de contribuírem para o sequestro de gases que provocam o efeito estufa, como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (PÔJO, 2016).

Desde a década de 1970 as microalgas são reconhecidas como fontes alternativas promissoras para a produção de biodiesel, mas as pesquisas acerca da produção de biocombustíveis de microalgas tomaram maior impulso nos últimos anos devido à preocupação com o esgotamento dos combustíveis fósseis, a segurança energética e as alterações climáticas, forçando os governos, cientistas e pesquisadores a explorarem fontes alternativas de energia (SAIFULLAH, KARIM e AHMAD-YAZID, 2014).

Diferentes tipos de lipídeos, hidrocarbonetos e outros óleos são produzidos por espécies de microalgas diferentes, algumas podem acumular até 80% de lipídeos por peso de biomassa seca (NARENDAR, JAYACHANDRAN e GANTAR, 2015).

A biomassa colhida pode ser utilizada para produção de energia elétrica, enquanto que o seu lipídeo bruto pode ser utilizado como combustível para transporte, uma vez que possuem 80% do teor médio de energia do petróleo (MILANO *et al.*, 2016). Outra possibilidade de aplicação após a extração do óleo é o aproveitamento de coprodutos como proteínas e biomassa, esta última usada para produzir fertilizante (SPOLAORE *et al.*, 2006), ou ser fermentada para produzir bioetanol ou metano (GRESSLER *et al.*, 2011; HIRANO *et al.*, 1998).

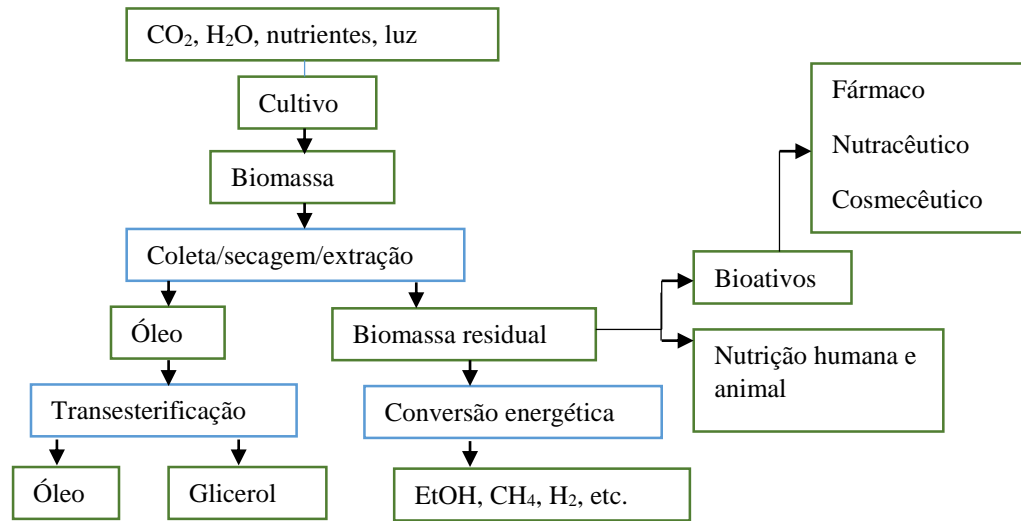
O bioetanol, um combustível limpo e renovável, é considerado uma boa alternativa para substituir o petróleo (MUSSATTO *et al.*, 2010). Embora a energia equivalente de etanol seja 68% inferior ao combustível de petróleo, a combustão do etanol é mais limpa (porque contém oxigênio). Por conseguinte, a emissão de substâncias tóxicas é inferior (KRYLOVA *et al.*, 2008). Ao usar o bioetanol em vez de combustíveis fósseis, as emissões de carbono são reduzidas em 80% e eliminadas as chuvas ácidas causadas pelo dióxido de enxofre (PÔJO, 2016).

O biometano é produzido a partir da digestão anaeróbia da matéria orgânica (neste caso, microalgas) por bactérias anaeróbias, e os principais produtos deste processo são os gases metano (55 - 75 %) e dióxido de carbono (25 – 45 %) (biogás), uma parte sólida que decanta no fundo do tanque (biofertilizante), e uma parte líquida que corresponde ao efluente mineralizado (tratado) (MUSSGNUM *et al.*, 2010; PÔJO, 2016). O metano é uma forma de energia renovável, enquanto os outros dois produtos (efluente mineralizado e o dióxido de carbono) podem ser reciclados para o sistema de cultivo de microalgas (SCHENK *et al.*, 2008; PÔJO, 2016).

A melhoria da viabilidade econômica de um processo produtivo de microalgas pode ser alcançada pela vinculação de produção de biocombustíveis com a produção simultânea de produtos de alto valor.

A seguir é apresentado um fluxograma demonstrativo do processo produtivo de microalgas em um sistema de biorrefinaria que permite melhor aproveitamento da matéria prima e de seus subprodutos resultantes das etapas de processamento:

Figura 5 - Fluxograma de produção de microalgas.



Fonte: MENEZES (2015).

A implantação de biorrefinarias é uma alternativa estudada por instituições que veem o potencial desse sistema como alternativa interessante para a consolidação de um processo produtivo de microalgas. A integração do cultivo de microalgas com a piscicultura, instalações de processamento de alimentos e estações de tratamento de águas residuais, por exemplo, oferece a possibilidade de processamento de resíduos através da reciclagem da matéria orgânica e, ao mesmo tempo o fornecimento de nutrientes de baixo custo (CARRIQUIRY, DU e TIMILSINA, 2011; MAGRO *et al.*, 2016).

Muitos processos industriais produzem águas residuais contaminadas capazes de causar danos ecológicos graves, se liberados no ambiente, sem pré-tratamento adequado. Diversos estudos utilizando o cultivo de algas são realizados visando o tratamento de águas residuais de processos industriais, destoxificação biológica e remoção de metais pesados, pois sabe-se que algumas microalgas concentram certos metais pesados (cerca de 1.000 vezes mais nas suas células do que as concentrações existentes no meio exterior), sendo a *Chlorella spp.* e a *Scenedesmus spp.* eficientes na remoção e recuperação desses metais. Além disso, as microalgas são utilizadas como bioindicadores para detecção de nutrientes e substâncias tóxicas como, por exemplo, detergentes, efluentes industriais e herbicidas (GRESSLER *et al.*, 2011; GROBBELAAR, 2004; RICHMOND, 2004; TAM *et al.*, 1998).

A biorremediação de águas residuais produzidas a partir de atividades de produção intensiva, tais como aquicultura, pecuária e produção de alimentos, é capaz de produzir quantidades

comerciais de biomassa de algas. Seu potencial para a remoção de dióxido de carbono, metais pesados e de nutrientes tais como nitrogênio e fósforo, os quais são utilizados em seu desenvolvimento, proporcionam uma solução sustentável para o desafio de poluição ambiental (SAFAFAR *et al.*, 2015). É uma opção promissora porque:

- a) Reduz a aplicação dos compostos químicos necessários;
- b) Diminui custos com métodos mecânicos convencionais, tais como a centrifugação, sedimentação por gravidade, flotação, filtração tangencial (SCHNEIDER *et al.*, 2013);
- c) Utiliza energia barata e abundante (luz solar);
- d) Produz biomassa para alimentação animal e obtenção de produtos de alto valor agregados e de química fina.

Entre as espécies utilizadas para a remoção do excesso de nutrientes de efluentes, assim como para a produção de biomassa para fins de bioenergia como biodiesel, etanol e hidrogênio, ou para extração comercial de pigmentos e lipídeos, têm-se as clorofíceas (*Chlorella* spp., *Scenedesmus dimorphus*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*) e algumas cianobactérias (*Spirulina* spp., *Arthrospira* spp.) (BOROWITZKA, 1999; GRESSLER *et al.*, 2011).

A *Spirulina* sp. e a *Chlorella* sp. são extensamente cultivadas para fins alimentícios. A primeira quando incorporada na alimentação ajuda no funcionamento do intestino, estimulando o desenvolvimento de diferentes espécies de lactobacilos. Também apresenta diversas aplicações terapêuticas, como o efeito anticancerígeno por seu conteúdo de  $\beta$ -caroteno, prevenção de má nutrição pela falta de vitamina A, controle do nível de açúcar no sangue, estimulação de certas prostaglandinas (PGE), prevenção de enfermidades degenerativas e cicatrização acelerada de feridas (GARCÍA, 2013).

Extratos de microalgas podem ser incorporados em produtos de dermocosmética, como por exemplo, em cremes antienvhecimento, regenerantes, emolientes e esfoliantes anti-irritantes. Dois exemplos são o extrato rico em proteínas de *Arthrospira* sp. que repara os sinais de envelhecimento da pele, exercendo um efeito atenuante e preventivo de estrias (Protulines, Exsymol S.A.M., Monaco) ou ainda, o extrato de *Chlorella vulgaris* habitualmente utilizado para estimular a síntese de colágeno na pele, o que permite a regeneração dos tecidos e redução das rugas (Dermochlorella, Codif, St. Malo) (SPOLAORE *et al.*, 2006; DUARTE, 2010).

A microalga *Chlorella* é comercializada na forma de polivitamínicos no Japão e na China, e como alimento dietético em países ocidentais. A *Chlorella sp.*, a *Chlamydomonas reinhardtii* e o *Stichococcus mirabilis* são capazes de produzir substâncias antibióticas, além de ácidos graxos como EPA, que também apresentam esse tipo de ação. Da microalga *Porphyridium* se extrai a enzima superóxido dismutase (SOD), utilizada como terapêutico em diferentes enfermidades.

Soares (2011) em seus experimentos com diferentes solventes na produção de extratos de microalgas avaliou a atividade antitumoral *in vitro* do extrato *Scenedesmus sp.* Usando o solvente hexano conseguiu reduzir drasticamente a viabilidade celular de células de hepatocarcinoma humano. Essa microalga é composta quimicamente por elevada quantidade de ácido graxos (19,6 – 21,1%) e carotenóides, sendo encontrado na sua composição o ácido linoleico (10,3%), substância com forte atividade anticancerígena, capaz de reduzir a incidência, a progressão e o número de metástase de tumores em camundongos (CHU *et al.*, 2011; MATA, MARTINS e CAETANO, 2010; SOARES, 2011).

Neste mesmo estudo, observou-se que o extrato contendo a microalga, éter e água apresentou efeito neuroprotetor, graças a elevada atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE). Sabe-se que a inibição da AChE é considerada um meio promissor para o tratamento terapêutico de várias doenças como: o mal de Alzheimer, Parkinson, glaucoma e outros (SOARES, 2011).

### **3.4 Atividade antimicrobiana dos compostos de microalgas**

Antimicrobianos naturais são substâncias produzidas por diversas espécies (vegetais, fungos, bactérias e microalgas) que interagem com organismos uni ou pluricelulares, podendo causar a morte ou inibir o metabolismo celular do microrganismo, assim como impedir a sua reprodução, permitindo que o sistema imunológico do organismo hospedeiro possa combater com mais eficácia a infecção (HECK, 2007; MATOS, 2015).

Em 1928, Alexander Fleming descobriu um antibiótico natural produzido por um fungo (o bolor do pão) que inibiu o crescimento de uma cultura de *Staphylococcus*. Como o fungo que produziu a nova substância se designava *Penicillium chrysogenum*, Fleming denominou-o de



penicilina. Em 1941, após comprovada a sua eficácia na terapêutica humana e a sua baixa toxicidade, foi o primeiro antibiótico a ser comercializado (HECK, 2007; MATOS, 2015).

O sucesso do uso terapêutico de substâncias antimicrobianas naturais incentivou cientistas a buscarem por novas fontes desses compostos, entre eles Selman Walksman, chefe de um grupo de cientistas da Universidade de Rutgers, em Nova Jersey, EUA, que se dedicou a estudar microrganismos de solo, especialmente os actinomicetos, e em 1940 descobriu a actinomicina A e em 1942 a estreptotricina, ambas tóxicas para seres humanos. Porém, em 1943 esse grupo descobriu a estreptomicina a qual revolucionou a terapêutica anti-infecciosa por causa da sua ação contra bacilos gram negativos e, sobretudo contra *Mycobacterium tuberculosis* promovendo a cura da tuberculose (CHAMBERS, 2003; HECK, 2007).

Atualmente, é significativo o número de pesquisas acerca da extração e identificação de compostos com ação antibacteriana e antifúngica de diferentes fontes, inclusive de microalgas, visto que os antibióticos tradicionais estão diminuindo sua eficácia devido ao aumento da resistência dos agentes infecciosos. Esses compostos podem ser de origem proteica (como proteínas, peptídeos e enzimas) ou podem ser metabólitos secundários como os antioxidantes, produzidos naturalmente pela célula.

Alguns agentes antifúngicos são usados no tratamento de pragas que acometem plantas domésticas ou cultivo agrícola, como por exemplo a majusculamida C, um agente de despolimerização de filamentos, extraído de *Lyngbya majuscule*, que demonstrou forte atividade fungicida (BATTAH *et al.*, 2014).

Estudos realizados com peptídeos cíclicos isolados da cianobactéria *Tolypotrix byssoidea* tiveram efeito inibitório do crescimento da *Candida albicans*, levedura patógena de humanos. Além disso, Ozdemir *et al.* (2004) também observou nesta mesma microalga outros compostos com ação antifúngica, porém de natureza fenólica (JAKI *et al.*, 2001; BATTAH *et al.*, 2014).

Shanab (2007) isolou três espécies de Oscillatoria: *O. hamellii*, *O. plantensis* e *O. rubescens*, e em seus estudos foi visto que ambas apresentavam eficiência contra a *C. albicans* e o fungo *Aspergillus flavus*. Outras espécies de cianobactérias foram testadas por Abedin e Taha (2008) como a *Anabaena oryza*, *Tolipotrix ceytonica* e *Spirulina Plantensis* quanto a capacidade de inibir o desenvolvimento de fungos causadores de doenças em plantas e humanos. Os microrganismos testados foram: o *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herquei*,

*Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium sp.*, *Alternaria brassicae*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Eles descobriram que a *Spirulina plantensis* e a *Anabaena Oryza* tinham grande eficiência na atividade antifúngica para todos os fungos testados (BATTAH *et al.*, 2014).

Battah *et al.* (2014) avaliou a presença de agentes com ação antifúngica no extrato de *Spirulina maxima* e verificaram que o extrato teve eficiência contra o *Penicillium oxalicum* (91%), seguido por *Fusarium solani* (65%) e *Rhizoctonia solani* (20%) em comparação com drogas antifúngicas testadas, usadas como controle.

Medina-Jaritz *et al.* (2011) avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de extrato aquoso e metanólico de *Artoospira maxima*, testados usando a técnica de disco difusão contra *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os extratos aquosos apresentaram atividade contra todos os organismos testados, exceto para *Bacillus subtilis*, enquanto o extrato metanólico apresentou atividade antimicrobiana contra todos testados.

Santoyo *et al.* (2007) encontrou muitas frações ativas no extrato aquoso de *Spirulina* com 10% de etanol. Em seus experimentos testou-se o extrato contra diferentes espécies microbianas incluindo a bactéria gram negativa *E.coli*, a bactéria gram positiva *S. aureus*, a levedura *C. albicans* e o fungo *A. niger*. Após avaliação do perfil de diferentes extratos fenólicos de *Spirulina* pelo método de cromatografia por HPLC, observou-se um grande número de ácidos fenólicos e flavonoides, em níveis variáveis. Ácido gálico, clorogênico, cinnâmico, pinostrobim e p-OH-benzóico foram os constituintes mais abundantes encontrados nos diferentes extratos (ABD. EL-BAKY, EL-BAZ e EL-BAROTY, 2009; BATTAH *et al.*, 2014).

### 3.5 Atividade antioxidante dos compostos microalgas

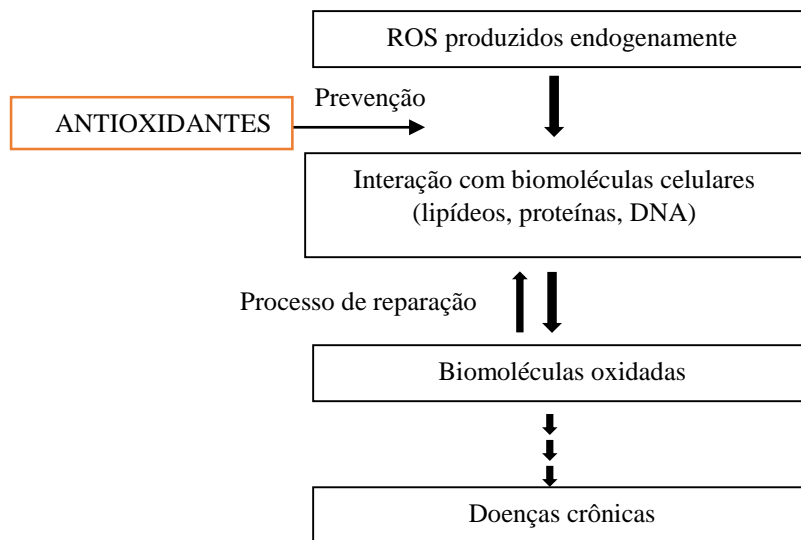
Antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formado por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e substâncias como enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres.. Os ROS (*Reactive Oxygen Species*) são produtos resultantes do metabolismo normal das células, aos quais estão associados com a produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas (DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos) e fagocitose, porém o seu excesso conduz a um desequilíbrio em que a condição pró oxidante sobressai a condição antioxidante, a qual é denominada de estresse oxidativo. Esse

processo provoca efeitos deletérios, tais como a peroxidação de lipídeos das membranas, destruição de proteínas estruturais, e causa alteração e/ou perda da função em enzimas, carboidratos e ácidos nucleicos (NAJI e DEVARAJ, 2011; SOARES, 2011; DECLEVA, 2012).

Esses efeitos estão relacionados com várias patologias tais como artrite, choque hipovolêmico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, envelhecimento e câncer, podendo ser a causa ou o fator agravante. (SHU e LUNG, 2008; SOARES, 2011).

Os organismos estão dotados de sistema de defesa natural com a produção de compostos antioxidantes biológicos que incluem várias enzimas entre elas a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e a catalase, meios de proteção contra os danos causados por radicais livres. Sabe-se que os processos de oxidação, ou estresse oxidativo, desencadeados pelos radicais livres podem ser evitados mudando as condições ambientais ou através do uso de compostos antioxidantes para prevenir ou reduzir reações oxidativas (SOARES, 2011).

Figura 6 – Intervenção dos carotenoides na prevenção de doenças crônicas.

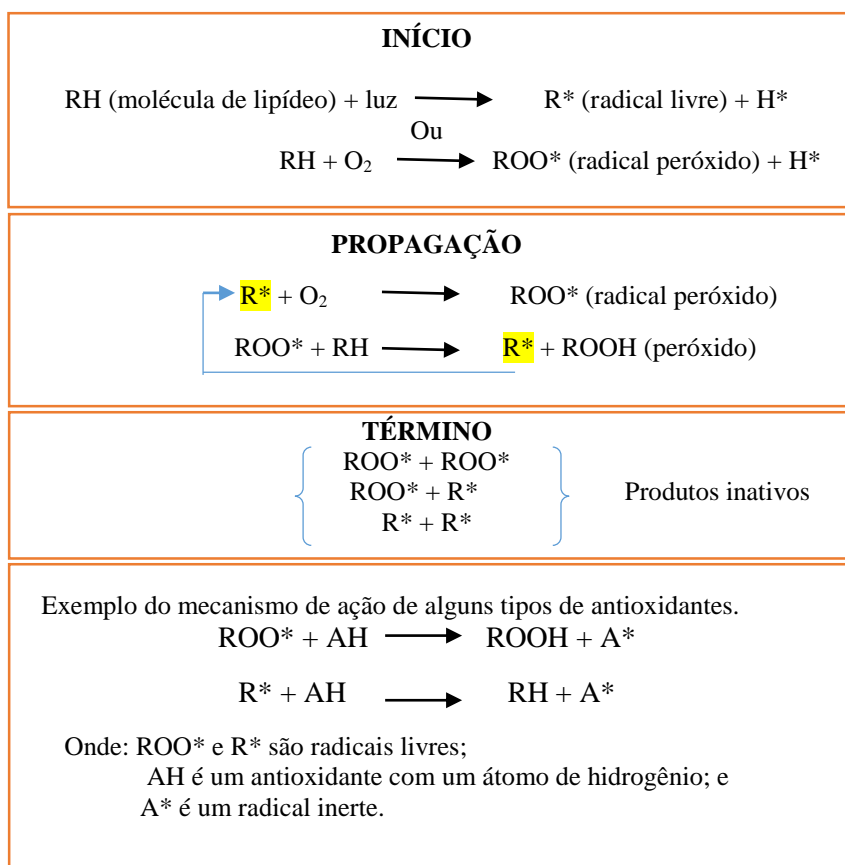


Fonte: DUARTE (2010).

O ranço oxidativo (auto-oxidação ou rancificação auto-oxidativa), exemplificado na figura 7, é responsável pelo odor desagradável dos alimentos rançosos. No estágio inicial da oxidação é necessário ter condições favoráveis ao processo, como temperaturas altas, oxigênio e certos catalisadores, como luz, radiação e traços de metais (como ferro, cobalto, cobre, níquel e outros). Nesse caso, há uma quebra da molécula de lipídeo e a retirada de um hidrogênio do carbono alílico, originando radicais. Uma vez formados, se ligam ao oxigênio produzindo radicais

peróxidos que podem retirar hidrogênio de outro ácido graxo formando novo radical livre e novo peróxido e assim se propagando continuamente. Teoricamente, a reação continua até que todo oxigênio ou toda a molécula de ácido graxo tenha sido utilizada ou inibida pela presença de uma substância antioxidante. No período final (término), os radicais reagirão entre si, para formar moléculas inativas (GAVA, SILVA E FRIAS, 2009).

Figura 7 - Exemplo de reação de auto-oxidação de lipídeos, tradicionalmente descrita como uma reação em cadeia.



Fonte: Adaptado de GAVA, SILVA E FRIAS (2006) e [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com).

A investigação de novas fontes naturais de compostos bioativos com efeito antioxidante é de grande interesse biotecnológico devido ao seu alto potencial profilático e terapêutico, além de menos agressivo a saúde (SOARES, 2011).

Muitos estudos demonstram a capacidade das microalgas para a produção desses compostos, uma vez que fazem parte do seu metabolismo em condições naturais ou como reação a um estado de estresse. Ao realizar fotossíntese elas absorvem a luz solar, o que resulta na

produção de energia e oxigênio. Como o oxigênio é facilmente convertido pela radiação ultravioleta (UV) em espécies reativas de oxigênio (ROS), as microalgas desenvolvem mecanismos de proteção que consistem na formação de compostos antioxidantes de forma a minimizar as concentrações ROS geradas (DUARTE, 2010; RODRIGUEZ-GARCIA e GUIL-GUERRERO, 2008).

A atividade antioxidante e anticâncer dos extratos de microalgas foi avaliada empregando as microalgas *Oscillatoria* sp, *Anabaena flos-aquae* e *Nostoc muscorum*. Nesses estudos registrou-se as maiores atividades antioxidantes (75,6, 73,6 e 72,8%). As cianobactérias *S. platensis* apresentaram maior atividade antioxidante (75,9%) e eficiência anticancerígena moderada (60,67 e 54,8% contra EACC e HepG2, respectivamente), devido ao seu conteúdo do total de pigmentos ficobiliproteína e metabólitos secundários produzidos em abundância (SHANAB *et al.*, 2012).

A eficiência do extrato aquoso das microalgas *Nostoc muscorum* e *Oscillatoria* sp. também foi testada contra células do carcinoma Ascítico de Ehrlich (EACC) e células de câncer hepatocelular humano (HepG2), demonstrando atividade que variou de 87,25% e 89,4%, respectivamente. A presença de ficobiliproteínas é responsável pela atividade antioxidante e atividade anticâncer em ambas as espécies de cianobactérias (SHANAB *et al.*, 2012).

Estudos realizados com microalgas do filo *Chlorophyta* confirmaram a presença de carotenoides com atividade biológica em algumas espécies. Da espécie *Dunaliella salina* é obtido o  $\beta$ -caroteno, antioxidante que demonstra atividade imunomoduladora. Na *Chlorella vulgaris* pode ser encontrada a astaxantina, composto com atividade antitumoral, e na *Chlorella ellipsoidea* a xantofila, também apresentando atividade tumoral (SOARES, 2011).

As microalgas do gênero *Scenedesmus*, *Muriellopsis* e *Chlorella* produzem a luteína, pigmento carotenoide que tem ação contra a degeneração macular (DM), previne a formação de cataratas e alguns tipos de câncer (GRANADO, OLMEDILLA e BLANCO, 2003; GARCÍA, 2013).

A microalga *Scenedesmus* sp. possui notável potencial farmacológico, exibindo atividades anticâncer e antioxidante (NATRAH *et al.*, 2007; ORDOG *et al.*, 2004). De acordo com Aremu *et al.* (2014) a bioatividade promissora das cepas de *Scenedesmus* testadas em seus experimentos indicam potencial como possíveis fontes alternativas de antioxidantes, apresentando um conteúdo fenólico de  $3,6 \geq 0,42$  mg GAE g<sup>-1</sup> DW e de inibidores de acetilcolinesterase (AChEI).

### 3.6 Características das microalgas do gênero *Scenedesmus*

Atualmente, a família Scenedesmaceae, após todos os avanços quanto à filogenia do grupo é composta por 29 gêneros (Hegewald *et al.*, 2010), porém apenas 13 gêneros de Scenedesmaceae estão morfológica e filogeneticamente bem definidos. Vários outros gêneros dessa família, como todo o grupo de crucigenioideae, ainda estão sendo revisados (Krienitz e Bock, 2012).

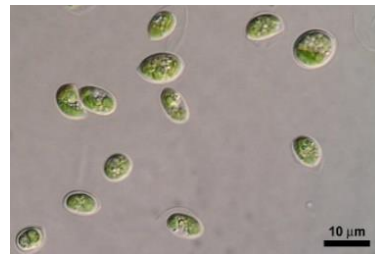
O gênero *Scenedesmus* é caracterizado como um cenóbio plano formado por 2 a 32 células, arranjadas em uma ou duas fileiras, apresentando-se de diferentes formas, geralmente pequenas (de 5-30  $\mu\text{m}$ ) e lisas, porém sempre alongadas, com polos celulares que podem variar de agudos a obtusos/truncados, e suas células possuem morfologia extremamente variável, podendo apresentar espinhos ou não, com um cloroplasto e um pirenoide (KOMÁREK e FOTT, 1983; TRAINOR, 1995; HEGEWALD, 1997).

Figura 8 - *Scenedesmus ecornis*.



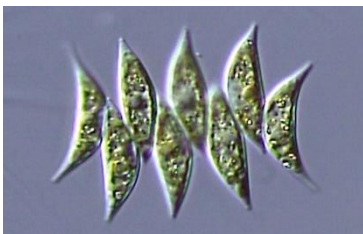
Fonte: [protist.i.hosei.ac.jp](http://protist.i.hosei.ac.jp)

Figura 9 - *Scenedesmus obliquus*.



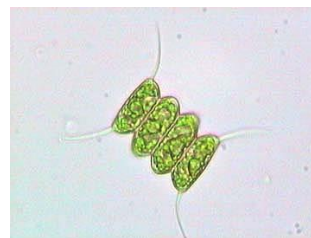
Fonte: <http://ccala.butbn.cas.cz/en/scenedesmus-obliquus-turpin-kuetzing>

Figura 10 - *Scenedesmus dimorphus*.



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/scenedesmusdimorphus>

Figura 11 - *Scenedesmus quadricauda*.



Fonte: <http://www.microscopy-uk.org.uk>

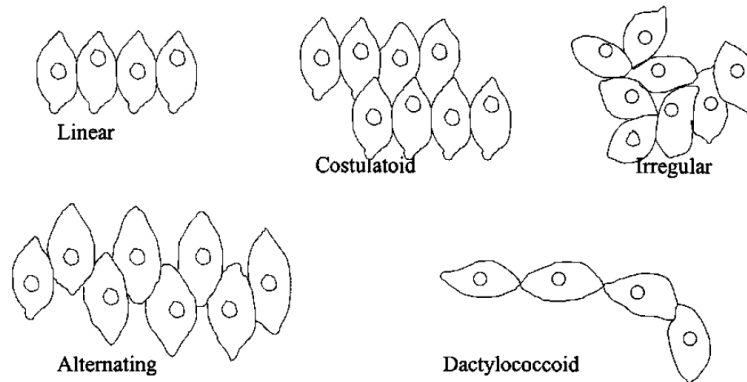
Sua classificação taxonômica se dá da seguinte forma (WENDY GUIRY IN GUIRY e GUIRY, 2016):

Domínio: Eucariotos  
 Reino: Plantae  
 Filo: Chlorophyta  
 Classe: Chlorophyceae  
 Ordem: sphaeropleales  
 Família: Scenedesmaceae  
 Gênero: Scenedesmus

O gênero *Scenedesmus* já foi dividido em três subgêneros *Acutodesmus*, *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (HEGEWALD, 1997). Posteriormente, os subgêneros passaram a ser classificados como gênero, formando assim grupos baseados nos resultados obtidos de estudos moleculares (ITS-2 rDNA) e morfológicos de *Scenedesmus* Meyen, separando os gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus* (Chodat) S.S. An, Friedly & E. Hegewald, este último anteriormente enquadrado como subgênero de *Scenedesmus*. Assim, a partir do gênero *Scenedesmus* deu-se origem ao gênero *Desmodesmus* pela retirada de todas as espécies deste último que possuem espinhos nas células do cenóbio (AN, FRIEDL e HEGEWALD, 1999), conseqüentemente várias espécies foram transferidas para *Desmodesmus* (HEGEWALD, 2000). Além disso, o subgênero *Acutodesmus* (Hegewald) foi elevado à categoria de gênero, *Acutodesmus* (Hegewald) Tsarenko (RAMOS, BICUDO E MOURA, 2015).

Amplamente distribuídas no planeta, são espécies de água doce, sendo muito comum encontrá-las em diversos corpos d'água, apresentando-se como unicelulares. Sua reprodução é assexuada através da formação de autosporos que se arranjam nas células-mãe havendo posterior rompimento para formar um novo cenóbio. A formação de colônias é um mecanismo de defesa desses organismos, que se unem a cada duas células para formar colônias com 4 a 8 células unidas. O cenóbio formado pelas *Scenedesmus* pode apresentar-se de diferentes formas: linear, costulatóide (em grupos alternados de 4 células), alternados, irregulares e dactylococóide (LÜRLING, LANGE e DONK, 1997).

Figura 12 - Exemplo de arranjos celulares observados no gênero *Scenedesmus*.



Fonte: LÜRLING, LANGE e DONK (1997).

Vários fatores têm demonstrado afetar o desenvolvimento morfológico das microalgas do gênero *Scenedesmus*. A formação de diferentes *ecomorph* pode se dar pela interferência do fotoperíodo, nutrientes, pH, temperatura, densidade celular, a idade e a taxa de crescimento (TRAINOR, 1998). Além disso, agentes químicos liberados por predadores também induzem a alterações morfológicas nas microalgas, isso explicaria porque um taxon é capaz de produzir dois morfotipos distintos. A defesa contra a predação pode ser considerada uma explicação ecológica consistente para a formação de colônias pela *Scenedesmus*. Um microcrustáceo predador natural das microalgas, como a *Daphnia*, por exemplo, pode facilmente ingerir células livres dessa microalga, mas não uma cenóbia com oito células (VAN DONK e HESSEN, 1993; LÜRLING, 1997).

Similar ao gênero *Chlorella*, as cepas de *Scenedesmus* podem produzir, no cultivo em larga escala, uma biomassa com um conteúdo de 50-56% de proteína (SOEDER & HEGEWALD, 1988). Apesar do potencial desta espécie, sua utilização comercial para outras finalidades é recente, havendo apenas alguns registros de estudos fisiológicos visando sua aplicação na alimentação de organismos aquáticos (LÜRLING, 1997), assim como na produção de biocombustíveis (SIGEE *et al.*, 2007 e DEAN *et al.*, 2010).

Para o gênero *Scenedesmus* os principais pigmentos porfirínicos são clorofila *a* e *b*. Os carotenóides encontrados na espécie *Scenedesmus obliquus* são neoxantina, loroxantina, violaxantina e luteína, porém também há presença de  $\beta$ -caroteno (CHU *et al.*, 2011).



Na espécie *Scenedesmus sp.*, por exemplo, a atividade da enzima superóxido dismutase que converte superóxido a peróxido de hidrogênio, aumenta à medida que se eleva as concentrações de metal no meio onde estão presentes (WILTSHIRE *et al.*, 2000). O aumento da síntese de carotenoides em *Scenedesmus sp.* tem sido demonstrado como uma resposta ao estresse oxidativo e, portanto, pode ser controlado (aumentado o poder de síntese) utilizando diferentes condições de cultivo (CHU *et al.*, 2011).

### 3.7 A espécie *Scenedesmus obliquus*

A espécie *Scenedesmus obliquus* apresenta células fusiforme-alongadas, com os polos celulares gradualmente atenuados, alongados e pontiagudos. Os cenóbios são em zigue-zague regulares. Este tipo morfológico corresponde, exatamente, a *S. obliquus* (Turpin) Kützing f. *magnus* Bernard, considerada uma espécie independente (GODINHO, 2009).

*Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing pertence a um dos grupos de espécies de identificação mais complicado do gênero *Acutodesmus* devido à sua ampla variabilidade morfológica. Os três tipos morfológicos principais que têm servido para estabelecimento de espécies ou variedades de *Acutodesmus* são: (1) cenóbios formados por células amplamente fusiformes ou fusiforme-elípticas, mais ou menos retas, polos acuminado-arredondados, células distribuídas alternadamente em uma ou duas fileiras (tipo *S. obliquus*); (2) cenóbios formados por células desde estreitamente até amplamente fusiformes, células externas nitidamente lunadas ou com uma convexidade na margem externa que não sobrepõe a linha dos polos, polos pontiagudos, células alinhadas ou levemente alternadas em uma fileira (tipo *S. dimorphus*); e (3) cenóbios formados por células amplamente fusiformes, células externas levemente curvas, voltadas para fora (ao menos seus extremos), margens livres com uma convexidade que geralmente passa da linha dos polos, polos mais ou menos pontiagudos, células alinhadas ou levemente alternadas, geralmente em uma raro em duas fileiras (tipo *S. acutus*). Dentro de cada um desses morfotipos tem-se encontrado modificações diferentes e particulares que deram origem a numerosos táxons infra-específicos (HEGEWALD e SILVA, 1988; GODINHO, 2009).

A reprodução das microalgas do gênero *Scenedesmus* se dá por autosporos, porém há registros de fases móveis em *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, na qual identificaram como zoósporos, contudo consideram-nas gametas. No entanto, posteriormente não foi observada

germinação de zigotos. LUKAVSKÝ (1991) encontrou células móveis e observou como uma célula flagelada se transformou em vegetativa tratando-se, portanto, de zoósporos. Assim, ao afirmar “fases móveis em *S. obliquus*” significa que não há ainda definição de que sejam zoósporos ou gametas (GODINHO, 2009).

TOLEDO e COMAS (1988) e COMAS (1996) consideram duas variedades taxonômicas: *S. obliquus* (Turpin) Kützing var. *obliquus* e *S. obliquus* (Turpin) Kützing var. *dimorphus* (Turpin) Kützing (incluindo *S. acutus* Meyen).

*Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing var. *dimorphus* é a espécie que apresenta maior variabilidade morfológica dentro do gênero, essa espécie encontra-se amplamente distribuída no Estado de São Paulo (GODINHO, 2009).

Em um levantamento florístico realizado no estado de São Paulo, observou-se que a *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing var. *dimorphus* (Turpin) Kützing foi encontrada em 22 municípios do Estado. A espécie também é considerada cosmopolita, sendo a que apresentou a maior distribuição geográfica dentre todas as espécies pesquisadas no trabalho. A espécie não foi considerada de fácil identificação pelo fato de apresentar vários tipos morfológicos, além de um grande número de espécimes intermediários nas populações examinadas (GODINHO, 2009).

Uma vantagem adicional da *Scenedesmus obliquus* é a sua habilidade para o crescimento rápido e sua resistência relativamente alta a contaminações (LEE, 2001; AREMU *et al.*, 2014). Esta microalga tem sido investigada quanto a capacidade de produção de ácidos graxos, sendo considerada importante alternativa para a produção de biocombustíveis. Porém, há poucos estudos em relação ao seu potencial como fonte de compostos biologicamente ativos, sendo observado uma lacuna que aos poucos pode ser preenchida a partir dos esforços de pesquisadores nas mais diversas áreas das ciências, entre elas a Biotecnologia Molecular.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Microrganismos

No presente estudo foi utilizada uma cepa da microalga *Scenedesmus obliquus*, adquirida da Algoteca mantida no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) da Universidade Federal do Ceará. O fungos *Colletotrichum musae* ATCC 96726, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. kefir*, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Aspergillus fumigatus* ATCC 1022 e as bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram adquiridos da micoteca também mantida no LabBMol.

### 4.2 Meios de cultura e reagentes

Os principais reagentes e meios empregados na pesquisa foram: para o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* utilizou-se o meio WC. Nas etapas ruptura celular e diálise utilizou-se tampão fosfato de sódio (PBS). A precipitação das proteínas foi realizada com sulfato de amônio em diferentes saturações 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%. Na quantificação foi utilizado como padrão a albumina sérica bovina (BSA) para a construção da curva padrão do reagente de Bradford. Durante a eletroforese foram empregados os reagentes: corantes (*Coomassie brilliant blue R e G*), acrilamida, bis-acrilamida, 2-mercaptoetanol, marcadores moleculares. Nos testes biológicos foram empregados Agar Sabouraud-Dextrose (Difco) para o crescimento de fungos e *Tryptic Soy Broth* (TSB; Difco) para bactérias. Outros reagentes de grau analítico foram empregados como ácido clorídrico, cloreto de sódio, etanol e metanol.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus*

As células da microalga *S. obliquus* mantidas na algoteca do LabBMol, foram inicialmente pré-inoculadas, sob condições assépticas, em um fotobiorreator cilíndrico contendo 100 mL de meio WC com pH ajustado para 7,0. Esse fotobiorreator foi mantido por 4 dias em uma câmara de crescimento B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) sob condições controlada de temperatura ( $27 \pm 2$  °C), fotoperíodo (de 12 horas), luminosidade promovida por lâmpada fluorescente (intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) e aeração estéril (mantida por aerador elétrico e filtros). Após esse período, pré-inóculo (com uma densidade óptica a 620 nm = 0,5) foi inoculado num fotobiorreator retangular (Figura 13) contendo 4.000 mL do meio de cultura W.C. e mantidos 14 dias sob as mesmas condições. As amostragens foram realizadas a cada dois dias alternados para observar densidade celular, clorofila a densidade óptica e pH do meio.

Figura 13 – Fotobiorreatores (cilíndrico e retangular) utilizados para o cultivo das microalgas.



Fonte: Autor.

## 5.2 Avaliação da densidade celular

Para avaliar a densidade celular, alíquotas de 1 mL foram retiradas do cultivo de microalgas e transferidas para microtubos estéreis (1,5 mL) a cada 48 horas. Em seguida, esses microtubos foram armazenados em ambiente local escuro e refrigerado (com temperatura de aproximadamente 10 °C), a fim de reduzir ao mínimo o crescimento e a fotossíntese. Posteriormente, 20 µL foram retirados e adicionados em câmara de Neubauer, até preencher o espaço existente entre a mesma e a lamínula. A contagem das células foi realizada em microscópio óptico (Olympus – Modelo Cx 21). A densidade celular da cultura foi estimada de acordo com a seguinte fórmula (CLESCERI *et al.*, 1989):

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células. L}^{-1} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas em 16 câmaras} \times \text{fator de diluição}}{10^{-1}}$$

(Equação 1)

## 5.3 Análise da taxa de crescimento específico das microalgas

A taxa de crescimento específico (SGR - *specific growth rate*), dado em µg/dia, foi determinada de acordo com a equação abaixo (CLESCERI *et al.*, 1989):

$$\text{SGR } (\mu\text{g/ dia}) = \frac{\log X_1 - \log X_2}{t_2 - t_1}$$

(Equação 2)

Onde,

X1 = Concentração de biomassa no fim do intervalo de tempo selecionado

X2 = Concentração de biomassa no início do intervalo de tempo selecionado

t2 – t1 = Intervalo de tempo em dias.

## 5.4 Análise da clorofila *a*

Para determinação do teor de clorofila microalgal, inicialmente 1 g de células frescas foi macerado com nitrogênio líquido, sendo, em seguida, adicionado 5 mL de acetona (P.A.)

refrigerada. O produto da maceração foi filtrado em fibra de vidro e coletado em balão volumétrico de 50 mL. A acetona foi adicionada sobre o macerado restante na fibra de vidro, até atingir o volume final de 50 mL de filtrado. Esse procedimento foi realizado sem a presença de luz. As absorvâncias das clorofilas *a* foram medidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 664 nm, respectivamente. A concentração do pigmento foi determinada de acordo com a equação definida por Clesceri *et al.* (1989), descrita abaixo:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/mL)} = 11,85 (\text{Abs}_{664}) - 1,54 (\text{Abs}_{647}) - 0,08 (\text{A}_{630})$$

(Equação 3)

### **5.5 Análise de pH do meio durante o cultivo das microalgas**

Para avaliar as mudanças de pH do meio durante o cultivo das microalgas, alíquotas de 20 mL foram retiradas do cultivo a cada 48 h e centrifugadas a 10000 x *g* por 2 min. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para tubos de ensaio. Em seguida, procedeu-se as medidas de pH nos diferentes tubos coletados.

### **5.6 Extração de proteínas das microalgas**

As microalgas coletadas após 14 dias de cultivos foram coletadas e centrifugadas a 10.000 x *g* por 20 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas e lavadas com o tampão de lise (Tris-HCl 50mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5mM, PMSF 1mM e EDTA 0,2mM). Em seguida, as células foram submetidas a lise celular utilizando os métodos de congelamento-descongelamento (1 ciclo), sonicação (10 ciclos, de 10 pulsos de 30 seg) e maceração manual com nitrogênio líquido. Na sequência, o macerado foi filtrado em papel-filtro estéril. O extrato obtido foi centrifugado a 10.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (denominado extrato bruto - EB) foi armazenado à -20 °C para ser utilizado nas demais etapas.

### **5.7 Precipitação das proteínas com sulfato de amônio**

O extrato bruto (EB) da microalga *S. obliquus* foi submetido à precipitação de proteínas com sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], utilizando diferentes níveis de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%). Os EBs saturados foram mantidos em repouso por 12 h à 10 °C, e em seguida, centrifugados a 12.000 x g por 30 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram coletados, solubilizados com tampão PBS pH 7, dialisados por 12 h contra água ultrapura (MilliQ) e por mais 4 h com o mesmo tampão. Esses solubilizados (denominados FrP) foram submetidos a dosagem de proteínas e ensaios eletroforéticos.

### **5.8 Dosagem de proteínas solúveis**

As dosagens de proteínas do EB e das frações proteicas obtidas da microalga *S. obliquus* foram realizadas segundo o método de Bradford (1976). Para cada 100 µL de extrato, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram agitadas e deixadas em repouso por 10 minutos a 25°C. Em seguida, foi determinada a absorvância a 595 nm, em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

### **5.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)**

O perfil proteico das FrPs foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não redutoras, redutoras e desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 15% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1%. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 8,3) contendo SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético: água (1:3,5:8, v/v/v)

## 5.10 Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana das frações proteicas da microalga *S. obliquus*

### 5.10.1 Condições de cultivo dos fungos e das bactérias

Os fungos *C. musae*, *C. albicans*, *A. niger* e *A. fumigatus* foram inicialmente cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Sabouraud-Dextrose (DIFCO) (Tabela 2). Basicamente, distribuiu-se 20 mL de ágar esterilizado em autoclave a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos em placas de Petri previamente autoclavadas, secas e individualmente embaladas. Após solidificação total do meio de cultura nas placas de Petri, os fungos foram inoculados no centro das placas contendo ágar estéril, sendo em seguida colocadas para crescer em estufa incubadora mantida a temperatura constante de  $27 \pm 2$  °C durante um período não superior a 10 dias. Após esse período, foi iniciado o processo de coleta dos esporos dos fungos cultivados. Foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 0,15 M autoclavada por toda a extensão das colônias. Em seguida, raspou-se levemente a superfície das colônias com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada para que prontamente ocorresse a liberação dos esporos. Com o auxílio de uma pipeta estéril, foi feita a aspiração de pelo menos 8 mL da suspensão dos esporos, os quais foram posteriormente submetidos a filtração prévia em gaze estéril, minimizando a presença de hifas no filtrado. Após essa etapa, apenas 1 mL do filtrado foi coletada em tubos de 1,5 mL estéreis e submetidos a centrifugação a 10.000 x g durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os esporos ressuspensos em 1 mL de NaCl 0,15 M. A determinação do número de esporos foi realizada em câmara de Neubauer. Após a correta montagem do aparato, aplicou-se 10 µL da amostra de cada fungo processada no item anterior para o retículo da câmara. Em seguida, visualizou-se os esporos através de microscópio óptico modelo Eclipse® 3000 da (Nikon) em objetivas de 20 ou 40X. A partir deste passo, os esporos eram contados com o auxílio de um contador hematológico manual, e a contagem determinada pela seguinte fórmula:

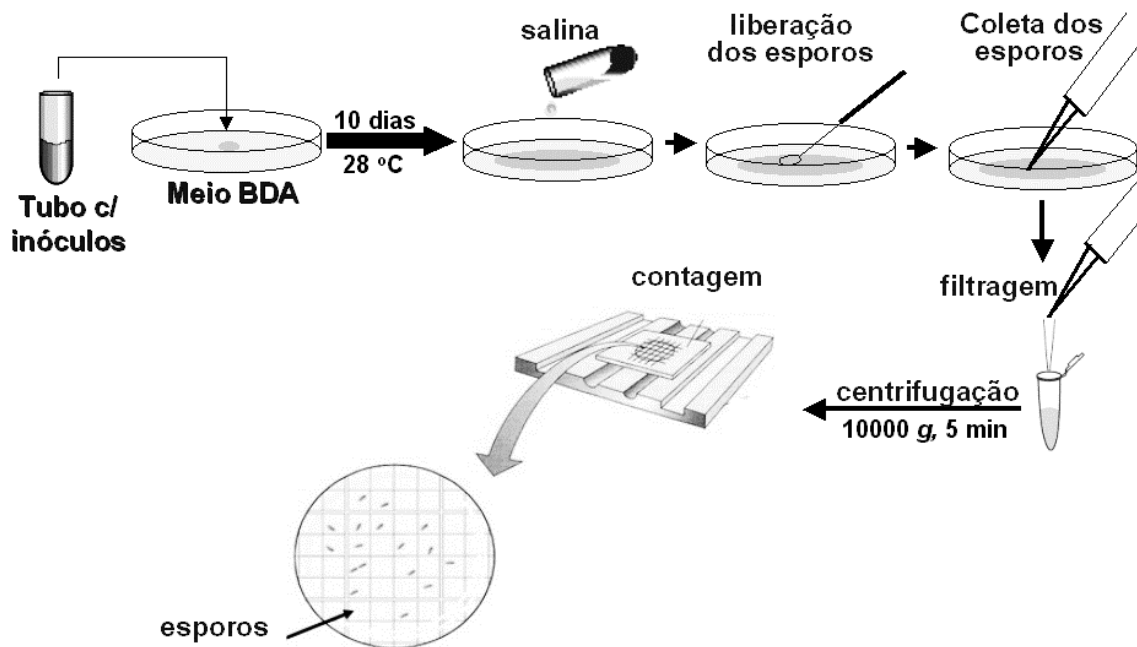
$$\text{N}^{\circ} \text{ esporos / mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de esporos (sobre o quadrado maior)} * \text{fator de diluição} * 10^4$$

(Equação 4)



O processo de aquisição dos esporos fúngicos utilizados na pesquisa pode ser representado pela figura 14.

Figura 14 - Esquema ilustrativo das etapas de aquisição dos esporos fúngicos.



Fonte: Autor

As bactérias *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus* e *S. epidermidis* encontravam-se devidamente criopreservadas (- 20 °C) em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) suplementado com 30% de glicerol. Para os ensaios antimicrobianos, essas cepas bacterianas foram cultivadas em meio *Tryptic Soy Agar* (Difco). Os inóculos bacterianos foram preparados tomando-se de três a quatro colônias de cada cepa isolada em ágar meio *Tryptic Soy Agar* e diluídas em solução salina a 0,85% até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (CLSI, 2003).

Todos os processos de inoculação foram realizados em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por luz ultravioleta e acompanhado por controle negativo, que consistia da exposição de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio sólido estéril no ambiente da câmara de fluxo laminar durante a realização de todo o processo.

### **5.10.2 Avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o método de difusão em disco**

Para avaliação da atividade antimicrobiana da fração proteica da microalga foi empregado o método de difusão em disco. Inicialmente, a fração proteica liofilizada da microalga foi solubilizada em tampão PBS pH 7,4 e esterilizada em filtro Millipore (0,22 µm). Na etapa seguinte, discos de papel-filtro estéreis (Whatman – tipo 3), de 6 mm de diâmetro, foram embebidos com 50 µL da solução proteica testada (com concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL). Discos de papel-filtro impregnados com uma solução de BSA solubilizada em tampão PBS (200 µg/mL) foram utilizados como controle negativo. Já os discos impregnados com 100 µg de anfotericina B, gentamicina e ampicilina foram usados como controle positivo.

Uma alíquota da suspensão de esporos ( $10^4$  esporos/mL) dos fungos testados foi inoculada (em triplicata) no centro das placas contendo o meio Agar Sabouraud-Dextrose, que foram incubadas a 28 °C. Os discos contendo a fração proteica impregnada só foram adicionados nas placas quando as colônias atingiram aproximadamente 40 mm de diâmetro. Em seguida, as placas foram novamente incubadas à temperatura de 28 °C numa câmara de crescimento por até 78 h. No caso das bactérias, uma suspensão (com  $10^8$  UFC/mL) de cada cepa foi semeada (em triplicada), com auxílio de um *swab* descartável, sobre toda a superfície de meio ágar *Tryptic Soy Agar*. Em seguida, foram adicionados discos de papel-filtro impregnados com as diferentes concentrações da fração proteica da microalga. As placas foram incubadas em estufa bacteriana, a 37 °C por até 48h.

A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o halo formado ao redor dos discos contendo a fração proteica, como um indicador da inibição do crescimento microbiano. Os resultados foram expressos pela medida do diâmetro (mm) de cada halo (Parekh e Chanda, 2007; Santos *et al.*, 2007).

### **5.11 Avaliação da atividade antioxidante das frações proteicas da microalga *S. obliquus***

O ensaio para avaliar atividade antioxidante das frações proteicas (FrPs) foi realizado utilizando o método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg/mL) das FrPs 0-20, 20-40, 40-60 e 60-80% foram adicionadas em tubos Falcon de 15 mL. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL da solução DPPH 0,1 mM e as amostra foram

incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida, foi determinada a medida da absorbância a 450 nm, em espectrofotômetro. A medição da absorbância do branco também foi realizada. Os resultados da determinação da atividade antioxidante das FrPs foram comparados com o ácido ascórbico, usado como controle positivo. O valor da atividade antioxidante foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{\text{Absorbância controle} \times \text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância controle}}$$

(Equação 5)

### 5.12 Determinação do perfil de aminoácidos essenciais presentes na fração proteica da microalga *S. obliquus*

A análise de aminoácidos da fração proteica FrP<sub>40-60%</sub> da microalga *S. obliquus* foi realizada no sistema Biochrom 20 (Pharmacia-LKB). Primeiramente a gelatina liofilizada (2 mg) foi hidrolisada com 2 mL de HCl 6 N contendo fenol 1% (m:v). A hidrólise foi realizada em ampolas de vidro, seladas sob atmosfera de nitrogênio e mantidas em estufa à 110 °C por 24 horas. Após a hidrólise, as ampolas foram abertas e o HCl juntamente com o fenol foram eliminados, sob pressão reduzida, na presença de NaOH 1 M. Em seguida, os resíduos hidrolizados foram lavados (4 x) com água ultrapura (MilliQ) e seco sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo. Após a secagem, as amostras foram redissolvidas em solução tampão estéril de citrato de sódio 0,1 M pH 2,2 e submetidas a análise de aminoácidos. O conteúdo de aminoácidos da amostra foi determinado pelo método de Spackman, Stain e Moore (1958), modificado e adaptado para o uso no sistema Biochrom 20. O triptofano foi determinado usando a metodologia modificada por Goodwin e Morgan (1946). Uma amostra de 1 mg da gelatina foi dissolvida em 1 mL de NaOH 0,1 M e foram realizadas medidas das absorbâncias a 280 e 294 nm. O teor de triptofano foi calculado com base na equação abaixo, utilizando o valor da tirosina obtido no sistema Biochrom:

$$M_{\text{tyr}}/M_{\text{trp}} = (0,592 \times A_{294} - 0,263 \times A_{280}) / (0,263 \times A_{280} - 0,170 \times A_{294})$$

(Equação 6)

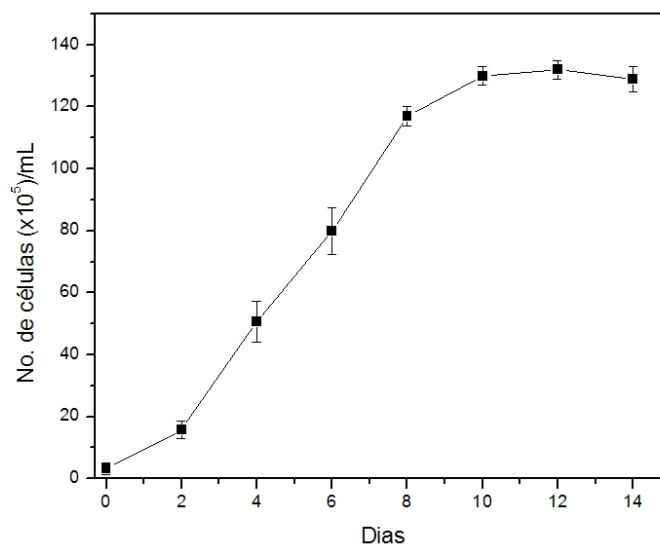
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir são apresentados os resultados obtidos nas análises realizadas com a microalga *Scenedesmus obliquus*.

### 6.1. Resultados da avaliação da densidade celular

Na figura 15 encontram-se os resultados da curva de crescimento da *Scenedesmus obliquus* em sistema de cultivo em fotobiorreator sob cultivo descontínuo. O gráfico foi construído a partir dos dados obtidos com a contagem de células a cada dois dias possibilitando a observação do perfil de crescimento dessa microalga no meio de cultivo W.C.

Figura 15 - Curva de crescimento da microalga *S. obliquus* cultivada em fotobiorreator durante quatorze dias.



Fonte: o autor.

A fase lag não se prolongou, indicando uma rápida adaptação desses microrganismos. As condições de cultivo apropriadas possibilitaram um bom desenvolvimento das células de *S. obliquus* no sistema empregado pela pesquisa. O W.C., meio sintético comumente utilizado para o cultivo de algumas espécies de microalgas, fornece nutrientes necessários ao desenvolvimento, contribuindo para uma boa produtividade e composição celular adequada para obtenção de

subprodutos de interesse industrial. Seu custo elevado é considerado um fator limitante para o emprego em cultivos de larga escala, por isso, muitos estudos são realizados objetivando avaliar meios alternativos em substituição ao W.C., dentre eles estão os resíduos de vinhaça, efluentes domésticos ou residual da indústria de alimentos, entre outros. No entanto, a proposta de uso deste meio sintético visava observar se o rendimento do crescimento da microalga *S. obliquus* diferem dos meios alternativos já testados com essa espécie.

A fase log, observada do 2º ao 10º dia de experimento, é caracterizada pelo aumento exponencial de células, pela grande produção de proteínas e enzimas e pela alta taxa de replicação do DNA, uma vez os microrganismos encontram plenas condições de desenvolvimento e nenhum fator externo ou componente do meio é limitante para o seu crescimento. Observa-se que o número de células variou entre 18 e  $130 \times 10^5$  cél/mL, e não apresentou oscilação na contagem, comportamento este que pode ser explicado pelo uso de condições ambientais adequadas.

A fase estacionária compreendeu um curto período entre o 10º e o 14º dia. Nessa fase ocorrem mudanças na composição do meio provocadas pela produção de metabólitos ou pela exaustão de nutrientes essenciais, o que faz as células reduzirem a taxa de crescimento progressivo e entrarem em uma fase de estagnação que, sob novas condições, passam a ter crescimento lento e após alguns dias declinam. Este efeito está relacionado, em células vivas, a fenômenos osmóticos que resultam em plasmólise celular, e as possíveis razões para que isso ocorra são interferência nos sistemas enzimáticos, provocando a repressão na síntese de enzimas e a desidratação desses sistemas devido à perda de água da célula ou pela inibição do transporte de nutrientes para seu interior.

O cultivo não apresentou fase de declínio, uma vez que a coleta das células foi realizada durante o estabelecimento da fase estacionária, período este em que as células se encontram completamente formadas, estabilizadas e em quantidade interessante para colheita e realização das análises.

As contagens de células variaram de 2 a  $130 \times 10^5$  cel/ mL, caracterizando um bom rendimento do cultivo. Segundo Oliveira (1993) a Densidade Celular Máxima alcançada (DCM) se refere ao maior valor obtido em número de células por mililitros e o tempo de cultivo se refere ao período transcorrido entre o início da cultura (inóculo) e o momento no qual a cultura alcançou a DCM. Conforme observado na figura 14, no 12º dia de cultivo foi observada a Densidade Celular Máxima (DCM) com  $130 \times 10^5$  cel / mL, porém o cultivo foi mantido por mais dois dias a fim de

confirmar o período mais favorável para a colheita. Resultados semelhantes foram encontrados por Toyub *et al.* (2008) em seus experimentos com *Scenedesmus obliquus* cultivada em diferentes meios como o BBM (Meio Bold Basal) e o SFWM (resíduo de indústria de piscicultura) diluída em diferentes concentrações (1,5, 2,0, 2,5 e 3,0%). O padrão BBM apresentou o número máximo de células  $136.30 \times 10^5$  cél/ mL, valor muito próximo ao encontrado nesta pesquisa. Alam (2004) encontrou densidade celular  $109,73 \times 10^5$  a  $197.33 \times 10^5$  cél/ mL, quando cultivou *Scenedesmus obliquus* no mesmo meio empregado por Toyub e colaboradores, SFWM 2,5%, empregando o BBM como controle (TOYUB *et al.*, 2008).

Almeida *et al.* (2016) avaliando a produtividade das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* cultivadas em efluentes de vísceras e efluentes domésticos obtiveram um bom rendimento para ambas microalgas. À despeito da *S. obliquus* observou-se um crescimento celular de  $120 \times 10^5$  cél/ mL em efluentes de vísceras e  $250 \times 10^5$  cél/ mL em efluentes domésticos. Observa-se, portanto, que os resultados obtidos por Almeida (2016) com efluentes domésticos superam os valores obtidos nas pesquisas anteriormente citadas. Os autores atribuem seus resultados, possivelmente, pela menor concentração de material orgânico, sólidos, turbidez e cor, o que, provavelmente, pode ter favorecido a melhor captura de luz para o metabolismo autotrófico, além das concentrações de fósforo e frações nitrogenadas que foram consumidas de forma eficiente pelas microalgas reproduzindo efeitos superiores de produtividade.

O cultivo em fotobiorreator plano vertical, com iluminação distribuída por toda a sua estrutura frontal vertical, onde as bolhas de ar se distribuíam constante e uniformemente, além da condução do experimento em câmara B.O.D mostrou-se um ambiente adequado e favorável para a manutenção da cultura, mantendo-o livre de competidores, propiciando um crescimento sem interferências. Esse manejo revelou-se interessante para cultivos cujo objetivo seja a produção de biocompostos ou biomassa para fins farmacêuticos ou para indústria de alimentos, assim como laboratórios pesquisas que dispõe de espaço reduzido para cultivo e, portanto, precisa de boa produtividade para o rápido acúmulo desses materiais.

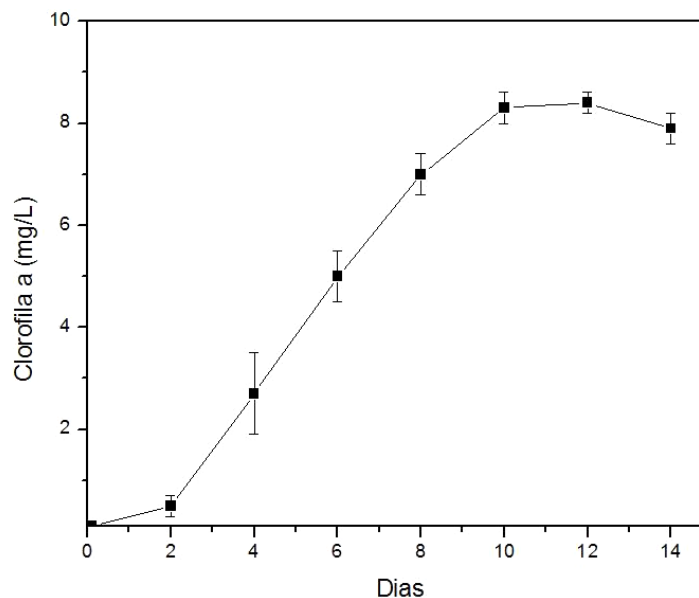
## **6.2 Resultados da análise da clorofila *a***

Dentre os principais metabólitos produzidos pelas microalgas a clorofila foi pouco investigada por pesquisas exploratórias acerca de compostos bioativos provenientes desses

microrganismos. Esses pigmentos naturais de coloração verde são encontrados em abundância na natureza, inclusive na *Scenedesmus obliquus*, porém sua instabilidade ao isolamento tem restringido a sua utilização como corante natural na indústria de alimentos (BERTOLDI, SANT'ANNA E OLIVEIRA, 2008; HENDRY, 1996; TAYLOR, 1984). Sabe-se que a ingestão de clorofila promove efeitos estimulantes no crescimento de tecidos, atuando como uma substância promotora da multiplicação de fibroblastos, células do tecido conjuntivo responsáveis pelo processo de cicatrização (TANAKA *et al.*, 1997; YAMAGISHI *et al.*, 1997).

A quantidade de clorofila *a* produzida pela *S. obliquus*, portanto, foi avaliada e os valores obtidos durante os diferentes dias de crescimento dessa microalga podem ser observados na figura 16.

Figura 16 - Quantidade de clorofila *a* avaliada durante os diferentes dias de crescimento da microalga *S. obliquus* em fotobiorreator.



Fonte: o autor.

A concentração do pigmento variou entre 0,1 a 8,5 mg/ L, e apresentou aumento significativo nos primeiros dias de cultivo, porém gradualmente diminuiu à medida que chegou na fase estacionária. Esse fenômeno é considerado previsível, uma vez que chegada a fase estacionária em cultivo descontínuo, há condições que desfavorecem o crescimento exponencial dos microrganismos e, conseqüentemente, a produção de certos metabólitos ligados diretamente à densidade celular, como é o caso da clorofila, também é reduzida.

O teor de clorofila *a* foi investigado nas microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* (MOURA JÚNIOR *et al.*, 2006). Os resultados apontaram um teor de  $3,74 \pm 0,26$  mg/L na microalga *C. gracilis*,  $1,87 \pm 0,08$  mg/L na microalga *I. galbana* e na microalga *T. weissflogii* um menor valor,  $0,96 \pm 0,08$  mg/L.

Foram investigados por Danesi *et al.* (2011) os efeitos da intensidade da luz e da temperatura, bem como os conteúdos de biomassa e de clorofila, sobre o crescimento da *Spirulina platensis*, cultivada em diferentes meios - um dos meios continha nitrato de potássio e outro ureia como fonte de azoto. O teor máximo de clorofila apresentado nas microalgas cultivadas no meio contendo  $\text{KNO}_3$  foi de  $1,05 \text{ mg/L d}^{-1}$  e naquelas cultivada em meio contendo ureia foi de  $1,23 \text{ mg/L d}^{-1}$ . A intensidade da luz mais adequada para obtenção de alto teor de clorofila *a* foi de  $24 \text{ mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para esta microalga.

Toyub *et al.* (2008) obteve uma concentração de clorofila *a* de  $6,14 \text{ mg/L}$  em *Scenedesmus obliquus* cultivada em meio BBM. Por outro lado, Alam (2004) encontrou um conteúdo de clorofila *a* de  $4,63 - 7,83 \text{ mg/L}$ , quando cultivou *Scenedesmus obliquus* em meio SFWM 2,5% (TOYUB *et al.*, 2008).

Como observado, a *S. obliquus* apresentou uma alta capacidade para sintetizar esse pigmento, colocando-a numa posição privilegiada como fonte alternativa microalgal de clorofila *a*. A biossíntese desse pigmento pela *S. obliquus* pode ser favorecida devido à composição do meio de cultivo e as condições de iluminação, que são fatores diretamente relacionados com o teor de clorofila *a* e biomassa.

### **6.3 Resultados da análise da taxa de crescimento específico da *S. obliquus***

As análises apontaram uma média de velocidade de crescimento ou *Specific Growth rate* (SRG) de  $0,45 \pm 0,01$  para as células da microalga *S. obliquus* e de  $0,44 \pm 0,01$  para clorofila *a* evidenciando que não houve diferença significativa entre esses parâmetros.

Toyub *et al.* (2008) em seus experimentos verificaram um SGR ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) de células de *S. obliquus* e seus dados apontaram uma variação de  $0,32$  e  $0,42 \mu\text{g}/\text{dia}$  para as microalgas cultivadas no meio SFWM nas diferentes concentrações empregadas e uma variação de  $0,33$  a  $0,41 \mu\text{g}/\text{dia}$  nas microalgas controle, cultivadas em meio BBM. A velocidade média de crescimento



encontrada nesta pesquisa foi significativamente maior ( $0,45 \pm 1$ ) indicando que houve um melhor desenvolvimento das células nas condições utilizadas.

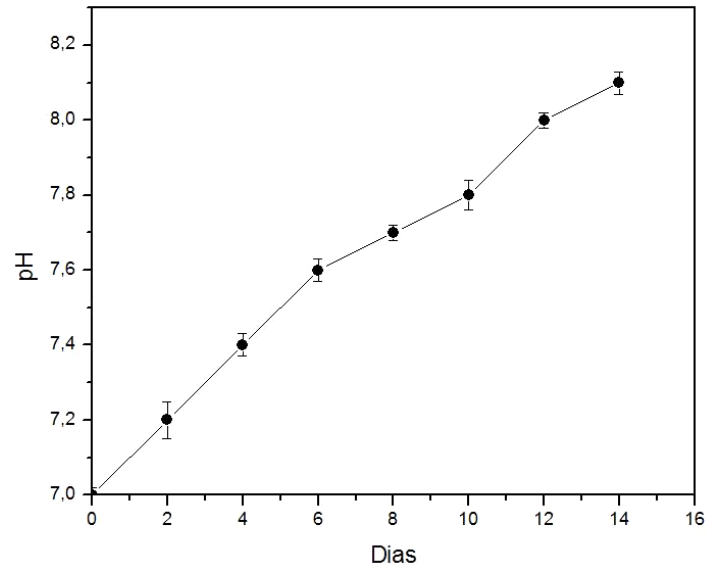
A influência da iluminação e da temperatura sobre o crescimento celular e teor de clorofila *a* pode estar relacionada com os parâmetros de intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $27 \pm 1$  °C empregados nesta pesquisa. Uma vez que as necessidades de nutrientes e de temperatura tenham sido satisfeitas, de modo que estas não limitam o crescimento, a intensidade da luz e sua duração definem a taxa de crescimento e o rendimento de produção (DANESI *et al.*, 2011; VONSHAK *et al.*, 1982). De acordo com Collier *et al.* (1994) a temperatura ótima para o desenvolvimento de microalgas situa-se na faixa de 25 a 35°C, caracterizando-as como mesófilas. É importante destacar a importância do borbulhamento de ar/gases no interior do cultivo. Esse processo de mistura do meio possibilitou às células melhor aproveitamento da luz, ocasionando a homogeneização dos nutrientes, além de favorecer a troca gasosa e como consequência acabou por aumentar a produtividade de biomassa. O fotobiorreator plano vertical utilizado nesta pesquisa possui um sistema aeração bem distribuído ao qual favoreceu a dispersão das células de forma que pudessem captar a luz com mais eficiência. A *Scenedesmus obliquus*, portanto, encontrou condições ideais de crescimento no sistema de cultivo ao qual foi submetido nesta pesquisa.

#### **6.4 Resultados da avaliação de pH do meio durante o cultivo das microalgas**

A produção microalgal em fotobiorreator é considerado vantajoso quando se trata do monitoramento das condições de cultivo. O pH, por exemplo, é um dos fatores que mais influenciam o crescimento das microalgas, pois afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos presentes no meio. Estes podem cristalizar e precipitar, dependendo do pH do cultivo. Assim, considera-se importante mantê-lo próximo à neutralidade para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (CORRÊA, 2015; LOURENÇO, 2006; SCHMIDT, 2007).

A figura 17 mostra a evolução do pH durante o período em que se deu o cultivo. A correção foi feita apenas no início do processo, elevando-o a 7,0. Não houve intervenção nesse parâmetro durante o experimento, apenas observou-se a sua evolução.

Figura 17 - Monitoramento do pH do meio de cultivo durante os diferentes dias de crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* em fotobiorreator.



Fonte: o autor.

O pH do meio, ao longo dos 14 dias de cultivo, variou entre 7,0 e 8,1, mantendo-se numa faixa adequada para o bom desenvolvimento da *Scenedesmus obliquus*. Valores semelhantes de pH foram encontrados por Toyub *et al.* (2008) e Ukeles (1973), observando uma variação de 7,03 a 8,07 ao longo dos seus experimentos. Miranda (2011), em seus ensaios de cultivo de *S. obliquus* em fotobiorreator e lagoa fotossintética do tipo *raceway*, observou a alcalinização do meio de cultura, ao qual chegou a apresentar pH 10,8.

Experimentos feitos com *Chlorella vulgaris* (Trevisan *et al.*, 2013) cultivada em diferentes meios como DM, MBM e MC, apresentaram ampla variação de pH, sendo os melhores resultados de produtividade observados na faixa de 6,5 a 9,0. Kumar *et al.*, (2010) ao cultivarem *C. vulgaris* com efluente de suinocultura identificaram valores altos de pH, sem alterações de produtividade significativas ao longo do período de cultivo.

O pH ótimo de crescimento varia com a espécie de microalga cultivada, e com os diferentes fatores envolvidos no processo produtivo. De acordo com Rubio *et al.* (1989) o pH ótimo da *S. obliquus* é de 6,8, porém observa-se que valores de na faixa de pH 7,1 a 7,9 são tolerados pela *S. obliquus*. Esta demonstrou crescimento acelerado até o 10º dia ao qual foi observado pH máximo de 7,8, entrou em fase estacionária no 12º dia com pH 8,0, ocorrendo uma leve diminuição do número de células no 14º dia, período em que o pH se encontrava acima de 8,0.

A elevação para valores mais alcalinos é um fenômeno decorrente da respiração das microalgas devido à uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez carbônica seja removida do meio, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (-OH), acarretando um aumento do pH (TREVISAN *et al.*, 2013).

A manutenção do pH em condições de adequadas é significativa para a manutenção do metabolismo dos microrganismos e, portanto, para determinar a biossíntese de produtos bioativos, bem como metabólitos secundários (GALVÃO, 2011).

### 6.5 Resultados da precipitação das proteínas com sulfato de amônio e dosagem de proteínas solúveis

As proteínas são componentes estruturais de grande relevância, responsáveis por uma grande diversidade de funções biológicas no organismo vivo. Essas estruturas orgânicas são formadas por cadeias polipeptídicas de aminoácidos (com 20 ou mais aminoácidos ligados entre si) unidas por ligações peptídicas (ligações covalentes entre carbono e nitrogênio), e correspondem de 50% a 80% do peso seco dos microrganismos (ANDRADE, 2014; TINDALE, 1988).

As proteínas ocorrem em grande variedade e são formadas por unidades monoméricas simples, peptídeos de tamanho relativamente pequenos até polímeros com pesos moleculares na faixa de milhões. São elas instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa, podendo ser observadas propriedades e atividades completamente diferentes pelo simples rearranjo dos 20 aminoácidos que formam a sua cadeia (LEHNINGER, 1984).

Tabela 3 – Determinação da concentração e da quantidade de proteínas solúveis totais presentes no extrato bruto e nas frações proteicas precipitadas com sulfato de amônio obtidas da microalga *S. obliquus*.

Frações	Volume da fração (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
EB <sup>1</sup>	500	0.828	414
FrP <sub>0-20%</sub> *	10	0.485	4,85
FrP <sub>20-40%</sub>	10	0.643	6,43
FrP <sub>40-60%</sub>	10	1.042	10,42
FrP <sub>60-80%</sub>	10	0,810	8,10

<sup>1</sup>Extrato bruto

\*Fração proteica precipitada com sulfato de amônio

Fonte: o autor.

Observa-se, que os resultados obtidos nesta pesquisa com *S. obliquus* cultivada em meio W.C proporcionou concentrações de proteínas que variaram entre 0,485 a 1,042 mg/ mL, representando as frações FrP<sub>0-20%</sub> que apresentou menor concentração de proteína e a fração FrP<sub>40-60%</sub> que apresentou maior quantidade. A precipitação de proteínas com sulfato de amônio pelo método *Salting out* com diferentes concentrações de sal demonstrou que, para o complexo de proteínas presentes na estrutura dessa microalga a saturação 40-60% promoveu uma maior eficiência na obtenção de frações mais concentradas. A concentração de proteína do extrato bruto (EB) inferior a fração FrP<sub>40-60%</sub> pode ser explicada pela presença de compostos polifenóis e polifenóis oxidase, que reagem com as proteínas impedindo a formação do complexo das mesmas com o corante BG-250 (ZAIA, ZAIA e LICHTIG, 1997).

Quevedo, Morales e Acosta (2008), em seus ensaios com *Scenedesmus sp* avaliou a produção de proteínas em diferentes meios de cultivo, aos quais foram denominados de Estandar 1, Estandar 2 e Algal, utilizando-se como fonte de carbono o NaHCO<sub>3</sub>. Os resultados de produtividade de proteína foram de 0,0788 mg/mL ± 0,0051 no meio Estandar 1, 0,138 mg/mL ± 0,0102 no meio Estandar 2 e 0,0665 ± 0,0024 mg/mL no meio algal.

Nunez *et al.* (2001) obtiveram uma produtividade de 0,0524 mg/mL de proteína de *Scenedesmus obliquus* cultivada em reatores de 2 litros de capacidade, em águas residuais.

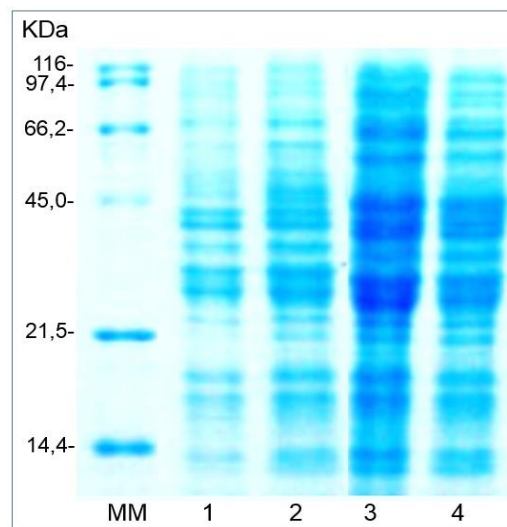
O teor de proteínas solúveis também foi avaliado por Moura Júnior *et al.* (2006) o qual observou nas microalgas *C. gracilis*, *I. galbana* e *T. weissflogii* um teor de 0,030 ± 0,001 mg.L<sup>-1</sup>, 0,01 ± 0,005 mg.L<sup>-1</sup> e 0,002 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Fabregas *et al.* (1985) encontrou resultados superiores para a microalga *I. galbana* a qual apresentou um conteúdo de proteínas de 4,1 – 291,8 mg/ L (Fabregas *et al.*, 1985). O cultivo de *S. obliquus* nas condições ambientais trabalhadas na pesquisa proporcionou a obtenção de um conteúdo de proteínas no extrato bruto de 828 mg/ L, resultado superior àqueles obtidos em outras microalgas reforçando a importância dessa microalga como fonte de proteínas potencialmente ativas.

## 6.6 Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

As frações proteicas submetidas ao processo de precipitação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%). O perfil eletroforético das proteínas é

uma ferramenta importante para a avaliação dos efeitos das variáveis envolvidas no processo de cultivo das microalgas e sua influência na produção de proteínas, uma vez que os fatores ambientais podem modificar a composição celular desses microrganismos. Na figura 18 observa-se a distribuição das bandas de proteínas pelo gel.

Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%) das diferentes frações proteicas obtidas com extrato bruto da microalga *Scenedesmus obliquus* precipitado com sulfato de amônio. MM – marcadores moleculares; 1) Fração 0-20%; 2) Fração 20-40%; 3) Fração 40-60% e 4) Fração 60-80%.



Fonte: o autor.

O perfil eletroforético das frações proteicas da microalga *S. obliquus* delineou-se por uma ampla faixa de peso molecular que variou entre 14,4 KDa e 116 KDa. Frações mais pesadas e significativamente mais concentradas se encontram na faixa de 21,5 a 45 KDa, em ambas as frações (Fração 0-20%, Fração 20-40%, Fração 40-60% e Fração 60-80%). É possível observar que todas as frações apresentam praticamente o mesmo perfil de proteínas, diferenciando apenas quanto a sua concentração (representada pela coloração mais forte do corante). Esses resultados indicam que a precipitação teve efeito sobre todas as proteínas, porém em grau de intensidade diferentes, verificando uma maior eficiência do processo na concentração de sulfato de amônio de 40-60%, confirmando os dados de quantificação, indicando um resultado superior em relação das demais frações.

As proteínas de peso molecular intermediário se localizam na faixa de 14,4 e 21,5 kDa, e as bandas mais leves podem ser visualizadas em todas as frações, porém em menor quantidade na fração Fr<sub>0-20%</sub>. Duas bandas de proteínas de baixo peso molecular (abaixo de 14,4 kDa,) são visualizadas no gel e podem representar frações peptídicas ou de aminoácidos.

Concentrações de proteínas no intervalo de peso molecular 14,3 a 66,0 kDa foram encontrados por Venkataraman *et al.* (1992) em ensaios realizados com a cianobactéria *Spirulina* e Jacob-Lopes *et al.* (2006) em pesquisa com a cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*. Rouxel *et al.* (2001), estudou a fração proteica das algas *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata* e *Porphyra umbicalis*, utilizadas na alimentação humana, e também observou em seus resultados a predominância de proteínas que se enquadravam na mesma faixa (JACOB-LOPES *et al.*, 2006).

Observa-se, portanto, que a *Scenedesmus obliquus* apresenta um perfil de proteínas que estende-se por uma ampla faixa de peso molecular, apresentando desde a frações menores como também mais pesadas.

Essa extensão amplia o leque de pesquisas que podem ser realizadas na tentativa de conhecer melhor essa microalga ainda pouco explorada quanto a presença de conteúdo proteico biologicamente ativo. A eletroforese além de contribuir para a caracterização das proteínas produzidas em determinadas condições de cultivo, permite a avaliação da eficácia de processos de purificação facilitando a identificação das frações de interesse.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas avaliando as possíveis atividades biológicas das proteínas para empregá-las como matéria prima na fabricação de produtos enriquecidos com compostos de alto valor biológico capazes de exercer efeitos diversos como ação antioxidante, antienvhecimento, antitumoral, anticâncer, antimicrobiana, etc.

### **6.7 Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana das frações proteicas da microalga *S. obliquus***

As frações obtidas após precipitação e diálise foram testadas quanto a atividade antimicrobiana. Nenhum tratamento teve efeito de inibição contra o fungo *Colleotricum musae*, causador da antracnose em plantios de banana. Os resultados podem ser observados na tabela 5, conforme a seguir:

Tabela 4 – Atividade antifúngica das frações proteica de microalga *S. obliquus* avaliada pelo método de difusão em disco.

Amostras	<i>C. musae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. kefyfyr</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>
Diâmetro do halo de inibição (mm)					
<sup>1</sup> Controle	9,2±2	12±2	10,1±1	13,3±2	12,4±1
FrP <sub>0-20%</sub> *	-	-	5,4±1	4,1±2	3,5±1
FrP <sub>20-40%</sub> *	-	-	7,6±2	7,4±1	6,2±2
FrP <sub>40-60%</sub> *	-	6,3±1	11,2±1	10±1	8,6±1
FrP <sub>60-80%</sub> *	-	-	7,3±2	8,2±2	5,1±2

<sup>1</sup>Anfotericina B 100 µg

\*Fração proteica precipitada com sulfato de amônio

Fonte: o autor.

A formação de halo de inibição foi observada apenas no grupo controle, que utilizou anfotericina B 100 µg. Nos testes realizado com *Candida albicans*, fungo envolvido em dermatites e processos inflamatórios em humanos, apenas a fração FrP<sub>40-60%</sub> apresentou efeito contra o seu crescimento desenvolvendo halo de 6,3±1 mm, além do controle com halo de 12±2 mm.

Nos ensaios realizados com *C. kefyfyr* todos os tratamentos apresentaram halo de inibição, não havendo diferença significativa para as frações FrP<sub>20-40%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub>, as quais foram observados valores de 7,6±2 e 7,3±2 mm. A fração FrP<sub>0-20%</sub> teve efeito inibitório com desenvolvimento de halo de 5,4±1 mm, resultado inferior aos demais tratamentos devido ao baixo teor de proteína na solução. Nos discos tratado fração FrP<sub>40-60%</sub> obteve-se um halo de inibição de 11,2±1 mm, enquanto na amostra controle foi observado halo de 10,1±1 mm. Esses resultados indicam que o tratamento com a fração de proteínas de *Scenedesmus obliquus* FrP<sub>40-60%</sub> de saturação tem efeito superior ao antibiótico anfotericina B 100 µg, indicando ser esta uma fonte alternativa de controle antimicrobiano para esse fungo.

Nos ensaios realizados com *Aspergillus niger*, fungo causador de danos aos cultivos de soja, os halos de inibição variaram de 4,1±2 a 10±1 mm. Na fração FrP<sub>0-20%</sub>, resultados, enquanto halos de 7,4±1 e 8,2±2 mm foram observados nos discos tratados com as frações FrP<sub>20-40%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub>, respectivamente. Percebe-se que houve uma proporcionalidade entre os efeitos inibitórios no

crescimento desse microrganismo e as respectivas concentrações de proteínas em cada fração. Os maiores halos foram observados no tratamento controle com  $13,3 \pm 2$  mm.

Nos ensaios com *A. fumigatus*, todas as frações apresentaram efeito sobre o crescimento desse fungo, com os tamanhos dos halos variando entre  $3,5 \pm 1$  a  $8,6 \pm 1$  mm, valores inferiores ao observados no tratamento controle cujo halo mediu  $12,4 \pm 1$  mm. Os efeitos de inibição também foram proporcionais às concentrações de proteínas, portanto, o menor halo foi observado no tratamento com a fração FrP<sub>0-20%</sub> e a maior com a fração FrP<sub>40-60%</sub>.

Os ensaios antibacterianos com as frações de proteínas da *S. obliquus* demonstraram maiores efeitos contra alguns dos microrganismos testados, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 5 – Atividade antibacteriana das frações proteicas de microalga *S. obliquus* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliada pelo método de difusão em disco.

Amostras	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Diâmetro do halo de inibição (mm)						
<sup>1</sup> Controle	$19,3 \pm 2$	$16,1 \pm 1$	$23,4 \pm 2$	-	-	-
<sup>2</sup> Controle	-	-	-	$12,5 \pm 1$	$11,3 \pm 2$	$18,8 \pm 1$
FrP <sub>0-20%*</sub>	-	-	$4,3 \pm 1$	-	$4,5 \pm 2$	-
FrP <sub>20-40%*</sub>	-	-	$9,2 \pm 2$	-	$7,6 \pm 1$	-
FrP <sub>40-60%*</sub>	$11,7 \pm 1$	-	$15,3 \pm 1$	-	$12,7 \pm 2$	-
FrP <sub>60-80%*</sub>	$9,4 \pm 2$	-	$8,5 \pm 2$	-	$7,3 \pm 1$	-

<sup>1</sup>Ampicilina 100 µg para as bactérias Gram-negativas

<sup>2</sup>Gentamicina 100 µg para as bactérias Gram-positivas

\*Fração proteica precipitada com sulfato de amônio

Fonte: o autor.

As frações com menor teor de proteínas como a FrP<sub>0-20%</sub> e FrP<sub>20-40%</sub> não apresentaram halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto na FrP<sub>40-60%</sub> observou-se halo de  $11,7 \pm 1$  mm e na FrP<sub>60-80%</sub> de  $9,4 \pm 2$  mm. Essa bactéria está comumente envolvida em DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos), devido a produção de toxinas capazes de produzir náuseas, vômitos, diminuição da temperatura corporal, dores abdominais e diarreia àqueles que consomem alimentos contaminados produzidos em condições higiênicas deficientes.

Observa-se que nenhum tratamento teve efeito sobre o crescimento da bactéria *S. epidermidis*, apenas o controle 1, realizado com ampicilina 100 µg, produziu halo de inibição de  $16,1 \pm 1$  mm. O mesmo ocorreu com as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, as



quais somente o tratamento controle com Gentamicina 100 µg provocou halos de inibição de  $12,5 \pm 1$  e  $18,8 \pm 1$  mm, respectivamente. A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno comum em pacientes de casos críticos em unidades de terapia intensiva, devido a sua capacidade de colonização e resistência, provocando infecções epidêmicas e endêmicas (FERRAREZE *et al.*, 2007). A *E. coli*, também envolvida em surtos de DTA pode ser encontrada naturalmente no intestino de humanos e animais de sangue quente, sendo o sorotipo de importância destacada o O157:H7, associado à colite hemorrágica, diarreia com sangue e síndrome urêmica hemolítica (HUS) (SOUZA, 2006).

Em todos os tratamentos com frações proteicas de *S. obliquus* foram observados efeitos inibitórios de crescimento contra o *Bacillus subtilis*. Os maiores efeitos foram observados pela fração FrP<sub>40-60%</sub> com halo de  $15,3 \pm 1$  mm e do tratamento controle com halo de  $23,4 \pm 2$  mm. O *B. cereus* é distribuído naturalmente na natureza, porém pode ser isolado a partir de produtos crus e processados, como arroz, condimentos, vegetais, preparações cárneas e laticínios. Esse microrganismo está associado a duas doenças transmitidas por alimentos, denominadas de síndrome emética e síndrome diarreica (KRAMER e GILBERT, 1989 *apud* SOARES *et al.*, 2008). A síndrome diarreica está associada a várias enterotoxinas, dentre elas, a enterotoxina hemolisina BL (HBL) e a enterotoxina não-hemolítica (NHE) (SOARES *et al.*, 2008).

A *Salmonella typhi* responsável pela febre tifoide, doença infecciosa aguda e transmissível, teve seu desenvolvimento inibido pelas frações testadas. Não houve diferença significativa entre os halos de inibição pelas frações FrP<sub>20-40%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub>, que apresentaram  $7,6 \pm 1$  e  $7,3 \pm 1$  mm, respectivamente. A fração FrP<sub>40-60%</sub> apresentou halo de inibição de  $12,7 \pm 2$  mm, resultado superior ao grupo controle no qual observou-se a formação de halo de  $11,3 \pm 2$  mm. Percebe-se, portanto, que essa fração proteica pode representar uma alternativa para o controle da *S. typhi*, uma vez que cada vez mais fica cada vez mais evidente a necessidade de alternativas mais eficientes no combate de algumas enfermidades. Com o desenvolvimento da resistência de algumas espécies aos antibióticos já consolidados no mercado e àqueles considerados de última geração, vê-se a necessidade de buscar novas fontes de composto antimicrobianos.

As frações de proteínas testadas tiveram eficiência para a maioria dos fungos testados, sendo a fração FrP<sub>40-60%</sub> a mais eficaz. Esses resultados são reflexos do conteúdo proteico de 1.042 mg/ mL e ao eficiente processo de obtenção dessas moléculas que permitiram a manutenção da sua atividade biológica.

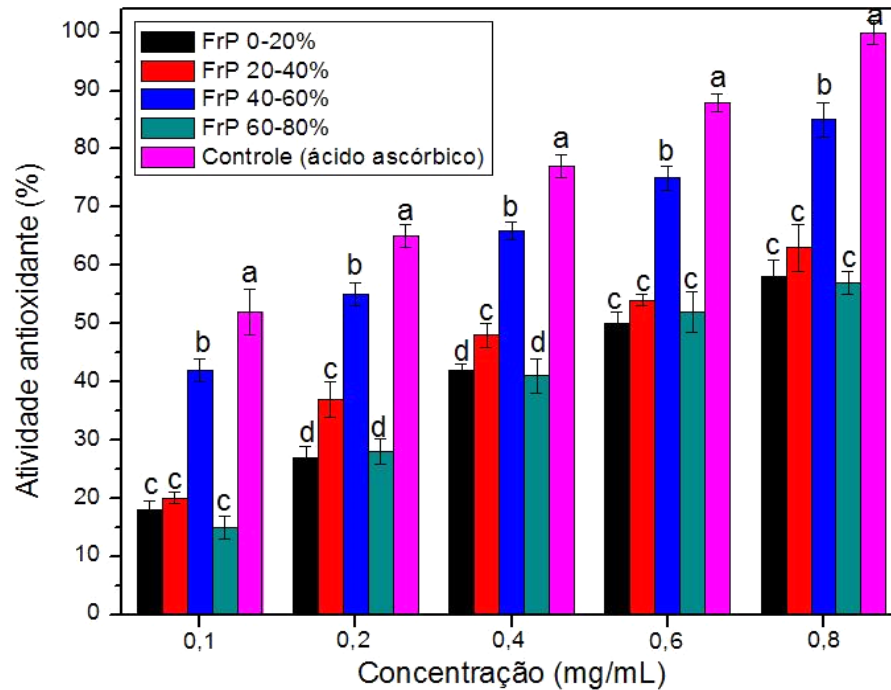
Os organismos unicelulares possuem sistemas de defesa eficientes capazes de protegê-los contra competidores no meio de cultivo, entre eles estão as proteínas e os peptídeos antimicrobianos. Proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM ou também conhecidos como AMP) são pequenas moléculas proteicas essenciais do sistema imune inato, com atividade letal rápida e capaz de atuar contra uma ampla variedade de microrganismos. Por tais características e também pelo fato de funcionarem como uma espécie de sistema de defesa de baixa especificidade, os PAM são considerados importantes na busca por novos agentes terapêuticos (REDDY, YEDERY e ARANHA, 2004).

### **6.8 Avaliação da atividade antioxidante das frações proteicas da microalga *S. obliquus***

Muitos estudos realizados com microalgas têm concluído que a presença de compostos fenólicos explicam seus efeitos antioxidantes. Os antioxidantes podem ser produzidos em resposta a situações de estresse com o objetivo de evitar maiores danos as células evitando, assim, a sua morte. No entanto, sabe-se que as células são capazes de se proteger contra ameaças utilizando recursos endógenos, um exemplo disso é a produção de compostos proteicos (aminoácidos, peptídeos ou proteínas) que desempenhem a função de protegê-las.

A atividade antioxidante das macro e microalgas marinhas foi investigada por vários autores através de ensaios *in vitro*, entre os métodos mais empregados está o método de sequestro do radical livre DPPH. Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante utilizando o método DPPH estão ilustrados na figura 19.

Figura 19 – Atividade antioxidante das frações proteicas da microalga *S. obliquus* usando o ácido ascórbico como controle positivo.



Fonte: o autor.

Todas as frações, nas diferentes concentrações testadas, apresentaram atividade antioxidante, porém em intensidades diferentes, variando de acordo com a concentração empregada. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, apresentou atividade antioxidante elevada, notadamente superior aos demais tratamentos. Este é um antioxidante com ação conservante empregado pela indústria de alimentos para a prevenção e retardo da oxidação dos alimentos prevenindo alterações de odor e da cor natural contribuindo para a manutenção da qualidade do produto (REDAÇÃO USP, 2014).

As frações FrP<sub>0-20%</sub>, FrP<sub>20-40%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub> não apresentaram diferença significativa na concentração 0,1, 0,6 e 0,8 mg/ mL e a atividade antioxidante dessas frações variam entre 20%, 50% e 60%, respectivamente. A fração FrP<sub>40-60%</sub>, nas mesmas concentrações testadas, apresentou resultados superiores alcançando valores como 43%, 75% e 85%, ficando abaixo apenas dos resultados obtidos no tratamento controle, que apresentou atividade antioxidante de 53%, 88% e 98%, respectivamente.

As frações FrP<sub>0-20%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub> não apresentaram diferença significativa na concentrações 0,2 e 0,4 mg/ mL com uma média de eficiência antioxidante de 25% e 40%, sendo

que FrP<sub>20-40%</sub> demonstrou efeito superior com atividades de 37% e 47%, respectivamente. A FrP<sub>40-60%</sub> apresentou atividade antioxidante de 55% e 65%, e o ácido ascórbico de 65% e 75%, nas concentrações 0,2 e 0,4 mg/ mL.

A alga vermelha *Palmaria palmati*, investigada quanto a atividade antioxidante do seu extrato proteico, apresentou atividade contra DPPH e radicais peroxil. Esse efeito foi atribuído a liberação de pequenos peptídeos ou aminoácidos por hidrólise enzimática pela proteases pode ser contribuído para a melhoria da sua eliminação atividades de ROS (WANG *et al.*, 2010; SAMARAKOON e JEON, 2012).

Mendes (2011) analisou a capacidade antioxidante dos extratos aquosos com 10 mg/mL de *T. chunii*, *B. braunii*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata*, determinadas pelo método DPPH. Seus resultados apontam uma capacidade antioxidantes desses extratos, aos quais apresentaram inibição oxidativa de 73,2±2,4%; 38,6±4,9%; 23,0±3,1% e 18,6±3,0%, respectivamente. Os extratos foram testados quanto a atividade antimicrobiana porém não foram observadas propriedades antibióticas sobre *L. anguillarum* e *P. damsela piscicida*.

O extrato metanólico de *Spirulina platensis* foi avaliado e inativou 53,5% o DPPH reativo e mostrou ação antifúngica, antimicotoxinas e antioxidante. Esses efeitos foram atribuídos a presença de compostos naturalmente presentes em alguns tecidos microbianos, promissores para substituição de antifúngicos e outros conservantes químicos (SOUSA, 2012).

A atividade antioxidante de extratos aquosos de oito algas foram avaliadas por Shaneb *et al.* (2012) pelos métodos DPPH e ABTS. Os ensaios revelaram que os maiores resultados foram obtidos com as microalgas para *S. platensis*, *Oscillatoria sp.*, *Anabaena flous-aquae* e *Nostoc muscorum* cujo percentual da atividade antioxidante para cada espécie foi 75,9%, 75,6%, 73,6% e 72,8%, respectivamente. Para cada método os valores variaram entre 30,1 - 72,4% e 32,0 - 75,9%, respectivamente. A *Spirulina plantensis* apresentou maior atividade antioxidante e essa atividade foi atribuída a presença de ficobiliproteínas presentes na sua composição celular.

Recentemente, alguns dos trabalhos relacionados com moléculas biologicamente ativas provenientes de microalgas focaram na avaliação dos hidrolisados de proteínas ou peptídeos antioxidantes do que nas extrações de solventes orgânicos a partir de algas marinhas.

Sheih, Wu e Fang (2007; 2009) avaliaram o extrato proteico hidrolisado das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa* e observaram o poder antioxidante desses extratos pelo método DPPH. As amostras apresentaram uma atividade antioxidante dose-dependente, e valores

acima de 80% de atividade foram observados na concentração de 100  $\mu$ M de hidrolisado de proteínas da microalga *Chlorella vulgaris*. Os ensaios com proteínas parcialmente hidrolisadas de *C. pyrenoidosa* observou atividade antioxidante dependente da concentração, avaliando pelo método ORAC. O hidrolisado proteico apresentou atividade antioxidante a uma concentração de 5,45 mg/ mL de proteína. Ambas pesquisas verificaram a presença de peptídeos com alta capacidade antioxidante, responsáveis respectivamente, pelo efeito apoptótico de células do hepatocarcinoma humano *in vitro* e pelo efeito protetor contra danos no DNA.

Proteínas hidrolisadas de três espécies de microalgas verdes: *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* e *Nannochloropsis sp* foram testadas quanto a capacidade antioxidante, determinada através de diferentes métodos (quanto a capacidade de absorção de radical oxigênio - ORAC, atividade cátion radical - ABTS e a atividade de eliminação de radicais - DPPH). Os resultados indicaram elevada capacidade antioxidante para as microalgas *D. tertiolecta* e *Nannochloropsis sp*. Esses hidrolisados mostraram capacidade antioxidante mais elevada do que o RBM (Resíduos de Biomassa Microalgal) e suas concentrações testadas (NORZAGARAY-VELENZUELA *et al.*, 2016).

Os antioxidantes desempenham um papel importante no corpo humano pela redução das reações oxidativas que provocam danos celulares e efeitos deletérios em tecidos. Muitas enzimas, aminoácidos, peptídeos e proteínas são capazes de proteger os órgãos internos e tecidos de danos oxidativos causados por várias espécies de oxigênio e nitrogênio reativos tóxicos (AHN *et al.*, 2004; SAMARAKOON e JEON, 2012).

### **6.9 Resultado da determinação do perfil de aminoácidos essenciais presentes na fração proteica da microalga**

Os resultados das análises de teor de proteína total e atividade antimicrobiana demonstraram que a fração FrP<sub>40-60%</sub> apresentou efeito superior as demais frações avaliadas, indicando um processo eficiente de concentração das proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* com atividade biológica. Foi realizada a quantificação de aminoácidos essenciais dessa fração e os resultados encontram-se na tabela 7.

Tabela 6 – Quantificação dos aminoácidos essenciais presentes na fração proteica FrP<sub>40-60%</sub> obtida do extrato total da microalga *S. obliquus*.

Aminoácido	mg/g
Cis	245
Fen	101
Ile	40
Leu	122
Lis	231
Met	44
Val	60
Tir	74
Tre	86
Trp	14

Fonte: o autor.

Com observado na tabela 7 foram encontrados em maior quantidade os aminoácidos cisteína, lisina, leucina e fenilalanina, nas concentrações de 245, 231, 122 e 101 mg/ g de proteína. O alto teor de proteínas totais podem explicar o elevado conteúdo aminoacídico, caracterizando a microalga *Scendesmus obliquus* como uma fonte rica em proteínas e aminoácidos essenciais.

A ação antioxidante observada na fração FrP<sub>40-60%</sub> pode estar relacionada com a presença dos aminoácidos hidrofóbicos, cisteína e leucina, uma vez que estas moléculas podem interagir diretamente com radicais livres. Além disso, a tirosina (74 mg/ g), o triptofano (14 mg/ g) e a fenilalanina (101 mg/ g), com resíduos aromáticos presentes em suas moléculas podem tornar estáveis espécies reativas de oxigênio (ROS) através da transferência direta de elétrons estabilizando as moléculas evitando, assim, processos oxidativos (QIAN, JUNG e KIM, 2008).

De acordo com Kurutas (2016) e Qian, Jung e Kim (2008), o grupo tiol da cisteína tem um papel muito importante na proteção das células e biomoléculas celulares contra o estresse oxidativo. O resíduo Cys, encontrado em grande quantidade na fração proteica da microalga *S. obliquus* tem a propriedade de doar prótons aos radicais peroxil e outros radicais livres na célula e, portanto, exibe efeito protetor em lípidos e outras biomoléculas (SHEIH, WU e FANG, 2007). Outras funções relacionadas à Cys são a ativação da proliferação celular e as funções de quimiotaxia, fagocitose e citotoxicidade natural de células malignas (SANTOS e BURINI, 2005).

Outras microalgas foram investigadas quanto a presença de composto biológicos de alto valor agregado, como Sheih, Wu e Fang (2007; 2009) que avaliaram o extrato proteico hidrolisado das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa*.

Sheih, Wu e Fang (2009) encontraram um perfil de peptídeos que apresentava um conteúdo de aminoácidos na seguinte ordem decrescente de concentração His > Val > Glu > Asp > Lys > Gly > Thr > Ser, na microalga *C. vulgaris*. A atividade antioxidante observada nesses ensaios e o efeito de indução a apoptose de células envolvidas no efeito cancerígeno de células gástricas. Os resultados foram atribuídos, pelos autores, ao conteúdo de histina, aminoácido com capacidade para doar hidrogênio, reduzindo os efeitos dos radicais livres. Também observaram que certas sequências de aminoácidos com ligações covalentes e estabilidades térmicas estão associadas a propriedades antioxidantes eficazes (SHEIH, WU e FANG, 2009).

Sheih, Wu e Fang (2007) encontraram a seguinte sequência de aminoácidos na *C. pyrenoidosa*, Val-Glu-Cys-Tyr-Pro-Asn-Arg-Pro-Gln-Phe. A presença de determinados aminoácidos podem explicar os efeitos antioxidantes observados no extrato hidrolisado de proteína, como a Tyr, Phe, Val, Pro, Phe e resíduos Cys, aminoácidos capazes de interagir com radicais livres e ROS, estabilizando suas moléculas (QIAN, JUNG e KIM, 2008; SHEIH, WU e FANG, 2007).

A microalga *S. Platensis*, muito explorada em pesquisas à despeito da presença de moléculas bioativas, demonstrou um elevado teor de lisina (Lys) apresentando um conteúdo de 50-55 mg/ g desse aminoácido. Comparativamente, a *S. Obliquus* demonstrou uma maior concentração de lisina apresentando um conteúdo de 231 mg/ g, indicando ser esta uma fonte promissora desse aminoácido. Além disso, foram encontrados os aminoácidos metionina e cisteína (Met + Cis) em conjunto (15-20 mg/ g de proteína) e treonina (45-50 mg/ g de proteínas), relatados como aminoácidos transformados a partir de *S. Platensis* (MORIST *et al.*, 2001).

A presença de lisina na concentração 231 mg/ g, aponta para uma elevada produção desse aminoácido de grande importância econômica, utilizado desde a década de 1960 para a suplementação em ração animal contribuindo para a melhoria da eficiência na produção de proteínas de origem animal. A produção de L-lisina por fermentação foi iniciada no Japão para a suplementação de alimentos para aves. Posteriormente a DL-metionina e L-lisina, HCl, L-treonina e L-triptofano foram introduzidos no final da década de 1980. Com os progressos em biotecnologia, o custo de produção de cada um dos aminoácidos foi diminuindo significativamente, o que tem sido um dos principais fatores na expansão de utilização de aminoácidos na alimentação animal. O emprego de aminoácidos nas rações reduz o custo com farelo de trigo, e com isso contribui para melhorar o aproveitamento das áreas cultivadas (TORIDE, 2016). O cultivo de microalgas tem um

aspecto vantajoso em relação a produção de biocompostos por meio da produção tradicional, graças à sua forma de cultivo que exige menos apropriação de terras, consequência da sua alta produtividade em espaço reduzido.

Os aminoácidos funcionais também conhecidos como AA funcionais, incluem arginina, cisteína, glutamina, leucina, prolina e triptofano. A suplementação da dieta com um ou uma mistura desses AA pode trazer grandes benefícios à saúde contribuindo para recuperação ou diminuição de problemas de saúde em vários estágios do ciclo de vida (por exemplo, restrição de crescimento fetal, morbidade e mortalidade neonatal, desmame associado a disfunção intestinal, obesidade, diabetes, doença cardiovascular, a síndrome metabólica e infertilidade. A eficiência das transformações metabólicas que promovem o crescimento muscular está associada a esse consumo, proporcionando melhoria no desempenho atlético, evitando a deposição de gordura em excesso e reduzir a adiposidade. A suplementação de aminoácidos essenciais e funcionais na dieta de animais também está relacionada ao aumento na produção de leite, ovos e carne de qualidade, demonstrando sua influência positiva e a justificativa de maiores investimentos para produção e obtenção desses compostos de alto valor biológico (WU, 2009).



## CONCLUSÃO

O cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* representa uma opção atrativa para o desenvolvimento de complementos nutricionais em virtude do alto teor proteico e de aminoácidos biologicamente ativos presentes na biomassa celular.

As frações proteicas testadas apresentaram efeito antimicrobiano contra os fungos *C. kefyri*, *A. niger* e *A. fumigatus*, porém somente a fração FrP<sub>40-60%</sub> e o tratamento controle apresentaram halo de inibição para *C. albicans*. Nenhum tratamento teve efeito sobre o crescimento das bactérias *S. epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas as frações FrP<sub>40-60%</sub> e FrP<sub>60-80%</sub> apresentaram halo de inibição para a bactéria *Staphylococcus aureus*, com halos de 11,7±1 mm e 9,4±2 mm, respectivamente.

As frações proteicas testadas apresentaram atividade antioxidante, com efeito proporcional a concentração de proteínas precipitadas, demonstrando ser dose-dependentes. A maior atividade foi encontrada na fração FrP<sub>40-60%</sub> com resultados superiores nas atividades antioxidantes e antimicrobianas em todos os testes realizados alcançando uma atividade antioxidante máxima de 85% na concentração de 0,8 mg/ mL. Esta fração foi utilizada para a quantificação de aminoácidos.

O resultado da análise quantitativa de aminoácidos essenciais encontrou a seguinte sequência de aminoácidos, por decrescente de quantidade, Cis, Lis, Leu, Fen, Tre, Tir, Val, Met, Ile e Tri. A maior parte dos aminoácidos encontrados tem poder antioxidante sobre radicais livres e ROS, portanto, também sobre o radical DPPH devido aos grupamentos químicos característicos dessas moléculas. Os aminoácidos Cis e Liz tem a propriedade de doar prótons aos radicais peroxil e outros radicais livres na célula. Aminoácidos hidrofóbicos como a Cis e Leu podem interagir diretamente com radicais livres estabilizando-os. A Tir, o Tri e Fen possuem resíduos aromáticos em suas moléculas capazes de tornar estáveis espécies reativas de oxigênio (ROS).

Faz-se necessário que mais pesquisas sejam realizadas a fim de explorar a microalga *Scenedesmus obliquus*, uma vez revelada sua grande relevância como alternativa para a produção de proteínas e aminoácidos essenciais para alimentação humana e animal. Além disso, é importante que sejam aprofundados os estudos acerca da sua atividade antioxidante uma vez que esses compostos são importantes para a prevenção de doenças mediadas por radicais livres como artrite,

choque hipovolêmico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, envelhecimento e câncer, podendo ser a causa ou o fator agravante.

É interessante a continuidade da cooperação entre o Laboratório de Desenvolvimento de Processos, coordenado pelo Professor José Oswaldo Beserra Carioca e o Laboratório de Biotecnologia Molecular, LabBMol, coordenado pelo Professor André Luis Coelho da Silva, além do o Laboratório de Estudos de Simulação Computacional, coordenado pelo Prof. Francisco Sávio Macambira dos Santos no IFCE, por exercerem um trabalho de grande relevância para a visibilidade do Ceará como potencial polo de desenvolvimento regional de microalgas no nordeste brasileiro.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL, B. H. H.; EL BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under salt stress. **Acta. Phys. Plant**, Cairo, vol. 31, p. 623-631, 2009. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jas/1/1/3/>> Acesso em: 22 jun. 2016.
- ABEDIN, R.M.A.; TAHA, H.M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, Egypt, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008. Disponível em: <[www.idosi.org/gjbb/gjbb3\(1\)08/4.pdf](http://www.idosi.org/gjbb/gjbb3(1)08/4.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2016.
- ADL, S.M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, vol. 52, n 5, p. 399- 451, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16248873>>. Acesso em: 14 jun. 2016.
- AHN, C. B.; JEON, Y. J.; KANG, D. S.; SHIN, T. S.; JUNG, B. M. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. **Food Research International**, vol. 37, p. 253–258, 2004.
- ALMEIDA, H. G.; MOTA, F. S. B.; CARIOCA, O. B.; GOMES, R. B.; BUARQUE, H. L. B.; LIMA, A. C. A. Avaliação do aproveitamento de efluentes na produção de biomassa algal e da biorremediação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. CD-ROM.
- AMBROSI M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA LM. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**; vol. 29, n 2, p. 109-17, 2008.
- AN, S.S.; FRIEDL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant Biology**, vol. 1, p. 418-428, 1999. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=> >. Acesso em: 12 jun. 2016.
- ANDERSEN, R. A. Algal Culturing Techniques. **Elsevier academic press**, p. 565, 2005. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id...assetKey...>> Acesso em: 14 jul. 2016.
- ANDRADE, L. M. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição proteica e lipídica via espectrometria de massas**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

AREMU, A. O.; MASONDO, N. A.; STIRK, W.A.; ORDOG, V.; VAN STDEN, J. Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. **Journal of Applied Phycology**, Spring International, vol. 26, ed. 1, p. 407-415, 2014. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0144-y>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

ATHUKORALA, Y.; JUNG, W. K.; VASANTHAN, T.; JEON, Y. J. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. **Carbohydr. Polym.**, vol. 66, p. 184-191, 2006.

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

BATTAH, G., M., *et al.* Antifungal Agent from *Spirulina maxima*: Extraction and Characterization. **Global Journal of Pharmacology**, vol. 8, n. 2, p. 228–236, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2014.8.2.8369>>. Acesso em: 04 jun. 2016.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. CEPPA**, Curitiba, vol. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BJERK, D. Re-examining the Impact of Dropping Out on Criminal and Labor Outcomes in Early Adulthood. **Economics of Education Review**, vol. 31, p. 110-122, 2012.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. **Progress in Industrial Microbiology**, vol. 35, p. 313-321, 1999.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p. 248–254, 1976.

BROWN, S.; GILLESPIE, A.; LUGO, A. E. Biomass estimation methods for tropical forests with applications to forest inventory data. **For Science**, vol. 35, p. 881–902, 1989.

CARRIQUIRY, M. A.; DU, X.; TIMILSINA, G. R. Second generation biofuels: economics and policies. **Energy Policy**, v. 39, n. 7, p. 4222–4234, 2011.

CHACÓN-LEE, T. L.; GANZÁLEZ-MARINÓ, G. E. Microalgae for “healthy” food-possibilities and challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 655-675, 2010.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos: considerações Gerais; *In: GOODMAN, G. As bases farmacológicas da terapêutica*. Mc-Graw Hill, Rio de Janeiro, 10 ed., p.859 – 875, 2003.

CHEN, Y. *et al.* A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, vol. 18, n. 2, p. 213-21, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, vol. 25, n.3, p. 294-306, 2007.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 686-702, 2011.

CHU, Y. *et al.* Identification of small molecular inhibitors for Ero1p by structure-based virtual screening. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, vol. 21, n. 4, p. 1118-21, 2011.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; TRUSSELL, R. R. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation**, New York, p. 92-1110, 1989.

CLSI, 2003. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. CLSI, M2-A8, vol. 23, n. 1, 2003.

COLLIER, J.L.; HERBERT, S.K.; FORK, D.C.; GROSSMAN, A.R. Changes in the cyanobacterial photosynthetic apparatus during acclimation to macronutrient deprivation. **Photosynthesis Research**, vol. 42, p. 173-183, 1994.

COMAS, A. **Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba**. Stuttgart: J. Cramer. Bibliotheca Phycologica, p. 192, 1996.

CORRÊA, D. O. **Desenvolvimento e caracterização do cultivo de microalgas em fotobiorreator alimentado por emissões gasosas de motores**. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 42, p. 362-373, 2011.

DANTAS, D. M. M. **Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

DEAN, A. P.; SIGEE, D. C.; ESTRADA, B. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4499–4507, 2010.

DECLEVA, D. V. L. Atividade dos sistemas antioxidantes da microalga *minutocellus polymorfhus* frente a exposição ao cádmio. Dissertação. Programa de pós Graduação em toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo – SP, 81 p. 2012.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

DUARTE, D. R. S. Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3. Lisboa, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10451/2424>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

FABREGAS, J.; HERRERO, C.; ABALDE, J.; CABEZAS, B. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations, **Aquaculture**, v. 50, p. 1-11, 1985.

FERRAREZE MGV, LEOPOLDO MC, ANDRADE D, SILVA MFI, HAAS VJ. Pseudomonas aeruginosa multirresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paul Enferm.**, vol. 20, n. 1, p. 7-11, 2007.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. GAVA. Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, p. 512, 2009.

GODINHO, L. R. **Família Scenedesmeaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) no Estado de São Paulo: levantamento florístico**. 2009. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Área de Concentração Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo, 2009.

GOODWIN, T. W.; MORTON, R. A. **Biochem. J.**, vol. 40, 628 p. 1946.

GALVÃO, R. M. **Modelagem da produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis***. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

GARCÍA, M. C. C. Produccion de microalgas com aplicaciones nutricionales para humanos y animales. **Cuadernos de estudios agroalimentarios – CEA05**, p. 87-105, 2013.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B. Y; BLANCO, I. Nutricional and clinical relevante of lutein in human health. **British Journal of Nutrition**, vol. 90, p. 487-502, 2003.

GRESSLER, V.; STEIN, E. D. F.; FUJII, M.T.; COLEPICOLO, P. P. E. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Cerámiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. **Rev. Bras. Farmacogn.**, vol. 21, p. 248-254, 2011.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition. *In*: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell**, p. 97–115, 2004.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. **Yellow green algae with chlorophyllid-c**. **Journal of Phycology**, New York, v. 8, p. 10-14, 1972.

HECK, M. G. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces sp.* Linhagem 2s. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Algological Studies**, vol. 96, p. 1-18, 2000.

HEGEWALD, E.; SILVA, P. Annotated catalogue of *Scenedesmus* and nomenclaturally related genera, including original descriptions and figures. **Bibliotheca Phycologica** vol. 80, p. 1-587, 1988.

HEGEWALD, E.; WOLF, M.; KELLER, A.; FRIEDL, T.; KRIENITZ, L. ITS2 sequence–structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. **Phycologia**, vol. 49, p. 325–335, 2010.

HENDRY, G.A.F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. *In*: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. 2. ed. London: Blackil Academic Professional, p.131-155, 1996.

HIRANO M, HIRANO T. ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. *EMBO J.* vol. 17, p. 7139–7148, 1998.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica nãgeli* cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 26, n. 2, p. 482-488, 2006.

JAKI, B., ZERBE, O.; HEILMANN, J.; STICHER, O. Two novel cyclic peptides with antifungal activity from the cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195). **Journal of Natural Products**, vol. 64, n. 2, p. 154-158, 2001.

QIAN ZJ.; JUNG; WK; KIM, SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresour Technol.**, vol. 99, n. 6, p. 1690-8, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512726>. Acesso em: 10 mai. 2016.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordiniung: Chlorococcales. *In*: HUBER-PESTALOZZI, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. **Das Phytoplankton des Süßwasser: systematik und biologie**. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchlandlung, Stuttgart, p. 1-1044, 1983.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**. Published online: p. 1-32, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-012-1079-z>>. Acesso em: 22 mai. 2016.

KRUSE, O. *et al.* Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production Technologies. **Photochem. Photobiol. Sci.**, vol. 4, p. 957-969, 2005.

KRYLOVA, A.Y., KOZYUKOV, E.A. e LAPIDUS, A.L. Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: A review. **Solid Fuel Chemistry**, vol. 42, ed. 6, p. 358-364. 2008.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture médium. **Bioresource Technology**, v. 101, p.6012-6018, 2010.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J. online**, vol. 15 p. 71. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960740/>>. Acesso em: 02 set. 2016.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, vol. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Physiology**, v. 13, n. 4, p. 307-315, 2001.

LEHNINGER, A.L. **Fundamentos de bioquímica.** Sarvier, São Paulo, 1980.

LOPES, E.J. **Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores.** Tese (Pós-graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

LOPES, V., SCHMIDTKE, M, HELENA FERNANDES, M, MARTINS, R, VASCONCELOS, V. Cytotoxicity in L929 fibroblasts and inhibition of herpes simplex virus type 1 Kupka by estuarine cyanobacteria extracts. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 4, p. 944 - 950, 2011.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, p. 606, 2006.

LUKAVSKÝ, J. **Motile cells in *Scenedesmus obliquus* in outdoor mass culture.** *Archiv für Protistenkunde*, vol. 140, p. 345-348, 1991.

LÜRLING, M.; de Lange, H. J.; VAN DONK, E. Changes in food quality of the green algae *Scenedesmus* induced by *Daphnia* infochemicals: Biochemical composition and morphology. **Freshwater Biology**, vol. 38, p. 619-628, 1997.

MAGRO, C. D. **Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*.** 87f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso em Bacharelado em Engenharia Ambiental), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2010.



MATA, T. M.; MARTINS, A. A. e CAETANO, N. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232, doi:10.1016/j.rser.2009.07.020, 2010.

MATA, T., ALMEIDA, R., CAETANO, N. Effect of the Culture Nutrients on the Biomass and Lipid Productivities of Microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Chemical Engineering Transactions*. vol. 32, p. 973-978, 2013.

MATOS, M. J. C. P. P. Novos métodos cromatográficos para análise e separação de produtos naturais antimicrobianos. 2015. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Lusófica de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, p. 51, 2015.

MEDINA-JARITZ, N.B., PEREZ-SOLIS, D.R., Ruiloba de Leon, F. and OLVERA-RAMIREZ, R. Antimicrobial activity of aqueous and Methanolic extracts from *Arthrospira maxima*. **Formatex**, p. 1267-1271, 2011.

MENDES, N. G. R. **Compostos bioactivos de microalgas com interesse em aquacultura como imunostimulantes, antioxidantes e antibióticos.** 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Aquacultura e Piscas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro, 2011.

MENDONCA, T. G.; URBANO, V.R.; BASTOS, REINALDO GASPAR; SOUZA, C.F. **Efeitos da aplicação de água de reúso no solo cultivado com alface (*Lactuca sativa* L.).** In: Anais do XLII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Fortaleza, 2013.

MENEZES, Rafael Silva. **Estudo do potencial de microalgas dulcícolas como matéria-prima para a cadeia de produção de biodiesel.** 173 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004.

MILANO, J.; ONG, H.C.; MASJUKI, H.H.; CHONG, W.T.; LAM, M.K.; LOH, P.K.; VELLAYAN, V. **Microalgae biofuels, as an alternative to fossil fuel for power generation.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 58, p. 180-197, 2016.

MIRANDA, J. R. P. C. Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia). Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, 2011.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ, J. A.; GÒDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 535-547, 2001.

MORRIS, H. J.; CARRILLO, O.; ALMARALES, A.; BERMUDEZ, R. C.; LEBEQUE, Y.; FONTAINE, R. *et al.* Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, p. 456–460, 2007.

MOURA JUNIOR, A. M.; BEZERRA NETO, E.; KOENING, M. L.; LEÇA, E. E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.37, n.2, p.142-148, 2006. Disponível em: < [www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/viewFile/191/185](http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/viewFile/191/185)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

MURRAY, B. A.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 773–791, 2007.

MUSSATTO, S.I. *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, vol. 28(6), p.817–830, 2010.

MUSSGNUM, J.H. *et al.* Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, vol. 150, p.51–56, 2010.

NAJI K. M.; DEVARAJ, V. R. Antioxidant and other biochemical defense responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. (Horse gram) induced by high temperature and salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology, On-line version*, Campos dos Goitacases, vol. 23, n. 3, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid= S1677-04202011000300002&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1677-04202011000300002&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acesso em: 03 ago. 2016.

NARENDAR, P.; JAYACHANDRAN, K.; GANTAR, M. Screening of Florida Native Green Microalgae as a Potential Source of Biodiesel. **Journal of Environmental and Social Sciences**, vol. 2, ed. 1, 2015. Disponível em: < [www.opensciencepublications.com](http://www.opensciencepublications.com)>. Acesso em: 03 mai. 2016.

NATRAH, F. M. I.; YUSOFF, F. M.; SHARIFF, M.; ABAS, F.; MARIANA, N. S. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. **Journal of Applied Phycology**, vol. 19, n. 6, p. 711-718, 2007.

NORZAGARAY-VALENZUELA, C. D.; VALDEZ-ORTIZ, A.; SHELTON, L.M. *et al.* Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalgae species exhibit antioxidant and anti-aging activity. **J Appl Phycol**, 2016. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s10811-016-0938-9>>. Acesso em: 04 set. 2016.

NUÑEZ, J. V.; VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; PIÑA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Biores Technol**, vol. 78, p. 161-164, 2001.

OHSE, S.; RAMOS, D. M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R.; OLIVEIRA, J. L. B. Composição centesimal e teor de nitrato em cinco cultivares de alface produzidas sob cultivo hidropônico. *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 2, p. 407-414, 2009.

OLIVEIRA *et al.*, Cyanobacteria: a review of potential nutritional and biotechnological aspects  
Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, vol. 2, p. 49. 2013.

OLIVEIRA, A. Crescimento das diatomáceas bacillariophyceae *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade. 1993. 204 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

ORDOG, V.; STIRK, W.A.; LENOBEL, R.; BANCIROVA, M.; STRAND, M.; VAN STANDEN, J. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **J. Applied Phycol.**, vol. 16, p. 309-314, 2004.

OSWLAD, W. J.; GLUEKE, C. G.; Biological Transformations of solar Energy, “Advances in Applied Microbiology, vol. 2, p. 223-262, 1960.

OZDEMIR, G.; KARABAY, N.U.; DALAY, M.C.; PAZARBASI, B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. **Phytother Res.**, vol. 18, ed. 9, p. 754-7, 2004.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal bio- technology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, vol. 20, p. 359-466, 2003.

PAREKH, J.; CHANDA, S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. **Afr. J. Biomed. Res.**, vol. 10, p. 175-181, 2007.

PIRES, J.C.M. et al.. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 16, p. 3043 – 3053, 2012.

PIZARRO, C *et al.* An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. **Ecological Engineering**, v. 26, n. 4, p. 321-327, 2006.

PÔJO, V. I. N. C. Seleção de Microalgas com Potencial de Produção de Biocombustíveis. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Escola de Engenharia. Universidade do Minho, 2016.

PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I.; ZACHLEDER, V.; BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 1359–1377, 2014.

QUEVEDO, C. O; MORALES, S. P. V.; ACOSTA, C. A. Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la produccion de proteina microalgal. **Vitae, Revista de La**

**Facultad de Química Farmacéutica**, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, vol. 15, n. 1, p. 25-31, 2008.

QIAN, ZJ .; JUNG, WK.; KIM, SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512726>. Acesso em: 22 jul. 2016.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N.; PÉREZ, A. D. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, vol. 42, n. 3, p. 549–566, 2015.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v, 24, p. 536-547, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15555874> >. Acesso em: 02 dez. 2014

REDAÇÃO USP, **Técnica de microencapsulação mantém efeito protetor do ácido ascórbico em alimentos**, Editora Tecnologia, 2014. Disponível em:< <http://www5.usp.br/40709/tecnica-de-microencapsulacao-mantem-efeito-protetor-do-acido-ascorbico-em-alimentos/>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; GUIL-GUERRERO, J. L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chem.**, vol. 108, p. 1023–1026, 2008.

ROUXEL, C.; DANIEL, A.; JERONE, M.; ETIENNE, M.; FLEURENCE, J. Species identification by SDS-PAGE of red algal used as seafood or a food ingredient. **Food Chemistry**, v. 74, p. 349-353, 2001.

RUBIO, C. SANCHO, M. E. M.; VILLASCLARAS, S. S. Influence of pH on the kinetic and yield parameters of *Scenedesmus obliquus* Heterotrophic Growth. **Process Biochemistry**, 1989.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. *Biologia Vegetal*. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgais culture: biotechnology and applied phycology*. 1. ed. Oxford: Blackwell Science, p. 584, 2004.

SAFAFAR, H.; MOLLER, P.HELD, S.L.; JACOBSEN, C. Microalgal bioremediation of nutrients in wastewater and production of food/feed ingredients. **Book of Abstracts. DTU's Sustain Conference 2015**, Lyngby: Technical University of Denmark, F-4, 2015. Disponível em: <[orbit.dtu.dk/files/119696830/F4\\_DTU\\_Sustain\\_2015.pdf](http://orbit.dtu.dk/files/119696830/F4_DTU_Sustain_2015.pdf)>

SAIFULLAH, A. Z. A.; KARIM, M.D. A.; AHMAD-YAZID, A. Microalgae: An Alternative Source of Renewable Ener. **American Journal of Engineering Research (AJER)**, vol. 03, n. 3, p. 330-338, 2014.

- SAMARAKOON, K.; JEON, Y.-J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae- A review. **Food Research International**, v. 48, p. 948–960, 2012.
- SANTOS, M. D. B.; BURINI, R. C. Bases metabólicas da suplementação de cisteína Rev. Bras. Nutr. Clín vol. 20, n. 4, p. 259-264, 2005.
- SANTOS, V.; GONÇALVES, I. C. R.; CARVALHO, E. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V. Effect of paclobutrazol on the microbial biomass in a Brazilian soil. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, **Anais...** p. 31, 2007, CD-ROM.
- SANTOYO, S. *et al.* Screening of functional compounds in supercritical fluids extracts from *Spirulina plantensis*. **Food Chemistry**, ed. 102, p. 1357-1367, 2007.
- SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUM, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, v. 1, p. 20–43, 2008.
- SCHNEIDER, U. *et al.* GPCC's new land surface precipitation climatology based on quality-controlled in situ data and its role in quantifying the global water cycle. **Theoretical and Applied Climatology**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00704-013-0860-x>>.
- SCHMIDT, C. J. B. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. *In*: VEGA, B. O. A. VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 1. ed., p. 1-16, 2007.
- SELVAKUMAR, P.; UMADEVI, K. Biomass production of multipopulation microalgae in open air pond for biofuel potential. **Niscair online periodicals repository (NOPR)**, IJEB, Índia, vol. 54, 2016. Disponível em: <<http://14.139.47.15/handle/123456789/34068>>. Acesso em: 20 mai. 2016.
- SHANAB, S. M. M. Bioactive allele-chemical compounds from *Oscillatoria* species (Egyptian Isolates). **International Journal of Agriculture and Biology**, p. 617-621. 2007.
- SHANAB, S.M.M., MOSTAFA, S.S.M.; SHALABY, E.A.; MAHMOUD, G.I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 608-615, 2012.
- SHEIH, I.; WU, T.; FANG, T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Elsevier, **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 3419–3425, 2009a. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)>. Acesso em: 13 jul. 2016.
- SHEIH, I.; WU, T.; FANG, T. J. **Characterization of bioactive peptides from the green algae *Chlorella 2 pyrenoidosa* protein hydrolysate**. Department of Food Science and Biotechnology,

National Chung Hsing University, 2007. Disponível em:

[http://research.nchu.edu.tw/ADPuploud/oc\\_dowmul2271354684](http://research.nchu.edu.tw/ADPuploud/oc_dowmul2271354684). Acesso em: 15 jul. 2016.

SHEIH, I.; FANG, T. J.; WU, T. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme ( ACE ) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, vol. 115, n. 1, p. 279–284, 2009.

SHEIH, I.; FANG, T. J.; WU, T.; LIN, P. H. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein in waste. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 1202–1207, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19916544>>. Acesso em: 18 abr. 2015.

SHU, CH; LUNG, MY. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. **J. Chin. Inst. Chem. Eng.**, vol. 39, p. 1-8, 2008.

SIGEE, D.C. *et al.* The influence of phosphorus availability on carbon allocation and P quota in *Scenedesmus subspicatus*: a synchrotron-based FTIR analysis. *Phycology*, v. 46, p. 583–592, 2007.

SILVA, I. B. **Diversidade de Algas Marinhas**. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Programa de Capacitação de Monitores e Educadores. São Paulo, 2010. Disponível em: <[http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Diversidade\\_Algas\\_Marinhas\\_Ingrid\\_Balesteros.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Diversidade_Algas_Marinhas_Ingrid_Balesteros.pdf)> Acesso em: 22 jul. 2016.

SOARES, F. J. A. S. **Avaliação da Actividade Biológica de Extractos de Diferentes Espécies de Microalgas**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Lisboa, 2011. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/3258>. Acesso em: 05 jun. 2016.

SOARES, C. M.; VALADARES, G. F; AZEREDO, R. M. C.; KUAYE, A. Y. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.38, n. 2, p.504-510, 2008.

SOEDER C. J., HEGEWALD E. *Scenedesmus*. In: BOROWITZKA M. A., BOROWITZKA L. J. **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge University Press: Cambridge, p. 59-84, 1988.

SOLAZYME. Disponível em: < <http://solazyme.com>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W.; MOORE, S. **Analyt. Chem.**, vol. 30, 1185 p., 1958.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p.87-96, 2006.

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da produção de aflatoxina por extratos fenólicos de *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis***. 2012. 162. Tese (Doutorado em

Engenharia e Ciência de Alimentos), Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2012.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S.; SIMPSON, C. G. Removal of Copper and Immobilized Microalga, *Chlorella Vulgaris*. In: WONG, Y. S.; TAM, N. F.Y. **Wastewater Treatment with Algae**. Springer-Verlag, vol. 2, p. 17-36, 1998.

TANAKA, K. *et al.* Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta Medica**, vol. 63, n. 5, p. 465-466, 1997.

TAYLOR, A.J. Natural colours in food. In: WALFORD, J. **Developments in food colours**. Manchester: Elsevier Applied Science, v. 2, p.159-206, 1984.

TINDALE, A. Biology: A concise Revision Course for CXC. London: Great Britain. 1988

TOYUB, M. A.; MIAH, M. I.; HABIB, M. A. B.; RAHMAN, M. M. GROWTH Performance and nutritional value of *Scenedesmus Obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media, vol. 37, n. 1, p. 86–93, 2008.

TORIDE, Y. Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding. FAO CORPORATE DOCUMENT REPOSITORY, Japão, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5019e/y5019e0a.htm>. Acesso em: 10 set. 2016.

TRAINOR, F.R. Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity. Nova Hedwigia, Beiheft, vol. 117, p. 367, 1998.

TRAINOR, F.R. The sequence of ecomorph formation in a phenotypically plastic, multispined *Scenedesmus* species (Chlorophyceae). Arch. Hydrobiol, vol. 133, p. 161-171, 1995.

TREVISAN, E.; NETO, M. L.; MORO, P.; HOSHINO, S. O.; ARROYO, P. A. Avaliação do pH em cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*. Encontro Internacional de Produção Científica, VIII EPCC, **Anais Eletrônico**, Editora CESUMAR Maringá, Paraná, 2013.

UGWU, C.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, 2008.

UKELES, R. Continuous culture- a method for the production of unicellular algal foods. In: STEIN, J. R. **Handbook of Physiological Methods, Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge University Press Publication, Cambridge, p. 233-256, 1973.

VAN DONK, E.; HESSEN, D. O. Grazing resistance in nutrient stressed phytoplankton. **Oecologia**, vol. 93, p. 508-511, 1993.

VENKATARAMAN, V.; PRAKASH, V.; NIRMALA, C. Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). **Die Nahrung**, v. 36, p. 569-577, 1992.

YAMAGISHI, Y. *et al.* Therapy for gastric ulcer with Chlorella. **Japanese Medical Journal**, v.32, p.25-27, 1997.

WANG, H.M.; PAN, J. L.; CHEN, C. Y.; CHIU, C. C.; YANG, M. H.; CHANG, H. W.; CHANG, J. S. Identification of anti-lung cancer extract from Chlorella vulgaris C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochem**, vol. 45, p. 1865- 1872, 2010.

WENDY GUIRY IN GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2016. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>; Acesso em: 12 mai. 2016.

WILTSHIRE, K. H.; BOERSMA, M.; MÖLLER , A. *et al.* Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Aquatic Ecology**, v. 34, p. 119–126, 2000.

ZAIA, D.A.M., ZAIA, C.T.B.V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, vol. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.