



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

JÉSSICA FERNANDES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE LISE
CELULAR NA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA MICROALGA
*Chlorococcum elbense***

FORTALEZA

2019

JÉSSICA FERNANDES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE LISE CELULAR
NA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA MICROALGA *Chlorococcum*
elbense

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

FORTALEZA

2019

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)

- S238a Souza, Jessica Fernandes de.
Avaliação da eficiência de diferentes métodos de lise celular na extração de proteínas solúveis da microalga *Chlorococcum elbense*. / Jessica Fernandes de Souza. – 2019.
57 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. Microalgas. 2. *Chlorococcum elbense*. 3. Métodos de lise. I. Título.

CDD 661

JÉSSICA FERNANDES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE LISE CELULAR
NA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA MICROALGA *Chlorococcum*
elbense

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

Aprovada em: 14/11/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ricardo Oliveira Tavares
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UEVA)

MSc. Talita Abrante Leite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha tia Maria Ilanice.

À minha bisavó Edite.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

À minha tia Maria Ilanice, por todo suporte para que eu estivesse aqui.

À minha família.

Agradeço ao meu orientador, Dr. André Coelho, por ter me recebido em sua equipe. Por todo conhecimento e ajuda, por toda paciência e a sua não desistência a minha formação.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Tavares, por toda ajuda durante esse período que estive no laboratório.

A participante da banca examinadora, Ms. Talita Abrante, por toda disponibilidade, ajuda em feriados, conversas descontraídas durante as refeições, pela alegria de trabalhar, pela amizade e por toda paciência. Gratidão.

Ao Wallady, Samara e Germana pela ajuda em todos os ensaios experimentais, pela contribuição para a realização deste trabalho, pelo companheirismo, pela amizade, pelas risadas e lanches compartilhados.

A minha colega de turma e grupo de pesquisa Bruna, por todos os momentos compartilhados durante a graduação, por todos os cafés na padaria Romana durante o processo de escrita do trabalho, por me receber em sua casa.

Aos meus colegas integrantes do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), Vanessa, Fábio, Samuel, Leonardo, Samyلة, Lais, Igor, Elaine e Tiago, por todo conhecimento e momentos felizes compartilhados.

À coordenação do curso Bacharelado em Biotecnologia, pela disponibilidade.

Ao Gilmar Ferreira, secretário do curso, sempre gentil e solícito.

Ao corpo docente da Biotecnologia UFC, em especial aos professores, Dr. Bruno Matias e Dra. Daniele Sousa.

Aos meus amigos de curso, que são muitos. Entre eles: Lucas, Amanda, Joaquim, Maria Eduarda, Caio, Marcus Rafael, Agnes, Larisse, Dayara, Pedro, Luca, Caroline X., Sara P., Vanessa, Raissa L, Walber, Lucas C, Ayrton Markos, Cristiano, Jamile, Matheus F, Thais F.

Ao meu melhor amigo Israel Nascimento, pela amizade incondicional.

Ao Programa de Incentivo ao Desporto Universitário, pelo auxílio financeiro e vivências esportivas nas modalidades de futsal e basquete.

Ao Programa Mangue Vivo, por toda educação ambiental e aulas de campo.

Ao movimento Ocupa Biotec, pelo momento de resistência e compartilhamento de vivências.

Ao centro acadêmico da Biotecnologia, pela gestão Splice como secretária de eventos.

À UFC, por do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que disponibilizou o espaço físico para realização do referido trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.
Gratidão!

“If you had a idea that was going to outrage
Society, would you keep it yourself?”

(Charles Darwin)

RESUMO

A biodiversidade de microalgas ainda é um recurso pouco explorado. Sua biomassa é uma rica fonte de compostos bioativos naturais, principalmente proteínas, lipídeos e corantes, que podem ser aplicados na alimentação humana e animal; nas indústrias cosmética, farmacológica e química fina; no tratamento de águas residuais e na biorremediação de compostos nocivos. As microalgas do gênero *Chlorococcum sp.* são consideradas fontes promissoras de macromoléculas e têm ganhado atenção devido sua utilização na produção de biodiesel. Contudo, seu potencial como fonte de proteínas ainda é pouco explorado científica e economicamente, principalmente devido aos desafios no rompimento das rígidas paredes celulares. O objetivo do trabalho foi avaliar os diferentes métodos de lise celular da microalga *Chlorococcum elbense* cultivada em fotobiorreator para extração de proteínas hidrossolúveis. A microalga foi cultivada em meio NPK em um sistema de cultivo autotrófico em um biorreator de placa plana e a biomassa resultante foi caracterizada e utilizada na preparação de extratos aquosos. Os extratos foram produzidos utilizando diversos métodos de lise física (homogeneização com esferas de vidro, ultrassonicação, maceração, congelamento e descongelamento) de forma individual ou de forma combinada. A fim de avaliar a capacidade de ruptura da parede celular da *C. elbenses* pelos métodos de lise física, os extratos foram avaliados quanto a concentração de proteínas solúveis pelo método de Bradford e qualitativamente por SDS-PAGE. O cultivo da microalga *C. elbenses* teve um rendimento médio de biomassa seca de $8,08 \pm 0,03$ g. L⁻¹ após o 10º dia de cultivo e apresentou uma composição rica em proteínas (35,23 %) e lipídeos (28,48 %). O método de lise que combinou métodos de congelamento/descongelamento, maceração e ultrassonicação foi o mais eficiente no rompimento da parede celular, além de propiciar uma melhor recuperação do conteúdo de proteínas (0,943 mg/ml). Este estudo pode fornecer algumas orientações sobre a implementação de uma metodologia simples, escalável e econômica de ruptura celular de microalgas a fim de acessar seu valioso conteúdo de compostos nutricionais, principalmente proteínas.

Palavras-chave: Microalgas. *Chlorococcum elbense*. Métodos de lise.

ABSTRACT

The biodiversity of microalgae is still an unexplored resource. Its biomass is a rich source of bioactive natural compounds, specially proteins, lipids and dyes, which can be applied in human and animal nutrition; cosmetic industry, pharmacology and fine chemistry; on the treatment of water waste and on the biorremediation of nocive compounds. *Chlorococcum sp.* microalgae are considered promising sources of macromolecules and have gained attention because of their usage in biodiesel production. However, their potential as a protein source is still poorly explored scientifically and economically, specially due to the challenges of rupture of hard cell walls. The objective of the research was to evaluate different methods of cell lysis of microalgae *Chlorococcum elbense*, cultivated in flat-plate photobioreactor for water soluble protein extraction. The resulting biomass was characterized and used in the preparation of an aqueous extract. The extracts were produced using several methods of physic lysis (homogenization with glass spheres, ultrasonication, maceration, freeze and defrost) individually or combined. In order to evaluate the capacity of rupture of the cell wall of *C. elbenses* by methods of physic lysis, the extracts were assessed for their concentration of soluble proteins using the Bradford method and qualitatively using the SDS-PAGE. The culture of microalgae *C. elbenses* had an average yield of dry biomass of $8.08 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$ after day 10 of cultivation and showed a composition rich in proteins (35.23%) and lipids (28.48 %). The lysis method combining methods of freeze/defrost, maceration and ultrasonication was the most efficient on the cell wall rupture, besides providing better recovery of the protein contente (0.943 mg/ml). This study can provide some orientations to the application of a simple, scalable and affordable methodology of cell wall rupture of microalgae, in order to access their valuable content of nutritional compounds, specially proteins.

Keywords: Microalgae. *Chlorococcum elbense*. Lysis methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura química da clorofila a e b.....	20
Figura 2	- Estrutura química do carotenoide (β -caroteno).....	20
Figura 3	- Estrutura química da ficobilina (ficocianobilina).....	20
Figura 4	- Aplicações da biomassa microalgal.....	21
Figura 5	- Sistemas de cultivo de microalgas em micro e larga escala.....	25
Figura 6	- Tipos de envoltório celular de microalgas.....	27
Figura 7	- Estrutura da parede celular de microalgas frequentemente utilizadas em Biotecnologia.....	28
Figura 8	- <i>Chlorococcum humicola</i> célula solitária (A) e células coloniais (B).....	32
Figura 9	- Células de <i>Chlorococcum sp. intactas</i>	34
Figura 10	- Pré-inóculo de microalga <i>C. elbense</i> cultivado em fotobiorreator cilíndrico (A) e cultivo da microalga em fotobiorreator retangular de placa plana (B)..	36
Figura 11	- Adição do pré-inóculo microalgal no fotobiorreator de placa plana para a produção de biomassa.....	46
Figura 12	- Biomassa microalgal de <i>C. elbense</i> liofilizada.....	48
Figura 13	- Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 15%) dos extratos bruto: obtidos a partir da biomassa microalgal de <i>C. elbense</i>	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento da microalga <i>C. elbense</i> . cultivada em fotobiorreator retangular de placa plana.....	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Interferência da temperatura na produção de carotenoides em <i>Chlorococcum</i> sp.....	33
Tabela 2 – Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras da biomassa microalgal de <i>C. albense</i> com base na massa seca.....	49
Tabela 3 – Determinação da concentração e da quantidade de proteínas solúveis totais presentes nos extratos brutos obtidos a partir da biomassa microalgal de <i>C. albense</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Mm	Micrômetro
M	Metro
Nm	Nanômetro
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
Pi	Fosfato inorgânico
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
Fe	Ferro
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
K	Potássio
Mn	Manganês
I	Iodo
Na	Sódio
N	Nitrogênio
Se	Selênio
Co	Cobalto
Mo	Molibdênio
S	Enxofre
Cu	Cobre
UV	Ultravioleta
US\$	Dólares
%	Por cento
HPV	Vírus do papiloma humano
RP	<i>Raceway ponds</i>
CO ₂	Gás carbônico
Cm	Centímetro
G	Grama
pH	Potencial hidrogeniônico
kHz	Quilohertz
GHz	Gigahertz
MHz	Megahertz

H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NaOH	Hidróxido de sódio
L	Litro
WC	Water Culture
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
M	Massa
NPK	Nitrogênio-Fósforo-Potássio
mm ²	Milímetros quadrados
<i>G</i>	Força gravitacional
CuSO ₄	Sulfato de cobre
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
Cu ₂ O	Óxido de cobre
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
N	Normal
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EB ₁	Extrato bruto 1
EB ₂	Extrato bruto 2
EB ₃	Extrato bruto 3
EB ₄	Extrato bruto 4
S	Segundos
Rpm	Rotações por minuto
EB ₅	Extrato bruto 5
EB ₆	Extrato bruto 6
EB ₇	Extrato bruto 7
BSA	Albumina sérica bovina
mM	Milimol
μL	Microlitro
V	Volume
kDa	Quilodalton
MM	Massa molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Microalgas: aspectos gerais	18
1.1.1	<i>Reprodução das microalgas</i>	21
1.2	Aplicações das microalgas	21
1.2.1	<i>Biocombustível de microalgas</i>	22
1.2.2	<i>Microalgas como fontes suplementares de macro e micronutrientes</i>	23
1.2.3	<i>Microalgas como fonte de moléculas de alto valor agregado</i>	23
1.3	Cultivo de microalgas	24
1.4	Método da lise celular	26
1.4.1	<i>Métodos mecânicos de ruptura celular</i>	28
1.4.1.1	<i>Homogeneizados de alta pressão</i>	28
1.4.1.2	<i>Moinho de bolas</i>	29
1.4.1.3	<i>Ultrassom</i>	29
1.4.1.4	<i>Microondas</i>	30
1.4.2	<i>Métodos não mecânicos de ruptura celular</i>	30
1.4.2.1	<i>Químicos</i>	30
1.4.2.2	<i>Enzimáticos</i>	31
1.5	Microalgas do gênero <i>Chlorococcum</i>	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específico	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	Cultivo indoor da microalga <i>Chlorococcum elbense</i>	36
3.2	Curva de crescimento da microalga <i>C. elbense</i>	37
3.3	Obtenção da biomassa microalgal para preparação dos extratos proteicos	38
3.4	Análise elementar da biomassa microalgal	38
3.4.1	<i>Umidade</i>	38
3.4.2	<i>Cinzas</i>	39
3.4.3	<i>Proteínas totais</i>	39
3.4.4	<i>Lipídeos totais</i>	40
3.4.5	<i>Carboidratos totais</i>	41

3.4.6	<i>Fibra bruta</i>	41
3.5	Extração de proteínas das microalgas utilizando diferentes métodos de lise celular	42
3.5.1	<i>Lise em homogeneizador com esferas de vidro</i>	42
3.5.2	<i>Lise por maceração</i>	42
3.5.3	<i>Lise por ultrassonicação</i>	42
3.5.4	<i>Lise em homogeneizador com esferas de vidro e ultrassonicação</i>	43
3.5.5	<i>Lise por congelamento e descongelamento</i>	43
3.5.6	<i>Lise por congelamento/descongelamento e maceração</i>	43
3.5.7	<i>Lise por congelamento/descongelamento, maceração e ultrassonicação</i>	44
3.6	Dosagem de proteínas solúveis dos extratos	44
3.7	Análise eletroforética das frações proteicas de microalgas	44
3.8	Análises estatísticas	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Cultivo de <i>C. elbense</i> em fotobiorreator de placa plana	46
4.2	Curva de crescimento	47
4.3	Rendimento de biomassa seca	48
4.4	Caracterização da biomassa microalgal	49
4.5	Dosagem de proteínas solúveis dos extratos microalgais produzidos	49
4.6	Análise eletroforética SDS-PAGE dos extratos de <i>C. elbense</i>	51
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO 1 - Composição do meio de cultura WC	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microalgas: aspectos gerais

Na Ficologia, a terminologia “alga” se refere a todo organismo que apresenta uma estrutura vegetativa chamada de talo, cuja diferenciação celular é praticamente nula, englobando indivíduos microscópicos e macroscópicos (LEE, 2008; LOURENÇO, 2006; ANDRADE *et al.*, 2014) que podem ser definidos como organismos fotossintéticos, unicelulares ou pluricelulares, que possuem funções biológicas e ecológicas correspondente às plantas, porém se diferenciam dessas em sua bioquímica por ser um grupo polifilético (KAISER *et al.*, 2011; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011). Outro critério de organização de estudos faz uma divisão didática em microalgas e macroalgas, fundamentado na variedade de tamanho desses organismos com dimensões microscópicas de 0,2 a 2 μm de diâmetro (fitoplanctons) (LOURENÇO, 2006) até dimensões macroscópicas de 80 m, os gigantes *kelps* (KAISER *et al.*, 2011).

O termo *alga* não possui valor taxonômico, uma vez que designa organismos muitos distintos entre si, quanto a: origem, organização, composição química, estratégias reprodutivas e morfologia (ANDERSEN, 1992; LOURENÇO, 2006). Apesar das dificuldades em sua classificação, a aplicação de ferramentas da biologia molecular tem favorecido o agrupamento das espécies. Filogeneticamente, as microalgas podem ser classificadas em procarióticas (cianobactérias) ou eucarióticas, que estão divididas em três grandes grupos: *Chromalveolata*, *Archaeplastida* e *Excavata* (ADL *et al.*, 2005; RAVEN *et al.*, 2005; SILVA, 2010).

As microalgas são organismos ubíquos, habitualmente presentes em sistemas aquáticos de água salgada ou dulcícolas, sendo que as diversas espécies, individualmente, ocupam diferentes ecotipos. Algumas microalgas podem estar fincadas a um substrato, como as plantas, outras apresentam mobilidade como os animais, algumas estão apenas suspensas em água, outras crescem livremente no solo, e algumas estão simbioticamente associadas a outros organismos, como corais, ou mesmo, com os fungos formando os líquens (ANDERSEN, 1992; ENZING *et al.*, 2014).

Apesar destes organismos apresentarem uma estrutura celular simples, demonstram grande importância ecológica nos diferentes ecossistemas, uma vez que atuam como produtores primários na cadeia alimentar, produzindo matéria orgânica a partir da luz solar, dióxido de carbono e água, sendo responsáveis pela maior parte do oxigênio molecular

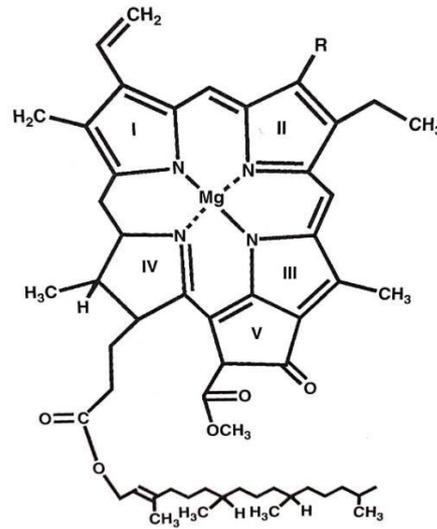
disponível no planeta (LEE, 2008; LOURENÇO, 2006; GRESSLER *et al.*, 2011;). As microalgas podem ser caracterizadas, ainda, de acordo com a sua pigmentação, ciclo de vida e componentes da parede celular (RICHMOND, 2013; TOMASELLI, 2004).

A biodiversidade de microalgas pode ser mensurada através das vias bioquímicas, funções ecológicas e estratégias de reprodução (RICHMOND, 2013). Ratha e Prasanna (2012) estimaram a existência de 200.000 a 800.000 espécies de microalgas. De acordo com Raven *et al.*, (2005), as principais linhagens de microalgas em termos de abundância são: Diatomáceas (*Bacillariophyta*), estima-se aproximadamente 100.000 espécies, apresentando distribuição cosmopolita no fitoplâncton dos oceanos, também pode ser encontrado em ambientes dulcícolas; Algas verdes (*Chlorophyceae*) representadas por cerca de 17.000 espécies, encontradas em sua grande maioria, em ecossistemas aquáticos marinhos e dulcícolas; Algas azuis (*Cyanophyta*) compreendem cerca de 2.000 espécies, podendo ser encontrados em diferentes habitats e Algas douradas (*Chrysophyceae*) que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente doce.

As espécies de microalgas fotossintetizantes possuem uma grande variedade de pigmentos para captar a energia luminosa (LOURENÇO, 2006). Esses podem ser divididos em três classes principais: clorofilas (Figura 1), carotenoides (Figura 2) e ficobilinas (Figura 3) (RICHMOND, 2013). O principal pigmento fotossintético algal é a clorofila *a* apresentando papel central no arranjo dos fotossistemas. Estruturalmente, os outros tipos de moléculas de clorofila designadas *b*, *c*, e *d* diferem em seus substituintes do grupo lateral no anel tetrapirrol, essas atuam como pigmentos acessórios da fotossíntese, com a função de aumentar a luminosidade absorvida (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2013). Segundo Richmond (2013), todas as clorofilas têm duas bandas de absorção principais: azul ou verde-azul (450-475 nm) e vermelho (630-675 nm), o que resulta em sua cor verde característica. Os carotenoides representam um grande grupo de cromóforos biológicos com uma variação na faixa de absorção entre 400 e 550 nm, que possuem colorações entre o amarelo e o vermelho no espectro de luz visível apresentando duas funções principais: aumento da captação de luz do fotossistema e proteção do complexo fotossintético quando há luz em excesso, evitando assim a fotoinibição. (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2013).

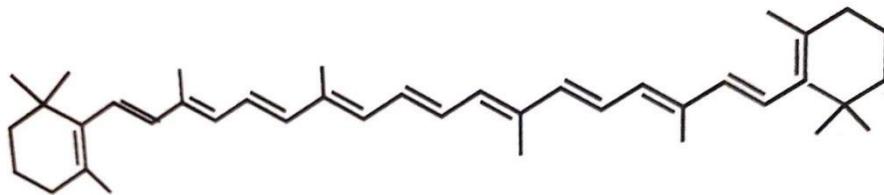
Figura 1 - Estrutura química da clorofila a e b.

R = $-\text{CH}_2$ in **Chl a** or $-\text{CHO}$ in **Chl b**



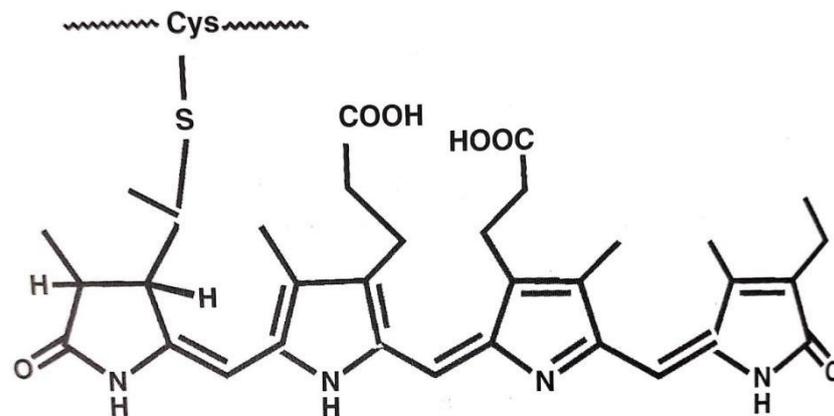
Fonte: Richmond *et al.* (2013)

Figura 2- Estrutura química do carotenoide (β -caroteno)



Fonte: Richmond *et al.* (2013)

Figura 3 - Estrutura química da ficobilina (ficocianobilina)



Fonte: Richmond *et al.* (2013)

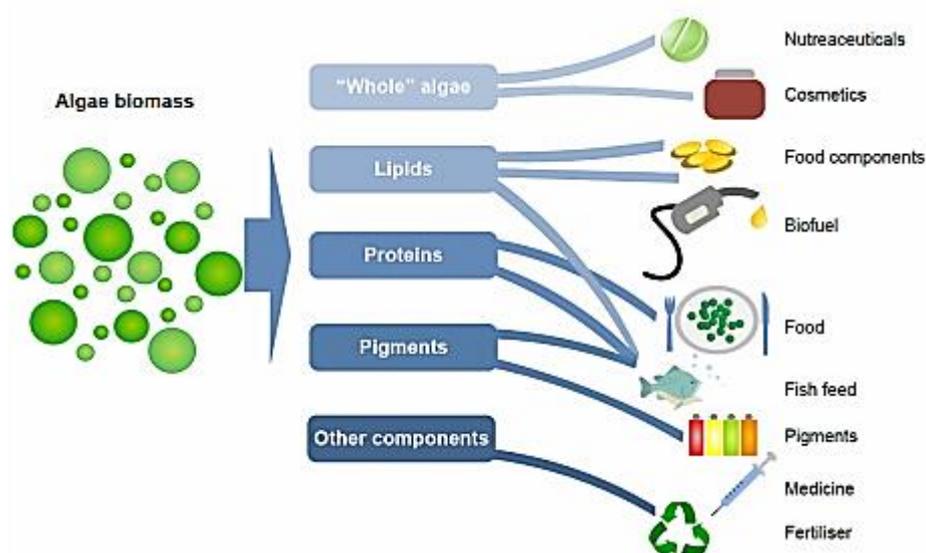
1.1.1 Reprodução das microalgas

A reprodução das microalgas pode ocorrer de forma assexuada e sexuada, apresentando diversificações no desenvolvimento do processo. Na assexuada, ocorre a produção de esporos a partir de células vegetativas, ou, esporângios que podem apresentar mobilidade (zoósporos) ou serem imóveis (aplanósporos) devido a presença de flagelos. Estes esporos são capazes de gerar um novo indivíduo completo. Já na reprodução sexuada existe a presença de fases esporófitas e gametófitas marcantes, além da alternância de gerações (LOURENÇO, 2006).

1.2 Aplicações das microalgas

A grande biodiversidade de microalgas é um recurso quase que inexplorado (COELHO, 2019) e a sua ampla composição bioquímica remete a uma fonte potencial de compostos bioativos para aplicações na alimentação humana e animal; nas indústrias cosmética, farmacológica e química fina; no tratamento de águas residuais; na biorremediação de compostos nocivos, dentre outros (DERNER *et al.*, 2006; LOURENÇO, 2006). Tais aplicações da biomassa microalgal estão ilustradas na Figura 4.

Figura 4 - Aplicações da biomassa microalgal



Fonte: Slegers (2014)

As microalgas usam a luz solar para crescer como matéria-prima completamente explorável, consistindo de biomassa bruta, necessitando para sua sobrevivência básica dos metabólitos primários, como: os carboidratos; a maioria dos aminoácidos e proteína; lipídios; ácidos nucleicos; vitaminas e cofatores; clorofilas e carotenoides. Já os metabólitos secundários, apresentam alto valor agregado como os terpenos, a luteína, a astaxantina e a maioria dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (BARSANTI; GUALTIERI, 2018).

1.2.1 Biocombustível de microalgas

Os combustíveis de origem fósseis possibilitaram o desenvolvimento tecnológico e fabril de diversos países durante o século XX inclusive o Brasil (OTOYA, 2018). Apesar de seus benefícios, esse recurso é limitado, vem sendo explorado há muitas décadas, levando a especulação do seu fim e das consequências de seu esgotamento. O uso dessa fonte não renovável ocasionou também um grande aumento na concentração de gases estufa na atmosfera (PITTAMN *et al.*, 2011).

Devido às problemáticas ocasionadas pelo uso dos combustíveis fósseis (poluição e abastecimento futuro), hoje se busca fontes renováveis de combustíveis de baixo ou nenhum impacto ambiental. Esses tipos de combustíveis ficaram conhecidos como biocombustíveis, uma vez que sua matéria prima é originalmente uma fonte biológica. Os chamados biocombustíveis são classificados em 3 diferentes gerações, sendo caracterizados de acordo com sua matéria prima (MARTÍN; GROSSMANN, 2012).

Os Biocombustíveis da 1ª geração são derivados de matéria prima bruta como fontes de açúcares e lipídeos. As principais matérias primas são a cana de açúcar, beterraba açucareira, milho e trigo para produção de bioetanol. Já na produção de biodiesel as principais fontes são a soja, mamona e demais óleos de origem vegetal. A 2ª geração utiliza como matéria prima, resíduos lignocelulósicos das indústrias: florestal, de alimentos e de biocombustível para produção de bioetanol. Já na produção de biodiesel é utilizado óleo vegetal residual da indústria de alimentos. Na 3ª geração, as matérias primas pra ambos os tipos de combustíveis são derivados de microalgas.

A escassez de recursos, a alta demanda de energia pela população mundial e os altos níveis de poluição ocasionados pela queima de combustíveis fósseis, tem levado a investimentos em pesquisas de fontes alternativas para produção de energia limpa, sendo as microalgas uma fonte promissora (MARTÍN; GROSSMANN, 2012).

1.2.2 Microalgas como fontes suplementares de macro e micronutrientes

As elevadas concentrações de macro e micronutrientes presentes na biomassa microalgal de diferentes espécies, despertou o interesse de diferentes grupos de pesquisa. Gonzalez e Sommerfeld (2016) demonstrou que a biomassa seca e o extrato aquoso de *Acutodesmus dimorphus* foram capazes de diminuir o tempo de germinação, aumento no número de ramos, flores e folhas em tomateiro. Outra forma de utilização de microalgas como insumo agrícola se dá na sua utilização como organismo biorremediador de área, que apresentam como poluentes íons de interesse agrícola. Microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella viridis* e *Chrorella* sp. já foram utilizadas como espécies captadoras de fosforo inorgânico (Pi) em cultivos controlados mostrando o potencial dessas espécies para uso em ambientes poluídos e, posteriormente suas biomassas foram utilizadas como biofertilizantes agrícolas ricos em Pi (SOLOYCHENKO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2006; CEMBELLA *et al.*, 1982).

Microalgas como *Chlorella vulgaris*, *Spirulina* sp. e *Schizochytrium* sp. têm sido extensamente exploradas como suplementos alimentares de elevado valor agregado. Essas espécies são fontes naturais de aminoácidos essenciais, ácidos graxos polinsaturados (DHA, Omega 3 e 6), vitaminas (A, B1, B2, B3, B6, B9, C, D, E e H) e sais minerais (Fe, Ca, Mg, K, Mn, I, F, Na, N, Se, Co, Mo, S e Cu) (PANAHI *et al.*, 2016).

1.2.3 Microalgas como fonte de moléculas de alto valor agregado

O mercado de carotenoides é bastante amplo sendo muito utilizado pelas indústrias de ração animal e suplementação alimentar humana. As microalgas como *Haematococcus pluvialis* e *Dunaliella salina* são utilizadas para obtenção de carotenoides naturais. Essas biomoléculas possuem alto valor agregado no mercado, pois são vendidas como nutracêuticos poderosos. Os carotenoides, como a astaxantina e o β -caroteno, são utilizados como antioxidantes, protetores UV e no combate de radicais livres. Outros estudos mostram a capacidade dessas moléculas na prevenção e auxílio no tratamento de neoplasias, doenças cardiovasculares e doenças infecciosas (CARAMUJO; CARVALHO, 2017; RICCIONI *et al.*, 2011).

O mercado hoje é dominado por grandes multinacionais, como a BASF e a Hoffmann-La Roche, que produzem tais compostos por síntese química (VALDUGA *et al.*, 2009). Na última década o mercado tem buscado cada vez fontes naturais desses pigmentos

na procura de moléculas mais eficientes, no seu efeito biológico e de maior valor agregado. Somente no Brasil entre 2010 e 2015 foram movimentados aproximadamente US\$ 28.000.000,00 em exportação e importação desses compostos (MESQUITA *et al.*, 2017).

Microalgas podem ainda ser exploradas como biofábricas de moléculas recombinantes ou como veículos para vacinas orais recombinantes humanas e animais. A espécie modelo para esses trabalhos é a microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Somchai *et al.* (2016) utilizaram *C. reinhardtii* expressando um dsRNA como estratégia de combate com vírus Yellow Head Virus do camarão, aumentando a taxa de sobrevivência de camarões em 22%. Não somente para fins de vacinação animal a microalga *C. reinhardtii* apresentou resultados satisfatórios; Demurtas *et al.* (2013) produziram antígenos contra o HPV (Vírus do Papiloma Humano) em cloroplastos de *C. reinhardtii*. O antígeno purificado dos extratos da microalga foi utilizado para imunização de camundongos apresentando-se imunogênico.

1.3 Cultivo de microalgas

Existem hoje dois principais métodos de cultivo, os de sistema aberto, onde o meio fica exposto ao ar atmosférico e intemperes climáticas, e os cultivos fechados, onde não há contato direto entre o cultivo e o meio externo (AISHVARYA *et al.*, 2015).

Cultivos abertos (Figura 5 A) são os mais utilizados para obtenção de biomassa microalgal, pois são mais baratos, necessitam de baixa manutenção e são bastante duráveis. Além disso, por normalmente possuírem maior área estes possibilitam uma maior capacidade produtiva do que os sistemas fechados.

O tanque de cultivo é construído na forma de uma pista de corrida ou *raceway ponds* (RP). O cultivo é movimentado por uma roda de pás com o objetivo de homogeneizar o meio e promover recirculação dentro do tanque. É comum ainda nesse tipo de cultivo, que haja injeção de suplemento de CO₂ para aumentar a atividade fotossintética. Os tanques têm em média de 30 a 50 cm de profundidade permitindo a entrada de luz solar com maior facilidade. A entrada e saída de meio são feitas após e antes a roda de pás, respectivamente; maximizando a densidade de células na saída do sistema. Densidade de até 1g de biomassa por litro de cultivo pode ser alcançada. Entretanto, o tempo de cultivo pode variar de espécie para espécie (CRAGGS *et al.*, 2015).

As principais desvantagens do cultivo aberto é a grande possibilidade de contaminação com espécies indesejadas. Essas contaminações descaracterizam o cultivo e

podem inviabilizar todo ele. Outra dificuldade são as mudanças climáticas que podem alterar diversos parâmetros desse sistema, como: mudanças na temperatura, concentração de células, pH e salinidade do meio. Devido a essas desvantagens poucas espécies são possíveis de utilizar no sistema RP (AISHVARYA *et al.*, 2015).

Já nos cultivos fechados é possível um controle fino dos parâmetros envolvendo o processo. O cultivo ocorre em recipientes fechados chamados de Biorreatores. Esses biorreatores devem prover todas as condições necessárias, como: entrada de ar; controle de temperatura e pH; revolvimento do meio e permitir entrada de luz no caso de cultivos fotoautotróficos.

Nos cultivos fotoautotróficos são utilizados fotobiorreatores para a produção de biomassa microalgal. Esses são transparentes e permitem a passagem da luz permitindo as células fotossintetizarem. Podemos classificá-los em 4 tipos (Figura 5).

Figura 5 - Sistemas de cultivo de microalgas em micro e larga escala



Em A: tanque de cultivo aberto do tipo *Raceway Pond*. Em B, C, D temos fotobiorreatores de diferentes conformações: B - biorreator fechado do tipo tubular; C - biorreator fechado de placas; D - biorreator fechado tubular e em E - biorreator fechado de tanque agitado. Fonte: adaptado de Enzing *et al* 2014

Segundo Aishvarya *et al.* (2015) podem ser classificados em 4 tipos: Tubulares - os tubos possuem não mais que 10 cm de diâmetro para maximizar a penetração da luz. Os tubos devem ser dispostos paralelos à fonte de luz objetivando maximizar a sua captação (Figura 5 B); de placas - o reator em placas possui um diâmetro pequeno de aproximadamente 5 cm e elevada área superficial afim de aumentar a superfície exposta a luz. O revolvimento

e aeração são realizados por borbulhamento de ar estéril (Figura 5 C); em coluna de bolhas - o reator é planar com uma razão altura/diâmetro elevada. O revolvimento do meio é realizado por pás mecânicas e a aeração por borbulhamento de ar estéril (Figura 5 D).

1.4 Métodos de lise celular

As paredes celulares das microalgas separam seu conteúdo interno do ambiente, protegendo a célula contra desidratação, patógenos e predadores; ao mesmo tempo permitem a troca de compostos. Um dos primeiros processos *downstream* utilizados nas plataformas biotecnológicas de microalgas a partir da biomassa microalgal, é o rompimento celular, uma operação unitária essencial na preparação de produtos intracelulares desses microrganismos. Dependendo da estrutura da parede celular e da morfologia das microalgas, a ruptura celular pode ser um desafio. Considerando que as etapas de *downstream* são responsáveis por grande parte dos custos operacionais em toda cadeia produtiva, as tecnologias de lise celular devem ser de baixo custo e com eficiência energética, aprimorando a qualidade do produto e seu rendimento (D'HONDT *et al.*, 2017; RICHMOND, 2013).

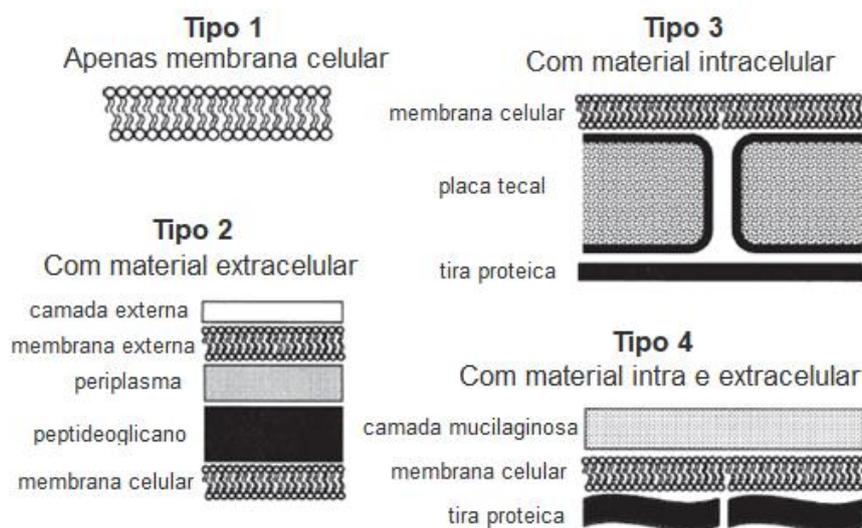
A composição da parede celular das microalgas é bastante diversificada, variando de pequenas membranas a estruturas complexas de múltiplas camadas. Apesar da relevância das propriedades da parede celular, nas biorrefinarias de microalgas poucas informações sobre suas estruturas estão disponíveis para a maioria das espécies (SCHOLZ *et al.*, 2014). Com base na complexidade dos diferentes morfotipos de parede celular, quatro tipos de paredes podem ser distinguidos, como pode ser observado na Figura 6 (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; LEE, 2008).

A membrana celular simples (Tipo 1), formada por uma bicamada lipídica com proteínas e carboidratos integrados, ocorre nas microalgas verdes (*Chlorophytas*), como por exemplo, *Dunaliella salina*; nas microalgas marrom-douradas (*Haptophytas*) da espécie *Isochrysis* sp.. As paredes celulares de microalgas são rígidas, homogêneas e frequentemente multicamadas. As paredes celulares de microalgas eucarióticas são formadas, fora a membrana celular, por uma estrutura microfibrilar embutida em um material mucilaginoso amorfo, constituído por polissacarídeos, lipídios e proteínas. Também protegendo a célula e facilitando a movimentação, mucilagens e bainhas, atuam como material de junção da parede.

O Tipo 2 apresenta uma camada rígida de peptideoglicanos sobrepondo a membrana interna da célula protegendo a célula da lise osmótica. A divisão *Dinophyta* possui membranas celulares com material intracelular nas vesículas caracterizando o Tipo 3, cada

vesícula pode conter de uma a várias placas tecais celulósicas que são constituídas principalmente de celulose. O Tipo 4 apresenta membranas celulares com material intracelular e extracelular, são características dos microrganismos das divisões *Euglenophyta* e *Cryptophyta*, contendo quatro componentes: membrana plasmática, tiras proteicas, microtúbulos e cisternas tubulares do retículo endoplasmático.

Figura 6 - Tipos de envoltório celular em microalgas

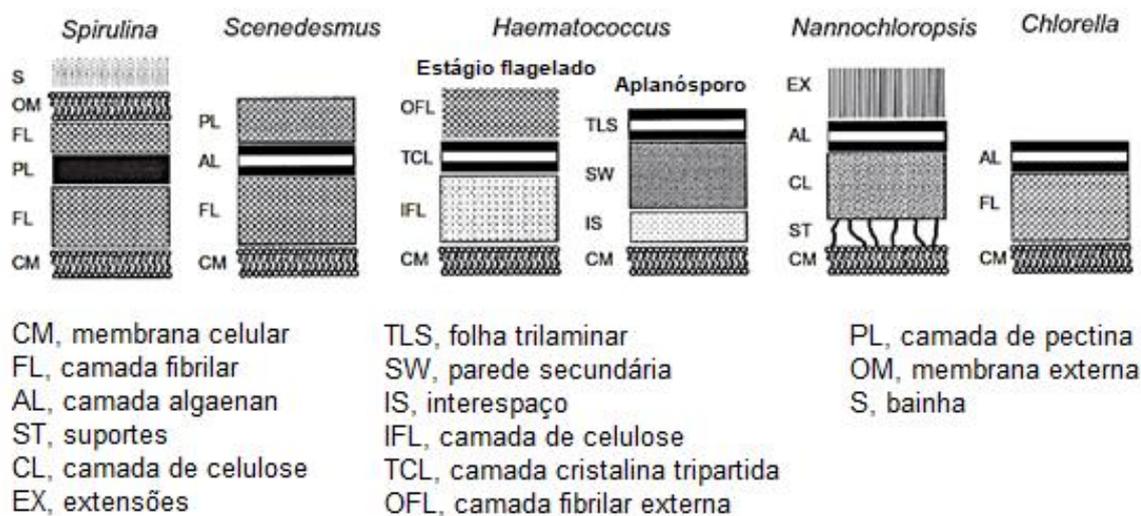


Fonte: adaptado de Lee (2008)

Principalmente *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus* e *Dunaliella* são cultivadas comercialmente em larga escala. Alguns exemplos de estruturas da parede celular das espécies mais frequentemente utilizadas em biotecnologia podem ser observados na Figura 7.

A ruptura celular é um parâmetro crítico na determinação do rendimento e qualidade do produto, seus métodos dependem da parede das microalgas e da natureza do produto a ser obtido (RICHMOND, 2013). Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), a ruptura e extração podem ocorrer de duas maneiras: pela ação mecânica - por meio de homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, ultrassom ou micro-ondas e pela ação não mecânica - através de congelamento, utilização de solventes orgânicos, choque osmótico, reações de ácidos ou bases ou por enzimas.

Figura 7 - Estrutura da parede celular de microalgas frequentemente utilizadas em Biotecnologia.



Fonte: adaptado de D'Hondt *et al.*, 2017

Estes métodos podem ser realizados de forma separada, mas a combinação de dois ou mais deles pode melhorar a eficiência da ruptura (THAMMAKITTI *et al.*, 2004). Os métodos mais utilizados para a lise celular de microalgas são os mecânicos (SILVA, 2013) uma vez que, os métodos não mecânicos podem desnaturar proteínas e enzimas presentes na célula.

1.4.1 Métodos mecânicos de ruptura celular

1.4.1.1 Homogeneizador de alta pressão

A homogeneização de alta pressão celular envolve a passagem forçada do fluido através de um orifício que liga uma câmara com a pressão atmosférica. Pela súbita descompressão, bem como uma elevada tensão de cisalhamento, acarreta no rompimento celular de microalgas. Esta mudança brusca de pressão gera uma grande quantidade de calor, sendo necessário um sistema de refrigeração eficaz (ANDRADE, 2014).

O grau de ruptura nesse tipo de equipamento depende da pressão aplicada, da resistência da parede celular (ANDRADE, 2014), e também, da fase de crescimento da microalga, sendo que as células da fase estacionária são mais resistentes que as da fase exponencial (TREVAN *et al.*, 1990). Dentro dos métodos de ação mecânica, os homogeneizadores de prensas francesas consomem menos tempo que outros métodos, são

fáceis de usar e podem garantir a lise quase completa das pequenas células. Em *Chlorococcum* sp., com o objetivo de romper as células das microalgas para bioprospecção de produtos intracelulares essenciais para a produção de biocombustíveis, a homogeneização atingiu uma ruptura média de 74% das células iniciais (RICHMOND, 2013).

1.4.1.2 Moinho de bolas

É um método simples e efetivo para o rompimento da parede celular de diferentes tipos microrganismos, pode ser a opção de pré-tratamento para espécies de microalgas que apresentam paredes celulares mais fortes (D'HONDT *et al.*, 2017). Utilizando o moinho de bolas, as células de microalgas em suspensão dentro de uma câmara fechada na presença de pequenas esferas (vidro, cerâmica, plástico ou aço) são submetidas a forte agitação, utilizando a energia cinética para as mesmas colidirem com as células microalgais, com o intuito de romper as células devido à força cisalhante (ANDRADE, 2014).

A escolha do diâmetro das esferas e da carga de partículas é de grande importância para uma maior eficiência no processo de ruptura celular, dependendo da localização do bioproduto na célula. Uma carga geralmente de 80-90% do volume livre do compartimento de abrasão é considerada ótima (MIDDELBERG, 1995; RICHMOND, 2013). Este método de rompimento celular pode ser usado em larga escala, sendo o mais indicado devido ao seu baixo custo operacional (CHISTI; MOO-YONG, 1986). É sabido que pode ser utilizado para desintegrar as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *S. platensis* (RICHMOND, 2013).

1.4.1.3 Ultrassom

O mecanismo de rompimento celular por ondas ultrassônicas está associado com o fenômeno da cavitação, onde as ondas induzem as alternâncias de ciclos de alta e baixa pressão no líquido. Resultando na liberação de microbolhas de choque altamente energéticas, que causam impacto e aumento na tensão de cisalhamento no fluido, provocando danos na superfície atingida. O sonicador é constituído por um gerador (oscilador), um transdutor e uma ponteira ou sonda (que em geral é composta de titânio). Esta última transmite as vibrações com frequência de 20 kHz. As forças cisalhantes produzidas pelo turbilhamento gerado durante a cavitação geram pequenas bolhas de ar, e quando estas bolhas são maiores

que as células, elas fazem com que estas células se movimentem de forma violenta até que ocorra o rompimento das mesmas (RICHAMOND, 2013).

No entanto, sua eficiência depende das espécies de microalgas, condições operacionais (temperatura, tempo, potência, número de ciclos) e concentração de biomassa. Em larga escala possui alto custo operacional (PASSOS *et al.*, 2015). Grande parte da energia ultrassônica absorvida pela suspensão celular se transforma em calor, por isto um controle de temperatura é necessário (MIDDELBERG, 1995). A utilização desse método é principalmente aplicado para a produção de biodiesel, bioetanol e biogás, por meio da extração de lipídeos de microalgas como *Chlorella* sp. (D'HONDT *et al.*, 2017; RICHMOND, 2013).

1.4.1.4 Micro-ondas

O pré-tratamento com micro-ondas tem sido amplamente aplicado em biomassa microalgal lignocelulósica (JU *et al.*, 2016). A frequência pode variar de 0,3 a 300 GHz, na qual ondas de 2450 MHz são normalmente utilizadas para o rompimento da parede celular de microalgas (GÜNERKEN *et al.*, 2015). O método baseado na interação de ondas eletromagnéticas com moléculas dielétricas polares provocando o aquecimento e aumento da pressão interna. Essa tecnologia é eficiente, robusta e de fácil expansão, porém sua eficiência depende do morfotipo da microalga (PASSOS *et al.*, 2015).

As espécies de microalgas *Chlorella* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. foram submetidas à micro-ondas para avaliação do grau de ruptura celular deste método de pré-tratamento em comparação com outros métodos e posterior extração de lipídios das células rompidas (LEE *et al.*, 2010; PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2011)

1.4.2 Métodos não mecânicos de ruptura celular

1.4.2.1 Químicos

A ruptura química de células microalgais utiliza uma grande variedade de compostos, sendo os mais utilizados amônia e hidróxido de sódio. Nos métodos ácidos e alcalinos, o H₂SO₄ é o ácido mais aplicado, enquanto o NaOH é a base mais usada (WAGNER; SCENI; RAMBALA, 2008). Os principais parâmetros operacionais são: o tipo,

a concentração de produtos químicos, a temperatura, o tempo, a concentração de biomassa e as espécies de microalgas (LAM; LEE, 2015). Os métodos químicos podem ser mais seletivos do que os métodos mecânicos, pois geralmente dependem de interações específicas com os constituintes da parede celular. Além disso, o consumo de energia é geralmente menor, a eficiência da interrupção das células é maior e o aumento da escala é mais simples. No entanto, o custo dos produtos químicos e a qualidade dos mesmos podem reduzir seus benefícios (D'HONDT *et al.*, 2017).

Os solventes orgânicos servem para romper muitos tipos de células microalgais e podem ser qualificados como um meio tradicional de ruptura. Não são indicados para o rompimento em escala industrial por diversas razões, entre elas o alto custo e a toxicidade (TREVAN *et al.*, 1990).

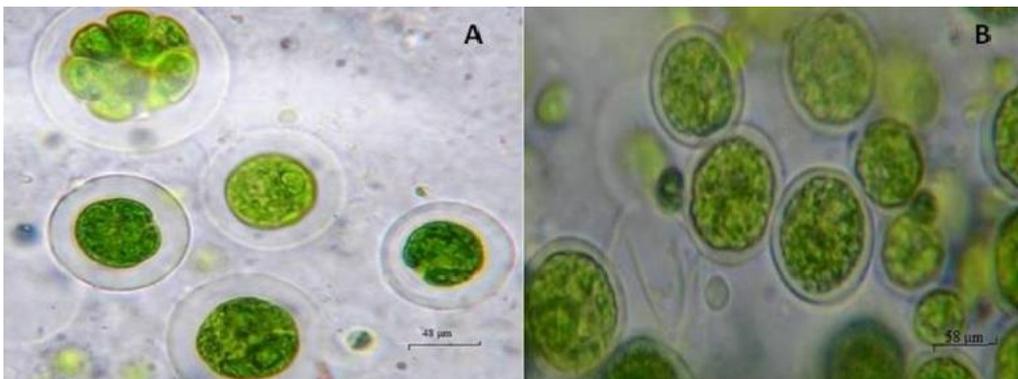
1.4.2.2 Enzimáticos

A hidrólise enzimática é um método bioquímico de ruptura de células através da conversão de carboidratos em açúcares ou proteínas em aminoácidos, resultando na ruptura da parede celular. É adequado para a recuperação de biomoléculas sensíveis à tensão de cisalhamento, ou à súbita mudança de pressão realizada pelos homogeneizadores. O mecanismo de rompimento é baseado no fato de que a pressão osmótica interna rompe a membrana, ou parte dela, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado para o meio externo (FLEURI; SATO, 2005; LAM; LEE, 2015). O tipo de enzima é o principal fator relacionado aos custos operacionais e determina as condições do processo (temperatura, pH, teor de biomassa, enzima, concentração, tempo e agitação). As enzimas mais utilizadas para a hidrólise enzimática são: celulases, glicosídeos, amilases, proteases, xilanases, peptídeos e lipases (LAM; LEE, 2015). A eficácia de enzimas na lise dos componentes da parede celular pode variar de acordo com gênero e espécie da microalga. Podendo apresentar vantagem em relação ao método alcalino e ácido, como a especificidade biológica, alta seletividade e baixo consumo de energia. Em contrapartida, além do alto custo enzimático, a presença de inibidores e a difícil recuperação enzimática são as desvantagens (LAM; LEE, 2015). Segundo Garcia *et al.*, 2012 foram obtidos rendimentos máximos de hidrólise enzimática de 60%, para extração de aminoácidos de 250 g/L de *Scenedesmus almeriensis* usando as enzimas comerciais Alcalase e Flavourzyme.

1.5 Microalgas do gênero *Chlorococcum*

As microalgas do gênero *Chlorococcum* pertencem ao filo *Viriplantae*, divisão *Chlorophyta* e família *Chlorococcaceae* são de vida livre (LOURENÇO, 2006), vivem como células vegetativas solitárias ou em grupos temporários de forma indefinida. A morfologia celular pode variar entre esférica ou elipses e a parede celular é lisa (Figura 8). O ciclo reprodutivo de *Chlorococcum* sp. é principalmente de forma assexuada, por zoósporos (ou aplanósporos desprovidos de flagelos) ou sexual, por isogametas, sob condições ambientais de estresse, como limitação de luz e de nutrientes (WATANABE; LEWIS, 2017; GUIRY, 2019).

Figura 8 - *Chlorococcum humicola* célula solitária (A) e células coloniais (B)



Fonte: Santhoshkumar *et al.*, 2016.

A biogeografia desse gênero de microalga se apresenta de forma cosmopolita. Foi isolado de fontes termais na Ásia Central e também em solos da Antártica. A microalga pode ser coletada de ambientes marinhos e dulcícolas, ambientes aéreos e também terrestres, nas superfícies rochosas (WATANABE; LEWIS, 2017; GUIRY, 2019). Segundo o *Algae Base*, já foram descritas até o presente momento 46 espécies com a taxonomia aceita em 2019.

As pesquisas com plataformas biotecnológicas de microalgas em diversas aplicações multifuncionais vêm se desenvolvendo, o que pode ser derivado de suas vantagens de crescimento rápido e boa adaptabilidade ambiental sobre os recursos normais de biomassa terrestre. A microalga *Chlorococcum littorale* pode apresentar uma cultura de alta densidade, até a 84 g/L usando um fotobiorreator de tela plana. Além disso, o *Chlorococcum littorale* possui uma alta tolerância ao CO₂ (até 65%), o que a torna um candidato interessante para a biofixação de CO₂ (OTA *et al.*, 2015).

Normalmente, o óleo de microalgas contendo ácidos graxos saturados e PUFA é usado como matéria-prima para a produção de biodiesel. A extração lipídica de *Chlorococcum humicola* contém cerca de 95,4% de ácidos graxos C14-18 (SANTHOSHKUMAR *et al.*, 2016; SHANKAR *et al.*, 2017).

Apesar das aplicações industriais de *Chlorococcum sp.*, em sua grande maioria tenha um enfoque na bioprospecção de lipídios para a produção biodiesel, biofixação de CO₂ e carotenoides para as indústrias cosmética e farmacêutica, o teor de proteínas também está se tornando relevante para as indústrias de alimentos ou rações (CHEW *et al.*, 2017). Devido à sua taxa de crescimento relativamente rápida, facilidade de cultivo e alta tolerância a pH extremo e alta temperatura, *Chlorococcum sp.* é considerada uma fonte comercial promissora de cetocarotenóides (Tabela 1) (YUAN *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Interferência da temperatura na produção de carotenoides em *Chlorococcum sp.*

Carotenoides	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
β-caroteno	25,3	14,5	6,79	5,21
Astaxantina	6,8	7,9	9,51	11,6
Carotenoides totais	4,4	6,5	7,2	8,4

Fonte: adaptado de Liu e Lee (2000).

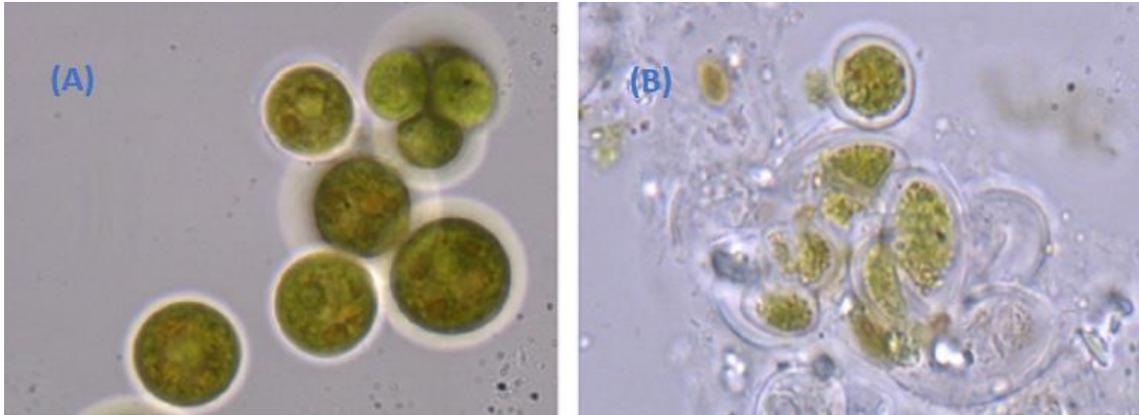
Um dos carotenoides mais importantes produzidos pelas microalgas é a astaxantina. Em *Chlorococcum sp.*, a astaxantina é sintetizada a partir de β-caroteno por vias diferentes das outras produtoras de astaxantina microrganismos. Em *Haematococcus lacustris*, os ésteres de astaxantina são os principais cetocarotenóides enquanto as microalgas de *Chlorococcum sp.* poderiam acumular não apenas astaxantina, mas também grandes quantidades de adonixantina e cantaxantina (YUAN *et al.*, 2002).

Estudos para avaliação da eficiência de métodos de lise celular em microalgas da espécie *C. elbense* para extração de proteínas são escassos. Halim *et al.*, (2012), realizou estudos para extração de lipídeos testando a eficácia de diferentes métodos de rompimento celular em *Chlorococcum sp.*, usando diversas tecnologias de interrupção celular, como ultrassom, homogeneização de alta pressão, lise química usando ácido. Examinando por meio de contagens de células intactas e reduções nos diâmetros médios das colônias. De acordo com a Figura 9.

Os métodos químicos utilizando ácido sulfúrico no tratamento, apesar de sua alta eficácia na ruptura de células de microalgas, não é apropriado para uso em uma biorrefinaria

de microalgas, pois tende a destruir a atividade dos biocompostos (HALIM et al., 2012)

Figura 9 - Células de *Chlorococcum* sp. intactas



(A) e células rompidas por homogeneização de alta pressão (B). Fonte: adaptado de Halim *et al.* (2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar diferentes métodos de lise celular da biomassa da microalga *Chlorococcum elbense* cultivada em fotobiorreator para extração de proteínas hidrossolúveis.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a. Estabelecimento e validação de cultivo e acúmulo de biomassa de *C. elbense* em escala laboratorial;
- b. Análise da composição elementar da biomassa da microalga *C. elbense*;
- c. Extração de proteínas solúveis de *C. elbense* utilizando diferentes métodos de lise celular;
- d. Dosagem de proteínas solúveis;
- e. Análises eletroforéticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo indoor da microalga *Chlorococcum elbense*

A microalga *C. elbense* utilizada no presente trabalho é mantida na algoteca do LabBMol e tem o número de registro no Sisgen ADA415C. Inicialmente, as células de *C. elbense* foram pré-inoculadas, sob condições assépticas, em um fotobiorreator cilíndrico (Figura 10A) contendo 100 mL de meio WC (Anexo 1) com pH ajustado para 7,0. Esse fotobiorreator foi mantido por 4 dias em uma câmara de crescimento (B.O.D.) sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 4000 Lux e aeração estéril constante (mantida por aerador elétrico e filtros de 0,25 μ m). Após esse período, o pré-inóculo (com uma densidade óptica a 690 nm = 0,5) foi inoculado num fotobiorreator retangular de placa plana (Figura 10B) contendo 4 L do meio NPK (formulação 20:10:20 m/m/m) pH 7,0. A cultura foi mantida por 14 dias na plataforma de crescimento usando as seguintes condições: temperatura de 25 ± 2 °C; intensidade luminosa de 50.000 Lux; fotoperíodo de 12 horas e aeração estéril constante.

Figura 10 - Pré-inóculo de microalga *C. elbense* cultivado em fotobiorreator cilíndrico (A) e cultivo da microalga em fotobiorreator retangular de placa plana (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Curva de crescimento da microalga *C. elbense*

Após a adição do pré-inoculo microalgal no fotobiorreator de placa planar (Figura 2), foram realizadas contagens com auxílio da câmara de Neubauer para acompanhar o crescimento celular. Esse protocolo consiste na utilização de uma lâmina de microscopia espessa, na qual existe marcação de área que permite determinar o volume de amostra contida em cada espaço determinado nos quadrantes. Então, foi retirada uma alíquota do cultivo de microalgas para aplicação da lâmina, sendo previamente diluída em meio NPK para a melhor visualização dos núcleos das células para contagem. O fator de diluição utilizado variou de acordo com a dificuldade de visualização dos núcleos, pois quanto maior o volume de células, maior a possibilidade de sobreposição de células.

Depois de homogeneizar da suspensão celular com auxílio de uma pipeta, a amostra foi aplicada na câmara de contagem, preenchendo todo espaço referente a área demarcada, esperando pelo tempo de 2 minutos para sedimentarem. Usando um microscópio, a área demarcada foi focalizada na lente de 40X para iniciar a contagem de cada quadrante médio. Foram adotados critérios de contagem para delinear corretamente o experimento, como a visualização de um núcleo visível das células contadas; contar como um único grupo as células agrupadas que tinham difícil distinção uma das outras, entre outros critérios. A área total da câmara de Neubauer, ocupada por 25 quadrados pequenos de contagem, corresponde a uma área total de 1 mm² (1 mm de cada lado), ou seja, cada quadrante pequeno corresponde a 0,0025 mm². Um quadrado grande possui 400 quadrados pequenos (25 x 16 = 400). Então, a área do quadrado grande é de 1 mm² (400 x 0,0025 mm² = 1 mm²). Assim, cada quadrante comporta um volume de 0,1 mm³ (LUCARINI *et al.*, 2004), então (equação 1):

$$\text{Volume} = \text{área} \times \text{profundidade} \quad \text{Volume} = \text{área} \times \text{profundidade}$$

(equação 1)

$$\text{Onde volume} = 1\text{mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3.$$

Então, é possível inferir o número de células por mL de solução através da equação 2:

$$n^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

(Equação 2)

A contagem ocorreu em tempos espaçados, com dois a três dias de diferença. Os valores obtidos da contagem de células foram plotados em um gráfico, com a assistência do programa ORIGIN, para observar o crescimento celular da microalga *C. elbense* por tempo decorrido do experimento.

3.3 Obtenção da biomassa microalgal para preparação dos extratos proteicos

As microalgas coletadas no décimo dia de cultivo foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos. A biomassa resultante foi lavada com água ultrapura (MilliQ) para o clareamento das células através de quatro etapas alternadas de ressuspensão da biomassa em água e centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos. A biomassa fresca foi pesada e submetida ao processo de liofilização, em seguida, acondicionada a temperatura ambiente (25 °C) para uso nas etapas posteriores.

Para o cálculo do rendimento da biomassa, foi utilizada a seguinte equação 3:

$$PM = PT - P_{placa} - P_{pf} \quad (\text{equação 3})$$

Onde:

PM = Peso da microalga;

PT = Peso total (obtido na balança analítica);

P_{placa} = Peso da placa de Petri utilizada na balança;

P_{pf} = Peso do papel de filtro utilizado no sistema de filtração;

O resultado é correlacionado ao volume inicial de cultura que tinha no recipiente (equação 4):

$$PM \text{ em gramas de biomassa} - mL \text{ de meio de cultura} \quad (\text{equação 4})$$

3.4 Análise elementar da biomassa microalgal

3.4.1 Umidade

Amostras de 1 g da biomassa microalgal foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente tarados em balança analítica. As referidas amostras foram colocadas

em estufa com temperatura entre 100 a 105 °C por 24 horas (Nagakura, 1972). Depois os cadinhos foram retirados e transferidos para dessecador com auxílio de pinça, até atingir a temperatura ambiente, sendo pesados posteriormente. O resultado da umidade foi encontrado pela diferença de peso inicial e final gerando uma resultante em percentagem. A equação utilizada foi a descrita abaixo (equação 5):

$$\%U = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

Onde:

U = Umidade;

V₀ = peso do cadinho seco;

V₂ = peso do cadinho com amostra;

V₁ = peso do cadinho com amostra após secagem.

3.4.2 Cinzas

Nessa etapa, amostras de 1 g de biomassa microalgal seca foram adicionadas em cadinhos previamente tarados, que foram posteriormente pesados e transferidos para mufla a 600 °C por 4 horas. Depois, os cadinhos foram para o dessecador até atingir a temperatura ambiente para em seguida serem pesados (BRASIL, 2011). Para o cálculo final do teor de cinzas expresso em porcentagem, utilizou-se a equação 6:

$$\%C = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100 \quad (\text{equação 6})$$

Onde:

C = Cinza;

V₀ = peso do cadinho;

V₁ = peso do cadinho mais cinza;

V₂ = peso do cadinho mais amostra.

3.4.3 Proteínas totais

A determinação do teor de proteínas totais foi realizado conforme o método de Micro-Kjeldahl (MAPA, 2013), no qual foi utilizado papel vegetal contendo 0,2 g de amostra

macerada, acondicionados em tubos com 2 g do catalisador, contendo uma mistura de sulfato de cobre (CuSO_4), selênio metálico (Se) e sulfato de potássio (K_2SO_4), e adicionados 4 mL de ácido sulfúrico. Em seguida, os tubos foram, foram levados ao aparelho digestor a 350°C , e foram observados até o final da digestão. No aparelho destilador, a amostra digerida foi neutralizada com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, até o surgimento da coloração escura, devido a formação de óxido de cobre (Cu_2O). Esta mistura foi destilada por meio do arraste de vapor e o produto (destilado) foi recolhido em erlenmeyer com 10 mL da solução de ácido bórico (H_3BO_3) a 2%, adicionando-se 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) até completar 50 mL. Desse modo, a mistura destilada foi titulada com solução padrão de ácido clorídrico (HCl) a 0,04 N em bureta até a coloração rosada e assim, anotou-se o volume de ácido gasto. A porcentagem de nitrogênio total foi obtida através da equação 7:

$$\%NT = \frac{(\text{Volume da amostra} - \text{Volume do branco}) \times 0,014 \times 0,04}{\text{Peso da Amostra}} \times 100$$

(equação 7)

A conversão do nitrogênio total (NT) para proteína total (PT) foi obtida a partir da equação 8:

$$\%PT = \%NT \times 6,25 \quad (\text{equação 8})$$

3.4.4 Lipídeos totais

O teor de lipídios foi determinado pelo método de *Soxhlet* (IUPAC, 1979). O hexano foi utilizado como solvente orgânico para extração dos lipídios totais. Seguidamente, os balões foram colocados em estufa a 100°C durante 1 hora. Logo após, os balões foram levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesados (BRASIL, 2011). Posteriormente, foram pesadas amostras de 1 g de biomassa para serem colocadas nos cartuchos de extração (papel filtro) e tampadas com algodão. Os balões contendo 100 mL de solvente foram levados ao determinador de gordura para a extração a 90°C por 2 horas. Logo após a extração, a amostra gotejou por 30 minutos (para a recuperação do solvente o aparelho foi calibrado para 150°C) e seguidamente os balões contendo o lipídio foram transferidos ao

dessecador até atingir a temperatura ambiente para serem pesados. O cálculo para obtenção da porcentagem de lipídeos foi realizado conforme a equação 9:

$$\%Lipídeo = \frac{(Peso\ do\ bal\tilde{a}o + Gordura) - (Peso\ do\ Bal\tilde{a}o\ Vazio) \times 100}{(Peso\ da\ Amostra)} \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o\ 9})$$

3.4.5 Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais presentes na biomassa microalgal foi obtido por diferença (PEARSON, 1976) empregando a seguinte equação 10:

$$\% \text{ Carboidratos} = (100\% \text{ da MA}) - [(\% \text{ Lipídeos}) + (\% \text{ Cinzas}) + (\% \text{ Proteínas})] \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o\ 10})$$

3.4.6 Fibra bruta

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método de Henneberg (WINTON; WINTON, 1958). Inicialmente, amostras de 1 g da biomassa delipidada foram adicionadas a uma solução de ácido sulfúrico 1,25% e, após a homogeneização, foram mantidas em banho seco por 30 minutos até alcançar a fervura. Em seguida, as amostras foram filtradas em papéis de filtro quantitativo, previamente aquecidos em estufa a 105 °C por 1 hora e pesados. Em seguida, cada papel de filtro contendo o resíduo foi lavado com água quente até não haver reação básica com o papel indicador de pH. Posteriormente, os resíduos foram lavados por 3 vezes com 3 mL álcool etílico (P.A) e 2 vezes com 3 mL de éter etílico (P.A). Após a evaporação dos solventes, os papéis de filtro com o resíduo foram colocados em estufa a 105 °C, para secagem, até alcançarem um peso constante. Os papéis com o resíduo foram colocados cadinhos de porcelana previamente tarados, e em seguida, foram incinerados em forno mufla a uma temperatura de 600 °C. O cálculo da fibra bruta foi calculado através das equações 11 e 12:

$$[(P + F + C) - P] - C = F \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o\ 11})$$

$$\% F = \frac{F \times 100}{P} \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o\ 12})$$

Onde:

P = peso do papel;

F= fibra;

C= cinza.

3.5 Extração de proteínas das microalgas utilizando diferentes métodos de lise celular

3.5.1 Lise em homogeneizador com esferas de vidro

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 150 mM, PMSF 1 mM e EDTA 0,2 mM) e homogeneizada sob agitação. Em seguida, 2 g de pérolas de vidro foram adicionadas ao mesmo tubo, que foi submetido a agitação máxima no vórtex por 45 minutos, com intervalos de 2 minutos em gelo. Após esse período, o extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₁) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₁ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.5.2 Lise por maceração

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise e homogeneizada sob agitação. A mistura foi transferida para um homogeneizador Potter e macerada vigorosamente por 10 minutos. Em seguida, a mistura macerada foi transferida para um béquer e mantida sob agitação por 60 min na câmara refrigerada. Após esse período, o extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₂) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₂ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.5.3 Lise por ultrassonicação

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise e homogeneizada sob agitação. A mistura foi submetida a um ciclo de ultrassonicação usando 100 pulsos de 10 segundos e intervalos de 5 segundos. Durante o

processo a mistura foi mantida em gelo. Em seguida, o extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₃) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₃ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.5.4 Lise em homogeneizador com esferas de vidro e ultrassonicação

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise e homogeneizada sob agitação. Em seguida, 2 g de pérolas de vidro foram adicionadas ao mesmo tubo, que foi submetido a agitação máxima no vórtex por 45 minutos, com intervalos de 2 minutos em gelo. A mistura foi submetida a um ciclo de ultrassonicação usando 100 pulsos de 10 segundos e intervalos de 5 segundos. Durante o processo a amostra foi mantida em gelo. Após esse período, o extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₄) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₄ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.5.5 Lise por congelamento e descongelamento

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise e homogeneizada sob agitação. A amostra foi submetida a três ciclos de congelamento lento freezer a -20 °C e descongelamento. Em seguida, a amostra foi submetida agitação por 1 h na câmara refrigerada. Após esse período, o extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₅) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₅ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.5.6 Lise por congelamento/descongelamento e maceração

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise e homogeneizada sob agitação. A amostra foi submetida a três ciclos de congelamento lento freezer a -20 °C e descongelamento. A amostra foi transferida para um homogeneizador Potter e macerada vigorosamente por 10 minutos. Em seguida, a mistura macerada foi transferida para um béquer e mantida sob agitação por 60 minutos na câmara

refrigerada. Após esse período, o extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₆) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₆ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.5.7 Lise por congelamento/descongelamento, maceração e ultrassonicação.

A biomassa microalgal (1 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise e homogeneizada sob agitação. A amostra foi submetida a três ciclos de congelamento lento freezer a -20 °C e descongelamento. Em seguida, a amostra foi transferida para um homogeneizador Potter e macerada vigorosamente por 10 min. Após esse período, a amostra macerada foi transferida para um béquer e mantida sob agitação por 60 min na câmara refrigerada. Por último, a mistura foi submetida a um ciclo de ultrassonicação usando 100 pulsos de 10 segundos e intervalos de 5 segundos. Durante o processo a amostra foi mantida em gelo. O extrato foi centrifugado 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (denominado EB₇) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EB₇ foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.6 Dosagem de proteínas solúveis dos extratos

As dosagens de proteínas dos EBs (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e das frações proteicas obtidas da biomassa microalgal 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 absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

3.7 Análise eletroforética dos extratos microalgais

Os ensaios eletroforese foram realizados sob condições 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. A amostra que apresentou melhor resultado na precipitação de proteína foi preparada em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 8,3 contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromo fenol 1%): 5 μ L do tampão de amostra para 25 μ L. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 2 minutos e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi aplicado de 15 a 20 μ L de amostra em cada poço do gel. Foram usados marcadores moleculares no primeiro e no último poço. 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).

3.8 Análises estatísticas

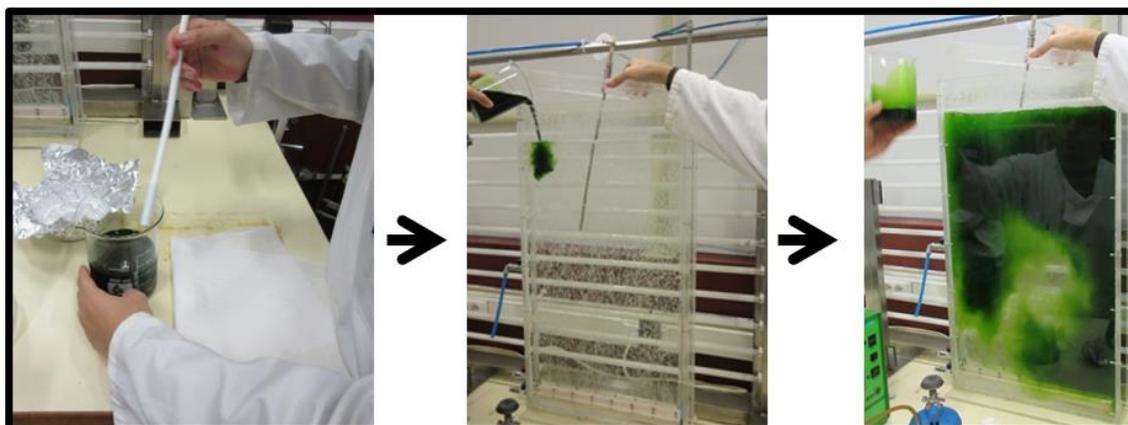
As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância e teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, visando detectar diferenças entre as médias dos dados obtidos. Para realização destas análises foi utilizado o programa ASSISTAT 7.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo de *C. elbense* em fotobiorreator de placa plana.

Inicialmente, as células de *C. elbense* coletadas foram pré-inoculadas em condições de cultivo apropriadas, em um fotobiorreator cilíndrico contendo 100 mL de meio WC (anexo I) mantido por 4 dias em uma câmara de crescimento (B.O.D). A composição do meio WC consiste em 9 soluções diferentes tornando-o complexo, ideal para o starter no crescimento de diversas espécies de microalgas, uma vez que fornece nutrientes necessários para uma boa produtividade e composição bioquímica celular adequada para a bioprospecção de insumos de interesse biotecnológico. Seu custo elevado é considerado um fator limitante para o emprego em cultivos em larga escala. Após esse período, o pré-inóculo (com uma densidade óptica a $690_{\text{nm}} = 0,5$) foi inoculado num fotobiorreator retangular de placa planar (Figura 11) contendo 4 L do meio de cultura contendo NPK (formulação 20:10:20 m/m/m).

Figura 11 - Adição do pré-inóculo microalgal no fotobiorreator de placa plana para a produção de biomassa.



Fonte: Elaborada pela autora.

Como fonte alternativa ao meio WC, utilizou-se o meio NPK por ter uma formulação simples e de baixo custo que propiciou o aumento da produção da biomassa microalgal, uma vez que fornece os três nutrientes primários imprescindíveis para o crescimento da biomassa. Segundo Ansilago *et al.* (2012), já havia demonstrado que o meio NPK proporcionava um aumento no crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

O cultivo em fotobiorreator plano vertical, permitiu uma ampla distribuição

da iluminação, melhor homogeneização para a absorção de nutrientes, facilitou os procedimentos de coleta da biomassa e evitou a sedimentação da biomassa microalgal.

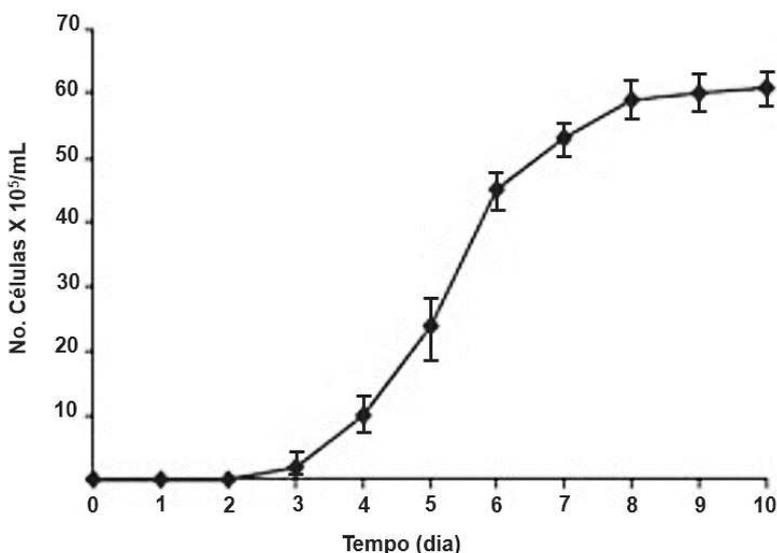
Estudos científicos relataram que esse manejo se mostrou relevante para cultivos cujo o objetivo seja a produção de biomassa microalgal e biocompostos de alto valor agregado para diferentes finalidades industriais (RICHMOND *et al.*, 2013; LOURENÇO, 2006).

4.2 Curva de crescimento

O gráfico 1 mostra o resultado da curva de crescimento da *Chlorococcum elbense* cultivada em sistema fotobiorreator fechado até o 10º dia de cultivo, com o objetivo de observar o crescimento celular microalgal. As coletas e as contagens foram realizadas como descrito na metodologia. A curva padrão observada ilustra as fases de crescimento (log, lag e estacionária) bem definidas até o 10º dia.

Gráfico 1- Curva de crescimento da microalga *C. elbense*.
cultivada em fotobiorreator retangular de placa plana.

Fonte: Elaborada pela autora.



A fase lag não se prolongou, sinalizando uma ligeira adaptação do pré-inóculo microalgal ao meio NPK. A fase log foi observada a partir do 3º ao 8º dia de cultivo. Pode ser caracterizada pelo crescimento exponencial de células (variável de acordo com a espécie

e as condições de cultivo) e pelo aumento da síntese de biomoléculas importantes para o metabolismo celular, como proteínas e enzimas. Observa-se que, na fase exponencial o número de células variou entre $0,3$ e $6,0 \times 10^9$ células/mL, já que a biomassa tende a ser algumas ordens de grandeza maior do que o inóculo inicial do cultivo devido as condições ambientais adequadas ao crescimento microalgal.

O decréscimo relativo da taxa de crescimento, pode ser observado a partir do 9º dia, na fase estacionária. Nessa fase, geralmente o rendimento final é máximo, assim a coleta da biomassa microalgal para a produção posterior dos extratos brutos foi realizada no 10º dia. Após a fase estacionária, inicia-se a fase de declínio, não vista no gráfico, nesta fase pode-se observar mudanças na composição do meio provocadas pela produção de metabólitos, inibidores enzimáticos, esgotamento de nutrientes, fotoinibição devido a alta densidade celular, reduzindo a taxa de crescimento microalgal.

4.3 Rendimento de biomassa seca

Ao final do 10º dia e após a aplicação da metodologia descrita no tópico de obtenção da biomassa microalgal de *C. elbense*, foi observado um rendimento médio de biomassa seca (Figura 12) de $8,08 \pm 0,03$ g. L⁻¹.

Figura 12 - Biomassa microalgal de *C. elbense* liofilizada



Fonte: Elaborada pela autora.

O rendimento da biomassa seca microalgal do gênero *Chlorococcum* ainda são incipientes na literatura. Outra espécie relatada por Caporgno *et al.* (2019) apresentou um rendimento de $1,80$ g. L⁻¹ de *C. vulgaris* em cultivo autotrófico.

4.4 Caracterização da biomassa microalgal

A biomassa da microalga *C. elbense* apresentou uma composição centesimal variável, com grande percentual de proteínas totais (35,23%) (Tabela 2). Estudos científicos são incipientes na análise centesimal de microalgas do gênero *Chlorococcum*, porém outros estudos relatam que microalgas das espécies *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* são abundantes em termos de proteínas brutas, apresentando valores 46,76% e 45,46% respectivamente (MOLINO *et al.*, 2018). Para *Chlorococcum* sp. o conteúdo de lipídios pode atingir valores superiores a 20% (PRABAKARAN *et al.*, 2018), no presente estudo observou-se um conteúdo lipídico superior em *C. elbense* com 28,48% a partir da biomassa seca. O aumento do conteúdo lipídico também sugere a existência de condições de estresse (PRABAKARAN *et al.*, 2018). Já Harun e Danquah (2011), encontraram um teor de carboidrato (32%) em *Chlorococcum* sp. superior ao conteúdo observado em *C. elbense* (16,63%).

Tabela 2 - Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras da biomassa microalgal de *C. elbense* com base na massa seca.

Constituinte	Teor na biomassa (%)
Umidade	4,93 ± 0,62
Cinza	5,52 ± 0,38
Fibra bruta	8,21 ± 0,36
Lipídeos	28,48 ± 0,93
Proteína total*	35, 23 ± 1,12
Carboidratos**	16,63

* Nitrogênio total x 6,25 **Obtido por diferença. Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Dosagem de proteínas solúveis dos extratos microalgais produzidos

As proteínas são componentes estruturais imprescindíveis para a diversidade de funções biológicas nos organismos vivos. Essas estruturas orgânicas são formadas por cadeias polipeptídicas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas (ligações covalentes entre carbono e nitrogênio), e pode variar de 50% a 80% do peso seco dos microrganismos (ANDRADE, 2014; TINDALE, 1988).

Essas biomoléculas ocorrem em grande diversidade e são formadas por unidades monoméricas simples, peptídeos de tamanho relativamente pequenos até polímeros com pesos moleculares na faixa de milhões. As proteínas são instrumentos moleculares por meio

dos quais a informação genética é expressa, onde a versatilidade do rearranjo simples dos 20 aminoácidos que formam a cadeia influi nas diferentes propriedades e atividades (LEHNINGER, 1984).

No presente estudo, foram realizados ensaios para avaliação na eficiência de recuperação de proteínas hidrossolúveis. Foram preparados 7 extratos brutos (EB1, EB2, EB3, EB4, EB5, EB6 e EB7) a partir da aplicação da metodologia descrita no tópico de extração de proteínas das microalgas utilizando diferentes métodos de lise celular.

A interrupção celular é uma etapa essencial do processamento *dowstream*, pois libera compostos bioativos da matriz celular microalgal com alto valor agregado (HALIM *et al.*, 2012). O rompimento celular é um parâmetro crítico na utilização de extratos microalgais em processos industriais de larga escala, devido ao alto custo e baixo escalonamento (PHONG *et al.*, 2018).

A avaliação da concentração de proteínas solúveis totais dos extratos brutos foi realizada pelo método de Bradford (1976) (Tabela 3), observando-se a concentração de 0,943 mg de proteína por mL de microalga utilizada e um teor de proteína total de 9,43 mg no extrato bruto 7, que usou a integração de congelamento e descongelamento, maceração e ultrassonicação. Segundo Wang e Zhang (2012) as combinações entre diferentes técnicas de rompimento celular, podem favorecer a eficiência do processo de extração.

Tabela 3 - Determinação da concentração e da quantidade de proteínas solúveis totais presentes nos extratos brutos obtidos a partir da biomassa microalgal de *C. elbense*.

Extratos ¹	Volume do extrato (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)*	Proteína total (mg)
EB1	10	0,432 ^c	4,32 ^c
EB2	10	0,273 ^d	2,73 ^d
EB3	10	0,415 ^c	4,15 ^c
EB4	10	0,420 ^c	4,20 ^c
EB5	10	0,040 ^e	0,40 ^e
EB6	10	0,730 ^b	7,30 ^b
EB7	10	0,943 ^a	9,43 ^a

¹Extrato bruto. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo Phong *et al.* (2018), a vibração ultrassônica causou aumento significativo na porcentagem de proteína recuperada. Seus resultados demonstram que o método combinado foi capaz de facilitar a penetração do solvente nas células e solubilizar proteínas. As ondas de choque da ultrassonicação poderiam facilitar o inchamento e a

hidratação da biomassa, causando a formação de poros nas superfícies da matriz (VINATORU, 2001). A lise por ultrassom é uma das técnicas que apresenta elevada eficiência na extração de compostos bioativos das microalgas (AL-ZUHAIR *et al.*, 2017). O desenvolvimento de poros na parede celular aumentou a permeação de solvente na estrutura interna e a transferência de massa, facilitando a liberação do composto alvo através dos microcanais (PORDESIMO, 2004; BOTH, 2014; XIE, 2015).

O método menos eficiente foi o utilizado no EB5 (lise por congelamento e descongelamento), apresentou a concentração de 0,040 mg de proteína por mL de microalga utilizada e um teor de proteína total de 0,40 mg. Os ciclos de congelamento e descongelamento formam grandes cristais que podem causar injúria a parede celular da microalga ou um rompimento parcial formando poros permeáveis aos compostos intracelulares. Bradford (1976) é um método preciso para a quantificação de proteínas e não requer fatores de conversão. Há também de se considerar que a extração de proteínas pode ser diminuída pela barreira da parede celular, o que pode impedir a solubilização de todas as proteínas intracelulares.

4.6 Análise eletroforética SDS-PAGE dos extratos de *C. elbense*

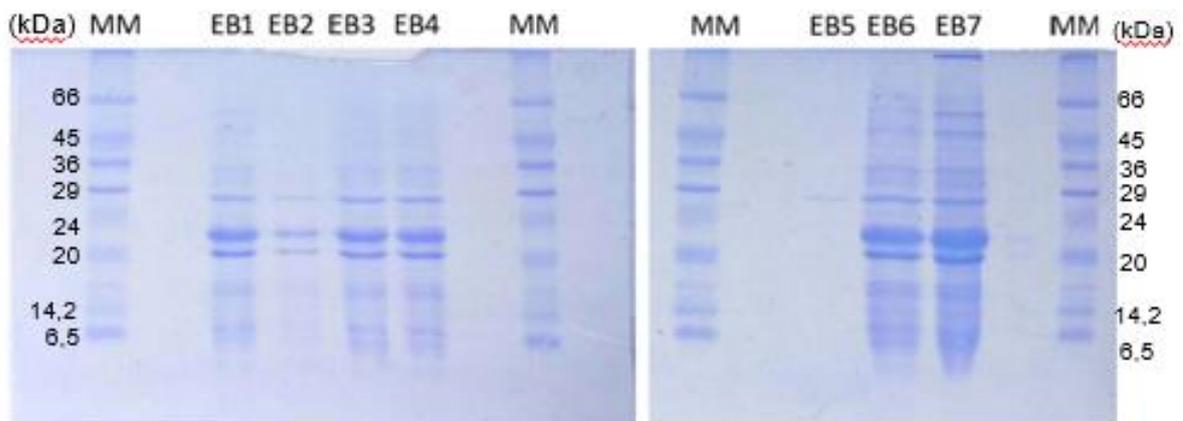
O perfil eletroforético das proteínas é uma ferramenta importante para a avaliação dos efeitos variáveis envolvidas no processo de cultivo das microalgas e sua influência na bioprospecção de proteínas, uma vez que fatores ambientais podem modificar a composição celular desses microrganismos.

Os resultados apresentados na tabela 2 podem ser corroborados pela análise qualitativa do perfil eletroforético dos extratos brutos que foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 15%), em condições desnaturantes. Para avaliar a eficiência dos diferentes métodos de lise presentes nesse trabalho observa-se a distribuição das bandas de proteínas do gel.

O extrato que apresentou maior teor de proteínas solúveis foi o EB7, com 0,943 mg/mL de proteína, delineou-se por uma ampla faixa de peso molecular que variou entre 6,5 kDa a 66 kDa, como também, a presença de muitas bandas sugerindo uma maior diversidade de proteínas. Este resultado mostra que a combinação dos métodos utilizados a partir da biomassa microalgal para o processamento do extrato bruto, que foi o congelamento e descongelamento, maceração e ultrassonicação, mostrou-se mais eficaz para o rompimento celular. O extrato bruto com menor conteúdo proteico foi o EB5, com 0,040 mg/mL de

proteína, apresentou um pequeno pool proteico na faixa de peso molecular de 24 kDa e 29 kDa, apresentou apenas uma banda com baixa coloração. Como resultado, somente o congelamento/descongelamento não é eficaz para o rompimento celular e posteriormente a extração de compostos bioativos intracelulares (Figura 13).

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 15%) dos extratos brutos obtidos a partir da biomassa microalgal de *C. elbense*.



Marcadores: Albumina (66kDa), Ovoalbumina (45kDa), Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (36kDa), Anidrase carbônica (24kDa), Inibidor de tripsina (20kDa), α -Lactalbumina (14,2kDa) e Aprotinina (6,5kDa). Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos científicos com *Chlorococcum elbense* ainda são incipientes na literatura. Outros estudos mostram que o perfil eletroforético do extrato bruto de *Chorella vulgaris* processado pelo método de lise enzimática apresentado por Al-Zuhair *et al.* (2017) mostram um número menor de bandas compreendidas em uma faixa de massa molecular aparente entre 66 e 6 kDa, com baixa diversidade das proteínas extraídas.

A eletroforese permitiu a avaliação da eficiência de um dos primeiros processos *downstream*, o rompimento celular identificando a metodologia de lise celular mais adequada para a produção dos extratos brutos e posteriormente a recuperação desses biocompostos, o que pode otimizar a cadeia produtiva de subprodutos de interesse biotecnológicos.

5 CONCLUSÃO

A Bioeconomia, sendo um conjunto de atividades econômicas baseadas na utilização sustentável e inovadora de recursos naturais renováveis (biomassa), em substituição às matérias-primas fósseis corrobora para o investimento em plataformas biotecnológicas envolvendo a bioprospecção de compostos biologicamente ativos de microalgas.

O rompimento celular da parede de microalgas é um dos primeiros parâmetros críticos em processos *downstream*. Este estudo, mostrou que a utilização de métodos de lise mecânicos combinados no extrato bruto 7 (congelamento e descongelamento, maceração e ultrassonicação) foi o mais eficiente na recuperação de proteínas hidrossolúveis, seguido do extrato bruto 6 (congelamento e descongelamento, maceração). O extrato bruto 5 mostrou-se o menos eficiente e consistiu em ciclos de congelamento e descongelamento, apenas, não integrado a outro método mecânico de ruptura celular. A otimização da cadeia produtiva de um subproduto de interesse industrial garante a qualidade e o rendimento do mesmo, por meio da avaliação dos métodos de ruptura celular e permite a redução de custos operacionais, financeiramente e, muitas vezes, energeticamente.

O cultivo de microalgas *Chlorococcum elbense*, bem estabelecido, ressalta a importância da padronização das condições de cultivo, para manter o padrão da análise centesimal, cujo percentual proteico quantificado pelo método de Bradford (1976) apresentou 0,932 mg de proteínas por mL de *C. elbense* utilizada. De acordo com a estratégia experimental utilizada, os ensaios de eletroforese, indicou uma ampla faixa de peso molecular entre 6,5 kDa e 66 kDa, uma grande diversidade de bandas protéicas bem coradas no extrato bruto 7.

REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. *et al.* The new higher level classification of *Eukaryotes* with emphasis on Taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S.l.], v. 52, n. 5, p. 399 – 451, 2005.
- AISHVARYA, V.; JENA, J.; PRADHAN, N.; PANDA, P. K.; SUKLA, L. B. Microalgae: cultivation and application. *In*: SUKLA, L.; PRADHAN, N.; PANDA, S.; MISHRA, B. **Environmental microbial biotechnology: Soil Biology**, v. 45, [S.l.]: Springer, 2015.
- AL-ZUHAIR, S.; ASHRAF, S.; HISAINDEE, S.; DARMAKI, N. A.; BATTAH, S.; SVISTUNENKO, D.; REEDER, B.; STANWAY, G.; CHAUDHARY, A. Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. **Engineering in Life Sciences**, [S.l.], v. 17, n. 2, p. 175 – 185, 2016.
- ANDERSEN, R. A. The biodiversity of eukaryotic algae. **Biodiv. Conserv** [S.l.], v. 1, p. 267-292, 1992.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais. **Microalgas de águas continentais: Produção de biomassa e coprodutos**. v. 2, Londrina: Eduel, 2014.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais. **Microalgas de águas continentais: Produção de biomassa e coprodutos**. v. 1, Londrina: Eduel, 2014.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 603 – 608, 2016.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? **Algal Research**, [S.l.], v. 31, p. 107 – 115, 2018.
- BOTH, S.; CHEMAT, F.; STRUBE, J. Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction, **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.l.], v. 21, n. 3, p. 1030 – 1034, 2014.
- CAPORGNO, M. P.; HABERKORN, I.; BÖCKER, L.; MATHYS, A. Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 288, 121476, 2019.
- CARVALHO, C. C. R.; CARAMUJO, M. J. **Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health**. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2017.00093/full>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- CEMBELLA, A. D.; ANTIA, N. J.; HARRISON, P. J. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part I. **Critical Reviews in Microbiology**, [S.l.], v. 10, p. 317 – 391, 1982.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v. 8, p. 194 – 204, 1986.

COELHO, D. F. *et al.*, Microalgae: cultivation aspects and bioactive compounds. **Brazilian achieves and biology and technology**, [S.l.], v. 62, p. 1 – 13, 2019.

CRAGGS, R., PARK, J., SUTHERLAND, D. *et al.* Economic construction and operation of hectare-scale wastewater treatment enhanced pond systems. **Journal of Applied Phycology**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 1913 – 1922, 2015.

D'HONDT, E. *et al.* Cell disruption technologies. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, [S.l.]: Woodhead Publishing, p. 133 – 154, 2017.

DEMURTAS, O.C. *et al.* A chlamydomonas-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 1 – 9, 2013.

DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959 – 1967, 2006.

ENZING, C. *et al.*, Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. **JRC Scientific and Policy Reports**, [S.l.], p. 1 – 78, 2014. Disponível em: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC85709/final%20version%20online%20ipts%20jrc%2085709.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 871 – 879, 2005.

GARCIA, J. M. R. *et al.* Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 112, p. 164 – 170, 2012.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of Applied Phycology**, [S.l.], v. 28, n. 2, p. 1051 – 1061, 2016.

GRESSLER, V.; STEIN, E. D. F.; FUJII, M. T.; COLEPICCOLO, P. P. E. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (*Ceramiales*, *Rhodophyta*): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 248 – 254, 2011.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **Algae Base**. Galway: World-wide electronic publication, National University of Ireland, 2019. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>> Acesso em: 27 set. 2019.

GÜRNEKEN, E. *et al.* Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 243 – 260, 2015.

HALIM, R.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development, **Applied Energy**, [S.l.], v. 91, n.1, p. 116 – 121, 2012.

KAISER, M. J. *et al.* Primary Production Processes. In: KAISER, M. **Marine Ecology: Processes, Systems, and Impacts**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2011.

LAM, M. K.; LEE, K. T. **Handbook of Marine Microalgae**. [S.l.]: Science Direct, p. 197 – 208, 2015.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, **Food Research International**, [S.l.], v. 37, n. 7, p. 731 – 738, 2004.

LI, Q. *et al.* Isolation and characterization of a sodium-dependent phosphate transporter gene in *Dunaliella viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 340, n.1, p. 95 – 104, 2006.

LIU, B. H.; LEE, Y. K. Composition and biosynthetic pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 21, n. 11, p. 1007 – 1010, 2000.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

MARTÍN, M.; GROSSMANN, I. E. On the synthesis of sustainable biorefineries. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S.l.], v. 52, n. 9, p.3044 – 3064, 2012.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 217 – 232, 2010.

MESQUITA, S. S. *et al.* Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 2, p. 672 – 688, 2017.

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganism. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 491 – 551, 1995.

MOLINO, A. *et al.* Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.l.], v. 15, n. 11, p.1 – 21. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>. Acesso em: 27 set. 2019.

OTA, M. *et al.* Effects of light intensity and temperature on hotoautotrophic growth of a green microalga, *Chlorococcum littorale*. **Biotechnology Reports**, [S.l.], v. 7, p. 24 – 29, 2015.

OTOYA, N. Oil in 20th century Brazil: energy dependence in the Second World War. **Varia História**, [S.l.], v. 34, n. 65, p. 347 – 374, 2018.

PANAHI, Y. *et al.* *Chlorella vulgaris*: a multifunctional dietary supplement with diverse medicinal properties. **Current Pharmaceutical Design**, [S.l.], v. 22, n. 2, p. 164 – 173, 2016.

PAQUOT, C. **Standard methods for the analysis of oils fats and derivatives**. 6. ed.

[S.l.]: Science Direct, 1979.

PARINYACHAT, S. B. *et al.* Use of microalgae *chlamydomonas reinhardtii* for production of double-stranded rna against shrimp virus. **Aquaculture reports**, [S.l.], v. 3, p.178 – 183, 2016.

PASSOS, F. *et al.* Algal biomass: physical pretreatments. **Pretreatment of Biomass**. Elsevier, p. 195 – 226, 2015.

PASSOS, F. *et al.* Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. **Chemical engineering journal**, [S.l.], v. 279, p. 667 – 672, 2015.

PRABAKARAN, P.; PRADEEPA, V.; SELVAKUMAR, G.; DAVID RAVINDRAN, A. efficacy of enzymatic transesterification of *Chlorococcum* sp. algal oils for biodiesel production. **Waste and Biomass**, [S.l.], v. 10, n. 7, p. 1873 – 1881, 2018.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, [S.l.], v. 53, n. 2, p. 150 – 154, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2005.

RATHA, S. K.; PRASANNA, R. Bioprospecting microalgae as potential sources of “green energy”: challenges and perspectives. **Applied biochemistry and microbiology**, [S.l.], v. 48, n. 2, p. 109 – 125, 2012.

RICCIONI, G. *et al.* Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. **Mar Drugs**, [S.l.], v. 9, n. 7, p. 1166 – 1175, 2011.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. [S.l.]: Jonh Wiley and Sons, 2013.

SANTHOSHKUMAR, K. *et al.* *Chlorococcum humicola* (Nageli) rabenhorst as a renewable source of bioproducts and biofuel. **Journal of Plant Studies**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 48 – 57, 2016.

SHANKAR, M. *et al.* Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water *Chlorella* and *Chlorococcum* microalgae. **Algal Research**, [S.l.], v. 25, p. 228 – 236, 2017.

SILVA, A. P. F. de S. **Eletroflotação não-convencional aplicada à separação e ruptura celular de microalgas: um avanço na viabilidade da geração de biodiesel**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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. Acesso em: 6 maio 2019.

SLEGGERS, P. M. **Scenario studies for algae production**. 2014. Disponível em: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/294573>. Acesso em 20 set. 2019.

SOLOVCHENKO, A. *et al.* Phosphorus from wastewater to crops: an alternative path involving microalgae. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 34, p. 550 – 564, 2016.

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

THAMMAKITI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; PHAESUWAN, T.; VERDUYN, C. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, [S.l.], v. 39, p. 21-29, 2004.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, [S.l.], v. 1, p. 3 – 19, 2004.

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotechnologia: princípios biológicos**. Zaragoza: Acribia, 1990.

VALDUGA, E., *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429 – 2436, 2009.

WAGNER, J. R.; SCENI, P.; RAMBALA, M. A. O. Ruptura celular y fraccionamiento de componentes de levadura. **Universidad Nacional de Quilmes Editorial**, v. 1, p. 215-214, 2008.

WANG, X.; ZHANG, X. Optimal extraction and hidrolisis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 126, p. 307 – 313, 2012.

WATANABE, S. *et al.* Phylogenetic interpretation of light and electron microscopic features of selected members of the phylogroup *Moewusinia* (*Chlorophyceae*), with new generic taxonomy. **Phycologia**, [S.l.], v. 56, n. 3, p. 329 – 353, 2017.

XIE, P.; HUANG, L.; ZHANG, C.; YOU, F.; ZHANG, Y. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance, **Food and Bioproducts Processing**, [S.l.], v. 93, p. 29 – 38, 2015.

YUAN, J. P. *et al.* Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 76, n. 3, p. 319 – 325, 2002.

ANEXO 1 – Composição do meio de cultura WC

Soluções	Componentes	Massa (g)	
1	CaCl ₂ * 2H ₂ O	36,8	
2	MgSO ₄ * 7H ₂ O	37,0	
3	NaHCO ₃	12,6	
4	K ₄ HPO ₄ * 3H ₂ O	11,4	
5	NaNO ₃	85,0	
6	NaSiO ₃ * 5H ₂ O	21,2	
7	Na ₂ EDTA	4,36	
	FeCl ₃ * H ₂ O	3,15	
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,01	
	MnCl ₂ * H ₂ O	0,18	
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,022	
	CoCl ₂ * H ₂ O	0,01	
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,006	
8	H ₃ BO ₃	1,0	
	Tiamina HCl	0,1	
	9	Biotina	0,0005

Todas as quantidades acima são para 1L de solução estoque. Fonte: elaborada pela autora