



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

ELIONAI GOMES FREIRE

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO E DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA MICROALGA *Synechococcus*
***nidulans* CULTIVADA EM FOTOBIOREATOR.**

FORTALEZA

2021

ELIONAI GOMES FREIRE

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO E DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA MICROALGA *Synechococcus nidulans*
CULTIVADA EM FOTOBIOREATOR.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

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

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F933a Freire, Elionai Gomes.
Atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante do extrato e das frações proteicas da microalga *Synechococcus nidulans* cultivada em fotobiorreator. / Elionai Gomes Freire. – 2023.
90 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva..
1. Extrato de *Synechococcus nidulans*. 2. Proteínas. 3. Antioxidante. 4. Antifúngica. 5. Antibacteriana.
I. Título.

CDD 660.6

ELIONAI GOMES FREIRE

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO E DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA MICROALGA *Synechococcus nidulans*
CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 30/07/2021

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Álvaro Marcos Pereira Lima Universidade
Estadual do Rio Grande do Norte (UERN)

Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte Universidade
Estadual Vale do Acaraú (UVA)

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

Aos meus pais,
exemplos de amor, perseverança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal do Ceará pela estrutura concedida na realização dos experimentos e aulas.

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

Ao prof. Bartolomeu que sempre se mostrou solícito a me prestar informações técnica e pedagógica

Aos amigos, Wallady, Vanessa e Talita pela ajuda em todos os ensaios experimentais, pela contribuição na realização deste trabalho, pelo companheirismo, pela amizade, pelas risadas e lanches compartilhados.

Ao meu amigo Fábio pela companhia no laboratório, no refeitório e nas viagens de Fortaleza para casa em Viçosa do Ceará.

A minha esposa Rebeca Siqueira Carvalho pela força nos momentos difíceis e pela compreensão de nem sempre poder está presente ao seu lado.

Ao meu amado filho, Davi Carvalho Freire, agora com um ano e oito meses de idade. Sempre foi e será para mim fonte de força e motivação para continuar me dedicando aos estudos e ao trabalho.

Aos meus pais pela ajuda em momentos difíceis e apoio nas minhas decisões.

“Quem acredita sempre alcança...”.(Renato Russo)

RESUMO

A biomassa de microalgas é útil em diversas aplicações biotecnológicas como: tratamento de águas residuais, biorremediação de compostos nocivos, biocombustível, alimentação animal e humana, produção de cosméticos e medicamentos. Diante de tanta versatilidade, o objetivo deste trabalho é avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante do extrato e das frações proteicas da biomassa microalgal de *Synechococcus nidulans*. Um pré-inóculo de *Synechococcus nidulans* foi inoculado num fotobiorreator retangular de placa planar contendo 4 L de meio de cultura NPK (formulação 20:10:20 m/m/m) em condições controlada (temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 50.000 Lux, aeração estéril e Ph 7,0). Após 30 dias de cultivo obteve-se um rendimento médio de biomassa seca de $7,12 + 1,3$ g.L⁻¹. Análise bioquímica da biomassa microalgal de *S. nidulans* apresentou 45% de proteínas, 23% de carboidratos e 12% de lipídios. A cultura foi coletada e centrifugada a $10.000 \times g$ por 30 min, a 25 °C. e a biomassa fresca resultante foi lavada com água destilada através de quatro etapas alternadas de ressuspensão e centrifugação para formar o Extrato Bruto total (EBt). Para preparar as Frações Ricas em Proteínas (FRP), volumes de 10 mL do EBt foram submetidos à precipitação de proteínas utilizando diferentes níveis de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) com sulfato de amônio. A atividade antioxidante foi determinada pela medida de capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Esse ensaio foi realizado em placas de microtitulação (de 96 poços), foram adicionados nos poços 10 µL de cada amostra testada ((EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}), nas concentrações de 100 a 1.000 µg.mL⁻¹ e 190 µL da solução metanólica de DPPH (Sigma) a 78 µM. As FRPs apresentaram uma capacidade de sequestro do radical DPPH próximo a 3,0% em baixas concentrações (100 µg.mL⁻¹) e 7,0% em altas concentrações (1000 µg.mL⁻¹), ficaram bem a quem da capacidade de EBt que foi de 16,9% e 68,0% em baixas e altas concentrações, respectivamente. A atividade antifúngica se deu pelo método de difusão em disco, utilizou-se os fungos: *Colletotrichum musae*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. 1 mg de cada amostra (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}) liofilizada foi solubilizada em tampão PBS pH 7,4 e esterilizada em filtro *Millipore* (0,22 µm). O EBt e as FRP 40-60% foram os mais eficazes no combate aos fungos apresentando os maiores halos de inibição. A atividade antibacteriana sobre as bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus* foi realizada segundo o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços. Os poços da placa foram preenchidos inicialmente com 200 µL de cada amostra (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}) e

100 µL da suspensão de cada bactéria testada na concentração de 2×10^6 UFC.mL⁻¹. A Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi mensurada através da turbidez dos poços com auxílio do leitor demicroplacas (*SpectraMax i3*) a um comprimento de onda de 620 nm. Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), 24 h depois da incubação, foram removidos 10 µL da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguido de inoculação em placas de Petri com meio TSA. O EBt e FRP 40-60% mostraram capacidade bactericida semelhantes para as bactérias do gênero *Staphylococcus*. Mas, para capacidade inibitória e bactericida somente o EBt mostrou-se eficiente. Desta forma, o extrato bruto total da biomassa de *Synechococcus nidulans* mostrou excelente resultado antioxidante, antifúngico e antibacteriano. Quanto às frações ricas em proteínas, apenas FRP 40-60% apresentaram os melhores resultados antifúngico e antibacteriano.

Palavras-chave: extrato de *Synechococcus nidulans*; proteínas; antioxidante; antifúngica; antibacteriana.

ABSTRACT

Microalgae biomass is useful in several biotechnological applications such as: wastewater treatment, bioremediation of harmful compounds, biofuel, animal and human food, production of cosmetics and medicines. Given its versatility, the objective of this work is to evaluate the antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the extract and protein fractions of the microalgal biomass of *Synechococcus nidulans*. A pre-inoculum of *Synechococcus nidulans* was inoculated in a rectangular planar plate photobioreactor containing 4 L of NPK culture medium (20:10:20 m / m / m mandatory) under controlled conditions (temperature 25 + 2 °C, photoperiod of 12 h, luminous intensity of 50,000 Lux, sterile aeration and Ph 7.0). After 30 days of cultivation, an average dry biomass yield of 7.12 + 1.3 g.L⁻¹ was obtained. Biochemical analysis of microalgal biomass of *S. nidulans* presenting 45% proteins, 23% carbohydrates and 12% lipids. The culture was collected and centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 25 oC. and the resulting biomass was washed with distilled water through four alternating steps of resuspension and centrifugation to form the total Crude Extract (EBt). To prepare the High Protein Fractions (FRP), 10 mL volumes of EBt were topped up to protein using different saturation levels (0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%) with sulphate. ammonium Antioxidant activity was determined by measuring the DPPH radical scavenging capacity (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl). This assay was performed in microtiter plates (96-well), 10 µL of each tested sample were added to the wells ((EBt, FRP0-20%, FRP20-40%, FRP40-60% and FRP60-80%), in the concentrations of 100 to 1,000 µg.mL⁻¹ and 190 µL of the methanolic solution of DPPH (Sigma) at 78 µM. The FRPs showed a DPPH radical scavenging capacity close to 3.0% at low concentrations (100 µg.mL⁻¹) and 7.0% at high concentrations (1000 µg.mL⁻¹) , were well suited to the EBt capacity which was 16.9% and 68.0% at low and high concentrations, respectively. Antifungal was performed by the disk diffusion method, using the fungi: *Colletotrichum musae*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*. 1 mg of each sample (EBt, FRP0-20%, FRP20-40%, FRP40 -60% and FRP60-80%) lyophilized was solubilized in PBS buffer pH 7.4 and sterilized in a Millipore filter (0.22 µm).The EBt and FRP 40-60% were the most effective in combating fungi, presenting the bigger inhibition halos. The antibacterial activity on *S. epidermidis* and *S. aureus* bacteria was performed according to the broth microdilution assay, in 96-well polystyrene plates. The plate wells were initially filled with 200 µL of each sample (EBt, FRP0-20%, FRP20-40%, FRP40-60% and

FRP60-80%) and 100 μ L of the suspension of each bacteria tested at a concentration of 2×10^6 CFU \cdot mL⁻¹. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was measured through the turbidity of the wells with the aid of a microplate reader (SpectraMax i3) at a wavelength of 620 nm. To determine the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), 24 h after incubation, 10 μ L of the solution contained in the wells that did not show microbial growth were removed, followed by inoculation in Petri dishes with TSA medium. EBt and FRP 40-60% showed similar bactericidal capacity for bacteria of the *Staphylococcus* genus. However, for inhibitory and bactericidal capacity, only EBt proved to be efficient. Thus, the total crude extract from the biomass of *Synechococcus nidulans* showed excellent antioxidant, antifungal and antibacterial results. As for the protein-rich fractions, only FRP 40-60% showed the best antifungal and antibacterial results.

Key words: *Synechococcus nidulans* extract; proteins; antioxidant; antifungal; antibacterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A:	Reator tipo Raceway instalação real	18
Figura 1 - B:	Esquema de um reator tipo Raceway	18
Figura 2 -	Exemplos de diferentes tipos de biorreatores em sistemas fechado ...	19
Figura 3 -	Fotomicroscopia de <i>Synechococcus nidulans</i> ; a fotografia mostra a forma irregular das células (setas vermelhas) e as células de <i>S.nidulans</i> cercadas por outras cianobactérias. Barra de escala: 5 μm ..	27
Figura 4 -	Preparação do pré-inóculo da microalga <i>S. nidulans</i> em fotobiorreator cilíndrico	31
Figura 5 -	Cultivo de microalga <i>S. nidulans</i> em fotobiorreator retangular de placa planar	32
Figura 6 -	Esquema de disposição dos discos com as amostras (A) para avaliação da atividade antifúngica via pelo método de difusão em disco com a medida de halos de inibição (B)	41
Figura 7 -	Esquema de distribuição das amostras (EBt, FRP0-20%, FRP20-40%, FRP40-60% e FRP60-80%) de <i>S. nidulans</i> na placa de microtitulação para avaliação da atividade antibacteriana	43
Figura 8 -	Curva de crescimento da <i>S. nidulans</i> em fotobiorreator fechado, sob condições controladas. A concentração de células no primeiro momento foi de $5,8 \times 10^3$ células.mL ⁻¹ . As barras de erro representam a variação na determinação da amostra	46
Figura 9 -	Concentração de clorofila a avaliada durante os diferentes dias de crescimento da microalga da <i>S. nidulans</i> em fotobiorreator fechado. As barras de erro representam a variação na determinação da concentração	48
Figura 10 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%) do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i> . MM: marcadores moleculares (fosforilase 97 KDa; albumina bovina 67 KD; ovalbumina 45 KDa; anidrase carbônica 30 KDa; mioglobina 18 KDa e citocromo c 14 KDa)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise elementar da biomassa microalgal de <i>S. nidulans</i> com basena massa seca	49
Tabela 2 -	Determinação da concentração de proteínas solúveis totais do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) obtidos a partir da biomassa microalgal de <i>S. nidulans</i>	12
Tabela 3 -	Análise da atividade antioxidante do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i> via a capacidade de sequestro do DPPH	54
Tabela 4 -	Resultados da atividade antifúngica do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i> aos fungos da espécies <i>C. musae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. kefir</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumifatu</i>	56
Tabela 5 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i> contra cepas bacterianas do gênero <i>Staphylococcus</i>	58

LISTA DE ABREVIATURA

NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ VO ₃	Vanadato de amônia
NiSO ₄	Sulfato de Níquel
Nm	Nanômetro
Nº	Número
NPK	Nitrogênio-Fósforo-Potássio
NT	Nitrogênio Total
°C	Graus Celsius
P	Peso
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
Rad p/s	radiano por segundo
Rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TiSO ₄	Sulfato Titânio
TRIS	Ttris(hidroximetil)aminometano
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo soja tripticaseína
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V	Volume
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco
Mm	Micrômetro
%	Por cento
C	Cinzas
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Microalgas: conceitos e características gerais	17
2.2	Cultivo de microalgas	18
2.2.1	<i>Sistemas de cultivo</i>	18
2.2.2	<i>Formas de condução de cultivo</i>	20
2.2.3	<i>Parâmetros de cultivo</i>	20
2.3	Produção nacional e global de microalgas	23
2.4	Compostos bioativos das microalgas e suas atividades biológicas	24
2.5	Aplicações biotecnológicas de microalgas	25
2.6	Microalgas do gênero <i>Synechococcus</i>	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS	31
4.1	Microalga <i>Synechococcus nidulans</i>	31
4.2	Fungos e Bactérias	31
4.3	Reagentes	31
5	MÉTODOS	32
5.1	Cultivo da microalga <i>S. nidulans</i> em fotobiorreatores fechados	32
5.2	Curva padrão de crescimento da microalga <i>S. nidulans</i>	33
5.3	Obtenção da biomassa microalgal <i>S. nidulans</i> para preparação do extrato proteico	34
5.4	Análise elementar da biomassa microalgal <i>S. nidulans</i>	34
5.4.1	<i>Umidade</i>	34
5.4.2	<i>Cinzas</i>	35
5.4.3	<i>Proteínas totais</i>	35
5.4.4	<i>Lipídeos totais</i>	36
5.4.5	<i>Carboidratos totais</i>	37
5.4.6	<i>Fibra bruta</i>	37
5.4.7	<i>Análise da clorofila a</i>	38
5.5	Lise celular e preparação do extrato bruto total	38

5.6	Preparação das frações proteica.....	39
5.6.1	<i>Dosagem de proteínas solúveis do extrato proteico total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRP) obtidas da S. nidulans</i>	39
5.7	Análise eletroforética do EBt e das FRP de <i>S. nidulans</i>	39
5.8	Atividade antioxidante do EBt e das FRP de <i>S. nidulans</i>	40
5.9	Atividade antifúngica do EBt e das FRP de <i>S. nidulans</i>	41
5.9.1	<i>Condições do cultivo dos fungos</i>	41
5.9.2	<i>Ensaio de atividade antifúngica utilizando o método de difusão em disco</i>	42
5.10	Atividade antibacteriana	43
5.10.1	<i>Condições da cultura</i>	43
5.10.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	43
5.11	Análises estatísticas	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
6.1	Cultivo e produção da biomassa microalgal de <i>S. nidulans</i>	46
6.2	Curva de crescimento da microalga <i>S. nidulans</i>	47
6.3	Análise da clorofila a durante o crescimento da <i>S. nidulans</i>	49
6.4	Análise elementar da biomassa microalgal de <i>S. nidulans</i>	50
6.5	Determinação de proteínas solúveis totais do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i>	52
6.6	Análise eletroforética do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i>	54
6.7	Atividade antioxidante do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i>	56
6.8	Atividade antifúngica do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i>	57
6.9	Atividade antibacteriana do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de <i>S. nidulans</i>	60
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A - CADASTRO NO MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE	72
	ANEXO B – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A *Synechococcus nidulans* é uma microalga pertencente ao grupo das cianobactérias, portanto, um organismo procarioto fotossintético. Semelhante aos vegetais, seu principal pigmento fotossintético é a clorofila **a**, além dos pigmentos acessórios como as ficobiliproteínas. Apresentam bom crescimento em locais aquáticos bem iluminados como nas regiões fóticas dos oceanos e rios; além do mais, suas células são geralmente muito mais abundantes em ambientes ricos em nutrientes. (BENCHRAKA, 2014)

O cultivo de microalgas apresenta uma grande versatilidade, pois pode ser feito em grandes espaços com milhões de litros de água como nos oceanos ou em pequenos espaços com poucos litros de água em biorreatores de laboratório.

A vantagem do cultivo em locais maiores como em lagos ou tanques rasos é o baixo custo da produção e uma maior quantidade de biomassa produzida, porém sem muito padrão de qualidade. Em biorreatores a desvantagem consiste no alto custo da produção, no entanto, é possível selecionar microalgas de maior interesse, aumentar a produtividade algal em curto tempo e controlar a produção de determinado bioativo levando em consideração os parâmetros de cultivo. Estes parâmetros de cultivo incluem alguns fatores como: CO₂, intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação do meio (MIAO, 2004; TREDICI, 2004).

Sobre os parâmetros de cultivo estes são específicos para cada espécie de alga e para o tipo de bioativo que se espera produzir. Por exemplo, ao analisarem os efeitos da concentração de CO₂ no rendimento em biomassa da *Chlorella sp* concluíram que o aumento na concentração de CO₂, entre 10 e 20%, exerceu efeito negativo no crescimento microalgal. Porém, ao avaliar o efeito do CO₂ na produção lipídica de *Chlorella vulgaris*, constatou que a máxima produtividade em lipídios totais foi alcançada quando utilizou-se 10% de CO₂ (ZHAO *et al.*, 2015).

Os fotobiorreatores são normalmente painéis iluminados artificialmente de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato onde se cultivam microalgas. Podem ser classificados em “tubulares” e “planares”, de acordo com a geometria do compartimento que encerra a cultura. Neste tipo de sistema as microalgas têm menos contato com o ambiente externo em relação ao sistema de cultivo aberto (HALLMANN, 2015).

As aplicações biotecnológicas das microalgas apresentam-se como um leque de

muitas possibilidades. Historicamente, as algas servem de fonte nutricional para muitos animais inclusive para o homem, pois constitui uma excelente fonte de carboidratos, proteínas e lipídeos. Uma variedade cada vez maior de espécies de microalgas tem-se cultivado para obter compostos considerados nutracêuticos, alimentos com propriedades terapêuticas, dentre eles estão os ácidos graxos poliinsaturados, eicosapentaenóico e o ácido docosaheptaenóico (GILL *et al.*, 1997; TRIPATHI *et al.*, 1999).

A biotecnologia de microalgas também demonstra versatilidade em outros setores como no tratamento de efluentes, biorremediando metais pesados, fonte de matéria-prima para produção de ração, corantes naturais, fertilizantes e inclusive por reduzir a concentração de CO₂ atmosférico, um dos gases do efeito estufa.

Quanto as cianobactérias, um grupo de microalgas com cerca de 2800 espécies, exercem diversas funções nos ambientes aquáticos, são produtores das cadeias alimentares aquáticas, fazem a fixação do nitrogênio e em algumas situações produzem substâncias consideradas tóxicas (HOWARTH *et al.*, 1988; FIORE *et al.*, 2005; EHRENREICH *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, pesquisadores observaram o potencial de algumas cianobactérias na produção de substâncias com propriedades antibióticas e antifúngicas. Tal propriedade tem despertado muito interesse por pesquisadores em biotecnologia na busca de espécies de cianobactérias com capacidade antibiótica, bem como, avaliar o uso desses organismos em outras aplicações de interesse comercial (SINGH *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012).

Alguns pesquisadores têm relatado as vantagens do uso dos antibióticos de cianobactérias como a facilidade de extração dessas substâncias que pode ser feita por solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona, entre outros sem comprometer as propriedades ou a qualidade do produto. Além do mais, testes comparativos dos antibióticos extraído de cianobactérias com o de outros organismos revelaram que a atividade antimicrobiana destas é mais consistente (MADHUMATHI *et al.*, 2011; BIONDI *et al.*, 2008; HAMEED, 2013).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante dos extratos da cianobactéria *Synechococcus nidulans* cultivada em fotobiorreator.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microalgas: conceitos e características gerais

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes podendo existir em grupos ou como organismos independentes. Em sua maioria são autotróficos onde utilizam a energia luminosa como fonte de energia e nutrientes inorgânicos para sintetizar suas substâncias de reserva como carboidratos, lipídeos e proteínas. Existem algumas espécies que podem crescer em meios heterotróficos ou mixotróficos (MARKOU *et al.*, 2014).

O termo microalgas não tem valor taxonômico e inclui uma enorme variedade de microrganismos, mas é utilizado comumente para aqueles que possuem clorofila **a** e outros pigmentos fotossintéticos capazes de realizar fotossíntese. A sistemática desses organismos é complexa e considera uma série de critérios (HOEK *et al.*, 1995; RAVEN *et al.*, 2001).

A classificação desses microrganismos considera os tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e os constituintes da parede celular. Além destes deve-se considerar também os aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e a divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear; além desses, técnicas de biologia molecular também devem ser empregadas (HU, 2004; TOMASELLI, 2013).

Com a denominação microalgas estão incluídos organismos com dois tipos de estruturas celulares: estrutura procariótica, com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; e estrutura celular eucariótica, Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta, (HOEK *et al.* 1995).

As microalgas podem ser encontradas nos mais diversos ecossistemas: marinho, dulcícola e terrestre, respondendo por pelo menos 60% da produção primária da Terra. Estima-se existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade reflete uma vasta composição bioquímica, portanto, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (CHISTI, 2004; NORTON *et al.*, 1996; PULZ e GROSS, 2004).

Os metabólitos derivados das microalgas apresentam uma infinidade de aplicações que vão desde a alimentação humana e animal, biocombustível, passando pelas

áreas de cosméticos e farmacêuticos. No entanto, algumas espécies sintetizam compostos que podem ser altamente tóxicos para outras espécies de organismos, inclusive para o homem (TEIXEIRA, 2002).

2.2 Cultivo de microalgas

Para cultivar microalgas devem-se considerar os fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada e a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento da alga. Quanto aos fatores físico-químicos, considera-se como mais importante, a iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (DERNER, 2006).

Os meios de cultivo para o crescimento das microalgas pode ser água de lagoa, rio, mar ou um meio preparado com todo controle físico e químico. Existem os meios de culturas considerados alternativos, alguns já utilizados a mais de meio século que incluem: esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores, lodo digerido, despejos industriais purificados, vinhaça de cana-de-açúcar, águas residuais da produção de azeite de oliva e resíduos da suinocultura (RODRIGUES, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2001; TRAVIESO *et al.*, 2006).

O cultivo de microalgas apresenta muitas vantagens, por se tratar de um organismo fotossintetizante a alga utiliza a luz solar como principal fonte de energia para produzir sua biomassa tornando seu cultivo de baixo custo; se destacam também por produzir uma rápida quantidade de biomassa em pouco tempo devido seu curto ciclo de vida.

Diferentemente das plantas que apresentam diferenciação celular em seus tecidos e órgãos e podem apresentar substâncias acumuladas em diferentes células, uma população de microalgas consegue produzir uma mesma substância de interesse em todas as suas células de maneira uniforme; produtos bioquímicos de interesse comercial encontrados nas plantas podem ser facilmente encontrados nas algas, visto que estas evoluíram das algas; o ciclo de vida das algas marinhas se completa em poucas horas o que facilita a escolha de cepas para melhoramento.

2.2.1 Sistemas de cultivo

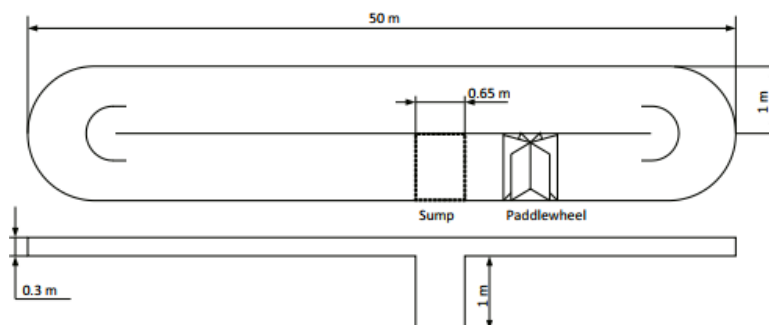
As microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. O sistema de cultivo aberto é pouco sofisticado, uma vez que o cultivo se desenvolve a céu aberto, em condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle destes parâmetros ambientais.

Os arranjos dos reatores abertos utilizados em indústrias podem ser tanques retangulares ou circulares do tipo *raceway*, (Figura 1A e 1B). O cultivo de microalgas nestes reatores abertos são realizados, normalmente, em locais próximos às indústrias com alta descarga de gás carbônico (SU et al., 2017; SA et al., 2014).

Figura 1 – A: Reator tipo Raceway instalação real.



Figura 1 - B: Esquema de um reator tipo Raceway .



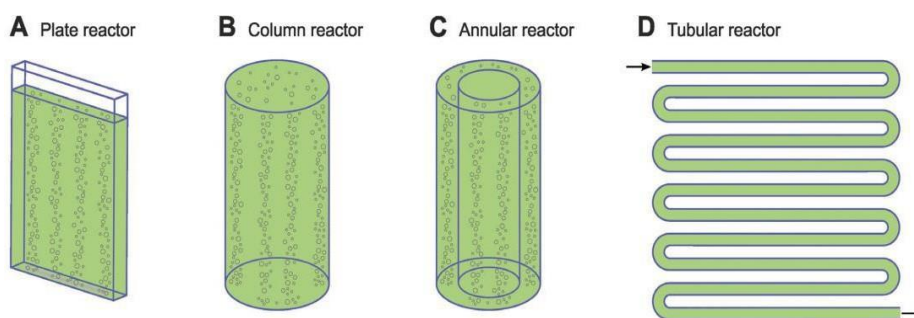
Fonte: (PAWLOWSKI et al., 2015)

O cultivo aberto também pode utilizar lagoas ou tanques abertos, a luz solar e o CO₂ da atmosfera. Os tanques normalmente são de cimento com baixa profundidade e sem tampa; oferecem muitas vantagens, desde que sejam utilizadas espécies adequadas para este tipo de cultivo (MATA, 2010).

No sistema fechado, as microalgas têm menos contato com o ambiente externo. São desenvolvidos em equipamentos específicos, denominado fotobiorreatores, visando alcançar elevada produtividade.

Os fotobiorreatores são normalmente painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (figura 2). Nos sistemas fechados são utilizados, luzes fluorescentes e gás carbônico borbulhado através de tubos ou compressores de ar. Normalmente apresentam formatos tubulares transparentes com diâmetro de 20 cm para absorção de luz. Esses sistemas tem a desvantagem devido ao custo de construção e luzes fluorescentes, além do alto custo de construção e operação destes sistemas (SU et al., 2017)

Figura 2 - Exemplos de diferentes tipos de biorreatores em sistemas fechado



Fonte: (HALLMANN; HALLMANN, 2016)

Em resumos, a vantagem do cultivo no sistema aberto é o baixo custo com seu manejo, porém não é possível exercer um controle sobre o crescimento populacional das microalgas ou sobre o tipo de substâncias que serão produzidas. Em fotobiorreatores, é possível controlar o crescimento populacional das algas e a produção de substâncias de interesse comercial; porém com custos maiores que no sistema aberto (TREDICI, 2004).

2.2.2 Formas de condução de cultivo

As microalgas podem ser cultivadas nos modos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, a diferença entre estas formas de cultivo está na fonte de energia e de carbono.

O cultivo autotrófico, mais especificamente, fotoautotrófico, as células obtêm energia da luz e o carbono do CO₂ atmosférico produzindo através da fotossíntese suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (FRANCO *et al.*, 2009). No cultivo heterotrófico, as células utilizam os compostos orgânicos do meio de cultivo como fonte de energia e de carbono. Já em cultivo mixotrófico as microalgas tanto usam a luz como fonte de energia e ou a energia de reações envolvendo compostos orgânicos e inorgânicos; a fonte de carbono tanto pode ser de compostos orgânicos como do CO₂ atmosférico (JIANG *et al.*, 1999).

O cultivo autotrófico é interessante porque diminui a quantidade de CO₂ atmosférico, um dos gases do efeito Estufa. Esse cultivo é bastante recomendado para usinas que queimam combustível fóssil ou carvão mineral liberando uma grande quantidade de dióxido de carbono. Apesar de sua alta eficiência em utilizar a luz, as microalgas em cultivo autotrófico apresentam um crescimento lento devido à limitação de luz em condições de larga escala, quando se alcançam altas densidades de células, ou “fotoinibição” devido à luz excessiva, efeito da foto-oxidação (FRANCO *et al.*, 2009).

O crescimento heterotrófico, por outro lado, elimina o requerimento por luz e oferece a possibilidade de aumentar significativamente a concentração celular e a produtividade de biomassa em larga escala (GARCÍA *et al.*, 2000).

Um fator positivo para fins comerciais associadas ao cultivo heterotrófico e mixotrófico é a possibilidade de se aumentar a produtividade em biomassa e em lipídeo. Por outro lado, a desvantagem dessa forma de cultivo é a utilização de fontes de carbono orgânico que traz preocupação acerca de uma possível competição pelo uso destas matérias-primas, voltadas também para a alimentação humana. Convém ressaltar também que no modo heterotrófico somente algumas microalgas são capazes de crescer sem que seja feita alguma manipulação genética (FRANCO *et al.*, 2009)

2.2.3 Parâmetros de cultivo

A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza fisiológica de cada espécie microalgal, mas depende também dos parâmetros de fatores como, CO₂, intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação (MIAO e WU,

2004). Como exemplo, Moazami e Franco investigaram a produção em larga escala de *Nannochloropsis sp.*, em lagoas abertas de 2000 L de capacidade em ambiente coberto. Como um dos parâmetros que mais influenciaram a produtividade em biomassa e o teor de lipídeos em tanques de lagoas abertas foi a distribuição uniforme dos nutrientes e do CO₂. Os parâmetros meio de crescimento, iluminação, pH, nível de água e temperatura foram mantidos constantes. A produtividade máxima em biomassa (46 g.L⁻¹.m⁻²) e maior teor de lipídeos (52%) foram alcançados após 14 dias e com velocidade das pás de 2,1 rad.s⁻¹ (FRANCO *et al.*, 2009).

A luz é importantíssima para o crescimento das microalgas porque é a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa. A luminosidade atua sobre enzimas influenciando a síntese de proteínas. Porém, o excesso de luz pode provocar efeito letal nas células pela formação de peróxido de hidrogênio. Esta reação é conhecida como foto-oxidação ou morte fotooxidativa (RUYTERS, 1984; UMINO *et al.*, 1991; HIRAYAMA *et al.*, 1996; LACAZ-RUIZ, 1996).

O pH é outro fator importante no processo de cultivo, deve variar de neutro a alcalino para a maioria das espécies de microalgas. Quanto a temperatura, ela pode influenciar o crescimento celular e a composição química das microalgas. Células da microalga *Chlorella*, por exemplo, quando são cultivadas em temperatura entre 25 e 35 °C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos aumenta (RAVEN, 1990; OGBONNA e TANAKA, 1996).

A agitação da cultura facilita o acesso às microalgas dos fatores essenciais relacionados à produção de biomassa microalgais. A agitação da cultura, em meio líquido, também favorece as células em suspensão e evita que algumas células fiquem depositadas no fundo do fotobiorreator e outras permaneçam na superfície recebendo luz em excesso. Além dessas vantagens, a agitação evita a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (BECKER *et al.*, 1994).

O dióxido de carbono é a fonte principal de carbono utilizada pelas microalgas e vegetais para sintetizar suas estruturas constituintes, bem como, as suas diversas substâncias de reserva, porém quando empregado acima de 10% ocorre inibição do crescimento algal em algumas espécies (ROUND, 1983).

Ao analisarem os efeitos da concentração de CO₂ no rendimento em biomassa da *Chlorella sp.*, cultivada em reatores do tipo colunas de bolhas, chegaram à conclusão de que o aumento na concentração de CO₂ entre 10% e 20%, exerceu efeito negativo no crescimento microalgal. Porém, ao avaliar o efeito do CO₂ na produção lipídica de *Chlorella vulgaris*,

constatou que a máxima produtividade em lipídios totais foi alcançada quando utilizou-se 10% de CO₂. Portanto o parâmetro CO₂ vai depender da espécie de alga cultivada e quanto se espera na produção de biomassa, no seu teor de lipídeo e até na composição dos ácidos graxos. (ZHAO *et al.*, 2015).

Nitrogênio é um elemento importante para o metabolismo das microalgas e contribui para a formação das proteínas. A redução na quantidade de nitrogênio no meio possibilita as microalgas a sintetizarem lipídios e carboidratos preferencialmente (RIGANO *et al.*, 1998).

Aumentando-se a concentração de nitrogênio no meio de cultura pode elevar o teor de clorofila na biomassa microalgal. A concentração de nitrogênio também afeta outros compostos das microalgas. Conforme experimento realizado, o teor lipídico de diversas espécies de microalgas aumentou de duas a três vezes após quatro e nove dias na ausência de nitrogênio (SHIFRIN e CHISHOLM, 1981).

O fósforo é tão importante que pequenas quantidades no meio de cultura podem limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas. Por exemplo, o cultivo de *Chlorella*, contendo 0,25 mg.L⁻¹ de fosfato apresentou 15,7% de proteína. Entretanto, com a elevação da concentração de fosfato para 0,50 mg.L⁻¹ a quantidade de proteína alcançou 37%. Assim, a quantidade de K₂HPO₄ influencia a concentração de proteína (ROUND, 1983; MAHASNEH, 1997). Em contrapartida, a carência de fosfato no meio produz aumento no teor de lipídios na composição da biomassa seca. O fósforo também atua como transportador de substratos ou energia química, pois faz parte dos ácidos nucleicos e das membranas (ROCHE *et al.*, 1993; SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

2.3 Produção nacional e global de microalgas

Empresas localizadas nos mais diversos continentes cultivam microalgas em escala industrial para obtenção e comercialização de biomassa e bioativos. Empresas nos Estados Unidos (Martek/Omegatech, Cyanotech, MERA), Canadá (OceanNutrition), França (InnovalG), Áustria (Panmol/Madaus) e Alemanha (Nutrinova/Celanese) tem se dedicado ao comércio de bioativos extraído de microalgas com finalidades terapêuticas há mais de uma década (DERNER; 2006).

A produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada por poucas empresas localizadas no litoral de Santa Catarina e nos Estados da Região Nordeste que produzem a biomassa e a empregam principalmente na alimentação de

organismos como camarões e moluscos marinhos. Embora tenha abundância na matéria prima e condições climáticas favoráveis, percebe-se que o Brasil precisa progredir na área de purificação de bioativos extraído de algas com interesse comercial (DERNER; 2006).

Portanto, as microalgas por serem organismos de fácil cultivo com crescimento rápido em curto tempo é uma ótima ferramenta para produzir diversas substâncias de interesse comercial, visto que as demandas para suprir os interesses do comercio mundial é crescente e visa cada vez mais tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas na obtenção de seus produtos.

2.4 Compostos bioativos das microalgas e suas atividades biológicas

Os compostos bioativos naturais extraídos das microalgas incluem: isolados proteicos, polissacarídeos, ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos carotenóides, vitaminas, esteróis e outros (BECKER, 2004; DERNER *et al.*, 2006).

As proteínas de algumas algas são consideradas ricas fontes de aminoácidos que podem ser utilizadas na alimentação humana. Há relatos que povos africanos da cidade de Chade e astecas do lago Texcoco no México utilizam biomassa de *Spirulina sp* na alimentação a bastante tempo (RICHMOND 2013).

As proteínas de *Spirulina platensis* apresentam avaliações nutricionais que revelam alta qualidade, comparável às proteínas vegetais, mas com conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, aminoácido ausente na maioria das outras microalgas (BERTOLDI ,2008)

As ficobiliproteínas são pigmentos coloridos os quais funcionam como um receptor de luz para a fotossíntese. Ficocianina, um corante natural, é um tipo de ficobiliproteína encontrado em microalgas é comumente aplicada na indústria de alimentos e de cosméticos. Estudos tem demonstrado que este biopigmento também pode apresentar atividade anti-inflamatória, antioxidante e propriedades anticânceres (ABALDE *et al.*, 1995).

Alguns peptídeos bioativos de microalgas têm recebido muita atenção devido aos seus benefícios na área de saúde e sua atividade biológica, podendo apresentar atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), antiproliferativo, anticoagulante, antidiabética e antiobesidade (BETORET *et al.*, 2011; RAJANBABU; WHEN, 2011; NAJAFIAN,

2012; VO *et al.*, 2013).

Os carboidratos das microalgas de atividade estrutural estão na composição da parede celular externa das microalgas e variam entre espécies, estas contêm geralmente polissacarídeos específicos como pectina, ágar e alginatos.

A parede celular interna é composta principalmente pelo polissacarídeo celulose e outros como hemicelulose e glicoproteínas. O amido é o principal polissacarídeo de reserva das microalgas e junto com os carboidratos da parede celular, podem ser hidrolisados a monossacarídeos para subsequente fermentação (CHEN *et al.*, 2013; MARTÍN-JUÁREZ *et al.*, 2017).

Os óleos produzidos pelas microalgas são ricos em ácidos graxos insaturados e poliinsaturados e inclui algumas cadeias de ácidos graxos que podem apresentar até quatro ligações duplas. Por exemplo, o consumo de ω -3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão (SALEM, 1999; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

As microalgas possuem pigmentos de considerável utilidade ao homem precisamente o betacaroteno, considerada uma provitamina A, e astaxantina, os quais possuem ação antioxidante. Os carotenoides também funcionam como fotoprotetores utilizados na proteção da pele contra radiações solares. Além disso, estudos comprovam sua ação preventiva contra doenças degenerativas, no combate aos radicais livres, estimulando o sistema imunológico e evitando o surgimento do câncer. Certas espécies podem conter até 60 tipos de carotenoides em suas células e muitas podem acumular grande quantidade destes (PULZ; GROSS, 2004; DERNER; 2006).

2.5 Aplicações biotecnológicas de microalgas

A produção de suplementos alimentares é a principal aplicação biotecnológica das microalgas através de técnicas de cultivo ou por engenharia genética algumas espécies de microalgas podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos e lipídios. As microalgas mais utilizadas com o objetivo de produzir esses suplementos e de extrair substâncias com valor nutricional comercial incluem as espécies dos gêneros *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella* e *Dunaliella* (BECKER, 2004).

Existem também estudos sobre os efeitos da ingestão de pequenas quantidades de biomassa algal, entre elas, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina*, que podem afetar de forma

positiva a fisiologia de animais induzindo resposta imune não-específica e auxiliando o sistema imunológico (BELAY, 1993). Neste sentido, várias espécies de microalgas vêm sendo cultivadas visando a obtenção de compostos considerados nutracêuticos, alimentos com propriedades terapêuticas, dentre eles estão os ácidos graxos poliinsaturados, eicosapentaenóico e o ácido docosaheptaenóico (GILL e VALIVETY, 1997; TRIPATHI *et al.*, 1999).

A biomassa e os extratos microalgal estão ganhando destaque no mercado mundial nos últimos anos. O aumento na demanda dos produtos de origem algal deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes, proteínas imunológicas e compostos virostáticos (COHEN, 1999).

As técnicas de cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* geraram o desenvolvimento de processo para extração de um corante natural com alto valor agregado, astaxantina. Esse corante tem sido utilizado na formulação de rações para peixes aumentando significativamente a coloração dos músculos de salmões; este produto tornou-se de grande interesse comercial por criadores de salmão uma vez que se utilizava de corantes artificiais para valorizar a carne do salmão (PICCARDI *et al.*, 1999).

Considerando aspectos relacionados à cadeia alimentar, as microalgas são de fundamental importância na aquicultura e especialmente na maricultura. Constituem a fonte alimentar das larvas de várias espécies de crustáceos, moluscos e peixes (LAVENS e SORGELOOS, 1996).

Algas autótrofas diminuem o efeito estufa provocado pelo acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera liberados com a queima de combustível fóssil. Essas algas retiram o CO₂ do ar e utilizam na fotossíntese produzindo o O₂ tão necessário para a existência de vida em nosso planeta. As microalgas marinhas são responsáveis pela maior taxa de fotossíntese em nosso planeta.

A biotecnologia de microalgas também demonstrou versatilidade em outros setores, podendo atuar no tratamento de efluentes, biorremediando metais pesados, nitrogênio e fósforo que podem causar eutrofização quando descartados diretamente nos rios. A biomassa obtida nessa biorremediação pode servir como fonte de matéria-prima para produção de ração, fertilizantes, e até mesmo ser utilizada na indústria de química fina (DE LA NOÛE e DE PAUW, 1988).

Os ácidos graxos consistem em uma grande riqueza nesses organismos a quantidade desta substância pode chegar a 40% do seu peso seco e em determinadas condições a 85%. Esse fato tem despertado o interesse biotecnológico das microalgas na

produção de biodiesel, um tipo de combustível renovável e menos poluente que o combustível fóssil (BECKER, 2004).

Diante deste esboço, concluímos que as microalgas são organismos de grande interesse pela biotecnologia, um ramo da ciência que procura aplicar derivados de organismos e às vezes o próprio organismo em produtos ou processos que são de interesse pela sociedade humana.

2.6 Microalgas do gênero *Synechococcus*

As microalgas do gênero *Synechococcus* podem ser descritas pequenas célula cilíndrica, fotossintetizante e procarionte que compõem o plâncton de água doce e marinha, são encontradas em superfícies de algas e até sobre plantas (BENCHRAKA, 2014). Elas apresentam paredes celulares altamente estruturadas podendo apresentar projeções em sua superfície. A microscopia eletrônica frequentemente revela a presença de inclusões de fosfato, grânulos de glicogênio e, mais importante, carboxissomos altamente estruturados (PERKINS *et al.*, 1981).

Algumas espécies desse gênero são móveis, mas não apresentam flagelos e possivelmente apresentam um método de deslizamento. Muitas são capazes de crescimento foto-heterotrófico e ou quimio-heterotrófico, mas todas as cepas marinhas de *Synechococcus* parecem ser fotoautotróficos obrigatórios e são capazes de suportar suas necessidades de nitrogênio usando nitrato, amônia ou, em alguns casos, ureia como única fonte de nitrogênio (CASTENHOLZ, 1982; WATERBURY *et al.*, 1986).

O principal pigmento fotossintético em microalgas do gênero *Synechococcus* é a clorofila a, enquanto seus principais pigmentos acessórios são a ficobiliproteína. Existem quatro ficobilinas comumente reconhecidas são ficocianina, aloficocianina, aloficocianina B e ficoeritrina (BENCHRAKAC, 2014).

Já foi relatado a ocorrência de microalgas do gênero *Synechococcus* em regiões da zona eufótica oceânica. No entanto, geralmente elas são mais abundantes em ambientes ricos em nutrientes do que no oceano oligotrófico e preferem a parte superior e bem iluminada da zona eufótica. Outro ambiente onde espécies desse gênero se desenvolvem particularmente bem são as plumas costeiras dos rios. Essas plumas são enriquecidas na costa com nutrientes como nitrato e fosfato, que levam a grandes florações de fitoplâncton (WATERBURY *et al.*, 1986; WAWRIK *et al.*, 2003).

Os fatores que controlam a abundância de microalgas do gênero *Synechococcus*

não são precisos, porém nas regiões mais pobres em nutrientes a abundância de células costuma ser muito baixa, as taxas de crescimento populacional dessas microalgas são frequentemente altas e não drasticamente limitadas, apesar das incertezas, provavelmente existe uma relação entre as concentrações ambientais de nitrogênio e a abundância de espécies (BLANCHOT *et al.*, 1992; F. PARTENSKY, 1999)

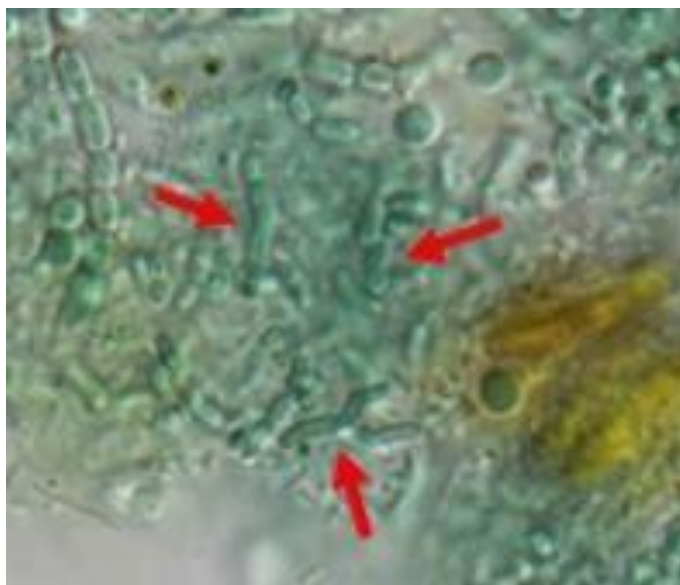
2.6.1 *Características da microalga Synechococcus nidulans*

A espécie *S. nidulans* tem suas células isoladas de formato cilíndrico, curvo ou sigmoide. Tem aproximadamente 3 µm de comprimento por 2 µm de largura. Não possui envelope mucilaginoso e tem conteúdo citoplasmático bem homogêneo (figura 1).

Quanto a sua reprodução é assexuada por fissão binária e o crescimento das células- filha atinge o tamanho da célula original antes de outra divisão. Habitam ambientes aquáticos e subaéreos, principalmente, plâncton, metafíton em superfícies rochosas (SAN'TANNA *et al.*, 2012).

Estudos isolados com microalgas marinhas dos gêneros *Synechocystis* e *Synechococcus* evidenciaram que espécies desses gêneros produziram substâncias com efeitos inibidores sobre organismos procariontes, inibindo bactérias Gram-positivas, e com atividade apoptótica frente células eucariontes tornando este organismo promissor inclusive para o tratamento do câncer (MARTINS *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2011)

Figura 3 - Fotomicroscopia de *Synechococcus nidulans* ; a fotografia mostra a forma irregular das células (setas vermelhas) e as células de *S.nidulans* cercadas por outras cianobactérias. Barra de escala: 5 µm



Fonte: Yim BC (2018)

Muitos pesquisadores têm usado a espécie *S. nidulans* na obtenção de bioprodutos como antibióticos e bioplástico, além de existir muitos trabalhos que mostram o bom desempenho da espécie nas áreas de biorremediação de ambientes aquáticos, alguns casos contaminados com elementos altamente radioativos.

As microalgas *S. nidulans* tem grande potencial biotecnológico por possuir substâncias antimicrobianas acumuladas em seu citoplasma que agem sobre vários microrganismos, tanto procariotos quanto eucariotos (SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2011; MADHUMATHI *et al.*, 2011; BIONDI *et al.*, 2008; HAMEED, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante do extrato bruto e das frações proteicas da biomassa de microalgas *Synechococcus nidulans* em fotobiorreator fechado, sob condições controladas.

3.2 Objetivos específicos

Padronizar as condições de cultivo e produção de biomassa de *S. nidulans* em escala laboratorial, utilizando fotobiorreator fechado;

Avaliar a curva de crescimento da microalga cultivada em fotobiorreator sob a condições estabelecidas;

Determinar a composição elementar da biomassa microalgal de *S. nidulans*;

Avaliar o perfil proteico do extrato e das frações proteicas obtidas da biomassa microalgal;

Analisar as atividades antioxidante, antifúngica e antibacteriana do extrato bruto e das frações proteicas de *S. nidulans*;

4 MATERIAIS

4.1 Microalga *Synechococcus nidulans*

A microalga *S. nidulans* foi coletada em corpos de água do município de Granja, do Estado do Ceará, identificada e isolada no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabMol) da UFC. A espécie de microalga utilizada nesta pesquisa está devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número de cadastro AC13018 (ANEXO A).

4.2 Fungos e Bactérias

Os fungos *Colletotrichum musae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* foram obtidos da micoteca mantida no LabBMol. Já as bactérias (*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC7000698) utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS)/UFC.

4.3 Reagentes

Meios Zarrouk, NPK, TSA, TSB e Agar Sabouraud-Dextrose; Álcool etílico P.A; Metanol; Hidróxido de sódio; Epicloridrina (Clorometiloxirano); Cloreto de sódio; Glicina (Ácido aminoacético); Ácido clorídrico; Sulfato de cobre; Selênio metálico Sulfato de potássio; BSA (*Bovine Serum Albumin*); Azida sódica; L-ácido ascórbico; Acetona; Tris [2- Amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol]; PMSF; EDTA; DDPH; Dodecil sulfato de sódio; Glicerol; β -mercaptoetanol; Marcador Molecular (6.500 – 66.000 Da); Azul de bromofenol; Persulfato de amônio; TEMED (Tetrametiletlenodiamina); Acrilamida; Bis-acrilamida; Azul de *Comassie Brillhante* R-250 e outros reagentes de grau analítico.

5 MÉTODOS

5.1 Cultivo da microalga *S. nidulans* em fotobiorreatores fechados

Para a preparação do pré-inóculo, as células de *S. nidulans* foram inicialmente cultivadas, sob condições assépticas, em um fotobiorreator cilíndrico (figura 1) contendo 500 mL do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) cujo a composição foi (g.L^{-1}): NaHCO_3 16,8; K_2HPO_4 0,5; NaNO_3 2,5; K_2SO_4 1,0; NaCl 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; CaCl_2 0,04; EDTA 0,08 e $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$ das soluções A₅ e B₆. Solução A₅ (g.L^{-1}): H_3BO_3 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222; $\text{CuCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079; MnO_3 0,015. Solução B₆ (g.L^{-1}): NH_4VO_3 22,86; $\text{NH}_4\text{VO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 192; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 44,8; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17,94; $\text{TiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 61,1; $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 43,98.

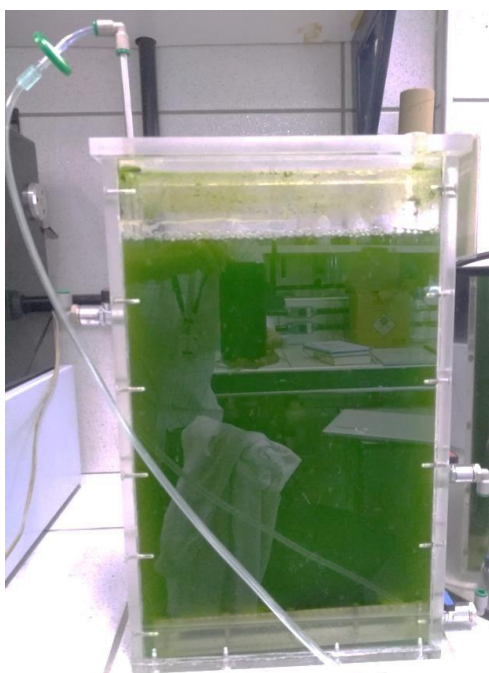
Figura 4 - Preparação do pré-inóculo da microalga *S. nidulans* em fotobiorreator cilíndrico.



Fonte: Registro do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol)

O fotobiorreator cilíndrico foi mantido por 10 dias em uma câmara de crescimento (B.O.D.) sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 4000 Lux e aeração estéril constante (mantida por aerador elétrico e filtros de 0,25 μm). 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 2) contendo 4 L do meio de cultura contendo NPK (formulação 20:10:20 m/m/m) pH 7,0. A cultura foi mantida por 30 dias na plataforma sob condições crescimento controladas (temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 50.000 Lux e aeração estéril constante).

Figura 5 - Cultivo de microalga *S. nidulans* em fotobiorreator retangular de placa planar.



Fonte: Registro do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol)

5.2 Curva padrão de crescimento da microalga *S. nidulans*

Após a inoculação das células de *S. nidulans* no fotobiorreator fechado de placas planas, foram realizadas contagens das células (nos dias 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30) com auxílio da câmara de Neubauer determinar a curva de crescimento da microalga. Com o auxílio de uma micropipeta, para cada dia avaliado, foram retiradas três alíquotas de 10 μL da cultura de microalgas para aplicação na câmara de Neubauer, sendo previamente diluída

(1:5 v/v) em meio NPK para a melhor visualização das células para contagem.

Depois de homogeneizar a suspensão celular com auxílio de uma micropipeta, a alíquota foi aplicada na câmara de contagem, preenchendo todo espaço referente a área demarcada, esperando pelo tempo de 2 min para a sedimentação das células. Usando um microscópio, a área demarcada foi focalizada na lente de 40X para iniciar a contagem de cada quadrante médio. Os valores obtidos da contagem de células foram plotados em um gráfico, com a assistência do programa ORIGINPro, para determinar a curva de crescimento da *S. nidulans* por tempo avaliado.

5.3 Obtenção da biomassa microalgal *S. nidulans* para preparação do extrato proteico

Após 30 dias, a cultura de microalgas foi coletada do fotobiorreator e submetida a centrifugação a 10.000 x g por 30 min, a 25 °C. A biomassa fresca resultante foi lavada com água destilada para remoção do meio de cultura através de quatro etapas alternadas de ressuspensão da biomassa em água e centrifugação nas mesmas condições citadas. Em seguida, a biomassa fresca foi transferida para um papel de filtro estéril e colocada em um sistema de filtração a vácuo para a remoção do excesso de água da biomassa. Na sequência, essa biomassa foi pesada em balança analítica e após o registro, ela foi submetida ao processo de liofilização. Após a secagem completa, a biomassa foi novamente pesada para o cálculo do rendimento e, em seguida, acondicionada para uso nas etapas posteriores.

5.4 Análise elementar da biomassa microalgal *S. nidulans*

5.4.1 Umidade

A determinação de umidade foi realizada por meio da utilização de materiais como cadinhos de porcelana, balança analítica, estufa, dessecador e pinça (para manusear os cadinhos). Amostras de 1 g da biomassa foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente tarados em balança analítica. As referidas amostras foram colocadas em estufa com temperatura entre 100 e 105 °C por 24 h, técnica descrita por 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 fórmula utilizada foi:

$$\%U = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100$$

Onde:

U = Umidade;

V_0 = peso do cadinho seco;

V_2 = peso do cadinho com amostra;

V_1 = peso do cadinho com amostra depois da secagem.

5.4.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado com o auxílio de cadinhos de porcelana, estufa, mufla (forno), dessecador e balança analítica). No procedimento, amostras de 1 g de biomassa seca foram adicionadas em cadinhos previamente tarados, que foram posteriormente pesados e transferidos para mufla a 600 °C por 4 h. 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 fórmula:

$$\%C = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100$$

Onde:

C = Cinza;

V_0 = peso do cadinho;

V_1 = peso do cadinho que continha as cinzas;

V_2 = peso do cadinho que continha as amostras.

5.4.3 Proteínas totais

Para determinação do teor de proteínas totais foi usado o método de Micro-Kjeldahl, onde 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 (Cu₂O). 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 (H₃BO₃) a 2%, adicionando-se três 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 M em bureta até a coloração rosada e assim, anotou-se o volume de ácido gasto. A porcentagem de nitrogênio total foi obtida através da fórmula:

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

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

$$\%PT = \%NT \times 6,25$$

5.4.4 *Lipídeos totais*

O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet. O hexano foi utilizado como solvente orgânico para extração dos lipídios totais. Seguidamente, os balões foram colocados em estufa a 100 °C durante uma 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 desolvente foram levados ao determinador de gordura para a extração a 90 °C por duas horas. Logo após a extração, a amostra gotejou por trinta minutos (para a recuperação do solvente o aparelho foi calibrado para 150 °C e, posteriormente, 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 abaixo:

$$\%Lipídeo = \frac{(\text{Peso do balão} + \text{Gordura}) - (\text{Peso do balão vazio}) \times 100}{(\text{Peso da Amostra})}$$

5.4.5 *Carboidratos totais*

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

$$\%Carboidratos = (100\% \text{ da Biomassa}) - [(\%Lipídeo) + (\%Cinzas) + (\%Proteínas)]$$

5.4.6 *Fibra bruta*

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método de Henneberg (WINTON e 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 min até alcançar a fervura. Em seguida, essas amostras foram filtradas em papéis de filtro quantitativo, previamente aquecidos em estufa a 105 °C por 1 h 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 teor da fibra bruta foi estipulado através das seguintes fórmulas:

$$F = [(P + F + C) - P] - C$$

$$\%F = \frac{F \times 100}{P}$$

Onde:

P = Peso do papel;

F = Fibra;

C = Cinza.

5.4.7 Análise da clorofila a

Para determinação do teor de clorofila microalgal, inicialmente 1 g de células frescas foi macerado com nitrogênio líquido, sendo, em seguida, adicionado 5 mL de acetona (P.A.) refrigerada. O produto da maceração foi filtrado em fibra de vidro e coletado em balão volumétrico de 50 mL. A acetona foi adicionada sobre o macerado restante na fibra de vidro, até atingir o volume final de 50 mL de filtrado.

Esse procedimento foi realizado sem a presença de luz. As absorvâncias das clorofilas *a* e *b* foram medidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 664 e 630 nm, respectivamente. A concentração dos pigmentos foi determinada de acordo com a equação definida por Clesceri *et al.* (1989), descrita abaixo:

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

5.5 Lise celular e preparação do extrato bruto total

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. A mistura foi submetida a um congelamento lento no freezer a -20 °C e posterior descongelamento, por três vezes seguidas esse processo. Em seguida, a mistura foi transferida para um homogeneizador Potter e macerada vigorosamente por 10 min.

Após esse período, a mistura 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 180 pulsos de 10 s e 180 intervalos de 15 segundos. Durante o processo a mistura foi mantida em gelo. O extrato foi centrifugado $14.000 \times g$ por 30 min. O sobrenadante (denominado Extrato total proteico - EBT) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EBT foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20°C .

5.6 Preparação das frações proteicas

Para a preparação das frações proteicas, volumes de 10 mL do EBT foram submetidos à precipitação de proteínas utilizando diferentes níveis de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Os EBT saturados foram mantidos em repouso por 12 h à 10°C , e em seguida, centrifugados a $12000 \times g$ por 30 min, a 10°C . Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram coletados, solubilizados e dialisados por 12 h, em ambiente refrigerado (a 10°C) com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 150 mM, PMSF 1 mM e EDTA 0,2 mM. Após o processo de diálise, essas frações (denominadas Frações Ricas em Proteínas, FRP) foram coletadas e armazenadas a -20°C para serem utilizadas nas etapas posteriores.

5.6.1 Dosagem de proteínas solúveis do extrato proteico total (EBT) e das frações ricas em proteínas (FRP) obtidas da *S. nidulans*

A dosagens de proteínas do EBT e das FRP obtidas da biomassa microalgal foram realizadas segundo o método de Bradford (1976). Para cada 100 μL de amostra, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram agitadas e deixadas em repouso por 10 min 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).

5.7 Análise eletroforética do EBT e das FRP de *S. nidulans*

Os ensaios de 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 120 V.

As amostras do EBt e das FRP foram preparadas em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 8,3 contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%): 5 μ L do tampão de amostra para 25 μ L de cada amostra analisada (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%} de *S. nidulans*). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 2 min e centrifugadas a 1000 x g por 5 min à 25 °C. Foi aplicado de 15 a 20 μ L de amostra em cada poço do gel. Foram usados marcadores moleculares (faixa de 14 a 97 KDa) no primeiro e no penúltimo poço. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético: água (1:3,5:8, v/v/v).

5.8 Atividade antioxidante do EBt e das FRP de *S. nidulans*

A atividade antioxidante foi determinada pela medida de capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), foi determinada segundo Kato *et al.* (2016), com algumas modificações, com base no método original descrito por Blois (1958). Esse ensaio foi realizado em placas de microtitulação (de 96 poços), nas quais foram adicionados nos poços, 10 μ L de cada amostra testada ((EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}), nas concentrações de 100 a 1.000 μ g.mL⁻¹ e 190 μ L da solução metanólica de DPPH (Sigma) a 78 μ M. Nos poços denominados “branco da amostra” foram adicionados 10 μ L dos extratos (nas concentrações supracitadas) e 190 μ L de metanol.

Os poços denominados “controle” - controle negativo do experimento - foram adicionados 10 μ L de metanol e 190 μ L da solução metanólica de DPPH a 78 μ M. O L-ácido ascórbico (Sigma) foi utilizado como controle positivo, nas mesmas concentrações dos extratos e tratado de forma idêntica. As placas contendo amostra, branco da amostra, controle da amostra e controle positivo foram agitadas e incubadas à temperatura ambiente por 30 min no escuro. Posteriormente, as absorbâncias foram lidas em 517 nm em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340).

As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. A capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos e do controle positivo, expressos em porcentagem, foram calculados pela fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Capacidade de sequestro do radical DPPH(\%)} \\ & = \frac{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})]}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \end{aligned}$$

5.9 Atividade antifúngica do EBT e das FRP de *S. nidulans*

5.9.1 Condições do cultivo dos fungos

Os fungos *Colletotrichum musae*, *Candida albicans*, *Candida kefir*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Sabouraud-Dextrose (DIFCO). Basicamente, distribuiu-se 20 mL de ágar esterilizado em autoclave a uma temperatura de 121 °C durante 15 min em placas de Petri previamente autoclavadas, secas e individualmente embaladas.

Após solidificação total do meio de cultura nas placas de Petri, os fungos foram inoculados no centro das placas contendo ágar estéril, todo o procedimento ocorrendo dentro da câmara de fluxo para manter a esterilidade do processo e com auxílio de uma alça de platina. Posteriormente, as placas foram colocadas para crescer em estufa incubadora mantida a temperatura constante de 27 ± 2 °C durante um período não superior a 10 dias. Após esse período, foi iniciado o processo de coleta dos esporos dos fungos cultivados. Foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 0,15 M autoclavada por toda a extensão das colônias.

Em seguida, raspou-se levemente a superfície das colônias com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada para que prontamente ocorresse a liberação dos esporos. Com o auxílio de uma pipeta estéril, foi feita a aspiração de pelo menos 8 mL da suspensão dos esporos, os quais foram posteriormente submetidos a filtração prévia em gaze estéril, minimizando a presença de hifas no filtrado.

Após essa etapa, apenas 1 mL do filtrado foi coletada em tubos de 1,5 mL estéreis e submetidos a centrifugação a 10.000 x g durante 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os esporos ressuspensos em 1 mL de NaCl 0,15 M. A determinação do número de esporos foi realizada em câmara de Neubauer.

Após a correta montagem do aparato, aplicou-se 10 µL da amostra de cada fungo processada no item anterior para o retículo da câmara. Em seguida, visualizou-se os esporos através de microscópio óptico modelo Eclipse® 3000 da (Nikon) em objetivas de 20 e 40X. A partir deste passo, os esporos eram contados com o auxílio de um contador hematológico

manual, e a contagem determinada pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \frac{\text{esporos}}{\text{mL}} = N^{\circ} \text{ esporos (sobre quadrado grande)} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

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

5.9.2 Ensaio de atividade antifúngica utilizando o método de difusão em disco

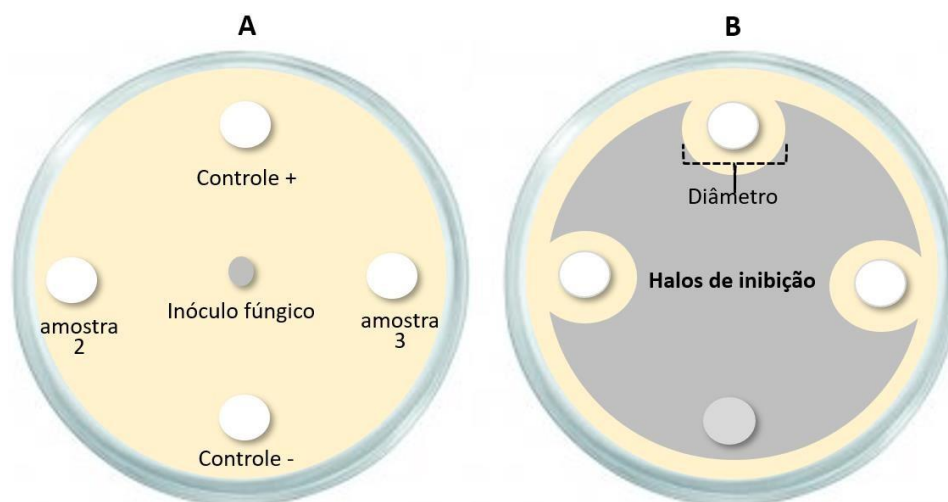
Para avaliação da atividade antifúngica do EBt e das FRP da microalga de *S. nidulans*, foi empregado o método de difusão em disco. Inicialmente, 1 mg de cada amostra (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}) liofilizada foi solubilizada em tampão PBS pH 7,4 e esterilizada em filtro *Millipore* (0,22 µm).

Na etapa seguinte, dois discos de papel-filtro estéreis (Whatman tipo 3), de 6 mm de diâmetro, foram embebidos com 100 µL de cada amostra solubilizada. Um disco de papel-filtro saturado com 100 µL de solução BSA (1 mg.mL⁻¹) em tampão PBS pH 7,4 foi utilizado como controle negativo e outro disco contendo com 100 µg de anfotericina B foi usado como controle positivo. Antes de distribuir os papéis de filtros com as amostras nas placas de Petri teste, conforme o esquema da Figura 6. A, uma alíquota da suspensão de esporos (com aproximadamente 10⁴ esporos.mL⁻¹) de cada fungo foi inoculada no centro das placas testes contendo o meio Agar Sabouraud-Dextrose.

Em seguida essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C para o crescimento inicial dos fungos. Os discos contendo as amostras só foram adicionadas as placas quando as colônias fúngicas atingiram aproximadamente 40 mm de diâmetro. Em seguida, as placas foram novamente incubadas na estufa, à 28 °C por até 78 h.

A visualização dos resultados foi realizada medindo-se o halo formado (figura 3B) ao redor dos discos contendo as amostras analisadas, como um indicador da inibição do crescimento microbiano. Os resultados foram expressos pela medida do diâmetro (mm) de cada halo. (PAREKH e CHANDA, 2007; ROBERTS e SELITRENNIKOFF, 1988).

Figura 6 - Esquema de disposição dos discos com as amostras (A) para avaliação da atividade antifúngica via pelo método de difusão em disco com a medida de halos de inibição (B).



Fonte: Autor

5.10 Atividade antibacteriana

5.10.1 Condições da cultura

Para as condições de crescimento das espécies bacterianas adotou-se a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), com algumas modificações. As bactérias mantidas no meio Soja Tríplica Caldo (TSB) e glicocol 20% a -80°C foram devidamente descongeladas e estriados, com auxílio da alça de Drigalski, em placas de Petri contendo meio Soja Tríplica Ágar (TSA) e incubadas por 24 h, a 37°C em uma estufa bacteriológica.

Após o crescimento, cinco colônias isoladas foram coletadas, inoculadas em 5 mL em tubos contendo meio TSB e incubadas sobre as mesmas condições por mais 24 h. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos falcon (50 mL) e centrifugadas a $8600 \times g$, a 4°C por 5 min. Os precipitados formados foram ressuspensos em meio TSB (10 mL). Posteriormente, com o auxílio do espectrofotômetro, a concentração celular da suspensão bacteriana foi ajustada a 2×10^6 Unidades Formadoras de Colônias ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), através da turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

5.10.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

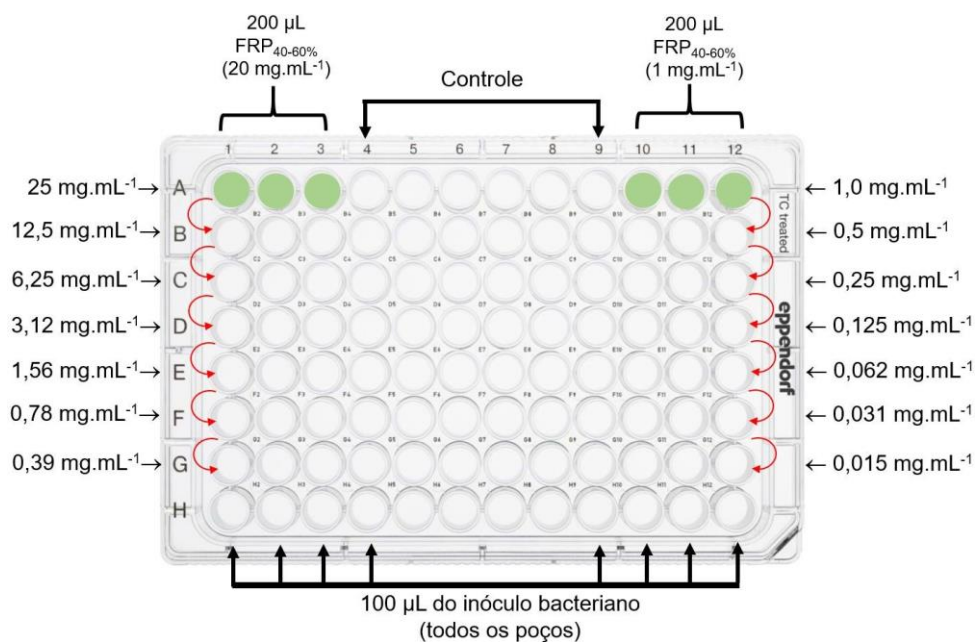
A avaliação da atividade antibacteriana do EBt e das FRP de *S. nidulans* foi realizada segundo o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano de acordo com as normas sugeridas pelo CLSI (2017), com algumas modificações.

Para a determinação da CIM, os poços da placa foram preenchidos (figura 4) inicialmente com 200 μL de cada amostra (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}), sendo realizado o experimento em concentrações iniciais de 1 mg.mL^{-1} e outro de 25 mg.mL^{-1} . Em seguida, realizou-se a diluição seriada na base dois para obtenção de diferentes concentrações, que variaram entre 1 mg.mL^{-1} a 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 mg.mL^{-1} a 0,39 mg.mL^{-1} , respectivamente.

Posteriormente, 100 μL da suspensão de cada bactéria testada já previamente ajustada na concentração de 2×10^6 UFC. mL^{-1} , foi adicionada na placa, com consequente diminuição na concentração do extrato proteico e da suspensão bacteriana, ficando as concentrações finais entre 500 e 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato proteico e de 1×10^6 UFC. mL^{-1} para a suspensão bacteriana, obtendo-se um volume final de 200 μL por poço, sendo as placas incubadas por 24 h, a 37 °C.

A avaliação do crescimento bacteriano foi mensurada através da turbidez dos poços com auxílio do leitor de microplacas (*SpectraMax i3*), a um comprimento de onda de 620 nm. Considerou-se como CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração da substância teste capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) após 24 horas depois da incubação, foram removidos 10 μL da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguido de inoculação em placas de Petri com meio TSA. As placas de Petri foram incubadas novamente sobre as mesmas condições já descritas. Após o período de 24 h avaliou-se a presença de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e considerou-se como CBM, a menor concentração da substância teste que inibiu o crescimento visível das UFC.

Figura 7 - Esquema de distribuição das amostras (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}) de *S. nidulans* na placa de microtitulação para avaliação da atividade antibacteriana



Fonte: Autor

5.11 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 *ORIGINPro*

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Cultivo e produção da biomassa microalgal de *S. nidulans*.

Após 30 dias de cultivo da microalga *S. nidulans* em fotobiorreator retangular de placa planar contendo 4 L do meio de cultura NPK, obteve-se um rendimento médio de biomassa seca equivalente a $7,12 + 1,3 \text{ g.L}^{-1}$.

O rendimento da biomassa de microalgas do gênero *Synechococcus* não é uma informação recorrente na literatura. No entanto, a espécie *C. vulgaris* relatada por Caporgno *et al.* (2019) apresentou um rendimento de $1,80 \text{ g. L}^{-1}$ em cultivo também autotrófico. Portanto, a quantidade de biomassa microalgal obtida neste experimento pode ser considerada relevante para um sistema de cultivo autotrófico fechado com capacidade para 4 L de meio.

A produtividade de biomassa algal em fotobiorreatores fechados sob condições autotróficas depende da espécie, do meio de cultivo e de fatores ambientais como: CO_2 , intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação. É importante salientar também que a composição química das biomassas de algas pode ser alterada dependendo dos parâmetros de cada um destes fatores utilizados no cultivo (MIAO e WU, 2004).

Para esta pesquisa foi utilizado meio NPK na formulação 20:10:20 m/m/m, no pH 7,0, com temperatura de $25 + 2 \text{ }^\circ\text{C}$, no fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 50.000 Lux e aeração estéril constante em fotobiorreator de placa planar.

O cultivo em fotobiorreator de placa plano vertical, conforme já mostrado na Figura 5, permitiu uma ampla distribuição da iluminação, melhor homogeneização do meio para a absorção de nutrientes, facilitou os procedimentos de coleta da biomassa e evitou a sedimentação da biomassa microalgal. Portanto, mostrou-se muito prático e eficiente quando se deseja cultivar microalgas de forma controlada a fim de obter bioativos.

O meio NPK de formulação simples, com apenas três nutrientes primários (nitrogênio, fósforo e potássio), e de baixo custo propiciou aumento na produção da biomassa microalgal. Diferente de outros meios também utilizados para cultivar algas em biorreatores, o NPK mostrou-se imprescindível para o crescimento da biomassa de *S. nidulans* (ANSILAGO *et al.*, 2012).

Estudos científicos com outras espécies de algas que utilizaram esse mesmo manejo mostram-se satisfatório para cultivos cujo objetivo é, a produção de biomassa

microalgal e de biocompostos com alto valor agregado para diferentes finalidades industriais (RICHMOND *et al.*, 2013; LOURENÇO, 2006).

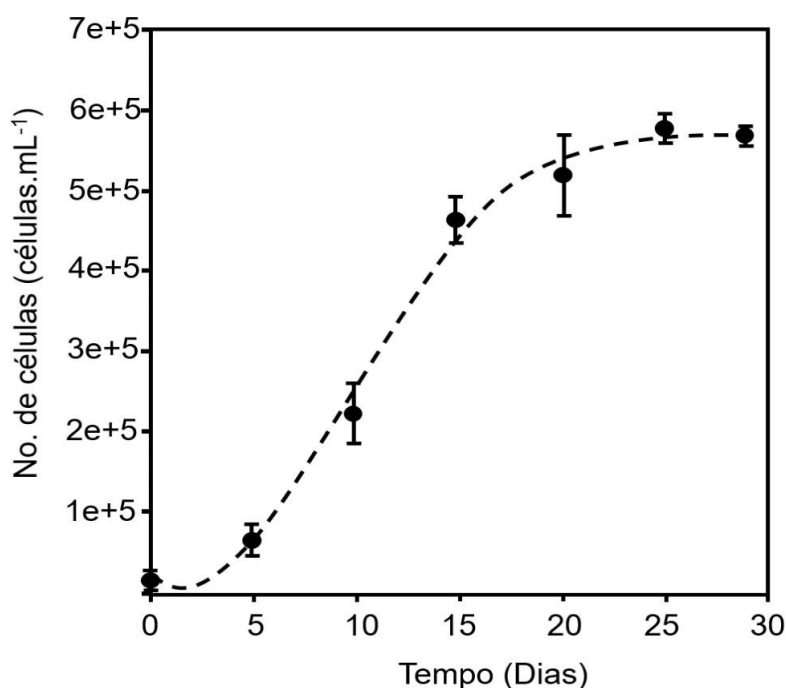
6.2 Curva de crescimento da microalga *S. nidulans*

A curva padrão de crescimento da *S. nidulans* com as fases (lag, log e estacionária) mostraram-se bem definidas durante 30 dias de cultivo em fotobiorreator fechado. A concentração inicial de células inoculada no fotobiorreator fechado de placa planar no dia 0 (zero) foi de $5,8 \times 10^3$ células.mL⁻¹. No intervalo entre o 5° e o 25° dia encontra-se o crescimento exponencial (Fase log) da população algal, onde no fim do 25° dia foram acrescidos $6,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ à população inicial. Entre o 25° e o 30° dia, observa-se a fase estacionária onde não foi registrado alterações no tamanho da população de *S. nidulans* (figura 8).

Logo depois da fase estacionária inicia-se a fase de declínio, não vista no gráfico, onde a população começa a diminuir devido a mudanças na composição do meio provocadas pela produção de metabólitos, inibidores enzimáticos, esgotamento de nutrientes e fotoinibição (SOUSA,2019).

Após a inoculação das células de *S. nidulans* no fotobiorreator fechado de placa planar, foram realizadas contagens das células (nos dias 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30) com auxílio da câmara de Neubauer para determinar a curva de crescimento da microalga. Com o auxílio de uma micropipeta, para cada dia avaliado, foram retiradas três alíquotas de 10 µL da cultura de microalgas para aplicação na câmara de Neubauer, sendo previamente diluída (1:5 v/v) em meio NPK para a melhor visualização das células para contagem.

Figura 8 - Curva de crescimento da *S. nidulans* em fotobiorreator fechado, sob condições controladas. A concentração de células no primeiro momento foi de $5,8 \times 10^3$ células.mL⁻¹. As barras de erro representam a variação na determinação da amostra.



A espécie *S. nidulans* apresenta reprodução assexuada por fissão binária e o crescimento das células-filha atinge o tamanho da célula original antes de iniciar outra divisão (SAN'TANNA *et al.*, 2012). Esta característica biológica explica o crescimento populacional de *S. nidulans* de maneira exponencial na fase lag. Além das características biológicas de cada microalga existem também diversos fatores ambientais que contribuem para o crescimento algal em sistemas fechados.

A luminosidade atua sobre as enzimas das algas influenciando a síntese de proteínas. Porém, o excesso de luz pode provocar efeito letal nas células pela formação de peróxido de hidrogênio, reação conhecida como fotooxidação ou morte fotooxidativa (RUYTERS, 1984; UMINO *et al.*, 1991; HIRAYAMA *et al.*, 1996; LACAZ-RUIZ, 1996). Neste experimento utilizou-se uma intensidade luminosa de 50.000 Lux com fotoperíodo de 12 h o que foi suficiente para aumentar a população de *S. nidulans*.

A temperatura também pode influenciar o crescimento celular porque também atua sobre a eficiência das enzimas desses organismos. (RAVEN, 1990; OGBONNA e TANAKA, 1996). A temperatura de 25 ± 2 °C mostrou-se adequada para o crescimento da microlaga *S. nidulans*.

A agitação da cultura traz muitas vantagens para o crescimento populacional das algas, pois facilita o acesso às microalgas dos fatores essenciais relacionados à produção de biomassa microalgais. A agitação da cultura, em meio líquido, também favorece as células

em suspensão e evita que algumas células fiquem depositadas no fundo do fotobiorreator e outras permaneçam na superfície recebendo luz em excesso. Além dessas vantagens, a agitação evita, por exemplo, a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (BECKER *et al.*, 1994).

O fósforo é um dos componentes do meio NPK considerado essencial para o crescimento celular de microalgas, tão importante que pequenas quantidades no meio de cultura podem limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas. O fósforo está presente nos ácidos nucleicos; atua como transportador de substratos e energia química; é também de ser um dos componentes fundamentais das membranas celulares. (ROCHE *et al.*, 1993; SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

O Nitrogênio é outro elemento essencial para o crescimento populacional de microalgas, pois contribui para a formação das proteínas. A redução na quantidade de nitrogênio no meio pode ser limitante para populações de algas (RIGANO *et al.*, 1998).

6.3 Análise da clorofila *a* durante o crescimento da *S. nidulans*

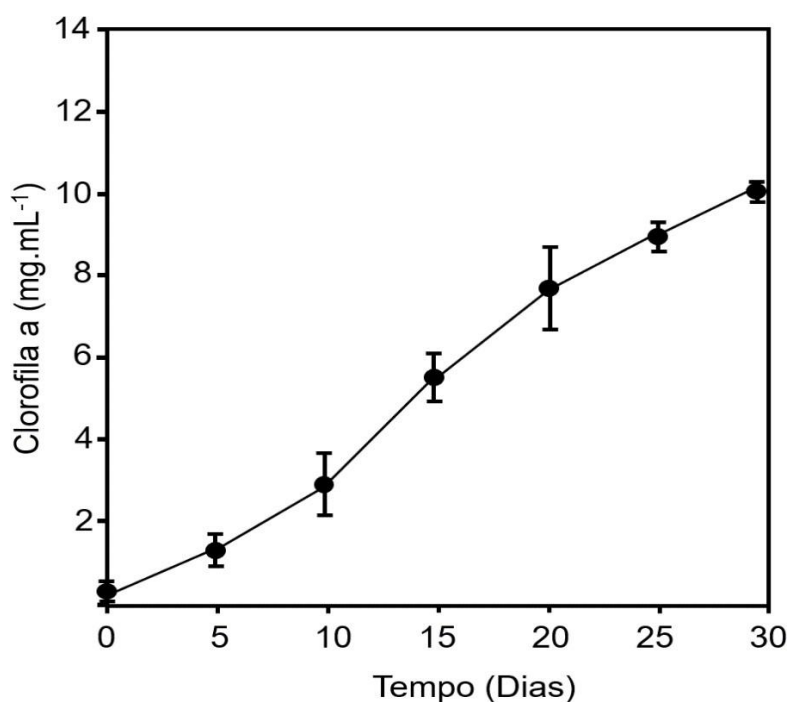
A concentração de clorofila aumentou durante os 30 dias de cultivo de *S. nidulans* de maneira quase linear (figura 9).

O fato da concentração de clorofila *a* aumentar durante os 30 dias de cultivo está relacionado ao crescimento populacional microalgal de *S. nidulans*, bem como, a concentração de nitrogênio no meio de cultura que pode elevar o teor de clorofila na biomassa microalgal (SHIFRIN e CHISHOLM, 1981).

O principal pigmento fotossintético em microalgas do gênero *Synechococcus* é a clorofila (*a*), enquanto seus principais pigmentos acessórios são as ficobiliproteínas. Existem quatro ficobilinas comumente reconhecidas: ficocianina, aloficocianina, aloficocianina B e ficoeritrina. Porém o teor de clorofila na biomassa algal pode servir como base para descrever a vitalidade da população de algas (BENCHRAKAC, 2014).

Através da clorofila, as microalgas assim como as plantas, conseguem realizar a fase clara da fotossíntese e a partir desta sintetizar seus próprios carboidratos que serão utilizados como fonte de energia e na composição de suas estruturas celulares.

Figura 9 - Concentração de clorofila *a* avaliada durante os diferentes dias de crescimento da microalga da *S. nidulans* em fotobiorreator fechado. As barras de erro representam a variação na determinação da concentração.



6.4 Análise elementar da biomassa microalgal de *S. nidulans*.

A composição bioquímica centesimal da biomassa de *S. nidulans*, apresentou-se bem variável com percentual maior para proteínas (45%) seguido de carboidratos (23%) e lipídios (12%) (Tabela 1).

Estudos científicos são incipientes na análise bioquímica da biomassa de microalgas do gênero *Synechococcus*; porém, outros estudos com microalgas das espécies *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* apresentaram abundância em proteínas brutas, cerca de 46,76% e 45,46% de sua biomassa seca, respectivamente (MOLINO *et al.*, 2018)

Quanto ao percentual de carboidratos (23,44%) presente na biomassa de *S.nidulans* apresentou resultado inferior ao encontrado na biomassa de microalgas do gênero *Chlorococcum* (32%) e superior ao encontrado na espécie *C. elbense* (16,63%) (HARUN 2011).

Os lipídios contidos na biomassa de *S.nidulans* (12,73%) apresentaram resultados inferiores ao encontrado na microalga do gênero *Chlorococcum* (20%) sob mesma condição de cultivo (SANTOS,2019)

Umidade (4,51%), cinzas (6,51%) e fibra bruta (7,80%) consistem a menor parcela da biomassa de *S.nidulans*. Resultados semelhantes também foram encontrados na biomassa das microalgas do gênero *Chlorococcum* com umidade (4,93%), cinzas (5,52%) e

fibra bruta (8,21%) utilizando as mesmas técnicas de análise bioquímica de biomassa microalgal (SANTOS,2019).

Tabela 1 - Análise elementar da biomassa microalgal de *S. nidulans* com base na massa seca.

Constituinte	Teor na biomassa (%)
Umidade	4,51 ± 0,41
Cinza	6,51 ± 0,44
Fibra bruta	7,80 ± 0,31
Lipídeos	12,73 ± 1,21
Proteína total*	45,01 ± 1,52
Carboidratos**	23,44 ± 1,73

* Nitrogênio total x 6,25

**Obtido por diferença

A composição bioquímica da biomassa de microalgas não é determinada tão somente pela natureza fisiológica de cada espécie microalgal, mas também, pelos parâmetros dos nutrientes contidos no meio de cultivo e dos fatores: CO₂, intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação (MIAO, 2004).

Em cultivo de sistema fechado envolvendo algas *Chlorella* percebeu-se que em meios contendo 0,25 mg.L⁻¹ de fosfato a biomassa apresentou 15,7% de proteína. Entretanto, com a elevação da concentração de fosfato para 0,50 mg.L⁻¹ a quantidade de proteína alcançou 37%. Assim, a quantidade de K₂HPO₄ influencia a concentração de proteína. Em contrapartida, a carência de fosfato no meio produz aumento no teor de lipídios na composição da biomassa seca (ROUND, 1983; MAHASNEH, 1997).

A temperatura influencia no crescimento celular e na composição química das microalgas. Células da microalga *Chlorella*, por exemplo, quando são cultivadas em temperatura entre 25 e 35 °C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos aumenta.

Um dos parâmetros que mais influencia no teor de lipídeos da biomassa de microalgas cultivadas em sistemas fechados é a velocidade das pás de agitação do meio (FRANCO *et al.*, 2009). Em sistemas com pouca agitação tem-se menor distribuição de

nutrientes e CO₂ o que resulta em baixa concentração de lipídios na biomassa algal.

Ao avaliar o efeito do CO₂ na produção lipídica de *Chlorella vulgaris*, constatou que a máxima produtividade em lipídios totais foi alcançada quando utilizou-se 10% de CO₂. Em outras algas percebeu-se que o aumento na concentração de CO₂ resultou em mais carboidratos em suas biomassas. Portanto, quanto ao CO₂ vai depender da espécie de alga cultivada, pois ela poderá produzir mais carboidratos ou lipídios em suas biomassas (ZHAO *et al.*, 2015).

Deste modo, a microalga *S. nidulans* tem grande potencial na produção de proteínas seguido de carboidratos e lipídios quando cultivada nas condições controladas de temperatura, luminosidade e no meio NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) com formulação de (20:10:20 m/m/m).

6.5 Determinação de proteínas solúveis totais do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans*

O extrato bruto total (EBt) que correspondente ao lisado da biomassa microalgal sem a precipitação por sulfato de amônia, apresentou uma pequena concentração de proteínas cerca de 0,232 mg.mL⁻¹ o equivalente a 23,2 mg de proteínas em 100 mL de amostra. As frações ricas em proteínas FRPs de *S. nidulans* saturados com 40 - 60% de sulfato de amônia apresentaram maior concentrações de proteínas com 0,810 ± 0,03 mg.mL⁻¹ o equivalente a 8,10 mg de proteínas contidas em 10 ml de amostra. As FRPs saturados com 60-80% de sulfato de amônio apresentaram a concentração proteica de 0,619 ± 0,08 mg.mL⁻¹ o equivalente a 6,19 mg em 10 ml. As FRPs saturadas com 20-40% tiveram um concentração proteica menor com 0,592 ± 0,10 mg.mL⁻¹, ou seja, 5,92mg em 10 ml de amostra. E por último, com menor concentração proteica estão as FRP saturados com 0 - 20% de sulfato de amônia 0,315 ± 0,07 mg.mL⁻¹ ou 3,15 mg de proteínas em 10 ml de amostra. (Tabela 2).

Tabela 2 - Determinação da concentração de proteínas solúveis totais do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) obtidos a partir da biomassa microalgal de *S. nidulans*

Amostras	Volume da amostra (mL)	Concentração proteica (mg.mL ⁻¹)	Proteína solúvel total (mg)
EBt ^a	100	0,232± 0,12	23,2
FRP _{0-20%} ^b	10	0,315 ± 0,07	3,15
FRP _{20-40%} ^b	10	0,592± 0,10	5,92
FRP _{40-60%} ^b	10	0,810± 0,03	8,10
FRP _{60-80%} ^b	10	0,619± 0,08	6,19

^a Extrato bruto proteico

^b Frações proteicas precipitadas com sulfato de amônio

Antes de proceder a análise de proteínas totais da biomassa microalgal de *S.nidulans*, foi necessário preparar o extrato microalgal, conforme descrito no tópico, lise celular e preparação do extrato bruto total. Utilizou-se a combinação de dois métodos de lise celular: o congelamento e descongelamento e a ultrassonicação. Esses métodos combinados são necessários para possibilitar a maior liberação de compostos intracelulares em células vegetais. É interessante considerar que esses métodos de maneira isolada podem não trazer os mesmos resultados, visto que, cada um de maneira isolada apresentam suas limitações (SOUSA, 2019)

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. Segundo SOUSA, (2019) esse método de maneira isolada mostra-se pouco eficiente para extração de proteínas devido o baixo comprometimento da parede celular de microalgas.

Segundo AL-ZUHAIR et al. (2017), a lise celular por ultrassom é uma das técnicas que apresenta elevada eficiência na extração de compostos bioativos das microalgas. As ondas de choque da ultrassonicação facilitam o inchamento e a hidratação da biomassa, causando a formação de poros nas superfícies da matriz; o desenvolvimento desses poros na parede celular aumenta a permeação de solvente na estrutura interna e a transferência de massa, facilitando a liberação do composto alvo através de microcanais (PORDESIMO, 2004; BOTH, 2014; XIE, 2015).

O método de Bradford foi utilizado para medir as concentrações de proteínas contidas tanto no EBt quanto nas FRPs de *S. nidulnas* onde para cada 100 μ L de amostra, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford.

Este método analítico de proteínas consiste em uma técnica que utiliza o corante

de “Coomassie brilliant blue BG-250”. Interação entre o corante e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON,1985)

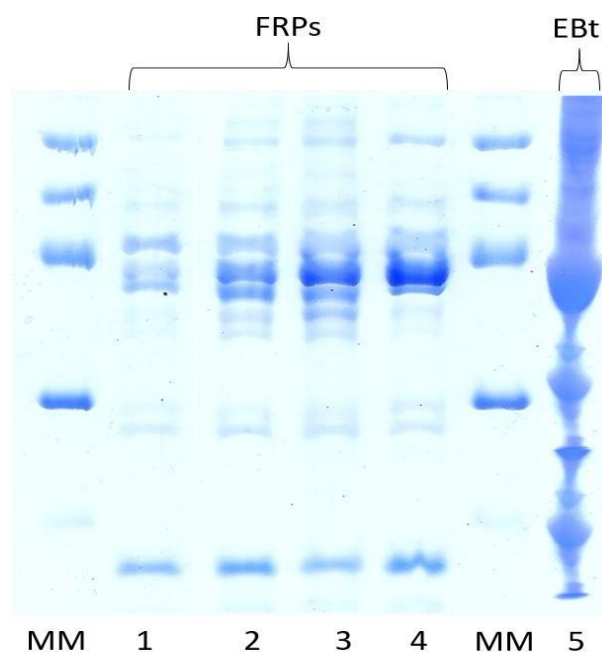
6.6 Análise eletroforética do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans*.

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%) das amostras de EBt não mostrou bandas visíveis e distintas. Tal fato pode ser explicado pelo acúmulo de diversas substâncias não proteicas presentes no extrato bruto conforme apresentado na tabela 1.

No entanto, o perfil eletroforético das FRPs apresentaram bandas indivisas e com boa visualização. Observou-se bandas proteicas com pesos moleculares nas faixas de 97, 67, 45, 30, 18 e 14 KDa. As FRPs 40-60% e as FRPs 60-80% tiveram suas bandas com visibilidade maior em relação as outras FRPs, tal fato, corrobora com os resultados apresentados na tabela 2 onde mostra que a concentração de proteínas é maior nessas FRPs. Este resultado é muito promissor, uma vez que as FRPs de *S. nidulans* possuem muitas proteínas com diversos pesos moleculares que podem apresentar potencial biotecnológico bem diverso (figura 10).

A eletroforese é uma técnica laboratorial simples que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos, deste modo, amostras contaminadas com outro tipo de molécula não conseguem ser separadas e dificultam a visualização das bandas proteicas. A migração das partículas ocorre por diferença de carga elétrica e por peso molecular, de forma que moléculas menores migram mais rapidamente que as maiores (MCPHERSON, 2011).

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE- SDS 12,5%) do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans*. MM: marcadores moleculares (fosforilase 97 KDa; albumina bovina 67 KD; ovalbumina 45 KDa; anidrase carbônica 30 KDa; mioglobina 18 KDa e citocromo c 14 KDa)



O extrato da microalga *S. nidulans* apresenta proteínas, carboidratos e lipídios, de todas essas moléculas, apenas as proteínas podem ser separadas pela eletroforese devido a sua polaridade. No entanto, todas essas biomoléculas encontradas no extrato podem funcionar como um bioativo, por isso, o extrato bruto da *S.nidulans* tem muito valor à biotecnologia. Há em curso muitas pesquisas quanto às aplicações de proteínas, carboidratos e lipídios extraídos das microalgas.

As proteínas algais apresentam avaliações nutricionais que revelam alta qualidade, comparável às proteínas vegetais, mas com conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, aminoácido ausente na maioria das outras microalgas (BERTOLDI, 2008).

Os carboidratos extraídos de microalgas como o amido que é o principal polissacarídeo de reserva das microalgas junto com os carboidratos da parede celular podem ser hidrolisados a monossacarídeos para subsequente fermentação e utilizado como fonte de energia. (MARTÍN-JUÁREZ *et al.*, 2017).

Os óleos produzidos pelas microalgas também têm seu uso na área da saúde, pois são ricos em ácidos graxos insaturados e poli-insaturados; algumas cadeias de ácidos graxos que podem apresentar até quatro ligações duplas. Por exemplo, o consumo de ω -3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e

depressão (SALEM, 1999; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

No entanto, os peptídeos de microalgas têm recebido muita atenção devido aos seus benefícios na área da saúde e suas atividades biológicas. Podem apresentar atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), antiproliferativo, anticoagulante, antidiabética e antiobesidade (BETORET *et al.*, 2011; RAJANBABU; WEN, 2003; NAJAFIAN, 2012).

6.7 Atividade antioxidante do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans*.

Os resultados revelaram que o EBt da biomassa de *S. nidulans* mostrou maior atividade antioxidante do que as FRPs da microalga *S. nidulans* tanto em baixas (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) como em altas concentrações (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de amostra. As FRPs não se mostraram muito eficiente quanto a atividade antioxidante; com uma capacidade de sequestro do radical DPPH próximo a 3,0% em baixas concentrações (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 7,0% em altas concentrações 1000 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), ficaram bem a quem da capacidade de EBt que foi de 16,9% e 68,0% em baixas e altas concentrações, respectivamente (Tabela 3).

A atividade antioxidante do EBt aproximou-se do ácido ascórbico em baixas concentrações com uma porcentagem de sequestro do DPPH equivalente a $16,9 \pm 0,9\%$ contra $15,0 \pm 1,2\%$ do ácido ascórbico, utilizado como controle positivo.

Os efeitos antioxidantes da biomassa dos extratos de algas são bem conhecidos e ganhou destaque no mercado mundial (COHEN, 1999). Os pigmentos como clorofila e as ficobiliproteínas, comumente encontrado em microalgas estão entre as possíveis moléculas que apresente atividade antioxidante nesses organismos (ABALDE *et al.*, 1995). Algumas pesquisas também apontam que alguns peptídeos de microalgas podem apresentar atividades antioxidantes (BETORET *et al.*, 2011; RAJANBABU; CHEN, 2011; NAJAFIAN, 2012; VO *et al.*, 2013).

Trabalhos envolvendo diversas microalgas apresentam os compostos fenólicos das microalgas como os principais bioativos de propriedades antioxidantes (MACHADO, 2017)

Tabela 3 - Análise da atividade antioxidante do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans* via a capacidade de sequestro do DPPH.

Concentração da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPPH (%)					
	Controle ^a	EBt ^b	FRPs ^c			
			0-20%	20-40%	40-60%	60-80%
100	15,0 \pm 1,2	16,9 \pm 0,9	3,2 \pm 0,9	3,8 \pm 0,7	5,1 \pm 0,8	3,7 \pm 0,5
250	23,5 \pm 2,5	24,7 \pm 1,1	4,3 \pm 0,5	4,6 \pm 0,3	6,4 \pm 0,5	4,4 \pm 0,6
500	40,4 \pm 3,1	39,6 \pm 2,0	5,5 \pm 0,6	5,7 \pm 0,5	6,9 \pm 0,2	5,6 \pm 0,5
1000	81,7 \pm 1,4	68,3 \pm 1,3	7,3 \pm 0,8	7,5 \pm 0,4	7,8 \pm 0,2	7,4 \pm 0,7

^a Ácido ascórbico com controle positivo

^b Extrato bruto proteico obtido a partir da biomassa microalgal de *S. nidulans*

^c Frações proteicas de *S. nidulans* precipitadas com sulfato de amônio

Os antioxidantes são importantes porque protegem as células de danos na sua estrutura provocados pela ação de radicais livres. Os antioxidantes também previnem o envelhecimento precoce além de doenças como, as cardiovasculares, aterosclerose, câncer, Alzheimer e doenças pulmonares.

Devido suas propriedades biológicas benéficas e essenciais à saúde, os produtos com propriedades antioxidantes têm sido de grande interesse pela indústria farmacêutica, nutricional e cosmética (EHLERT et al., 2006)

A ação antioxidante de biomoléculas tem sido uma das atividades biológicas dos óleos essenciais encontrado em plantas mais especificamente em suas folhas, frutos, sementes e flores. (MIRANDA et al., 2010).

Neste sentido, utilizar algas para extrair substâncias antioxidantes é mais viável pelo fato de: as algas diferentemente das plantas que apresentam diferenciação celular em seus tecidos e órgãos e podem apresentar substâncias acumuladas apenas em algumas células, uma população de microalgas consegue produzir uma mesma substância de interesse em todas as suas células de maneira uniforme; o crescimento populacional das algas também é diferente das plantas, pois essas tem preferência por reprodução assexuada do tipo divisão binária aumentando sua população em curto tempo

6.8 Atividade antifúngica do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans*

O EBt e as FRP 40-60% foram os mais eficazes no combate aos fungos do gênero *Colletotrichum*, *Candida* e *Aspergillus* com os maiores halos de inibição. Para a espécie *C. musae*, EBt e FRPs 40-60% apresentaram halo de inibição equivalentes a 7,2 \pm 0,2mm e 7,0 \pm 0,1mm, respectivamente. No caso do fungo *C. albicans*, EBt e FRPs

apresentaram $11,5 \pm 0,4$ mm e $11,3 \pm 0,4$ mm de halos inibitório. A espécie *C. kefy* teve inibição promovida por EBt e FRPs equivalente a $10,1 \pm 0,1$ mm e $10,5 \pm 0,3$ mm halos de inibição. Quanto a espécie *A. niger*, EBt e FRPs apresentaram os maiores halos inibitórios com $11,6 \pm 0,5$ mm e $11,4 \pm 0,2$ mm. E por último, EBt e FRps para a espécie *A. fumifatus* também apresentaram grandes halos de inibição equivalente a $11,4 \pm 0,3$ mm e $11,3 \pm 0,3$ mm. (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da atividade antifúngica do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans* aos fungos das espécies *C. musae*, *C. albicans*, *C. kefy*, *niger*, *A. fumifatus*

Amostra	Diâmetro do halo de inibição (mm)				
	<i>C. musae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. kefy</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumifatus</i>
Controle 1 ^a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Controle 2 ^b	$9,8 \pm 2,1$	$13,2 \pm 1,8$	$11,5 \pm 1,0$	$13,6 \pm 1,5$	$13,5 \pm 1,4$
EBt ^c	$7,2 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,4$	$10,1 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,5$	$11,4 \pm 0,3$
FRP _{0-20%} ^d	$5,1 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,2$
FRP _{20-40%} ^d	$6,3 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,3$
FRP _{40-60%} ^d	$7,0 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,4$	$10,5 \pm 0,3$	$11,4 \pm 0,2$	$11,3 \pm 0,3$
FRP _{60-80%} ^d	$6,2 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,1$

^aBSA 100 µg como controle negativo

^bAnfotericina B 100 µg como controle positivo

^cExtrato bruto proteico obtido a partir da biomassa microalgal de *S. nidulans*

^dFrações proteicas de *S. nidulans* precipitadas com sulfato de amônio

Quanto as outras FRPs (0-20%, 20-40% e 60-80%) todas tiveram resultados bem semelhantes, com halo de inibição praticamente iguais, contudo bem menores aos de EBt e das FRP 40-60%. É interessante notar que no caso do fungo *C. musae* todos apresentaram o menor halo de inibição inclusive o grupo controle que usa droga com eficácia antifúngica comprovada.

Para avaliação da atividade antifúngica do EBt e das FRP da microalga de *S. nidulans*, foi empregado o método de difusão em disco. Inicialmente, 1 mg de cada amostra (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}) liofilizada foi solubilizada em tampão PBS pH 7,4 e esterilizada em filtro *Millipore* (0,22 µm). Na etapa seguinte, dois discos de papel-filtro estéreis (Whatman tipo 3), de 6 mm de diâmetro, foram embebidos com 100 µL de cada amostra solubilizada. Um disco de papel-filtro saturado com 100 µL de solução

BSA (1 mg.mL^{-1}) em tampão PBS pH 7,4 foi utilizado como controle negativo e outro disco contendo $100 \mu\text{g}$ de anfotericina B foi usado como controle positivo (figura 6).

Os fungos *C. musae* são representantes do gênero *Colletotrichum*, são responsáveis por uma grave doença nas plantas conhecida como antracnose. A doença representa o mais grave problema em todas as regiões produtoras do mundo o que gera grande prejuízo ambiental e financeiro aos produtores de frutas em especial a banana. A doença geralmente ocorre na fase de maturação; entretanto, o fungo infecta os frutos verdes no campo de produção, e as infecções permanecem quiescentes até o início do estágio de maturação (CORDEIRO *et al.*, 2005).

Os fungos *C. albicans* e *C. kefyr* são representantes do gênero *Candida*. São residentes em membranas, mucosas, pele, trato gastrointestinal, canal vaginal e, normalmente, não causam nenhum dano à saúde são apenas comensais. Porém em condições ambientais particularmente favoráveis, especialmente, em climas quentes e úmidos ou quando as defesas imunitárias encontram-se debilitadas, essas leveduras deixam de serem comensais e passam a infectar o organismo, por isso são considerados fungos oportunistas (LIMA *et al.*, 2003).

As infecções causadas por estes fungos são conhecidas como candidíase. Pode causar infecções cutâneas em indivíduos saudáveis e em casos mais raros pode entrar na corrente sanguínea e causar sérias infecções em órgãos vitais. (MOLERO *et al.*, 1998).

Os fungos *A. niger*, *A. fumigatus* pertencem ao gênero *Aspergillus*, estes fungos respondem por uma infecção oportunista conhecida como aspergilose. Aproximadamente vinte espécies foram identificadas como agentes de infecção nos humanos, sendo que as principais são: *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*, a infecção ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimido (PRAKASH e JHA, 2014)

O *A. fumigatus* é o mais comum agente infeccioso da aspergilose. Este fungo está presente em vários ambientes como no interior de casas, solo, folhas mortas, grãos armazenados e até em ambientes hospitalares. É uma doença que afeta animais e seres humanos, no caso dos seres humanos ela é considerada rara, afetando geralmente pessoas com o sistema imunológico debilitado, como em casos de HIV, câncer, após transplante e lúpus. Normalmente invade o organismo pelas vias respiratórias, alojando-se primeiro nos seios paranasais em seguida tomando as vias aéreas inferiores (PIANETTI *et al.*, 2005)

Estudos mostram que as microalgas do gênero *Snechococcus* possuem substâncias com ação antimicrobianas acumuladas em seu citoplasma. Estas substâncias agem sobre

vários micro-organismos tanto procariotos quanto eucariotos. (MADHUMATHI *et al.*, 2011; BIONDI *et al.*, 2008; HAMEED, 2013).

Trabalhos científicos apontam que os compostos fenólicos encontrado em biomassa de microalgas apresentam comprovada ação antifúngica; entre outros mecanismos, esses bioativos promovem a inativação de sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e na síntese de seus componentes estruturais (OLIVEIRA, 2008).

Os resultados de ação antifúngica tanto do EBt como das FRP 40-60% para fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Candida* e *Aspergillus* são muito promissores uma vez que se aproximam aos do grupo controle positivo onde foi utilizado uma droga já comercializada no mercado, anfotericina.

6.9 Atividade antibacteriana do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans*.

Os resultados apontam eficácia do EBt tanto sobre a CIM como na CBM em relação as FRPs, pois uma concentração menor de EBt, ($0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente) foi suficiente para apresentar efeito inibitório no crescimento bacteriano e bactericida sobre todas as bactérias do gênero *Staphylococcus*. As FRP 40-60% apresentaram concentrações idênticas ao EBt ($1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$) para efeito bactericida, porém, no que tange a concentração mínima inibitória de bactérias do gênero *Staphylococcus* a concentração de FRP 40-60% foi maior ($1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$) do que EBt ($0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Tabela 5).

As FRPs (0-20%, 20-40% e 60-80%) também apresentaram resultados sobre a inibição do crescimento bacteriano e bactericida sobre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, porém com concentrações bem maiores do que o EBt e as FRPs 40-60% (tabela 5).

Para a determinação a CIM, os poços da placa foram preenchidos inicialmente com 200 μL de cada amostra (EBt, FRP_{0-20%}, FRP_{20-40%}, FRP_{40-60%} e FRP_{60-80%}), sendo realizado o experimento em concentrações iniciais de 1 mg.mL^{-1} e outro de 25 mg.mL^{-1} . Em seguida, realizou-se a diluição seriada na base dois para obtenção de diferentes concentrações, que variaram entre 1 mg.mL^{-1} a $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 mg.mL^{-1} a $0,39 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente (conforme mostrado na figura 7).

Para a determinação da CBM após 24 horas depois da incubação, foram

removidos 10 μL da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguida de inoculação em placas de Petri com meio TSA.

Nos teste iniciado com a concentração menor de 1 mg.mL^{-1} , não ocorreu nenhuma atividade bactericida ou inibitória contra as cepas utilizadas. Todavia, a segunda testagem com a concentração inicial de 25 mg.mL^{-1} , houve atividade antibacteriana contra todas cepas testadas (conforme já mostrado na [figura 7](#)).

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato bruto total (EBt) e das frações ricas em proteínas (FRPs) de *S. nidulans* contra cepas bacterianas do gênero *Staphylococcus*.

Amostra	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228		<i>S. epidermidis</i> ATCC25923		<i>S. aureus</i> ATCC25923		<i>S. aureus</i> ATCC7000698	
	CIM (mg.mL^{-1})	CBM (mg.mL^{-1})	CIM (mg.mL^{-1})	CBM (mg.mL^{-1})	CIM (mg.mL^{-1})	CBM (mg.mL^{-1})	CIM (mg.mL^{-1})	CBM (mg.mL^{-1})
EBt ^a	0,78	1,56	0,78	1,56	0,78	1,56	0,78	1,56
FRP ^b	6,5	12,5	6,5	12,5	6,5	12,5	6,5	12,5
0-20% FRP ^b	3,12	3,12	3,12	3,12	6,5	12,5	6,5	12,5
20-40% FRP ^b	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
40-60% FRP ^b	6,5	12,5	6,5	12,5	6,5	12,5	6,5	12,5
60-80%								

^aExtrato bruto proteico obtido a partir da biomassa microalgal de *S. nidulans*

^bFrações proteicas de *S. nidulans* precipitadas com sulfato de amônio

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*; suas toxinas causam gastroenterites em humanos (ZECCONI e HAHN, 2000).

A espécie *S. aureus* são cocos Gram positivos formadores de colônias pigmentadas e um importante micro-organismo causador de mastite contagiosa nos rebanhos de gado; seu tratamento é difícil devido à elevada resistência aos antibióticos. Por este motivo, o *S. aureus* é o microrganismo patogênico frequentemente isolado no leite cru (ZECCONI e HAHN, 2000).

A *S. epidermidis* também é uma bactéria gram-positiva; é encontrada nos alimentos e também produzem enterotoxinas. Já foram encontradas em alimentos como embutidos cárneos e mexilhão no sul do Brasil (PEREIRA, 2001; ARASAKI, 2002).

Estudos isolados com microalgas marinhas dos gêneros *Synechocystis* e *Synechococcus* evidenciam que espécies desses gêneros produzem substâncias com efeitos inibidores sobre bactérias Gram-positivas (MARTINS et al., 2008; KUMAR et al., 2011). Outras algas também apresentam bioativos que atuam como bactericidas para estas espécies de bactérias.

As galactanas sulfatadas, um tipo de polissacarídeo da alga marinha verde encontrada no extrato da alga *Chaetomorpha aerea* apresentam efeitos bactericidas contra *Staphylococcus aureus*. Pesquisas envolvendo o extrato da alga marinha *Laurencia majuscula* foram encontrados compostos halogenados: elatol e iso-obtusol, os quais inibiram o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus epidermis* (PIERRE et al., 2011)

Os ácidos graxos da microalga *Synechocystis sp*, exibem atividade antioxidante e antimicrobiana, identificadas como: fitol, fucosterol, neofitadieno, ácidos palmítico, palmitoleico e oleico (PLAZA et al., 2010). Os compostos halogenados: elatol e iso-obtusol inibiram também o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus epidermis* (MACEDO et al., 2010)

Deste modo, a atividade antimicrobiana do extrato de algas pode estar relacionada com a ação de diversos compostos bioativos isolados como: florataninos, fenóis, galactana sulfatada, ácidos graxos, polissacarídeos sulfatados, alginato, pigmentos, carotenóides dentre outros. Ou pode ocorrer através do efeito sinérgico entre os compostos presentes no extrato. De modo que o extrato bruto pode apresentar inibição microbiana, porém, ao fracionar este extrato, a atividade inibitória de microrganismos pode desaparecer ou diminuir (EOM et al., 2012; PIERRE et al., 2011).

Os metabólitos secundários de algas também respondem por algumas atividades biológicas, sobretudo citotóxica e antibacteriana. Dentre os principais metabólitos secundários estão os terpenos e acetogeninas

É importante salientar que a extração dos diversos compostos bioativos de linhagens de cianobactérias necessita de solventes específicos como metanol, etanol, acetona, entre outros (SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2011; MADHUMATHI et al., 2011; BIONDI et al., 2008; HAMEED, 2013).

No estudo quanto a atividade bactericida do extrato da alga *Ulva fasciata* e *Lobophora variegata* frente à bactéria Gram + (*S. aureus*) foi constatada a ineficácia dos extratos etanólicos, metanólicos, acetônicos e hexânicos, porém o extrato aquoso da alga *Ulvafasciata* mostrou-se eficaz. (Christobel et al., 2011).

Extratos etanólicos, cetônicos e metanólicos da clorófita *Ulva lactuca* promoveu a

inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, assim como também de *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* e *Klebsiella pneumoniae*.

Portanto, o tipo de solvente utilizado no extrato de uma alga pode influenciar nas suas atividades biológicas. Nesta pesquisa, o extrato da microalga *S.nidulans* encontrava-se em meio aquoso, pois o objetivo foi avaliar a atividade do extrato bruto e das proteínas extraídas de *S. nidulans* quanto a atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana.

Apesar da variedade de compostos existentes em extratos naturais, um desafio para produção desses bioprodutos com finalidade medicamentosa em larga escala é a baixa concentração que podem estar disponíveis, por isso a importância em otimizar a recuperação dessas substâncias através de metodologias eficientes (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

Embora não seja recorrente a ação bactericida do extrato de *S. nidulans* sobre as bactérias Gram-negativas, o que tornaria esse extrato um antibiótico de amplo aspecto, os resultados desta pesquisa são promissores, uma vez que, o extrato de *S. nidulans* apresentou tanto o efeito inibitório bacteriostático como bactericida sobre as bactérias do gênero *Staphylococcus*.

7 CONCLUSÃO

O cultivo da microalga *S. nidulans* mostrou-se favorável em sistemas fechado do tipo fotobiorreator apresentando uma quantidade considerável de biomassa seca de 7,12 + 1,3 g.L⁻¹ após 30 dias. O extrato bruto total da biomassa da microalga *S. nidulans* formado por 45% de proteínas, 23% de carboidratos e 12% de lipídios apresentou excelente aplicação biotecnológica com propriedades antioxidante, antifúngica e bactericida. Quanto as frações proteicas do extrato, apenas as FRP 40-60% apresentaram os melhores resultados para atividades antifúngica e bactericida.

O setor biotecnológico, um dos que mais cresce em países desenvolvidos, visa muito os organismos que apresentam alta produtividade, baixo custo e com múltiplas propriedades que possam ser utilizados nas mais diversas áreas da indústria. Deste modo, o setor biotecnológico mundial deve apresentar real interesse no extrato da microalga *S. nidulans*, uma vez que, esta pesquisa mostrou sua eficiência como agente antioxidante, antifúngico, bacteriostático e bactericida. Além do mais, a microalga *S. nidulans* mostrou-se um micro- organismo que apresenta alta produtividade em curto período de tempo utilizando meio de cultura barato como o NPK.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J. et al. Microalgas: cultivo e aplicaciones. España: Universidade da Coruña, 1995.
- 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.
- ARASAKI, K. M. Efeito da atividade antimicrobiana de substância produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* no controle da microbiota do mexilhão *Perna perna*, 2002. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina
- B. WAWRIK; J. H. PAUL; L. CAMPBELL; D. GRIFFIN; L. HOUCHIN; A. FUENTES-ORTEGA & F. MÜLLER-KARGER . "Vertical structure of the phytoplankton community associated with a coastal plume in the Gulf of Mexico". Marine Ecology Progress Series, 2003.
- BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. Journal of Applied Phycology, v. 5, p. 235-241, 1993.
- BENCHRAKA C.; Algae Removal of Heavy Metals from Mining Wastewaters Bachelor's thesis 40 pages, appendices 4 pages March 2014 Finlandia.
- BERTOLDI, F. C., SANT'ANNA, E. & OLIVEIRA, J. L. B.. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. Curitiba: B. CEPPA. 26(1): 9-20, 2008.
- BETORET, E.; BETORET, N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. Trends in Food Science & Technology, v. 22, p. 498-508, 2011. *Biochemical Engineering Journal* 78. Elsevier B.V.: 1–10, 2013.
- BIONDI, D.; MACEDO, J. H. P. Plantas invasoras encontradas na área urbana de Curitiba (PR). Floresta, v.38, n.1, p.129-144, 2008. Biotecnologia, n.4, p.389-415, 2015.
- CAPORGNO, M. P.; HABERKORN, I.; BÖCKER, L.; MATHYS, A. Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water Clinical and Laboratory Standards Institute. Verification of commercial microbial identification and susceptibility test systems. M52. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2016.
- CHEN, C. Y, ZHAO X. Q., YEN, H. W., HO, S. H., CHENG, C. L., LEE, D. J., BAI, F. W. E CHANG, J. S. "Microalgae-based carbohydrates for biofuel production". *Biochemical Engineering Journal* . 2013
- CHEN, C. Y, ZHAO X. Q., YEN, H. W., HO, S. H., CHENG, C. L., LEE, D. J., BAI, F. W. E CHANG, J. S.. "Microalgae-based carbohydrates for biofuel production", 2011. CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in

photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 603-608, 1996.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

COHEN, Z. Chemicals from microalgae. London: Taylor & Francis, 1999.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton: CRC, 1986.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; *Anal. Biochem.* 1985

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.99-117

COSTA, M., COSTA-RODRIGUES, J. FERNANDES, M. H., BARROS, P., VASCONCELOS, V., & MARTINS, R.. MARINE cyanobacteria compounds with anticancer properties: a review on the implication of apoptosis, 2012.

DE LA NOÛE, J.; DE PAUW, N. The potencial of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, v.6, p.725-770, 1988.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

EHLERT, P.A.D.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; CAMPOS, D.A.; ALVIANO, C.S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. *Rev. Bras.* v.8, n.2, p.79-80, Setembro, 2006

EHRENREICH, I. M., WATERBURY, J. B., & WEBB, E. A.. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7401-7413, 2005.

EOM, S. H.; KIM, Y.M.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3251-3255, 2012.

F. O. PERKINS; L. W. HAAS; D. E. PHILLIPS & K. L. WEBB. "Ultrastructure of a marine *Synechococcus* possessing spinae". *Canadian Journal of Microbiology*, 1981.

F. PARTENSKY, J. BLANCHOT, D. VAULOT. "Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review". In Charpy L, Larkum AWD (eds. *Marine cyanobacteria*. no. NS 19. *Bulletin de l'Institut Oceanographique Monaco*, 1999.

FIORE, M.F., NEILAN, B.A., COPP, J.N., RODRIGUES, J.L.M., TSAI, S.M., LEE, H. & TREVORS, J.T.. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain 2005.

- FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. química nova, Free Radical Research, v.25, n.3, p.247-257, 1996.
- GARCÍA, M. C.; SEVILLA, J. M. F.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G.; *J. Appl. Phycol.* 2000,
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. Trends in Biotechnology, v.15, p.401-409, 1997.
- HALLMANN, A. Algae Biotechnology - green cell-factories on the rise. Current, 2015.
- HAMEED, S. Investigation of the production and isolation of bioactive compounds from cyanobacteria. 2013. p. 412. Tese (Doutorado em filosofia), Robert Gordon University, Aberdeen, 2013.
- HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. 1996.
- HOEK, C. van den et al. **Algae**: an introduction to phycology. London: Cambridge University, 1995.
- HOWARTH, R.W., MARINO, R. & COLE, J.J.. Nitrogen Fixation in Freshwater, Estuarine, and Marine Ecosystems. 2. Biogeochemical. Limnol. Oceanogr 1988.
- HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.
- J. B. WATERBURY; S. W. WATSON; F. W. VALOIS & D. G. FRANKS. "Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, 1986.
- J. BLANCHOT; M. RODIER & A. LEBOUTEILLER. "Effect of El Niño Southern Oscillation events on the distribution and abundance of phytoplankton in the Western Pacific Tropical Ocean along 165°E" (abstract page). J. Plank. Res, 1992.
- JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R.; Appl. Energy , 88, 3336, 2011
- KOMÁREK J. & HAUER T.. CyanoDB.cz. On-line database of cyanobacterial genera 2011.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.. CYANOPROKARYOTA. 1. teil chroococcales. in süßwasserflora von mitteleuropa 19/1 (h. ettl, g. gärtner, h. heyning & d. mollenhauer, eds.). gustav fischer, jena 1998.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation, v.106, p.2747-2757, 2002.
- KUMAR, M., TRIPATHI, M. K., SRIVASTAVA, A., NATH, G., & ASTHANA, R. K. A comparative study of antibacterial activity of brackish and fresh water cyanobacterials strains. *Asian Journal of Experimental Biology Sciences*, 3, 548-542, 2012.

- LACAZ-RUIZ, R. Utilização de meios de cultura a base de solução de cinzas, efluente da indústria cítrica e meios de cultura alternativos formulados através de programa específico de computação para cultivo de *Spirulina platensis* (Norst.). 133 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1996.
- LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of life food for aquaculture. FAO Fisc Tech. Pap.,v.361, p.7-42, 1996.
- LIMA DR. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Tóxicologia. Vol. 1. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. p. 141-149
- MACHADO, A.R.; GRAÇA, C.S.; ASSIS, L.M. Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. Revista de Ciências Agrárias, v.40, n.1, p.264-278, 2017.
- MADHUMATHI M, RENGASAMY R Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV. Int J Eng Sci, 2011.
- MADHUMATHI, V.; DEEPA, P.; JEYACHANDRAN, S. ANOHARAN, C.; VIJAYAKUMAR, S. Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake. International Journal of Microbiological Research, v. 2, n. 3, p.213-216, 2011
- MAHASNEH, I. A. Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella* sp (Chlorophyta). Cytobios, v.90, p.153-161, 1997.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. Water Research, v.65, p.186-202, 2014.
- MARTÍN-JUÁREZ, J., G. MARKOU, K. MUYLAERT, A. LORENZO-HERNANDO, E S. BOLADO. "Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: solving the hurdles". Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products, 2017.
- MARTINS, R. F., RAMOS, M. F., HERFINDA, L., SOUSA, J. A., SKARVEN, K., & VANSCONCELOS, V. M.. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs*, 2008
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S.; Renew. Sust. Energy Rev., 14, 217,
- MACEDO, N. R. P. V.; RIBEIRO, M. S.; VILLAÇA, R. C.; FERREIRA, W.; PINTO, A. M.; MACHADO, F. L. S.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S.; GESTINARI, L. M.; SOARES, A. R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, n.3, p. 441-452, 2010.
- MCPHERSON, R. A. Specific Proteins. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders. p. 259- 272, 2011.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling

of *Chlorella protothecoides*. Journal of Biotechnology, v.110, p.85-93, 2004.

MIRANDA, C. A. S. F. Atividade antioxidante de óleos essenciais de diversas plantas. 2010. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de lavras. 2010

MOLERO, G.;DÍEZ-OREJAS, R.;NAVARRO-GARCIA, F.; MONTEOLIVA L,P.L.A.J.;GIL, C.;SÁNCHEZ-PÉREZ, M.;NOMBELA. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. Internatl Microbiol.1:95-106.1998

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. Peptides, v. 33, p. 178-185, 2012.

NORTON, T.A et al. Algal biodiversity. Phycologia, n.35, p.308–326, 1996.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark clyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.82, n.6, p.558-564, 1996.

OLIVEIRA MS, BADIALE-FURLONG E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. World Mycotoxin Journal2008

PAREKH, J. AND CHANDA, S.V. (). *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. Turk. J. 2007

PAWLOWSKI, A. et al. Control engineering practice selective pH and dissolved oxygen control strategy for a raceway reactor within an event-based approach. Control Engineering Practice, v. 44, p. 209–218, 2015.

PEREIRA ML, CARMO LS, PEREIRA JL. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. Cienc Tecnol Aliment. 2001

PIANETTI FILHO, G. et al. Aspergilose cerebral em paciente imunocompetente. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 63, n. 4, p. 1094–1098, 2005

PICCARDI, R.; MATERASSI, R.; TREDICI, M. Algae and human affairs in the 21st century. Firenze: Universita Degli Studi de Firenze, 1999.

PIERRE, G.; SOPENA, V.; JUIN, C.; MASTOURI, A.; GRABER, M.; MAUGARD, T. Antibacterial Activity of a Sulfated Galactan Extracted from the Marine Alga *Chaetomorpha aerea* Against *Staphylococcus aureus*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v.16, p.937-945, 2011.

PRAKASH, R.eJha, S. N. Basics of the Genus Aspergillus. International Journal of Research in Botany, 2014. Disponível em <http://urpjournals.com/tocjnls>

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology Biotechnology, v.65,p.635-648, 2004.

R. W. CASTENHOLZ. "MOTILITY AND TAXES". IN N. G. CARR; B. A. Whitton (eds.). The biology of cyanobacteria. University of California Press, Berkeley and Los Angeles. 1982

- RAJANBABU, V.; CHEN, J. Y. Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 30, p. 39-44, 2011.
- RAVEN, J. A. Sensing pH? *Plant, Cell and Environment*, v.13, p.721-729, 1990. RAVEN, P.H. et al. *Biologia vegetal*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- RIGANO, V. D. M.; VONA, V.; ESPORITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiological significance of light and dark NH₄⁺ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, v.47, p.177-181, 1998.
- ROBERTS, W.K. AND SELITRENNIKOFF, C.P. **Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity**. *J. Gen. Microbiol.* 1988
- ROCHE, J. L.; GLEIDER, R. J.; GRAZIANO, L. M.; MURRAY, H.; LEWIS, K. Introduction of specific protein in eukaryotic algae grown under iron-phosphorus or nitrogen-deficient conditions. *JOURNAL OF PHYCOLOGY*, V.29, P.767-777, 1993.
- RODRIGUES, J. B. R. **Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura – valorização e tratamento**. São Carlos, 2000. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos.
- ROUND, F. E. *Biologia das algas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983.
- RUYTERS, G. Effects of blue light on enzymes. In: *BLUE light effects in biological systems*. Berlin: Springer-Verlag, 1984.
- SALEM, N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. *Backgrounder*, v.3, p.1-8, 1999.
- SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, M. E.; ESPEJO, M. T. PACHECO, R.; ESPINOLA, F.;
- HODAIFA, G. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. ***Journal of Applied Phycology***, v. 13, p.443–449, 2001.
- SHIFRIN, N. S.; CHISHOLM, S. W. Phytoplankton lipids: inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. *Journal of Phycology*. v.17, p.374-384, 1981
- SILAMBARASAN, R. C.; ABRAHAM, J. Biodiversity of marine cyanobacteria and its antibacterial activity. *IJPI's Journal of Biotechnology and Biotherapeutics*, v. 1 n.4, p. 17-19, 2011
- SINGH, R. K., TIWARI, S. P., RAI, A. K., & MOHAPATRA, T. M.. *Cyanobacteria: an emerging source for drug Discovery*, 2011.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. *Limnologia aplicada à aquicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. *Limnologia aplicada à aquicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.

SOUZA, JF. Avaliação da eficiência de diferentes métodos de lise celular na extração de proteínas solúveis da microalga *Chlorococcum elbense*. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019..

SU, Y. et al. Progress of microalgae biofuel ' s commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 74, n. December 2016, p. 402–411, 2017. TEIXEIRA,

V.L. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R.G.; SOARES-GOMES, A.(Orgs). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering*, 2006.

TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.

TRIPATHI, U. et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, n.68, p.197-199, 1999.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAO, S. R; RAVISHANKAR, G. A. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, v.68, n.2, p.197-199, 1999.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and charge in $K_{1/2}$ (CO₂) of photosynthesis in *C. vulgaris*. *Plant and Cell Physiology*, v. 32, p.379-384, 1991.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and charge in $K_{1/2}$ (CO₂) of photosynthesis in *C. vulgaris*. *Plant and Cell Physiology*, v. 32, p.379-384, 1991.

WEN, Z.Y; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, v.21, p.273-294, 2003.

Yim BC, Jung HC, Bang SD and Lee OM.. A study of nine unrecorded species of planktonic cyanobacteria (Cyanophyceae, Cyanophyta) in Korea. *Korean J. Environ.* 2018

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, v.345, p.15-18, 2000

ZHAO, B.; ZHANG, Y.; CUI, G. Carbon dioxide fixation and biomass production from combustion flue gas using energy microalgae. *Energy*, n.89, p.347-357, 2015.

ANEXO A - CADASTRO NO MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE



Ministério do Meio Ambiente

**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO
CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO**

Comprovante de Cadastro de Acesso Cadastro nº AC13018

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AC13018**
Usuário: **Universidade Federal do Ceará07.272.636/0001-31**
CPF/CNPJ: **Patrimônio Genético**
Objeto do Acesso:
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Synechococcus nidulans
Synechococcus sp.

Título da Atividade: **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS DO GÊNERO
Synechococcus**
CULTIVADAS EM FOTOBIORREATOR

Equipe

André Luis Coelho da Silva **Universidade Federal do Ceará**
Bartolomeu Warlene Silva Souza **Universidade Federal do Ceará**

Bruno Anderson Matias da Rocha
Elionai Gomes Freire
Wallady da Silva Barroso

Universidade Federal do Ceará
Universidade Federal do Ceará
Universidade Federal do Ceará

Data do Cadastro: **22/06/2021 10:51:58**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:58** de **24/06/2021**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Jatropha curcas L. Seed Cake Residue as an Alternative Source for Obtaining Curcin: A Type 1 Ribosome-Inactivating Protein

Wallady da Silva Barroso¹ · Talita Abrante Leite¹ · Vanessa de Abreu Feitosa¹ · Samara Sena da Penha¹ · Elionai Gomes Freire¹ · Vinicius Rodrigues de Castro e Silva¹ · Bartolomeu Warlene Silva de Souza² · André Luis Coelho da Silva¹

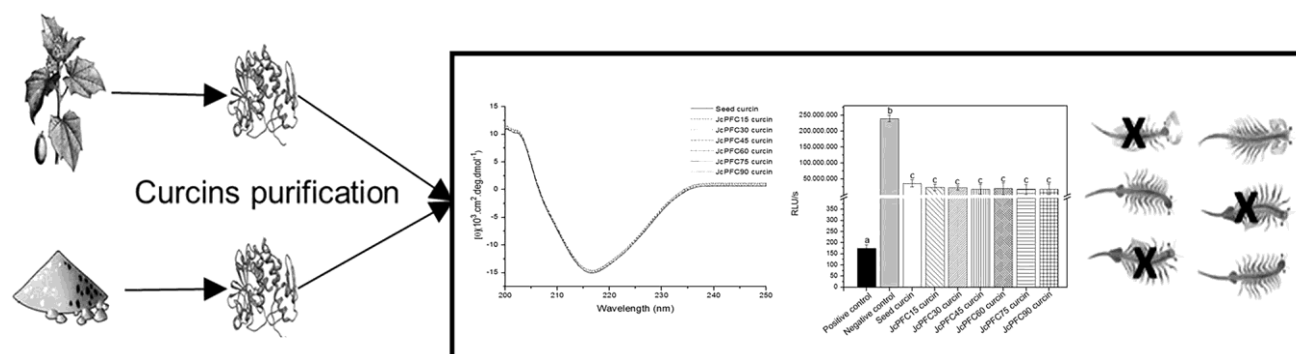
Received: 27 August 2020 / Accepted: 21 February 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. part of Springer Nature 2021

Abstract

Jatropha curcas seed cake is a byproduct of oil extraction from biodiesel industry. Although it has high protein content, its valorization is hampered by its toxicity. Curcin is a type 1 ribosome-inactivating protein (type 1 RIP) that contributes to the *Jatropha* seed cake toxicity. The present study aimed to evaluate the feasibility of using *Jatropha* seed cake as an alternative source to obtain bioactive curcin. Extracts from the seed cake stored for 15, 30, 45, 60, 75, and 90 days were used to produce protein fractions (JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90), which were further used in purifying curcin via size exclusion chromatography. All JcPFCs comprised curcin. The purified JcPFC curcins apparently had a molecular mass of 28 kDa, which was similar to the seed curcin. Western blot using antibody anti-curcin revealed a single band, corresponding to curcin. No significant differences were observed in the curcin concentrations in all JcPFCs throughout storage. Furthermore, JcPFCs' curcins presented conformational similarities to those of seed curcin, on evaluation by circular dichroism and intrinsic fluorescence spectroscopy. The RIP characteristic activity was assayed by rRNA-*N*-glycosidase activity test and in vitro protein synthesis inhibition assay, which revealed that the enzymatic activity was maintained in all JcPFCs' curcins. Moreover, the toxicity test did not indicate significant differences between JcPFCs' curcins and seed curcin. Accordingly, based on the results obtained, it is possible to affirm that *J. curcas* seed cake is a viable source of active curcin even after 90 days of storage.

Graphic Abstract



Keywords Curcin · Type 1 RIP · rRNA-*N*-glycosidase · *Jatropha curcas* seed cake

✉ André Luis Coelho da Silva
andre.coelho@ufc.br

Statement of Novelty

This work proposes a valorization of a biodiesel industry waste, *Jatropha curcas* seed cake. It is rich in bioactive compounds, like curcin, and it can be used to obtain this protein to Biotechnology.

Introduction

The *Jatropha curcas* L. or physic nut is a shrub from family Euphorbiaceae that is considered as a major source for global production of biofuel [1]. *J. curcas* seeds have high levels of triacylglycerol (43–61%) [2] making it an efficient source for second generation biofuel. Besides its energetic content, *J. curcas* is adapted to grow in dry regions and poor or contaminated soils, and it can be used as an erosion control agent [3].

The residual material, known as cake, that remains after the oil extraction can represent up to 70% of the seed weight [4, 5]. The *J. curcas* seed cake is rich in nitrogen, phosphorus, potassium, and carbon. It also has high protein content (at least 16%) and all amino acids besides lysine [6]. Despite its high nutritional value, *J. curcas* seed cake comprises antinutrients such as trypsin inhibitors [7], proteases inhibitors, phytates, and lectin [8].

The richness of *J. curcas* seed cake in bioactive compounds makes them a potential source of certain components that can be extracted, fractionated, and used for biotechnological purposes; however, *J. curcas* seed cake may prove toxic for several animal species due to the presence of phorbol esters and ribosome inactivating proteins (RIPs) [9, 10].

RIPs are a family of proteins that present rRNA *N*-glycosidase activity (EC 3.2.22), thereby removing a specific adenine residue from rRNA of the largest ribosome unit present in the exposed loop of 28S rRNA that is involved in the interaction between rRNA and eukaryotic elongation factors 1 (EF1) and 2 (EF2) [11]. The removal of these residues prevents the elongation factors from binding to the ribosomal subunit and, consequently, causing inhibition of protein synthesis [12, 13].

RIPs have been classified as type 1 RIPs that have a single polypeptide chain with rRNA *N*-glycosidase activity, type 2 RIPs that comprise an A-chain with catalytic activity (similar to type 1 RIPs) linked by disulfide bonds to the B-chain with lectin properties [14, 15], and type 3 RIPs that include a single chain with an additional protein segment that must be removed for the RIP to be active [16]. Besides the rRNA *N*-glycosidase activity, secondary enzymatic activities of RIPs were described such as lipase

Waste and Biomass Valorization

[17], DNase [18], phosphatase [19], chitinase [20], and superoxide dismutase [21].

In plants, RIPs contribute to the defense mechanism due to their antiviral [22], antifungal [23], antibacterial, and insecticidal activities [24], and can be applied in agriculture to combat pathogens and insect pest attacks. Furthermore, their biological activities suggest their use as potential antiviral drugs [25]. Additionally, conjugation of RIPs with antibodies or other carriers to form immunotoxins has been useful in research of anticancer therapy [26].

The curcin is a type 1 RIP found in seeds from *J. curcas*. Four isoforms have been reported for this RIP [27] with molecular weights ranging from 28.2 to 30 kDa, and pI between 8.3 and 4.8 [28]. Curcin possesses antitumor [29] and apoptotic [10] activities.

In particular, due to the high protein content (53–63%), *J. curcas* seeds act as an efficient resource in obtaining bioactive curcin; however, to the best of our knowledge, the curcin presence in seed cake has not been assessed for its conformational stability and biological activities in vitro and in vivo.

Therefore, the present study aimed to evaluate the presence, conformational stability, and biological activities of curcin present in residual *J. curcas* seed cake stored for different time periods.

Materials and Methods

Plant Material

Mature seeds of *J. curcas* were collected from plants grown in the experimental area (3°44'44.0"S; 38°34'28.6"W) of the Department of Biochemistry and Molecular Biology at the Federal University of Ceará. Seeds were collected under authorization number SISGEN ADA415C.

Yeast and Microcrustacean

The *Pichia pastoris* KM71H yeast strain was obtained from Invitrogen™ (Waltham, MA, USA). Freeze-dried cysts of brine shrimp (*Artemia salina*) were purchased from Maramar company (Arraial do Cabo, RJ, BRA).

J. curcas Seed Cake Preparation

Initially, *J. curcas* seeds were pressed using a stainless-steel expeller press (700 W Oil Press Machine, CGOLDEN-WALL, Germany), in order to extract the primary oil. The residual seed cake was divided in 1 kg samples, and was then dried and stored for 15, 30, 45, 60, 75, and 90 days into the air circulation oven at 37 °C. After each storage period, the samples were packed in aluminum foils and plastic bags, and were then frozen. For the experiments, the frozen samples

were defrosted and subjected to delipidation process with hexane (1:5 m/v) for 12 h, and the hexane solution was changed every 4 h. After removing the lipids, samples were dried for 12 h into an air circulation oven. The resultant material was grinded with an electric grain mill (Hamilton Beach, China), and then sieved through a 12-mesh sieve to obtain a fine and homogenous powder.

Protein Extraction

The total proteins were extracted by dispersing each powder seed cake (1:10 m/v) in PBS buffer with pH 7.2 at 10 °C under constant stirring (11×g) for 3 h. Thereafter, the samples were centrifuged at 12,000×g, at 4 °C, for 20 min in a refrigerated centrifuge (Thermo IEC Model Central GP & R 31,250,525, USA) to separate the solubilized proteins (supernatant). After centrifugation, solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used for 80% saturation of supernatants. After minimum 6 h, the protein precipitates were collected via centrifugation at 12,000×g at 4 °C for 20 min. They were then dissolved in the same buffer used for extraction and dialyzed for 12 h against a continuous flow of ultrapure water, followed by continuous flow of the PBS buffer for 4 h. These fractions obtained were named as protein fractions of seed cake (JcPFCs). The terms JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 were used to indicate JcPFCs obtained from *J. curcas* seed cakes after 15, 30, 45, 60, 75, and 90 days of storage, respectively.

Protein Quantification Assay

The protein was quantified according to the Bradford assay [30], and by utilizing bovine serum albumin (BSA) as the standard.

Curcin Purification

The curcin present in seeds, JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 were purified after size-exclusion chromatography on Sephadex G-100 column (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) pre-equilibrated with PBS buffer at pH 7.2 [31]. The protein peaks were eluted using the same buffer with a flow rate of 1 mL/min. The eluted fractions were monitored at 280 nm, using an Ultrospec 3100 Pro UV/Visible spectrophotometer (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

SDS-PAGE

The apparent molecular mass of the curcin isolated from the extract seeds and JcPFCs were determined via denaturing electrophoresis (SDS-PAGE) using 12.5% polyacrylamide gels (10 cm×8 cm), according to the Laemmli

method (1970) [32]. Before loading into the gel, samples were prepared in 62.5 mM Tris–HCl buffer (pH 6.8) containing 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, and 12.5% glycerol, followed by incubation at 100 °C for 5 min. Electrophoresis was carried out at a constant current of 25 mA for 90 min. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue (0.02%, v/v) in 10% (v/v) acetic acid. The molecular mass markers used were phosphorylase b, (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14 kDa).

Immunodetection Assay

Immunodetection was performed by Western blotting technique [33]. Initially, the protein bands in the SDS-PAGE were transferred to a nitrocellulose membrane (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) using a wet electroblotting system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at 110 V for 2 h. Thereafter, the reaction was inhibited with a protein solution (TBS buffer with pH 7.4 and 5% non-fat dry milk) at 50×g, 25 °C, for 5 min. Next, the membrane was washed using TBS buffer with pH 7.4 and incubated with rabbit polyclonal antibody anti-curcin (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h at 8 °C, followed by washing with the same buffer and incubating with anti-rabbit IgG peroxidase-conjugate antibody (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) for 2 h at 8 °C. The proteins bands were revealed with a diaminobenzidine (DAB) solution containing 5 μL of 30% hydrogen peroxide per mL of PBS buffer.

Circular Dichroism (CD)

The CD spectra were recorded on J-815 spectropolarimeter (JASCO Corporation, Japan) equipped with a Peltier temperature control unit. The entire equipment was constantly flushed with N_2 gas during operation. Measurements were carried out using a rectangular 1 mm path Spectrosil® quartz cuvette. Buffer scans were recorded under the same conditions and subtracted from the protein spectra before further analysis. CD spectra were averaged from 16 accumulations at 25 °C with a scanning speed of 50 nm/min. The spectra were measured in curcin solutions at 0.20 mg/mL in PBS buffer with pH 7.2. CD spectra were obtained in millidegrees and converted to molar ellipticity. Secondary structures were analyzed via CD spectrum deconvolution using the SELCON 3 program. Other programs used to process the obtained data were Spectra Manager™ II and Origin®.

Fluorescence Assay

Intrinsic fluorescence was used to evaluate the conformational changes in curcin during storage of the *J. curcas*

seed cake. The fluorescence emissions were measured on a FP-777 spectrofluorometer (JASCO Corporation, Japan) at 25 °C. The curcumin solutions (50 µg/mL) were excited at 295 nm and the emission spectra were monitored from 300 to 450 nm. After data collection, the buffer spectra were subtracted to avoid light scattering interference. For all emission measurements, 295 nm optic filter was used.

rRNA-N-glycosidase Activity

Yeast (*Pichia pastoris*) ribosome was isolated as previously described [34]. Yeast ribosomes (20 µg) were incubated at 25 °C for 1 h with 1 µg of curcumin isolated in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl. The reaction was inhibited by adding 1% SDS. The ribosome RNA (rRNA) was obtained via phenol-chloroform extraction and precipitated by adding 0.1 volume of sodium acetate 2 M at pH 6.0 and 2.5 volumes of 100% ethanol. The reaction mixtures were frozen and the precipitated rRNA was pelleted via centrifugation at 13,000×g for 30 min at 4 °C. The pellets were washed once with 70% ethanol and dried for 20 min in a vacuum desiccator. rRNA (10 µg) was treated (for 4 min, at 60 °C) with 20 µL of 1 M aniline-acetic (pH 4.5) or 20 µL of nuclease free-water (Promega Co., Madison, WI, USA) for no aniline-treated control. The reactions were inhibited by adding 0.1 volume of ammonium acetate 2 M and 2.5 volumes of 100% ethanol and the samples were then centrifuged at 15,000×g for 1 h at 4 °C. The pellets were resuspended in 15 µL buffer TPE (3.6 mM Tris, 3 mM NaH₂PO₄, 0.2 mM EDTA) and 60% formamide. They were mixed and run on a denaturing agarose-formamide gel electrophoresis. The RNA was visualized on a short-wave ultraviolet transilluminator.

Protein Synthesis Inhibition Assay

The activity of curcumin samples in inhibiting protein synthesis was assessed using the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System Kit (Promega Corporation, Mannheim, Germany) based on a cell-free system. Ricin (20 µg) was used as a positive control and the PBS buffer at pH 7.2 was used as a negative control. According to the manufacturer's instructions, the prepared mixture was incubated at 30 °C for 10 min and chilled on ice. Afterward, 2.5 µL of PBS buffer containing 20 µg of each curcumin isolated was added to the reaction mixture and incubated at 30 °C for 30 min. After adding 35 µL of nuclease-free water at room temperature, the reaction samples were transferred to a luminometer plate (LUMIstar® Omega) containing 5 µL of luciferase assay reagent at 25 °C. The relative luciferase activities of the samples were determined at 562 nm for 10 s using a microtiter top-plate reader (Infinite 200, Tecan, Mannedorf) with an initial delay of 2 s.

Toxic Activity

For this assay, 25 mg of *Artemia salina* cysts were incubated with artificial sea water (NaCl 23 g/L; MgCl₂·6H₂O 11 g/L, Na₂SO₄ 4 g/L; CaCl₂·2H₂O 1.3 g/L; KCl 0.7 g/L) at 25 °C, with continuous light and aeration [35]. After 24 h, the cysts hatched, and the nauplii were transferred to test tubes containing 1 mL of artificial sea water. Ten nauplii were transferred to each tube. Curcumin samples were added, to make the final volume of 2 mL, at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL), and for the negative control group, only artificial sea water was added. The second control group was provided BSA at the same concentrations of curcumin samples. After 24 h, the number of dead nauplii in each tube was counted. From these data, the percentage of death at each concentration and the DL₅₀ value by probit analysis, as described by Finney [36], were calculated.

Statistical Analyses

Quantitative data are expressed as the means ± standard deviation (SD). The statistical analyses were performed using OriginPro 8.5 software (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA). The collected data were statistically analyzed by Tukey's test, and the value of *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results and Discussion

Protein Quantification

The extraction of oil from *J. curcas* seeds results in cake generation, which may be rich in proteins. According to Oskoueian et al. [37] and Sharma et al. [38], *J. curcas* seeds and seed cake contain abundant bioactive compounds. The total proteins in the seeds, cake extracts, and JcPFCs are depicted in Fig. 1. High values of protein concentration were detected in the seeds (57.1 mg/mL) and cakes stored for 15, 30, 45, 60, 75, and 90 days (56.2, 53.3, 50.7, 46.3, 40.8, and 37.1 mg/mL, respectively) extracts. The protein content in the cake extracts was higher than that reported by Lestari et al. [39]. For cake extracts and JcPFCs, the maximum and minimum protein contents were found in seed cake storage at 15 and 90 days, respectively. The results also revealed decreasing protein concentrations in both curves. The quantity of proteins present in the residual cake could vary according to the method employed for oil extraction [40]. Delipidation from seeds using organic solvents can cause protein denaturation by exposing the hydrophobic groups of proteins and reducing their solubility [41]. Moreover, the prolonged storage of the seed cake at 37 °C may have led to the degradation of certain low thermostable proteins and

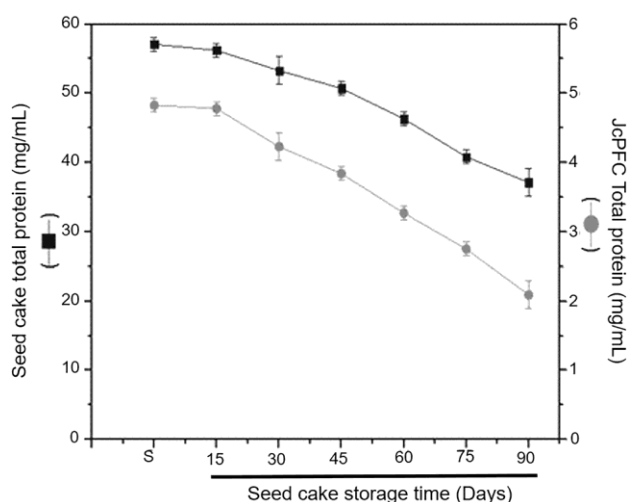


Fig. 1 Total protein quantification of the extracts from *Jatropha curcas* seed (S), seed cake storage at different time periods (15, 30, 45, 60, 75, and 90 days), and protein fractions of seed cake (JcPFCs) obtained after precipitation with ammonium sulfate at 80% saturation. All measurements were performed in triplicate

alteration of the protein amount obtained at the end of the process. Robl et al. [42] reported that the proteins present in plant biomass can also be degraded by proteases released by microorganisms during the storage process.

Curcin Purification

The seed extracts, JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 were subjected to chromatography on a Sephadex G-100 column pre-equilibrated with PBS buffer at pH 7.2. Moreover, the column was eluted with the same buffer and 1 mL fractions were collected. The chromatogram obtained for the seed extract presented five peaks, referred to as 1, 2, 3, 4, and 5 in the order of elution, respectively (Fig. 2a). Lin et al. [31] purified curcin from *J. curcas* seeds, they obtained only two major peaks in the Sephadex G-100 column. This difference was presumably due to the rigor of the parameters that we adopted during the purification process (as sample load, column dimensions, matrix packaging, flow rate, volume of fractions collected, etc.), which contribute to a more efficient separation profile [43].

The fractions corresponding to all peaks were collected, lyophilized, and analyzed via SDS-PAGE. Only peak 4 presented a single band protein (Figs. 2a1 and 3a) with apparent molecular mass of 28 kDa, similar to that of seed curcin [31]. The chromatograms obtained for JcPFC15 and JcPFC30 presented five peaks (Fig. 2b and c); however, peak 5 does not appear in JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 chromatograms (Fig. 2d–g). Presumably, low-molecular-weight proteins are more prone to cleavage and

degradation by proteases synthesized by the target-plant [44] or microorganisms [45] present in the cake. Although peaks 1, 2, and 3 presented significantly reduced intensities, peak 4 (corresponding to curcin) remained constant.

Fractions corresponding to peak 4 from JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 chromatograms were subjected to SDS-PAGE and Western blotting (Fig. 3). The electrophoresis result revealed that purified proteins from all JcPFCs exhibited a protein band pattern similar to seed curcin, free of contaminating proteins and with an apparent molecular mass of around 28 kDa (Fig. 3a). The presence of curcin in these samples was confirmed by Western blotting using rabbit polyclonal anti-curcin antibody (Fig. 3b). The curcin as well as others type 1 RIPs comprise a single peptide chain [46]. According to the procedures used, the pure seed curcin yield was 0.62 mg/g and the JcPFC curcin yield was approximately 0.57 mg/g.

Conformational Aspects

The results from circular dichroism (CD) spectra revealed that the curcin from *J. curcas* seeds and JcPFCs were quite similar (Fig. 4). JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 curcin spectra presented a large negative peak at 217 nm and a positive peak at 200 nm. The CD spectrum of curcin displayed a negative peak close to 217 nm, indicating that the β -sheet secondary structures are predominant. β -sheet structures typically reveal negative and positive bands at 217 and 195 nm, respectively [47]. The predicted secondary structure for all JcPFC curcins was 43.6% of β -sheet and 28.5% of α -helix. These results are in accordance with those of the seed curcin CD spectrum obtained by Lin et al. [31] and confirm that JcPFC curcin did not present conformational changes during the cake storage period.

The intrinsic fluorescence of tryptophan, tyrosine, and to a lesser extent phenylalanine, is a sensitive probe of conformational changes, because depending on the intensity signal and Stokes' shift of the fluorescence, it is possible to infer the local environment of the fluorophore [48]. The JcPFC curcins indicated intrinsic fluorescence typical of folded globular proteins with $\lambda_{em} \sim 337$ nm, characteristic of tryptophan side chains in a polar environment (Fig. 5). In corroboration, the maximum emission spectrum of native curcin from *J. curcas* seeds was similar to JcPFC curcins and the fluorescence intensity did not differ significantly [31]. Our results also revealed that no conformational changes existed in curcin during storage of the seed cake.

rRNA N-glycosidase Activity

The rRNA N-glycosidase test [12] was performed with JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and

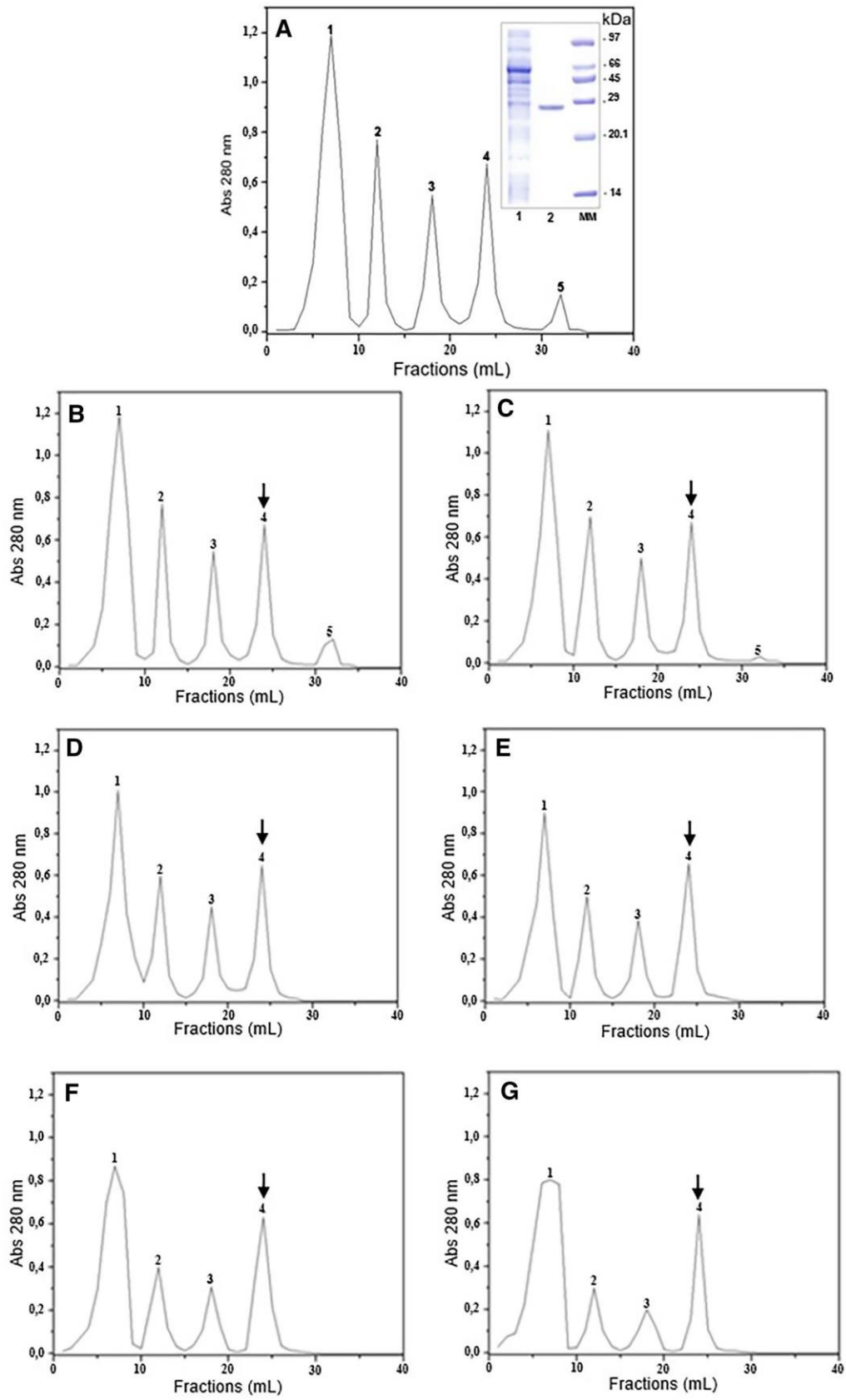


Fig. 2 Purification of curcins from *Jatropha curcas* seeds and JcPFCs via size exclusion chromatography on Sephadex G-100 column. The column was equilibrated and eluted with PBS buffer at pH 7.2. **a** Seed extract chromatography. Inset: SDS-PAGE 12.5% of the seed extract and purified curcins under presence of 1% β -mercaptoethanol (lane 1 shows seed extract, lane 2 shows curcins, and lane MM shows molecular mass markers); **b** JcPFC15; **c** JcPFC30; **d** JcPFC45; **e** JcPFC60; **f** JcPFC75; and **g** JcPFC90. The arrows indicate the peaks corresponding to curcins

JcPFC90 curcins (Fig. 6). All samples depurated the adenine residue and revealed a small RNA fragment (130–400 nucleotides) in the presence of aniline, which indicates a

positive activity [12, 33]. This fragment (also named as Endo's fragment) is considered as a diagnostic of RIP-catalyzed depurination [49–51]. In contrast, the depurination assay performed in the absence of curcins and aniline failed to generate the RNA fragment.

To further confirm the RIP activity, JcPFC15, JcPFC30, JcPFC45, JcPFC60, JcPFC75, and JcPFC90 curcins were tested in a rabbit reticulocyte lysate translation system to evaluate the inhibition of protein synthesis in a cell-free environment measured indirectly by luciferase-synthesis. The effect of seed curcins and JcPFC curcins on protein synthesis in vitro is illustrated in Fig. 7. Negative control

Fig. 3 **a** SDS-PAGE 12.5% analysis of the purified curcins from JcPFCs. MM: molecular mass markers; Lane 1: JcPFC15 curcins; Lane 2: JcPFC30 curcins; Lane 3: JcPFC45 curcins; Lane 4: JcPFC60 curcins; Lane 5: JcPFC75 curcins; Lane 6: JcPFC90 curcins; **b** Immunodetection of JcPFC15 (lane 1), JcPFC30 (lane 2), JcPFC45 (lane 3), JcPFC60 (lane 4), JcPFC75 (lane 5), and JcPFC90 (lane 6) curcins by Western blot using anti-curcins polyclonal antibody

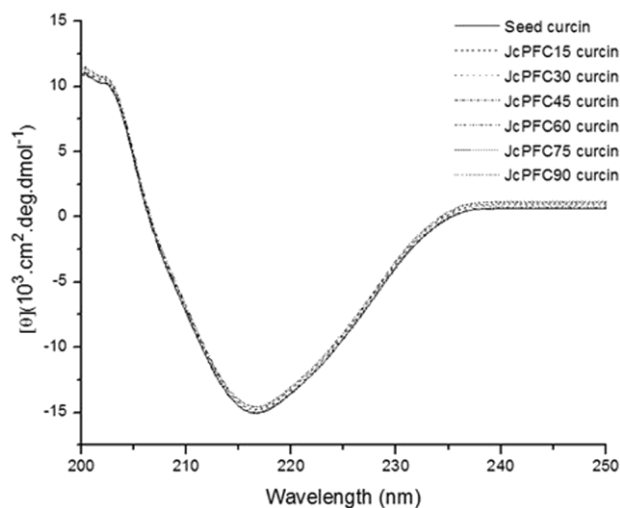
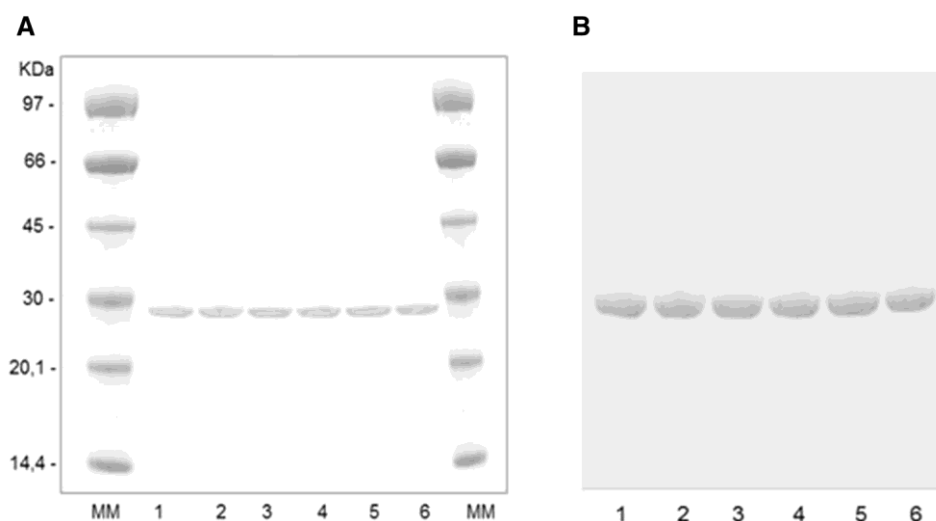


Fig. 4 Circular dichroism (CD) spectra of seed curcins and JcPFC curcins. CD spectra were measured in the far-UV range (200–250 nm) in 1 mm path length quartz cuvette and recorded as an average of 16 scans

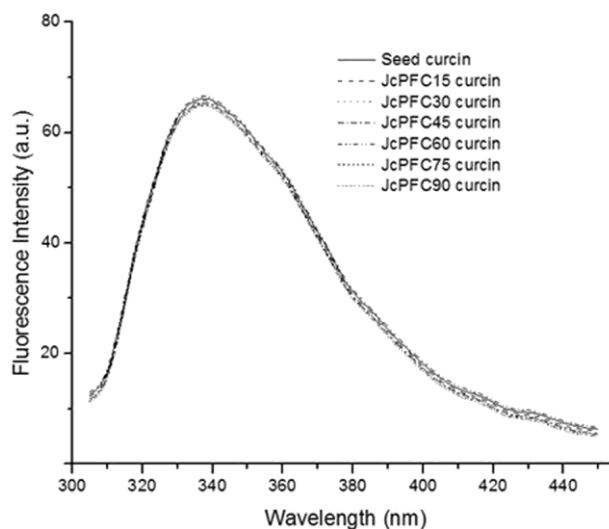


Fig. 5 Intrinsic fluorescence spectra of seed curcins and JcPFC curcins. Data obtained from CD and fluorescence indicates that isolated curcins from all the JcPFCs did not indicate evidence of denaturation and loss of secondary structure conformation even after 90 days of storage. The functional integrity of the JcPFC curcins was confirmed by rRNA *N*-glycosidase assay

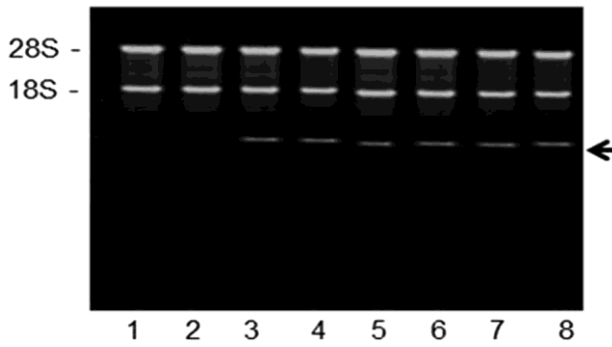


Fig. 6 rRNA N-glycosidase activity of the JcPFC curcins. Samples were analyzed by denaturing agarose–formamide gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. Lane 1: Ribosomes treated curcin only (negative control 1); Lane 2: ribosomes treated aniline only (negative control 2); Lane 3: ribosomes treated with JcPFC15 curcin and aniline; Lane 4: ribosomes treated with JcPFC30 curcin and aniline; Lane 5: ribosomes treated with JcPFC45 curcin and aniline; Lane 6: ribosomes treated with JcPFC60 curcin and aniline; Lane 7: ribosomes treated with JcPFC75 curcin and aniline; Lane 8: ribosomes treated with JcPFC90 curcin and aniline. The arrow indicates new RNA fragment produced by the JcPFC curcins and aniline cleavage

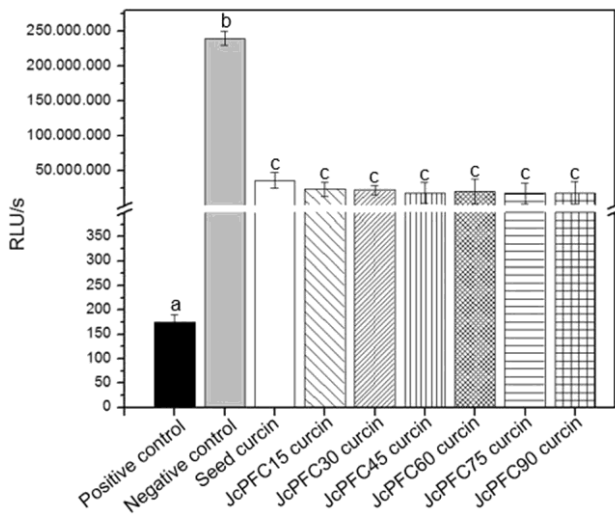


Fig. 7 In vitro protein synthesis inhibition assay. The samples (seed curcin and JcPFC curcins) were incubated at 37 °C for 1 h in a rabbit reticulocyte lysate mixture containing plasmid encoding for luciferase. Synthesis of luciferase was measured on a luminometer. Ricin (20 µg) was used as a positive control and the buffer in which curcin and JcPFC curcins were dissolved, that is, PBS with pH 7.2 was used as a negative control. Means followed by the same letter are not significantly different at Tukey’s 5% level of significance

group presented a result of approximately 238,000,000 RLU/s during luciferase-synthesis, whereas curcin decreased this value expressively at all fractions tested. JcPFC curcins presented approximately 25,000,000 RLU/s

Table 1 Percentage of dead *Artemia salina* nauplii in diferent concentrations of seed curcin and JcPFC curcins

Sample	Concentration (µg/mL)	%Mortality ¹	LD ₅₀ (µg/mL)
Seed curcin	100	100 ^{a*}	45.1 ± 2.30
	50	53 ^b	
	25	26 ^c	
	12,5	13 ^d	
	6,25	6 ^e	
JcPFC15 curcin	100	100 ^a	45.1 ± 2.30
	50	53 ^b	
	25	26 ^c	
	12.5	13 ^d	
	6.25	6 ^e	
JcPFC30 curcin	100	100 ^a	44.9 ± 2.31
	50	53 ^b	
	25	23 ^c	
	12.5	10 ^d	
	6.25	3 ^e	
JcPFC45 curcin	100	100 ^a	44.7 ± 2.85
	50	47 ^b	
	25	23 ^c	
	12.5	10 ^d	
	6.25	3 ^e	
JcPFC60 curcin	100	100 ^a	44.7 ± 2.32
	50	53 ^b	
	25	23 ^c	
	12,5	13 ^d	
	6.25	3 ^e	
JcPFC75 curcin	100	100 ^a	44.5 ± 2.08
	50	53 ^b	
	25	23 ^c	
	12.5	10 ^d	
	6.25	3 ^e	
JcPFC90 curcin	100	100 ^a	44.4 ± 2.16
	50	53 ^b	
	25s	23 ^c	
	12,5	17 ^d	
	6,25	2 ^e	
BSA ²	100	0	-
	50	0	
	25	0	
	12.5	0	
	6.25	0	

¹ After 24 h

²Bovine serica albumin—negative control

*Means followed by the same letter are not significantly different at Tukey’s 5% level of significance

at 20 µg/mL; however, ricin, seed curcin, and JcPFC curcins at same concentration revealed a different effect

on protein synthesis inhibition. This difference has been reported by Battelli [52] who analyzed the minimal concentration of RIP required to inhibit protein synthesis. The concentration varies from picomole for type 1 RIP and nanomole for type 2 RIP. The protein synthesis inhibition using rabbit reticulocyte lysate translation system has been used in others studies with different RIPs [53–55].

Toxicity Assay

The results presented in Table 1 indicate that curcins maintained its toxicity throughout the storage period of the seed cake. In this assay, both the seed and the JcPFC curcins were able to kill *Artemia salina* nauplii with extremely close LD₅₀ values (45.1–44.5), and the highest percentage of mortality was obtained in the protein concentration of 100 µg/mL. *A. salina* has been used as a target organism to detect the bioactive compounds and toxicity level in plant extracts [56, 57]; however, only few RIPs have been evaluated in the *Artemia* lethality test. In most instances, type 2 RIPs such as pulchellin [58] and fruticulosin [59] have presented high toxicity. In contrast, the other RIPs have low toxicity [60, 61].

Conclusion

We demonstrated that the isolated curcins maintains a stable concentration (at 0.57 mg/g) throughout the storage period. Moreover, JcPFC curcins conformational pattern remained identical to the curcins isolated from *J. curcas* seeds as proven by circular dichroism and intrinsic fluorescence spectroscopies. As expected, maintaining the structure integrity leads to an intact enzymatic activity, as demonstrated by rRNA-*N*-glycosidase activity and protein synthesis inhibition assays, and maintains equal toxicity levels between all JcPFC curcins and native curcins. We demonstrated that purification of active curcins using *J. curcas* seed cake as an initial source even after 90 days of storage at 37 °C is possible, indicating no need of refrigeration during the storage or for immediate utilization of the cake. Thus, we demonstrated that curcins isolation does not require *J. curcas* seeds and can be applied in the biodiesel industry for acquisition of the same raw material; however, industries looking for a product that uses curcins can utilize a byproduct from the biodiesel industry and have a more profitable and sustainable process.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the financial support of CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Brazil).

Author Contributions Not applicable.

Funding This research received grant from Brazilian public funding agencies CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Data Availability Not applicable.

Code Availability Not applicable.

Declarations

Conflicts of interest The authors do not declare any conflicts of interest in this study.

References

- Montes, J.M., Melchinger, A.E.: Domestication and breeding of *Jatropha curcas* L. Trends Plant Sci. **21**, 1045–1057 (2016)
- Abdulla, R., Chan, E.S., Ravindra, P.: Biodiesel production from *Jatropha curcas*: a critical review. Crit. Rev. Biotechnol. **31**, 53–64 (2011)
- Reubens, B., Achten, W.M.J., Maes, W.H., Danjon, F., Aerts, R., Poesen, J., Muys, B.: More than biofuel? *Jatropha curcas* root system symmetry and potential for soil erosion control. J. Arid Environ. **75**, 201–205 (2011)
- Achten, W.M.J., Verchot, L., Franken, Y.J., Mathijs, E., Singh, V.P., Aerts, R., Muys, B.: *Jatropha* bio-diesel production and use. Biomass Bioenerg. **32**, 1063–1084 (2008)
- Baldini, M., Ferfuaia, C., Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Pascali, J., Piasentier, E., Franceschi, L.: Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Ind. Crop. Prod. **59**, 268–276 (2014)
- Makkar, H.P.S., Aderibigbe, A., Becker, K.: Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chem. **62**, 207–215 (1998)
- Costa, H.P., Oliveira, J.T., Sousa, D.O., Morais, J.K., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C., Viegas, R.A., Vasconcelos, I.M.: JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. Front. Microbiol. (2014). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00005>
- Saetae, D., Suntornsuk, W.: Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. Int. J. Mol. Sci. **12**, 66–77 (2010)
- Gogoi, R., Niyogi, U.K., Tyagi, A.K.: Reduction of phorbol ester content in *Jatropha* cake using high energy gamma radiation. J. Radiat. Res. Appl. Sci. **7**, 305–309 (2014)
- Zhao, Q., Wang, W., Wang, Y., Xu, Y., Chen, F.: The effect of curcins from *Jatropha curcas* on apoptosis of mouse sarcoma 180-cells. Fitoterapia **83**, 849–852 (2012)
- Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L., Sperti, S.: Effect of alpha-sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. Biochem. J. **257**, 723–727 (1989)
- Endo, Y., Tsurugi, K.: RNA *N*-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. J. Biol. Chem. **262**, 8128–8130 (1987)
- Lin, J., Li, Y.-X., Zhou, X.-W., Tang, K.-X., Chen, F.: Cloning and characterization of a curcins gene encoding a ribosome inactivating protein from *Jatropha curcas*. DNA Seq. **14**, 311–317 (2003)

14. Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J.: Ribosome inactivating proteins from plants: more than RNA *N*-glycosidases? *FASEB J.* **15**, 1493–1506 (2001)
15. Stirpe, F.: Ribosome-inactivating proteins. *Toxicol.* **44**, 371–383 (2004)
16. Stirpe, F., Barbieri, L.: Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett.* **195**, 1–8 (1986)
17. Morlon-guyot, J., Helmy, M., Lombard-frasca, S., Pignol, D., Piéroni, G., Beaumelle, B.: Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **278**, 17006–17011 (2003)
18. Ruggiero, A., Chambéry, A., Di Maro, A., Pisante, M., Parente, A., Berisio, R.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of PD-L4, a ribosome inactivating protein from *Phytolacca dioica* L. leaves. *Protein Pept. Lett.* **14**, 97–100 (2007)
19. Helmy, M., Lombard, S., Piéroni, G.: Ricin RCA₆₀: evidence of its phospholipase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 252–255 (1999)
20. Shih, N.R., McDonald, K.A., Jackman, A.P., Girbés, T., Iglesias, R.: Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Sci.* **130**, 145–150 (1997)
21. Li, X.D., Chen, W.F., Liu, W.Y., Wang, G.H.: Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins: cinnamomin and camphorin from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Expr. Purif.* **10**, 27–31 (1997)
22. Kaur, I., Gupta, R.C., Puri, M.: Ribosome inactivating proteins from plants inhibiting viruses. *Virol. Sin.* **6**, 357–365 (2011)
23. Krivdova, G., Neller, K.C.M., Parikh, B.A., Hudak, K.A.: Antiviral and antifungal properties of RIPs. *Ribos. Inact. Proteins* (2014). <https://doi.org/10.1002/9781118847237.ch13>
24. Zhu, F., Zhou, Y.K., Ji, Z.L., Chen, X.R.: The plant ribosome-inactivating proteins play important roles in defense against pathogens and insect pest attacks. *Front Plant Sci.* (2018). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00146>
25. DiMaro, A., Pizzo, E., Girbes, T.: Biotechnological potential of ribosome-inactivating proteins (RIPs). In: Carlini, C.R., Braum, R.L. (eds.) *Plant toxins*. Springer, Dordrecht (2017)
26. Polito, L., Bortolotti, M., Pedrazzi, M., Bolognesi, A.: Immunotoxins and other conjugates containing saporin-S6 for cancer therapy. *Toxins* **3**, 697–720 (2011)
27. Hartley, M.R., Lord, J.M.: Genetics of ribosome-inactivating proteins. *Mini Rev. Med. Chem.* **5**, 487–492 (2004)
28. He, W., King, A.J., Khan, M.A., Cuevas, J.A., Ramiramana, D., Graham, I.A.: Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 1183–1190 (2011)
29. Jaramillo-quintero, L.P., Montis de Oca, A.C., De Rojas, M., Rojas-hernández, A.R., Campos-rodríguez, S., Martínez-ayala, A.L.: Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against Her2 receptor on tumor cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 896–906 (2015)
30. Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976)
31. Lin, J., Zhou, X., Wang, J., Jiang, P., Tang, K.: Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **40**, 107–118 (2010)
32. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970)
33. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–4354 (1979)
34. Smith, D.C., Marsden, C.J., Lord, J.M., Roberts, L.M.: Expression, purification and characterization of ricin vectors used for exogenous antigen delivery into the MHC Class I presentation pathway. *Biol. Proced. Online* **5**, 13–19 (2003)
35. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Mclaughlin, J.L.: Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* **45**, 31–34 (1982)
36. Finney, D.J.: Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press, Cambridge (1971)
37. Oskoueian, E., Abdullah, N., Saad, W.Z., Omar, A.R., Ahmad, S., Kuan, W.B., et al.: Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. *J. Med. Plants Res.* **5**, 49–57 (2011)
38. Sharma, A.K., Gangwar, M., Kumar, D., Nath, G., Kumar Sinha, A.S., Tripathi, Y.B.: Phytochemical characterization, antimicrobial activity and reducing potential of seed oil, latex, machine oil and presscake of *Jatropha curcas*. *Avicenna J. Phytomed.* **6**, 366–375 (2016)
39. Lestari, D., Mulder, W.J., Sanders, J.P.M.: *Jatropha* seed protein functional properties for technical applications. *Biochem. Eng. J.* **53**, 297–304 (2011)
40. Xiao, J., Zhang, H.: Comparative evaluation of *Jatropha curcas* L. seed meals obtained by different methods of defatting on toxic, antinutritional and nutritive factors. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1126–1132 (2011)
41. Labuckas, D., Maestri, D., Lamarque, D., Lamarque, A.: Effect of different oil extraction methods on proximate composition and protein characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) flour. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**, 794–799 (2014)
42. Robl, D., Mergel, C.M., Costa, P.S., Pradella, J.G.C., Padilla, G.: Endophytic actinomycetes as potential producers of hemicellulases and related enzymes for plant biomass degradation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **62**, 1–11 (2019)
43. Hong, P., Koza, S., Bouvier, E.S.P.: A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **35**, 2923–2950 (2012)
44. Capocchi, A., Muccilli, V., Casani, S., Foti, S., Galleschi, L., Fontanini, D.: Proteolytic enzymes in storage protein mobilization and cell death of the megagametophyte of *Araucaria bidwillii* Hook post-germinated seeds. *Planta* **233**, 817–830 (2011)
45. Zacharof, M.P., Lovitt, R.W.: Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *APCBEE Proc.* **2**, 50–56 (2012)
46. Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F.: Ribosome inactivating protein from plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1154**, 237–282 (1993)
47. Gopal, R., Park, J.S., Seo, C.H., Park, Y.: Applications of circular dichroism for structural analysis of gelatin and antimicrobial peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3229–3244 (2012)
48. Ballet, T., Boulange, L., Brechet, Y., Bruckert, F., Weidenhaupt, M.: Protein conformational changes induced by adsorption onto material surfaces: an important issue for biomedical applications of material science. *Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci.* **58**, 303–315 (2010)
49. May, M.J., Hartley, M.R., Roberts, L.M., Krieg, P.A., Osborn, R.W., Lord, J.M.: Ribosome inactivation by ricin chain-A sensitive method to assess the activity of wild-type and mutant polypeptides. *EMBO J.* **8**, 301–308 (1989)
50. Battelli, M.G., Barbieri, L., Bolognesi, A., Buonamici, L., Valbonesi, P., Polito, L., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Stirpe, F.: Ribosome-inactivating lectins with polynucleotide:adenosine glycosidase activity. *FEBS Lett.* **408**, 355–359 (1997)

51. Puri, M., Kaur, I., Perugini, M.A., Gupta, R.C.: Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discov. Today*. **17**, 774–783 (2012)
52. Battelli, M.G.: Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**, 513–521 (2004)
53. Barbieri, L., Polito, L., Bolognesi, A., Ciani, M., Pelosi, E., Farini, V., Jha, A.K., Sharma, N., Vivanco, J.M., Chambery, A., Parente, A., Stirpe, F.: Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1760**, 783–792 (2006)
54. Stirpe, F., Bolognesi, A., Bortolotti, M., Farini, V., Lubelli, C., Pelosi, E., Polito, L., Dozza, B., Strocchi, P., Chambery, A., Parente, A., Barbieri, L.: Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). *Toxicon*. **50**, 94–105 (2007)
55. Das, M.K., Sharma, R.S., Mishra, V.A.: Cytotoxic type-2 ribosome inactivating protein (from leafless mistletoe) lacking sugar binding activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 1096–1103 (2011)
56. Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z.L., Pérez, P., García-Grávalos, M.D.: A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* **2**, 1–5 (2002)
57. Pervin, F., Hossain, M.M., Khatun, S., Siddique, S.P., Salam, K.A., Karim, M.R., Absar, N.: Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on Brine Shrimp. *J. Med. Sci.* **6**, 999–1002 (2006)
58. Ramos, M.V., Mota, D.M., Teixeira, C.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A.: Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon* **36**, 477–484 (1998)
59. Vasconcelos, M.A., Penha, S.S., Castro e Silva, V.R., Leite, T.A., Souza, E.B., Souza, B.W.S., Teixeira, E.H., Silva, A.L.C.: Fruticulosin: a novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus fruticosus* seeds that exhibits toxic and antileishmanial activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **658**, 46–53 (2018)
60. Ferreras, J.M., Citores, L., Benito, F.M.D., Arias, F.J., Rojo, M.A., Munoz, R., Iglesias, R., Girbes, T.: Ribosome inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Curr. Topics Phytochem.* **3**, 113–128 (2000)
61. Van Damme, E.J.M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandebussche, F., Desmyter, S., Peumans, W.J.: Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **20**, 395–465 (2001)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Wallady da Silva Barroso¹ · Talita Abrante Leite¹ · Vanessa de Abreu Feitosa¹ · Samara Sena da Penha¹ · Elionai Gomes Freire¹ · Vinicius Rodrigues de Castro e Silva¹ · Bartolomeu Warlene Silva de Souza² · André Luis Coelho da Silva¹

¹ Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará 60455-970, Brazil

² Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará 60356-000, Brazil

EFFECT OF CHRONIC RENAL DYSFUNCTION ON THE PERMEABILITY OF THE COLON TO WATER AND ELECTROLYTES: EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

Efeito da disfunção renal crônica sobre a permeabilidade do cólon para água e eletrólitos: estudo experimental em ratos

Elionai Gomes **FREIRE**¹, José Cirlânio Sousa **ALBUQUERQUE**¹, Israel Pinto **LEAL**¹,
Nayara Alves **SOUSA**², José Ronaldo Vasconcelos da **GRAÇA**¹

How to cite this article: Freire EG, Albuquerque JCS, Leal IP, Sousa NA, Graça JRV. Effect of chronic renal dysfunction on the permeability of the colon to water and electrolytes: experimental study in rats. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2019;32(4):e1472. DOI: /10.1590/0102-672020190001e1472

From the ¹Laboratório de Fisiologia e Neurociência do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Faculdade de Medicina, Sobral, CE, Brasil, e ²Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, (¹Physiology and Neuroscience Laboratory of the Biotechnology Graduate Program, School of Medicine, Sobral, CE, Brazil, and ²Pharmacology Laboratory of the Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil)

HEADINGS - ENephrectomy. Renal insufficiency. Colon. Water. Electrolytes

Correspondence:

Elionai Gomes Freire
E-mail: elionai@hotmail.com

Financial source: none

Conflict of interest: none

Received for publication: 04/03/2019

Accepted for publication: 02/07/2019

DESCRITORES - Nefrectomia. Insuficiência renal. Cólon. Água. Eletrólitos..

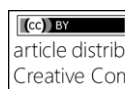
ABSTRACT - Background: Renal insufficiency is a disease that affects several organs by provoking hypervolemia and uremia. The disease reaches more than 500 million people worldwide and few studies bring their influence on the gastrointestinal tract. **Aim:** To evaluate the influence of 5/6 nephrectomy-induced hypervolemia on colonic permeability to water and electrolytes. **Method:** Sixty male Wistar rats weighing between 280-300 g were divided into three groups: 3, 7 and 14 days after nephrectomy, each one having a false-operated/control and partially nephrectomized. For colonic permeability they were submitted to colonic perfusion with a solution of Tyrode containing phenolphthalein. Differences among the concentrations of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ were used to calculate the rate of colonic permeability for the electrolytes. Phenolphthalein concentrations were used to evaluate the rate of secretion and water absorption. **Results:** The colonic secretion of water and electrolytes occurred expressively in the group seven days after nephrectomy. Hemodynamic and biochemical assessments determined the progression of renal failure in all three groups and polyethylene glycol was shown to be effective in reversing the secretory capacity of the colon. **Conclusion:** Hypervolemia established after 7 days post-nephrectomy 5/6 caused marked colonic secretion for water and electrolytes. The organism presents progressive colonic secretion as the blood volume increases; on the other hand, polyethylene glycol was able to revert this secretory framework of the colon to water and electrolytes by reversing the hypervolemia.

RESUMO - Racional: A insuficiência renal é doença que afeta diversos órgãos por provocar hipervolemia e quadro urêmico ao organismo. A doença atinge mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo, e poucos estudos trazem sua influência sobre o trato gastrointestinal. **Objetivo:** Avaliar a influência da hipervolemia induzida pela nefrectomia 5/6 sobre a permeabilidade colônica para água e eletrólitos. **Método:** Foram utilizados 60 ratos machos Wistar, pesando entre 280-300 g divididos em três grupos: 3, 7 e 14 dias de pós-nefrectomia. Cada grupo foi formado por um controle e outro parcialmente nefrectomizado. Para os estudos de permeabilidade colônica, os animais foram submetidos à perfusão colônica com solução de Tyrode contendo fenolftaleína por 60 min. Diferenças entre as concentrações de Na⁺, K⁺, e Cl⁻ foram utilizadas para calcular a taxa de permeabilidade colônica para os eletrólitos e as de fenolftaleína para avaliar a taxa de secreção e absorção de água. **Resultados:** A secreção colônica de água e eletrólitos ocorreu de forma expressiva no grupo 7 dias pós-nefrectomia. Avaliações hemodinâmicas e bioquímicas determinaram a evolução da insuficiência renal nos três grupos e o polietilenoglicol mostrou-se eficaz na reversão da capacidade secretora do cólon. **Conclusão:** O quadro de hipervolemia estabelecido a partir dos sete dias pós-nefrectomia 5/6 provocou acentuada secreção colônica para água e eletrólitos. O organismo apresenta secreção colônica progressiva a medida que aumenta a volemia sanguínea; por outro lado, o polietilenoglicol foi capaz de reverter esse quadro secretor do cólon para água e eletrólitos por reverter o quadro hipervolêmico.

INTRODUCTION

The kidneys are responsible for regulating body fluids and eliminating unwanted products from the body. Patients with renal failure do not maintain metabolic and hydroelectrolytic balance resulting in plasma hypervolemia that compromises the functioning of various systems or organs².

Kidney failure is a relevant public health problem because it has epidemic proportions. The disease affects more than 500 million people worldwide²³. In Brazil, the number of dialysis patients is around 100,000, with a hospital stay rate of 4.6% per month and mortality of 17% per year²¹. Clinical observations show that plasma hypervolemia in

 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

hemodialysis patients is associated with gastrointestinal disease. There is also a strong association between hypervolemia and gastric emptying time in patients with terminal renal failure. The results show that 68% of renal patients have dyspepsia and reduced gastric emptying time when compared to patients without this disease⁵.

Research on rats submitted to 5/6 nephrectomy has shown that there is a significant reduction in gastric emptying, and when submitted to bilateral nephrectomy they present intense intestinal secretion of water and electrolytes in the duodenal, jejunal and ileal segments^{3,10,11}. Any kind of electrolyte imbalance is dangerous since the optimal functioning of the body depends on it. Low sodium (hyponatremia), for example, can cause confusion and muscle weakness^{4,9,15}.

The colon is part of the intestine that suffers many influences of intrinsic factors directly compromising its absorptive and secretory capacity¹⁵. In this aspect, the hypervolemia caused by renal failure would alter the permeability of the colon causing dehydration and electrolyte imbalance in the body.

The aim of this study was to evaluate the colonic permeability to water and electrolytes in induced hypervolemia consequent to 5/6 nephrectomy.

METHOD

The project was approved by the Animal Use Ethics Commission of the Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil, with protocol number 11/15.

Male Wistar rats weighing between 280-300 g were used. The animals were kept in cages with a maximum of five at an average temperature of $24 \pm 2^\circ \text{C}$ in 12 h light/dark alternation cycles, receiving standard feed (Nuvilab[®]) and water ad libitum.

Sixty animals were divided into three groups: 3, 7 and 14 days, each group consisting of a control (SHAM) and a partially nephrectomized control (PNX).

Surgical procedures

The animals were anesthetized with xilasine (Virbaxil[®] 2%, Virbac, 20 mg/kg) and ketamine (Sed omin, Konig do Brasil, 25 mg/kg) both intramuscularly. Initially, they underwent left lateral lumbotomy, when the upper and lower left kidney nephrectomy was performed. For this, the animals' hair was shaved in the renal bed region and the abdominal cavity was opened. Then the left kidney was released, decapsulated with special care not to damage the adrenal gland, and both left and upper left kidney poles were removed by scalpel incision. Bleeding was stopped using an absorbable hemostatic (Surgicel[®], Ethicon), and the surgical wound was carefully closed by suturing in two planes with 4.0 nylon thread.

After seven days, the animals were again anesthetized as previously described and submitted to right lateral lumbotomy. The right kidney was decapsulated, the renal hilum was ligated, the right kidney was removed and the surgical wound was carefully closed by suturing in two planes with 4.0 nylon thread. The end result of both operations was a partial nephrectomy at 5/6¹.

For all experimental group, a SHAM group was submitted to the same laparotomy and renal pedicle manipulation, except for subtraction of renal mass.

During the 3rd, 7th and 14th days, a laparotomy of approximately 2 cm was performed on the SHAM and PNX animals to visualize the abdominal viscera. After isolation of the colon, polyvinyl cannulae (0.3 cm OD/0.2 cm OI) were introduced at their proximal and distal end by surgically created fistulas that were occluded by obstructive ligation with surgical threads (silk 3.0), forming in such a way between cannulae and colon segment, the circuit to be perfused. After cannula implantation, the loops were reintroduced into the abdominal cavity.

For infusion, modified Tyroard's solution (NaCl 6.5 g/l; KCl 0.14 g/l; CaCl 0.12 g/l; NaHCO₃ 0.2 g/l; NaH₂PO₄ 0.01 g/l)

and phenolphthalein 50 mg/ml as a non-absorbable marker, were used. The liquid was kept warm in a water bath at 37° C and infused by a peristaltic pump (Milan BP-200) at a constant rate of 0.14 ml/min. Once the preparation was stabilized for 30 min, the infusion was collected in test tubes every 20 min for 60 min (three samples).

To determine the effect of dehydration on colonic permeability, a group of animals seven days post-nephrectomy 5/6 received 4 h before subcutaneous colonic infusion, 2.5 ml of PM 20,000 polyethylene glycol solution (30%) on each side of the animal's back¹⁴.

Hemodynamic parameters by tail plethysmography

For measurements of systolic blood pressure and heart rate during the 3rd, 7th, and 14th days, SHAM and PNX rats were placed in a heated acrylic cylindrical tube and adequately ventilated for systolic blood pressure measurements. For such procedure, the tail was fitted to a rubber cuff and fitted to the proximal region of the tail and attached to the sphygmomanometer to automatically inflate and deflate at fixed intervals of approximately 50 s. The signal was captured and connected to a signal amplifier, RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats and Mice (Kent Scientific Corporation) and connected to a PowerLab/400 digital analog converter (ADInstruments, Australia).

The animals were kept for a period of adaptation and stabilization of the signals; thereafter, the 30-min experiments were started, being the first 10 min to adequate, and the systolic blood pressure and heart rate were simultaneously checked for the next 20 min.

Central venous pressure by jugular cannulation

To measure central venous pressure, before colonic perfusion, animals were anesthetized with 1.2 mg/kg of urethane, and had the right jugular vessel cannulated using cannulas (PE50); the cannulas were filled with saline and heparin (500 U/ml).

At the time of the experiments, the cannulas were previously inserted into the vessels and coupled to a PowerLab/400 biological signal acquisition system (AD Instruments, Australia) to obtain continuous hemodynamic records, which were stored in a computer.

Blood volume

Blood volume was determined after colonic perfusion by hemodilution technique. For this, the animals received intravenous injection (0.2 ml) of Evans blue solution (40 mg%) via the right jugular vein. At the time of sacrifice, blood was collected by cardiac puncture and centrifuged at 2,800 rpm for 20 min. Evans blue concentration was determined by spectrophotometry (620 nm). Blood volume was determined from hematocrit and plasma volume⁸.

Biochemical parameters

Phenolphthalein concentration was determined by spectrophotometry. Differences between concentrations were employed to evaluate the secretion/water absorption rate by the infused segment¹².

Sodium, potassium and chloride concentrations were measured by the AVL Roche[®] 9180 selective ion. Differences between their concentration values were used to calculate the electrolyte colon transport rate. Standard colorimetric tests (Labtest) were used to determine urea and creatinine values.

Statistical analysis

Data on hemodynamic and biochemical parameters (urea and creatinine) obtained from each of the groups were studied in the mean \pm E.P.M. Student's t-test followed by ANOVA was used to evaluate statistical differences between groups and different experimental protocols. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Colonic water absorption and or secretion rates revealed very equidistant absorption levels in the SHAM groups (3, 7 and 14 days, 0.049 ± 0.009 ul/g/min, 0.050 ± 0.008 ul/g/min, 0.011 ± 0.003 ul/g/min, respectively, $p < 0.05$) and variable secretion in the three groups 3, 7 and 14 days PNx (-0.07 ± 0.007 ul/g/min, -0.18 ± 0.01 ul/g/min, -0.16 ± 0.01 ul/g/min, respectively $\#^* p < 0.05$); however, the partially nephrectomized 7-day group had the highest colonic H₂O secretion (Figure 1A).

Sodium in the SHAM groups (3, 7 and 14 days) had similar absorption (19.08 ± 1.09 uEq/g/min, 22.38 ± 1.42 uEq/g/min, 23.73 ± 1.68 uEq/g/min respectively, $p < 0.05$) and secretion in groups 3, 7 and 14 days PNx (-8.27 ± 0.65 uEq/g/min, -28.42 ± 1.60 uEq/g/min, -24.85 ± 1.61 uEq/g/min, respectively, $\#^* p < 0.05$); however, the partially nephrectomized seven-day group of animals had higher colonic Na⁺ secretion than the following 3 and 14-day groups (Figure 1B).

Potassium in the SHAM groups (3, 7 and 14 days) had similar absorption (18.96 ± 1.63 uEq/g/min, 17.76 ± 1.50 uEq/g/min, 16.9 ± 1.965 uEq/g/min respectively, $p < 0.05$). Groups 3, 7 and 14 days PNx presented the following secretions: -1.8 ± 0.46 uEq/g/min, -24.01 ± 1.44 uEq/g/min, -17.24 ± 1.81 uEq/g/min, $\alpha \#^* p < 0.05$) in partially nephrectomized 7-day animals there was marked K⁺ secretion (Figure 1C).

Chlorine in the SHAM groups (3, 7 and 14 days) was absorbed at 16.04 ± 1.37 uEq/g/min, 16.88 ± 1.4 uEq/g/min, 17.33 ± 1.58 uEq/g/min respectively, $\alpha \#^* p < 0.05$ and high secretion in groups 3, 7 and 14 days PNx (-9.42 ± 1.03 uEq/g/min, -27.49 ± 1.86 uEq/g/min, -18.23 ± 1.71 uEq/g/min, respectively, $\alpha \#^* p < 0.05$); however, animals with seven days PNx had higher Cl⁻ secretion compared to groups, 3 and 14 days (Figure 1D).

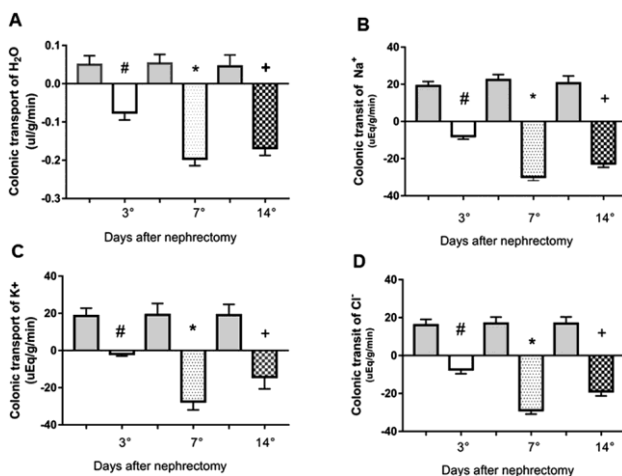


FIGURE 1 - Study of colonic permeability of water and electrolytes in sham-operated and partially nephrectomized (PNx) rats for 3, 7 and 14 days after nephrectomy 5/6: A) absorption and or colonic secretion of water; B) absorption and or colonic secretion of sodium Na⁺; C) absorption and or colonic secretion of potassium K⁺; D) absorption and or colonic secretion of chlorine. Negative bars represent the mean colonic secretion values while positive verticals represent the mean absorption values and the vertical lines indicate the standard error of the mean, $* p < 0.05$. Fifteen animals were used to compose the SHAM control group and fifteen for the NPX group.

Colonic water secretion in nephrectomized animals was proportional to blood volume and can be represented by linear regression curve established with the following equation $Y =$

$-0.02X + 0.13$, where Y represents the secretion rate and X is the blood volume ($r = 0.71$, Figure 2A).

Sodium secretion established an even closer correlation with blood volume than water, forming a linear regression curve established with the following equation $Y = -5.19X + 31.3$, Y represents secretion rate and X volume blood pressure ($r = 0.86$, Figure 2B).

Potassium strongly correlated blood volume with a linear regression curve established by the following equation $Y = -5.69X + 41.85$, where Y represents the rate of secretion, X blood volume ($r = 0.87$, Figure 2C)

Chlorine, similar to other electrolytes, also had a strong correlation between its secretion and blood hypervolemia and can be represented by a linear regression curve established with the following equation $Y = -4.70X + 26.6$, where Y represents secretion rate, X blood volume ($r = 0.85$, Figure 2D).

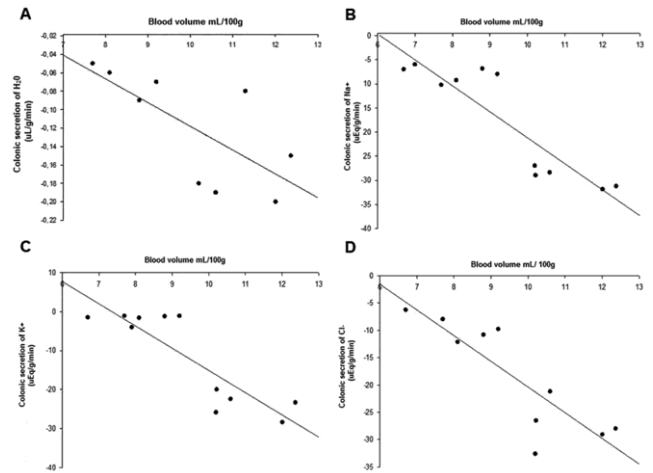


FIGURE 2 - Relationship between the volume of 5/6 nephrectomized rats and colonic secretion during the three and seven days after 5/6 nephrectomy: A) linear regression curve between blood volume and colonic water secretion (H₂O) $* p < 0.05$; B) linear regression curve between blood volume and colonic sodium secretion (Na⁺) $* p < 0.05$; C) linear regression curve between blood volume and colonic potassium secretion (K⁺) $* p < 0.05$; D) linear regression curve between blood volume and colonic chlorine secretion (Cl⁻) $* p < 0.05$

Hemodynamic variations - systolic blood pressure, heart rate, central venous pressure and blood volume - were significant in animals 7 and 14 days after nephrectomy; differences between three-day PNx animals and SHAM animals (128.7 ± 3.3 mmHg; 369.9 ± 3.4 bpm; 1.2 ± 0.13 cm H₂O; 7.067 ± 0.35 ml; respectively^{*}, 116.1 ± 1.7 mmHg; 370 ± 2.9 bpm; 1.7 ± 0.8 cm H₂O; 6.22 ± 0.38 ml; respectively^{*}, $* p < 0.05$) did not express relevance (Table 1).

TABLE 1 - Hemodynamic evaluation of SHAM groups and 3.7 and 14 days partially nephrectomized.

Variable	SHAM	3 Days	7 Days	14 Days
Blood pressure (mmHg)	116.1 ± 1.7	128.7 ± 3.3	$137.4 \pm 3.2^*$	149.6 ± 2.1
HB (beats/min)	370 ± 2.9	369.9 ± 3.4	383.5 ± 3.3	388.8 ± 1.4
CVP (cmH ₂ O)	1.7 ± 0.8	1.2 ± 0.13	3.5 ± 0.17	4.1 ± 0.19
Blood volume (ml/100g)	6.22 ± 0.8	7.067 ± 0.35	$12.14 \pm 0.37^*$	14.83 ± 0.82

Blood volume increase in animals with seven days PNx compared to animals with three PNx (7.067 ± 0.35 ml/100 g) and (12.14 ± 0.37 ml/100 g) was significant, the same can be observed in relation to blood pressure (128.7 ± 3.3 mmHg) and (137.4 ± 3.2 mmHg), respectively.

Polyethylene glycol promoted porous retraction of blood volume by dehydration in partially nephrectomized seven-day animals. It was able to reverse water secretory capacity (-0.18 ± 0.01 $\mu\text{L/g/min}$ vs. 0.70 ± 0.09 $\mu\text{L/g/min}$), respectively; $*p < 0.05$) and sodium (-28.42 ± 1.60 $\mu\text{Eq/g/min}$ vs. 0.53 ± 6.35 $\mu\text{Eq/g/min}$ respectively; $*p < 0.05$) by nephrectomy-induced colon 5/6 (Figure 3).

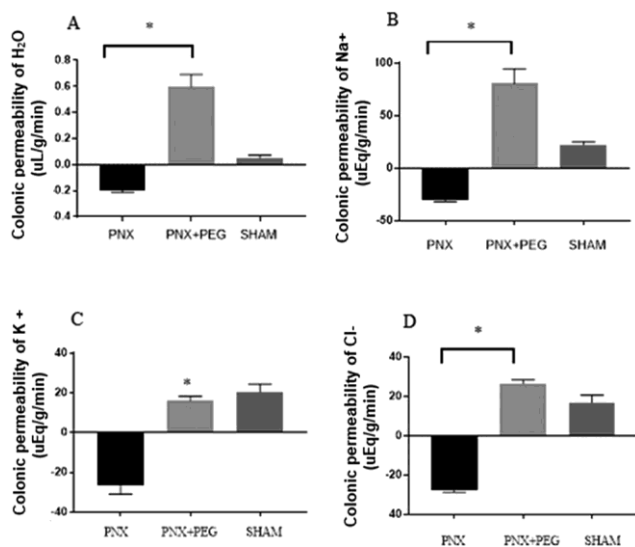


FIGURE 3 - In the group seven partially nephrectomized (PNX), partially nephrectomized days treated with polyethylene glycol (PNX + PEG) and SHAM: A) colonic absorption and H₂O secretion; B) colonic absorption and Na⁺ secretion; C) colonic absorption and K⁺ secretion; D) colonic absorption and Cl⁻ secretion. Negative vertical bars represent mean values of colonic secretion; positive vertical bars represent mean absorption values; and vertical lines indicate the standard error of the mean. $*p < 0.05$; $n = 5$ to 8 animals per group.

Plasma urea levels among nephrectomized animals were elevated in groups 7 and 14 days PNX 114.8 ± 1.8 mg/dl and 165.6 ± 7.2 mg/dl respectively, $*p < 0.05$. The 3-day PNX group (79.8 ± 3.63 mg/dl) did not differ significantly from SHAM (79.8 ± 3.63 mg/dl) $*p < 0.05$.

As for plasma creatinine level, a small evolution was observed among nephrectomized animals. The 14 days PNX group presented the highest creatinine level (1.3 ± 0.07 , $*p < 0.05$), followed by the seven days PNX group (0.95 ± 0.02 , $*p < 0.05$). The three-day PNX group (0.45 ± 0.08 mg/dl) was not very different from the SHAM (0.30 ± 0.07 mg/dl, $*p < 0.05$, Table 2).

TABLE 2 - Plasma biochemical analysis of urea and creatinine from SHAM control and experimental groups PNX 3, 7 and 14 days after nephrectomy 5/6

Biochemical variables	SHAM	3 days	7 days	14 days
Urea (mg/dl)	55.6 ± 1.07	79.8 ± 3.63	114.8 ± 1.8	$165.6 \pm 7.2^*$
Creatinine (mg/dl)	0.30 ± 0.07	0.45 ± 0.08	0.95 ± 0.02	$1.3 \pm 0.07^*$

DISCUSSION

In this study it was shown that there is colonic secretion of water and electrolytes during the 3, 7 and 14 days after nephrectomy 5/6, and the most significant results were found in the group 7 days followed by 14. During the three

days after nephrectomy no significant results were found for water and electrolyte secretion when compared to the SHAM group.

The relationship between hypervolemia on colonic water secretion in partially nephrectomized animals can be confirmed by the linear regression curve established in Figure 2. This secretagogue effect of colon to water is due to two very important factors. The first is because PNA inactivates renin and aldosterone, two potent hormones that act on the colon by stimulating water absorption^{17,19}. The second is that water absorption by the colon occurs by the osmotic gradient created by the high concentrations of ions in space. intercellular. Most of this osmosis occurs through the closed joints between the apical edges of the epithelial cells. However, a smaller proportion occurs through the intestinal cells themselves. If ion concentrations are high in the colonic lumen - a fact observed when the colon becomes an electrolyte secretor - the colon excretes water obeying the direction of the osmotic gradient⁶.

The seven days group presented higher electrolyte secretion, Na⁺ (-28.42 ± 1.60) followed by Cl⁻ (-27.49 ± 1.86), with very equidistant results. Figures 2B and 2D show a strong relationship between hypervolemia and Na⁺ and Cl⁻ secretion through a linear regression curve. The significant loss of these electrolytes by the colon is due to changes in the activity of colonic mucosal ATPases, as they are responsible for the electrochemical differential of the intestinal mucosa that promotes sodium absorption and consequently chlorine absorption.

The proximity in the secretion values of these electrolytes is due to their behavior similar to the absorptive pattern by the colon, the result of a chemical and electrical potential generated from sodium itself and occasionally by other electrolytes with the aid of the ATPase protein found in the basolateral membrane brush edges that promote the absorption of these ions. Meanwhile, potassium ions are transported in the opposite direction in exchange for sodium ions^{6,13}.

Increasing blood volume triggers colonic secretion to water and electrolytes because it promotes the release of natriuretic peptides, a group of hormones secreted by different tissues, especially the heart. These have their role in various organs, but there is emphasis on the kidney, by increasing the excretion of water and sodium through inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase pump and inhibition of renin and aldosterone^{17,19}.

There are at least three peptides related to natriuresis in the intestines and colon: STa, Gn and UGn. They bind to a receptor present on the brush border surface of the intestine and colon. These receptors were identified as a member of guanylate cyclase and were designated GC-C. Its activation increases intracellular levels of cGMP, which induces an intracellular cascade that culminates in the activation of protein kinase GII (PG and PKA), leading to activation of the cystic fibrosis transmembrane regulatory channel (CFTR), which promotes increased secretion of chlorine, bicarbonate and water in the intestine^{20,22}.

Polyethylene glycol is commonly used for experimentally reducing plasma volume, causing acute dehydration in cells. In studies of gastric emptying in PNX animals, it was able to reverse gastric emptying reducing hypervolemia¹¹. In this study, it was able to reverse colonic secretion of water and sodium by returning its absorptive capacity in partially nephrectomized animals (Figure 3).

Acute retraction of blood volume can be achieved by dehydration, reduced sodium intake or bleeding and results in the maximization of fluid and electrolyte absorption through the intestinal epithelium. This occurs by activating cardiovascular receptors, which trigger neural flexion, leading to the release of norepinephrine by the splanchnic and mesenteric nerves¹⁸.

Therefore hypervolemia would be the main cause of this colon secretagogue phenomenon observed in this study. Many researchers, through clinical and experimental observations, indicate that the gastrointestinal tract may modify its absorptive pattern, making it even secretory when subjected to acute plasma volume variations^{3,10,16,17,23}.

The high blood pressure in groups 7 and 14 days PNx compared to group 3 days PNx is due to the volume overload that occurred during this period. Blood volume in groups 7 and 14 days (11.12 ± 0.37 ml; 15.83 ± 0.82 ml, respectively, $p < 0.05$) was also quite pronounced when compared to the group three days ($8.067 \text{ ml} \pm 0.35$).

Plasma electrolyte concentrations, Na^+ , K^+ and Cl^- (141.1 ± 1.5 mEq/ml, 7.1 ± 0.5 mEq/ml and 99.2 ± 1.0 mEq/ml, respectively) at seven PNx days were higher than those at three PNx days (138.0 ± 1.7 mEq/ml, 3.8 ± 0.1 mEq/ml and 102.5 ± 1.2 mEq/ml, respectively; $p < 0.05$). This explains the expansion of blood volume during the period of renal failure. After 70% loss of renal mass, the body accumulates salt and water over time, which causes hypertension due to plasma volume overload⁶. Volume overload also increased central venous pressure between groups 7 and 14 days PNx compared to three days PNx (7.1 ± 0.19 cm H_2O , 5.2 ± 0.17 cm H_2O vs. 2.2 ± 0.13 cm H_2O) respectively, $p < 0.05$.

The progressive increase in urea and creatinine levels in groups 3, 7 and 14 days PNx (79.8 ± 3.63 , 114.8 ± 1.8 , 165.6 ± 7.2 , respectively, $p < 0.05$) and (0.30 ± 0.07 , 0.45 ± 0.08 , 0.95 ± 0.02 , 1.3 ± 0.07 respectively, $p < 0.05$) were the basis for determining the evolution of renal failure in rats submitted to nephrectomy 5/6. Uremic toxins generated in renal dysfunction are responsible for the progression of chronic kidney disease by inducing loss of residual renal function⁷. The mechanisms of colonic secretion and absorption for water and electrolytes in the hypervolemic situation should be better studied in humans since renal patients are at risk of an electrolyte imbalance and its manifestation is very gradual, most often asymptomatic and may be fatal.

CONCLUSION

The hypervolemia established in the rats from the 7th day after 5/6 nephrectomy caused a marked colonic secretion to water and electrolytes. The body presents progressive colonic secretion as blood volume increases; on the other hand, polyethylene glycol was able to revert this colonic secretory picture to water and electrolytes by reversing the hypervolemia.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the master's thesis in Biotechnology by M.Sc Elionai Gomes Freire from the Federal University of Ceará and we are grateful to Prof. José Ronaldo Vasconcelos da Graça for his guidance and Mr. Francisco José Gomes for his technical support.

ORCID

Elionai Gomes Freire: 0000-0002-7684-3106

- Amann K, Irzyniec T, Mall G, Ritz E. The effect of enalapril on glomerular growth and glomerular lesions after subtotal nephrectomy in the rat: a stereological analysis. *J Hypertens*. 1993 Sep;11(9):969-75.
- Bragato N. Fisiologia renal e insuficiência renal aguda em pequenos animais: causas e consequências. 2013;55
- Condim FDAA, De-Oliveira GR, Graça JRV, Cavalcante DIM, Souza MAN, Santos AA, et al. Variations in gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume changes in awake rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 1998;31(7):967-73.
- Cossio DC, Costa HCM, Fernandes KBP, Laranjeira LLS, Fernandes MTP, Poli-Frederico RC. Polymorphism of the COX-2 gene and susceptibility to colon and rectal cancer. *Arq Bras Cir Dig*. 2017 Apr-Jun;30(2):114-117. doi: 10.1590/0102-6720201700020008.
- Derwal L, Junior S, Santos PR, Aguiar A. Dyspepsia and gastric emptying in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *BMC Nephrol*. 2013;14:275.
- Duffy PA, Granger DN, Taylor AE. Intestinal secretion induced by volume expansion in the dog. *Gastroenterology* [Internet]. 1978;75(3):413-8.
- Eduardo C, Carlos J, Repka D, José C, Souza F De, et al. Colonic Anastomosis : Experimental Study In. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2018;31(4):1-5
- Ertl AC, Diedrich A, Raj SR. Techniques used for the determination of blood volume. *Am J Med Sci*. 2007;334(1):32-6
- Fernandez OOA, Pereira JA, Campos FG, Araya CM, Marinho GE, Novo RS, Oliveira TS, Franceschi YT, Martinez CAR. Evaluation of enemas containing succalfate in tissue content of MUC-2 protein in experimental model of diversion colitis. *Arq Bras Cir Dig*. 2018 Aug 16;31(3):e1391. doi: 10.1590/0102-672020180001e1391
- Graça JRV, Leal PRL, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. Variations in gastric compliance induced by acute blood volume changes in anesthetized rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2002;35(3):405-10.
- Graça JRV, Parente CC, Fiúza RF, da Silva PAF, Mota BT, Salles LD, et al. Subtotal nephrectomy inhibits the gastric emptying of liquid in awake rats. *Physiol Rep*. 2015;3(2):1-10.
- Lima AAM, Carvalho G, Figueiredo AA, Gifoni ÂR, Soares AM, Silva EAT, et al. Effects of an alanine-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. *Nutrition*. 2002;18(6):458-62.
- Medeiros BA, dos Santos CL, Palheta RC, de Queiroz DAF, da Graça JRV, dos Santos AA, et al. Spinal cord transection modifies ileal fluid and electrolyte transport in rats. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2008;139(1-2):24-9.
- Palheta RC, Silva MTB, Barbosa HLG, Pinheiro ADN, Cardoso KVV, Graça JRV, et al. Atrial stretch delays gastric emptying of liquids in awake rats. *Life Sci* [Internet]. 2013;92(10):569-75.
- Pellegrini C, Antonioli L, Colucci R, Ballabeni V, Barocelli E, Bernardini N, et al. Gastric motor dysfunctions in Parkinson's disease: Current pre-clinical evidence. *Park Relat Disord* [Internet].
- Rola FH, Dos-Santos AA, Xavier-Neto J, Cristino-Filho G, Rocha CI, Santiago AT Júnior, et al. Effects of acute volemic changes on jejunal compliance in dogs. *Brazilian J Med Biol Res*. 1989;22(4):523-31.
- Santos AA, Xavier-Neto J, Jr. Ats, Souza Man, Martins AS, ALZAMORA F, et al. Acute volaemic changes modify the gastroduodenal resistance to the flow of saline in anaesthetized dogs. *Acta Physiol Scand*. 1991;143(3):261-9.
- Santos PR, Monteiro DLS, De Paula PHA, Monte Neto VL, Coelho MLPM, Arcanjo CC, et al. Volaemic status and dyspepsia in end-stage renal disease patients. *Nephrology*. 2015;20(8):519-22.
- Santos-Araújo C, Roncon-Albuquerque R, Moreira-Rodrigues M, Henriques-Coelho T, Quelhas-Santos J, Faria B, et al. Local modulation of the natriuretic peptide system in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(6):1774-82.
- Schulz S, Green CK, Yuen PST, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*. 1990;63(5):941-8.
- Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Santos DR dos. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2013 - Trend analysis between 2011 and 2013. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2014;36(4):476-81.
- Sindić A, Velić A, Başoglu C, Hirsch JR, Edemir B, Kuhn M, et al. Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. *Kidney Int*. 2005;68(3):1008-17.
- Xavier-Neto J, Dos Santos AA, Rola FH. Acute hypervolaemia increases gastroduodenal resistance to the flow of liquid in the rat. *Gut*. 1990;31(9):1006-10

