



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

VANESSA RODRIGUES FERREIRA

PROTEASES DA BIOMASSA MICROALGAL DE *Chlorococcum infusionum*:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS

FORTALEZA
2024

VANESSA RODRIGUES FERREIRA

PROTEASES DA BIOMASSA MICROALGAL DE *Chlorococcum infusionum*:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

FORTALEZA

2024

VANESSA RODRIGUES FERREIRA

PROTEASES DA BIOMASSA MICROALGAL DE *Chlorococcum infusionum*:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 23/02/2024.

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof.^a Dra. Márjory Lima Holanda Araújo (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Men, de Sá Moreira de Souza Filho
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lindalva Rodrigues, de quem herdei o gosto musical, o amor pela biologia e esse jeito um tanto quanto comunicativo de ser. Ao meu pai, Adailton Ferreira, de quem herdei o gosto pelo futebol e pelo nosso querido Fortaleza Esporte Clube, o amor pela cozinha e por ser o meu melhor amigo desde o meu primeiro dia de vida. A vocês, meu agradecimento eterno. Pelo suporte incondicional, pela proteção e por sempre lutarem para me oferecer a melhor educação possível. Se estou onde estou hoje, devo tudo a vocês.

À minha avó, Aureliana Mauriza, por ser minha segunda mãe e por ter me acolhido no seu lar, e debaixo da sua asa, por vinte e um anos. Pela criação, pelos inúmeros ensinamentos de vida, por todo o cuidado que sempre teve comigo e por toda uma vida compartilhada que eu pretendo lembrar para sempre, por mim e pela senhora.

À toda minha família, que eu tanto amo e é a melhor base que eu poderia ter. Em especial à minha madrinha Manoela Rodrigues e ao meu tio José Hélder. Por serem meus professores favoritos, pelo incentivo, pelas conversas e pelo constante cuidado com minha educação.

Ao meu bem, André Felipe, com quem divido um lar, quatro filhos felinos e todos os meus dias. Por todo o apoio e companheirismo ao longo destes anos em que estamos juntos, especialmente no período de realização deste trabalho. Por ter sido suporte e acolhimento nos momentos de ansiedade, por ter sido escuta todas as vezes que precisei e por esse laço bonito que construímos diariamente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luis Coelho, e à minha co-orientadora, Prof^a Dra. Márjory Holanda, por que nutro imensa admiração. Pelo acolhimento no laboratório, pelas inúmeras conversas que me deram um norte, pela orientação, por todos os conselhos recebidos e inclusive pelos puxões de orelha. Meu muito obrigada.

Aos meus amigos Lucas e Éwerton, por estarem comigo desde a graduação. Pela paciência, pelas inúmeras trocas científicas e por todo o apoio durante a realização deste trabalho. Acima de tudo, pela amizade e por todos os momentos de alegria e descontração que dividimos juntos.

Ao meu querido amigo Acrísio Bastos (*in memoriam*), que carinhosamente me acolheu no BioAp e que foi fundamental na minha formação como biotecnologista. Por me ensinar muito do que aprendi em pesquisa, mas, principalmente, pela amizade e por todos os bons momentos que jamais sairão das minhas lembranças.

Aos meus amigos Diego Furtado, Heitor Bantim, Francisco Cardoso, Felipe

Carvalhedo, Ana Letícia, Gabriela Vieira e Eduardo Vale, com quem tenho o prazer de compartilhar a caminhada. Agradeço pela companhia e ajuda constante, por todas as risadas, lágrimas e abraços. Por, muitas vezes, terem mais fé em mim do que eu mesma.

A todos os membros do Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural (GBME) pelo apoio, carinho e acolhimento. Em especial, aos amigos: Wallady, Talita, Roberta, Ana Larissa, Giovanna, Edu, Letícia, Héctor, Luís, Gustavo, Léo e Bia.

A todos os membros do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP), pelo generoso volume de Bradford cedido, pelos cafés da tarde e por todas as alegres conversas. Em especial, aos amigos: Lucas, Éwerton, Raíssa e Gustavo.

Ao prof. Dr. Cléverson Diniz, que permitiu o uso de equipamentos e reagentes do seu laboratório e pelas tantas dúvidas esclarecidas, contribuindo para a realização deste trabalho.

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

Às agências de fomento CNPq e FUNCAP, pela disponibilização de recursos para realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho: meu muito obrigada!

RESUMO

A biodiversidade de microalgas ainda é um recurso pouco explorado. Sua biomassa é uma rica fonte de compostos bioativos naturais, como proteínas e lipídeos, que podem ser aplicados na alimentação humana e animal; nas indústrias cosmética, farmacológica e química fina; no tratamento de águas residuais e na biorremediação de compostos nocivos. As microalgas do gênero *Chlorococcum*, por sua vez, são consideradas fontes promissoras de macromoléculas, contudo, seu potencial como fonte de proteínas ainda é pouco investigado. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi extrair, isolar e avaliar as características físico-químicas e enzimáticas de proteases presentes na biomassa da microalga *Chlorococcum infusionum* produzida em fotobiorreator. Para isso, a microalga foi inicialmente cultivada em meio *Bold's Basal Medium* (BBM) em sistema autotrófico do tipo fotobiorreator fechado de placa plana. A biomassa resultante foi caracterizada e utilizada na preparação de extratos aquosos por meio da combinação de métodos de lise (EBCi). O cultivo da microalga apresentou um rendimento médio de biomassa fresca de $2,35 \pm 0,03$ g. L⁻¹ após o 12º dia de cultivo e apresentou uma composição rica em lipídeos (37,82%) e proteínas (27,32%). Para o isolamento das proteases, EBCi foi submetido às etapas de purificação em etapas subsequentes de cromatografia do tipo gel filtração, em coluna Sephadex G-100, e troca iônica em coluna DEAE-Sepharose™ *Fast Flow*, em que o pico majoritário obtido (denominado FPCiT-P3) foi submetido a ensaios de atividade proteolítica frente a um substrato inespecífico (azocaseína) e por meio de zimogramas. Foram realizados ensaios de determinação de parâmetros ótimos e ensaios de estabilidade frente à variações de temperatura e pH e avaliação da estabilidade da estrutura por meio da espectroscopia de dicroísmo circular. A FPCiT-P3 apresentou um pH ótimo de atividade em torno de 7,0-9,0 e temperatura ótima de 50 °C, sendo inibida parcialmente por PMSF e EDTA. A fração apresentou baixa estabilidade em pHs ácidos e em temperaturas acima de 60 °C, após incubação por 30 min. O espectro de dicroísmo circular de FPCiT-P3 indicou uma predominância de estrutura em folhas-β.

Palavras-chave: enzimas; bioprospecção; microalgas.

ABSTRACT

The biodiversity of microalgae remains a relatively underexplored resource. Its biomass represents a rich source of natural bioactive compounds, such as proteins and lipids, which hold potential applications in human and animal nutrition, as well as in the cosmetic, pharmaceutical, and fine chemical industries. Moreover, they exhibit promise in wastewater treatment and the bioremediation of harmful compounds. Specifically, microalgae belonging to the *Chlorococcum* genus are considered promising sources of macromolecules; however, their potential as protein sources remains inadequately investigated. In this context, the objective of this study was to extract, isolate, and evaluate the physicochemical and enzymatic characteristics of proteases present in the biomass of *Chlorococcum infusionum* microalgae produced in a photobioreactor. To achieve this, the microalgae were initially cultivated in Bold's Basal Medium (BBM) in an autotrophic closed-flat plate photobioreactor system. The resulting biomass was characterized and utilized in the preparation of aqueous extracts through a combination of lysis methods (EBCi). The microalgae cultivation yielded an average fresh biomass of $2.35 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$ after the 12th day of cultivation, with a composition rich in lipids (37.82%) and proteins (27.32%). For the isolation of proteases, EBCi underwent purification steps involving subsequent gel filtration chromatography using a Sephadex G-100 column and ion exchange chromatography using a DEAE-Sepharose™ Fast Flow column. The predominant peak obtained (designated as FPCiT-P3) was subjected to proteolytic activity assays against a nonspecific substrate (azocasein) and through zymograms. Optimal parameter determination assays, stability assays against temperature and pH variations, and structural stability evaluation through circular dichroism spectroscopy were conducted. FPCiT-P3 exhibited an optimum pH for activity around 7.0-9.0 and an optimum temperature of 50°C, being partially inhibited by PMSF and EDTA. The fraction showed low stability at acidic pHs and temperatures above 60°C after a 30-minute incubation. The circular dichroism spectrum of FPCiT-P3 indicated a predominance of β -sheet structure.

Keywords: enzymes; bioprospecting; microalgae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	— Divisão entre macro e microalgas	16
Figura 2	— Sistemas de cultivo de microalgas em fotobiorreator (PBR)	20
Figura 3	— Esquema das possibilidades de aplicações das microalgas	22
Figura 4	— Produtos alimentares à base de algas e microalgas	24
Figura 5	— Tratamento de águas residuais e produção de biocombustível como demandas combinadas	25
Figura 6	— Representação esquemática da obtenção de proteases de fontes diferentes	29
Figura 7	— Micrografia de <i>Chlorococcum humicola</i>	31
Figura 8	— Micrografias ópticas de cepas de <i>C. Infusio</i>	33
Figura 9	— Cultivo de microalga em fotobiorreator cilíndrico	36
Figura 10	— Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes, do extrato de proteínas solúveis de <i>C. Infusio</i>	54
Figura 11	— Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes, dos tubos coletados referentes ao FPCiE-P1	55
Figura 12	— Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) sob condições desnaturantes de FPCiT-P3	57
Figura 13	— Zimograma de FPCiT-P3	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	—	Curva de crescimento da microalga <i>C. Infusio</i> <i>num</i> cultivada em fotobiorreator fechado sob condições controladas	49
Gráfico 2	—	Concentração de clorofila <i>a</i> determinada durante os diferentes dias de crescimento da microalga <i>C. infusio</i> <i>num</i> cultivada em fotobiorreator fechado e sob condições controladas	50
Gráfico 3	—	Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 (0,8 X 100 cm) acoplada ao sistema FPLC <i>AKTA pure</i>	55
Gráfico 4	—	Cromatografia de troca iônica da fração FPCiT-P3 em coluna de DEAE-Sepharose™ <i>Fast Flow</i> (2,1 cm X 15 cm) acoplada ao sistema FPLC <i>AKTA pure</i>	56
Gráfico 5	—	Dicroísmo circular (CD) de FPCiT-P3 de <i>C. Infusio</i> <i>num</i>	65
Gráfico 6	—	Espectros de dicroísmo circular (CD) de FPCiT-P3 em diferentes valores de pH	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	—	Comparação de sistemas de cultivo de microalgas abertos, fechados e híbridos	18
Tabela 2	—	Análise elementar da biomassa microalga de <i>C. infusionum</i> com base na massa seca	52
Tabela 3	—	Atividade Proteolítica de FPCiT-P3 e suas diluições em tampão PBS, pH 7,0	58
Tabela 4	—	Atividade Proteolítica contra inibidores, em pH 5,0	60
Tabela 5	—	Atividade Proteolítica contra inibidores, em pH 9,0	60
Tabela 6	—	Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica de FPCiT-P3	61
Tabela 7	—	Determinação da temperatura ótima da atividade proteolítica de FPCiT-P3	62
Tabela 8	—	Estabilidade de FPCiT-P3 em função do pH	63
Tabela 9	—	Estabilidade de FPCiT-P3 em função do pH	64

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Abs	Absorbância
BBM	<i>Bold's Basal Medium</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	Dicroísmo Circular
CFT	Conteúdo Fenólico Total
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotreitol
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EBCi	Extrato Bruto de <i>Chlorococcum infusionum</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FPCi	Fração Proteica <i>Chlorococcum infusionum</i>
FPCiE-P1	Pico 1 da exclusão molecular de FPCi
FPCiT-P3	Pico 3 da troca iônica de FPCi
IAA	Iodoacetamida
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris hidroxí-amino-metano
UAP	Unidade de atividade proteolítica
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólares
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cálcio dihidratado
cm	Centímetro
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de cobalto (II)
CO_2	Gás Carbônico
Cu_2O	Óxido de cobre
CuSO_4	Sulfato de cobre
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso hepta-hidratado
g	Grama
h	Horas
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
K_2HPO_4	Fosfato de potássio dibásico
K_2SO_4	Sulfato de potássio
kDa	Quilodalton
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
Lux	Medida de Iluminância
m	Metro
M	Molar
mgP	Miligrama de Proteína
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio hepta-hidratado

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetros quadrados
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de manganês tetra-hidratado
N	Concentração normal
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	EDTA di-hidratado
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio di-hidratado
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
UV	Ultravioleta
V	Volume
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.1	Algas: aspectos gerais.....	15
1.2	Microalgas.....	16
1.3	Cultivo das microalgas em fotobiorreatores.....	18
1.4	Aplicações biotecnológicas das microalgas.....	22
1.5	Microalgas como fonte para prospecção de biomoléculas.....	26
1.5.1	<i>Proteínas de microalgas</i>	27
1.6	Proteases: consideração gerais e presença nas microalgas.....	28
1.7	Microalgas do gênero <i>Chlorococcum</i>.....	31
1.7.1	<i>Chlorococcum infusionum</i>.....	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral.....	34
2.2	Objetivos Específicos.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Materiais.....	35
3.1.1	<i>Material Biológico</i>.....	35
3.1.2	<i>Reagentes Químicos</i>.....	35
3.2	Métodos.....	35
3.2.1	<i>Cultivo da microalga C. infusionum em fotobiorreator fechado</i>.....	35
3.2.2	<i>Determinação da curva de crescimento das microalgas</i>.....	36
3.2.3	<i>Determinação da clorofila a</i>.....	37
3.2.4	<i>Coleta e processamento da biomassa microalgal</i>.....	38
3.2.5	<i>Análise elementar da biomassa microalgal</i>.....	39
3.2.6	<i>Lise celular para obtenção do extrato bruto de C. infusionum</i>.....	42
3.2.7	<i>Determinação de fenóis totais no EBCi</i>.....	42
3.2.8	<i>Precipitação das proteínas do EBCi com sulfato de amônio</i>.....	42
3.2.9	<i>Determinação do teor de proteínas solúveis do FPCi</i>.....	43
3.2.10	<i>Cromatografia de exclusão molecular da FPCi</i>.....	43
3.2.11	<i>Cromatografia de troca-iônica da FPCiE-P1 para o isolamento de proteases</i>.....	43
3.2.12	<i>SDS-PAGE das frações proteicas de C. infusionum</i>.....	44
3.2.13	<i>Determinação da atividade proteolítica total da FPCiT-P3</i>.....	44

3.2.14	<i>Dicroísmo circular e termoestabilidade da FPCiT-P3</i>	45
3.2.15	<i>Caracterização da atividade proteolítica da FPCiT-P3</i>	46
3.2.16	<i>Análises estatísticas</i>	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Cultivo de <i>C. infusionum</i> em fotobiorreator de placa planar	48
4.2	Caracterização da biomassa microalgal	51
4.3	Determinação de fenóis totais	53
4.4	Extração de proteínas solúveis do extrato bruto de <i>C. infusionum</i>	53
4.5	Obtenção das proteases de <i>C. infusionum</i>	54
4.6	Atividade proteolítica de FPCiT-P3	57
4.7	Caracterização da Atividade Proteolítica de FPCiT-P3	59
4.7.1	<i>Efeito de Inibidores</i>	59
4.7.2	<i>Determinação do pH e da temperatura ótimos de FPCiT-P3</i>	60
4.7.3	<i>Estabilidade de FPCiT-P3 em função do pH e temperatura</i>	62
4.7.4	<i>Análise de dicroísmo circular</i>	64
5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA BBM	85
	ANEXO A – COMPOSIÇÃO VITAMÍNICA DO MEIO BBM	86

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Algas: aspectos gerais

Algas são um grupo heterogêneo de seres vivos de complexa taxonomia (MAKKAR *et al.*, 2016), sendo, de modo geral, definidos como organismos fotossintéticos, unicelulares ou pluricelulares, que possuem funções biológicas e ecológicas semelhantes às plantas, mas diferem dessas na sua bioquímica e por não possuírem estruturas especializadas como raízes, folhas, flores e tecidos sofisticados para transporte de água, açúcares e nutrientes (KAISER *et al.*, 2011; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

O termo “alga” não possui valor taxonômico, uma vez que designa organismos muito distintos entre si, quanto à sua organização, origem, composição química e morfologia, e que possuem representantes em dois dos três domínios da vida, Eubacteria e Eukarya, estando as mais de 10.000 espécies distribuídas nos reinos Bacteria, Plantae, Chromista e Protozoa (GUIRY, 2012, 2014; LOURENÇO, 2006; REVIERS, 2002; STENGEL, CONNAN; POPPER, 2011).

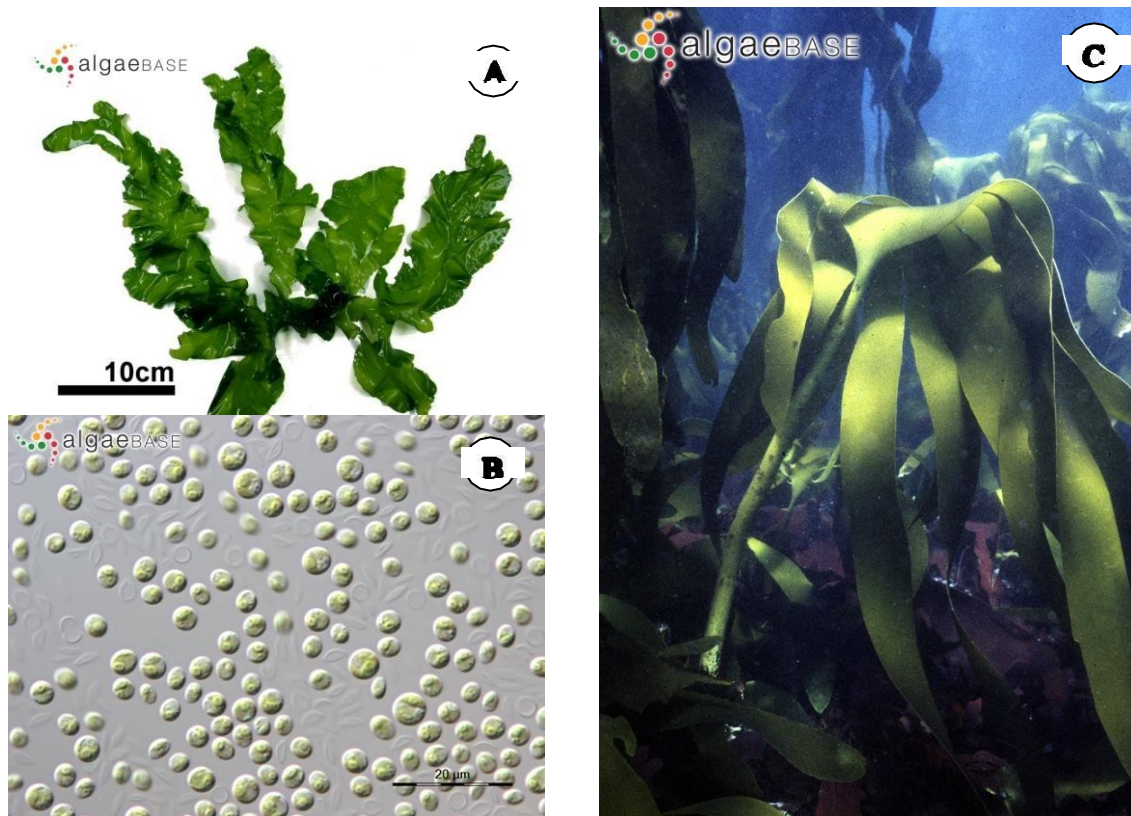
Quando se trata de organismos ubíquos, as algas geralmente são encontradas em ecossistemas aquáticos, tanto de água doce quanto salgada, onde diversas espécies ocupam habitats específicos de forma individual. Além disso, podem se encontrar fixadas ao substrato, como as plantas, ou podem ser móveis como animais, podem estar suspensas na água ou mesmo simbioticamente associadas a outros organismos, como aos fungos, formando os líquens. (ANDERSEN, 1992; ENZING *et al.*, 2014). Podem ser, ainda, encontradas em ambientes de extremas temperaturas, como as que vivem em neve, desertos e fontes termais (ANDERSEN, 2013; EL GAMAL, 2010; EVERT; EICHHORN, 2013; GUIRY, 2014; LEE, 2008; LOURENÇO, 2006).

As algas, em todos esses ecossistemas, demonstram grande importância ecológica, não somente pela produção de oxigênio para os outros organismos aquáticos, mas porque também atuam como produtores primários na cadeia alimentar, produzindo matéria orgânica a partir de luz solar, dióxido de carbono e água, e contribuindo grandemente para o balanço global da fotossíntese, além de serem capazes de remover poluentes de efluentes agrícolas e de esgoto (BOLD; WYNNE, 1985; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; LEE, 2008; LOURENÇO, 2006; SAMARAKOON; JEON, 2012; TAYLOR; TAYLOR; KRINGS, 2009).

A classificação das algas é extremamente complexa e até mesmo confusa, dado que

está em constante transformação e evolução (REVIERS, 2002). Portanto, faz-se uma divisão didática em microalgas e macroalgas (**Figura 1**), baseada na variedade de tamanho dos organismos, que podem medir desde 0,2 - 2 μm de diâmetro, os fitoplânctons, até 30 - 80 m, como os gigantes kelps, os quais dão origem a grandes florestas de algas do gênero *Laminaria* (BARSANTI; GUALTIERI, 2014; EVERT; EICHHORN, 2013; MAKKAR *et al.*, 2016; EL ZOKM *et al.*, 2021).

Figura 1 - Divisão entre macro e microalgas. a) *Ulva lactuca*; b) Micrografias de *Chlorella vulgaris*; c) *Laminaria pallida*, os gigantes kelps.



Fonte: Adaptado de *AlgaeBase*.

1.2 Microalgas

As microalgas constituem um grupo polifilético de microrganismos fotoautotróficos unicelulares e se espalham em filos distintos (HAMIDI *et al.*, 2020; BURKI *et al.*, 2020). São subdivididas em duas categorias: microalgas procarióticas e eucarióticas. As microalgas procarióticas incluem cianobactérias e proclorófitas (GARCIA *et al.*, 2017). As

eucarióticas contêm várias divisões, incluindo *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Cryptophyta*, *Ochrophyta*, *Myzozoa*, *Haptophyta* e *Euglenozoa* (HARPER *et al.*, 2012; MATSUNAGA *et al.*, 2005; PATRAS *et al.*, 2019). Elas podem ser caracterizadas, ainda, de acordo com a sua pigmentação, ciclo de vida e componentes da parede celular (RICHMOND, 2013; TOMASELLI, 2004).

As microalgas são microrganismos promissores e um importante recurso ecológico e econômico (BARSANTI; GUALTIERI, 2010). O aumento da exploração destes organismos para a obtenção de novos produtos coincide com os inúmeros benefícios que estes podem proporcionar (HU *et al.*, 2008). Eles podem crescer em água doce ou marinha, não competem com terras aráveis, multiplicam-se rapidamente e podem acumular grandes quantidades de componentes valiosos (pigmentos, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, lipídios e carboidratos) em um curto período (SAFI *et al.*, 2017). Por conta disso, estes organismos têm ganhado importância como componente integral dos ecossistemas marinhos e, também, cada vez mais importância econômica (DENNY; GAINES, 2007; YASUHARA-BELL *et al.*, 2010).

No cenário de negócios, o mercado global de microalgas, atualmente estimado em US\$ 1 bilhão no ano de 2022, deverá atingir um tamanho revisado de US\$ 1,6 bilhão até 2030, crescendo a um CAGR de 5,7% durante o período de análise 2022-2030. Isso se deve à crescente conscientização sobre os valiosos compostos funcionais possuídos pelas microalgas e os benefícios que eles podem fornecer em termos de sustentabilidade em comparação com os métodos atuais de produção de alimentos ou energia (MARKETS, 2021).

Em 2018, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) registrou 87 toneladas de cultivo de microalgas em 11 países, sendo 86,6 toneladas apenas da China. Os dados não incluem informações de outros países produtores, como Austrália, República Tcheca, França, Islândia, Índia, Israel, Itália, Japão, Malásia, Mianmar e Estados Unidos da América (FAO, 2020). Num estudo recente, a União Europeia apresentou 23 países mapeados com 447 produtores de algas e *Spirulina*. As principais regiões produtoras de microalgas foram Alemanha, Espanha e Itália (ARAÚJO *et al.*, 2021).

No cenário nacional, a produção de microalgas vem crescendo e conta com a participação de empresas de energia, *startups* e projetos-piloto (VALENTI *et al.*, 2021). O Brasil possui uma tendência natural para expandir o cultivo de microalgas devido ao seu custo representativo e condições climáticas adequadas, juntamente com a enorme disponibilidade de fontes de água doce e salgada (ANDRADE *et al.*, 2020; BRASIL *et al.*, 2017). No entanto, esse

modelo de produção precisa ser aperfeiçoado, pois representa uma fonte notável de oportunidades científicas, tecnológicas e, portanto, sociais (OLIVEIRA; BRAGOTTO, 2022).

1.3 Cultivo das microalgas em fotobiorreatores

O cultivo fotoautotrófico é o modo de produção mais comumente usado e, no momento, a estratégia mais tecnicamente viável para a obtenção de biomassa microalgal em larga escala (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; LAM; LEE; MOHAMED, 2012). Métodos de cultivo que recorrem ao crescimento mixotrófico, heterotrófico ou fotoheterotrófico também podem ser utilizados, a depender do produto desejado, das espécies disponíveis e do custo mais elevado (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020).

As tecnologias atualmente utilizadas para o cultivo de microalgas fotoautotróficas são categorizadas em: sistemas abertos, sistemas fechados e sistemas híbridos (SIROHI *et al.*, 2022). No cultivo em sistema aberto, o meio fica exposto ao ar atmosférico e às intempéries climáticas, enquanto no cultivo em sistema fechado não há contato direto com o meio externo (AISHVARYA *et al.*, 2015). Em paralelo, os sistemas híbridos são projetados principalmente para reunir os pontos fortes dos sistemas abertos e fechados, visando o aumento da eficiência durante o processo e a redução do custo capital (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020; BELOHLAV *et al.*, 2021; NARALA *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2021).

Tabela 1. Comparação de sistemas de cultivo de microalgas abertos, fechados e híbridos.

Critério	Sistema			Referência
	Aberto	Fechado	Híbrido	
Espaço requerido	Alto	Moderado	Moderado	(CHISTI, 2007)
Razão área/volume	20 - 200m ⁻¹	5 - 10m ⁻¹	7 - 50m ⁻¹	(CAMPO <i>et al.</i> , 2007; MATA <i>et al.</i> , 2010)
Manutenção	Fácil	Difícil	Moderado	(UGWU <i>et al.</i> , 2008)
Período para atingir a produção líquida	6 - 8 semanas	2 - 4 semanas	1 - 2 semanas	(PULZ, 2001)

Concentração de biomassa	0,1 - 0,2 g/L	2 - 8 g/L	2 - 8 g/L	(PULZ, 2001)
Qualidade da biomassa	Inconsistente	Consistente	Consistente	(PULZ, 2001)
Risco de contaminação	Alto	Baixo	Moderado	(CAMPO <i>et al.</i> , 2007; PULZ, 2001)
Método de cultivo	Batelada / Semi-contínuo	Batelada / Contínuo	Batelada / Contínuo / Semi-contínuo	(CAMPO <i>et al.</i> , 2007; MATA <i>et al.</i> , 2010)
Custo capital	8 - 55 USD/m ³	685 - 2065 USD/m ³	11 - 30 USD/m ³	(DEL RUE <i>et al.</i> , 2012; MATA <i>et al.</i> , 2010)
Consumo de energia	~3,7 W/m ³	53 - 2500 W/m ³	~52 W/m ³	(DEPRA <i>et al.</i> , 2019; JORQUERA <i>et al.</i> , 2010)
Variabilidade de espécies	Limitada	Alta variabilidade	Alta variabilidade	(MATA <i>et al.</i> , 2010; PULZ, 2001)
Perdas por evaporação de água	Alta	Baixa	Moderada	(MATA <i>et al.</i> , 2010; PULZ, 2001)
Perdas de CO ₂	Alta	Baixa	Moderada	(MATA <i>et al.</i> , 2010; PULZ, 2001)

Fonte: Adaptado de Khor *et al* (2022).

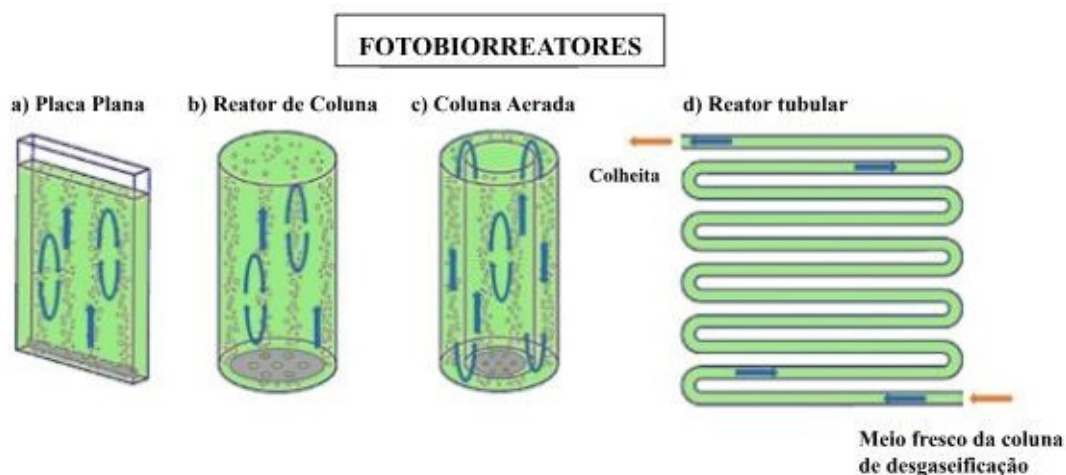
Cultivos abertos são os mais utilizados para obtenção de biomassa microalgal, pois são mais baratos, necessitam de baixa manutenção e são bastante duráveis. Além disso, por normalmente possuírem maior área estes possibilitam uma maior capacidade produtiva do que os sistemas fechados, sendo os dispositivos mais usados em nível industrial, representando 90% da produção anual de microalgas (PLACZEK; PATYNA; WITCZAK, 2017). Alguns exemplos dos sistemas mais comumente usados desse tipo são lagoas abertas, como lagoas circulares e *raceway ponds* (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020).

Apesar de mais rentável, esse tipo de cultivo apresenta desvantagens, como o risco de contaminação com espécies indesejadas, podendo descaracterizar ou inviabilizar todo o cultivo (AISHVARYA *et al.*, 2015; ZITELLI *et al.*, 2013). Por ser muito exposto ao contato com meio externo, mudanças climáticas também podem vir a afetar diversos parâmetros desse tipo de sistema, como: variação da temperatura, pH, salinidade do meio e concentração/contagem de células (AISHVARYA *et al.*, 2015).

Em contrapartida, sistemas de cultivo fechados - os chamados biorreatores - têm sido desenvolvidos para atender à crescente demanda e interesse por microalgas (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020). Nesse tipo de sistema é possível um maior controle dos parâmetros e condições de cultivo, fazendo com que esses dispositivos sejam mais frequentemente utilizados na obtenção de produtos de alto valor (ERBLAND *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2012), superando as principais desvantagens dos sistemas abertos: baixas taxas de transferência de massa, alta evaporação de água, difícil garantia de condições estáveis de cultura e alta susceptibilidade à contaminação, além da exigência de extensa superfície de terreno para instalação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; BRENNAN; OWENDE, 2010; CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006; ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020).

Os sistemas fechados cujos quais permitem a entrada de luz são chamados de cultivos fotoautotróficos, em que se utilizam fotobiorreatores (PBRs) para a produção de biomassa microalgal, em escala piloto ou maior, tanto em laboratório quanto ao ar livre (ZITELLI *et al.*, 2013; POSTEN, 2009; HUANG *et al.*, 2017). Alguns dos exemplos mais comuns, são: Pannel plano (TREDICI; ZITELLI, 1998; RICHMOND; CHENG-WU, 2001; RICHMOND; CHENG-WU, 2003), Tubular (horizontal) (ZITELLI *et al.*, 2013; TREDICI; ZITELLI, 1998; SLEGERS *et al.*, 2013; MOLINA-GRIMA *et al.*, 2001) e tipo Coluna (SÁNCHEZ-MIRÓN, 2004; ANJOS *et al.*, 2013), que se subdivide em: coluna agitada e colunas aeradas (de bolhas ou *airlift*) (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020). A **Figura 2** ilustra os tipos de PBRs citados anteriormente.

Figura 2. Sistemas de cultivo de microalgas em fotobiorreator (PBR). (a) reator tipo pannel de placas planas; (b) reator tipo coluna; (c) reator tipo coluna aerada; (d) reator tipo tubular.



Fonte: Hallmann (2015); Suparmaniam *et al.* (2019); Zerrouki e Henni (2019). Adaptado de Khor *et al.* (2022).

É sabido que PBRs fechados permitem um melhor controle dos parâmetros de crescimento em termos de nutrientes, temperatura, pH e iluminação (CHANG *et al*, 2017). Esses sistemas são projetados para distribuir a luz de modo uniforme sobre uma grande área de superfície, minimizando assim a fotoinibição e a fotooxidação (GUPTA; LEE; CHOI, 2015; SCHENK *et al*, 2008).

Um PBR fechado é capaz de atender a todas as necessidades da microalga, mantendo o controle de diversos parâmetros (SATHINATHAN *et al*, 2023). Por conta disso, tornam-se uma excelente opção para produção de compostos utilizados em produtos especiais, como ingredientes de formulações cosméticas e farmacêuticas, procurados sob especificações mais rígidas no mercado (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020).

No entanto, uma desvantagem dos PBRs é o seu alto custo de construção e de operação (HASHEMI *et al*, 2020). O cultivo de microalgas nesses dispositivos é caro porque é realizado em um sistema específico e complexo, em contrapartida, garantindo a manutenção das células microalgais em altas taxas de produtividade de biomassa e de compostos bioativos (DASAN *et al*, 2020), e a ampla gama de aplicações de microalgas e compostos obtidos a partir de sua biomassa levou ao avanço das tecnologias de cultivo (KHOR *et al*, 2022) e design de PBRs.

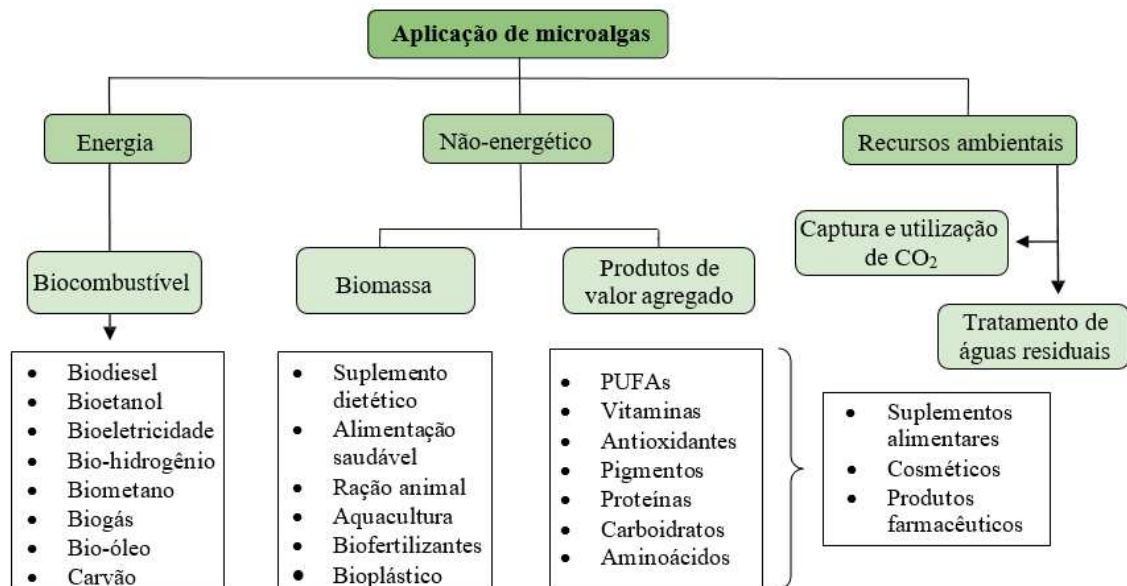
São muitos os fatores essenciais e críticos no projeto de um PBR para alcançar altos rendimentos de microalgas, pois a produção de biomassa e o acúmulo de metabólitos de interesse dependem fortemente de como as fontes de luz e carbono (ou seja, CO₂) são disponibilizadas nesses dispositivos (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020). Os esforços para obter designs eficientes de PBR para exploração comercial se voltam para a otimização do fornecimento de luz ou CO₂ e, também, para o seu desenho geométrico em termos de: relação superfície-volume, hidrodinâmica, fornecimento de nutrientes, controle de contaminação, cinética de crescimento, entre outros (ASSUNÇÃO; MALCATA, 2020; CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006; HUANG *et al*, 2017) são levados em consideração. O design de um PBR e os métodos dedicados de operação são determinados pelas características da microalga selecionada para produção e dos compostos bioativos alvo (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006). Além disso, tanto a quantidade quanto a qualidade da biomassa e o produto final devem ser colocados em perspectiva para a seleção final da melhor configuração de PBR (CHANG *et al*, 2017).

1.4 Aplicações biotecnológicas das microalgas

As microalgas possuem vasta diversidade e são organismos considerados potenciais recursos prospectáveis, uma vez que são ricos em compostos bioativos e, por isso, adequados para compor processos e produtos industriais, como formulações bioativas, alimentos funcionais e outros produtos de valor agregado (ANSILAGO, 2021; BANU *et al.*, 2020; FEHLING *et al.*, 2007; STERN *et al.*, 2010). Suas células contêm uma gama de compostos bioativos e metabólitos secundários (ABU-GOSH *et al.*, 2021). Esses metabólitos são biossintetizados por diferentes vias dentro das células, e sua produção e acúmulo são afetados por muitos fatores, como condições ambientais bióticas e abióticas (ANDRADE *et al.*, 2021).

Apesar desse potencial, segundo Richmond (2004), apenas 30.000 espécies de microalgas foram estudadas, mas o que se sabe até aqui já é suficiente para que estes organismos e sua biomassa sejam utilizados em diversos setores da indústria. Atualmente, as microalgas já são cultivadas comercialmente para produzir produtos nutracêuticos, farmacêuticos, cosméticos, lubrificantes, rações para incubadoras de aquicultura, na agricultura e em muitas outras aplicações na vida (LEVASSEUR *et al.*, 2020) (**Figura 3**).

Figura 3. Esquema das possibilidades de aplicações das microalgas.



Fonte: (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; RIZWAN *et al.*, 2018; SIROHI *et al.*, 2022; SPOLAORE *et al.*, 2006). Adaptado de Khor *et al* (2022).

A utilização consolidada das microalgas ocorre principalmente devido ao seu rico conteúdo bioquímico, que é considerado um recurso biológico valioso a ser explorado. Além

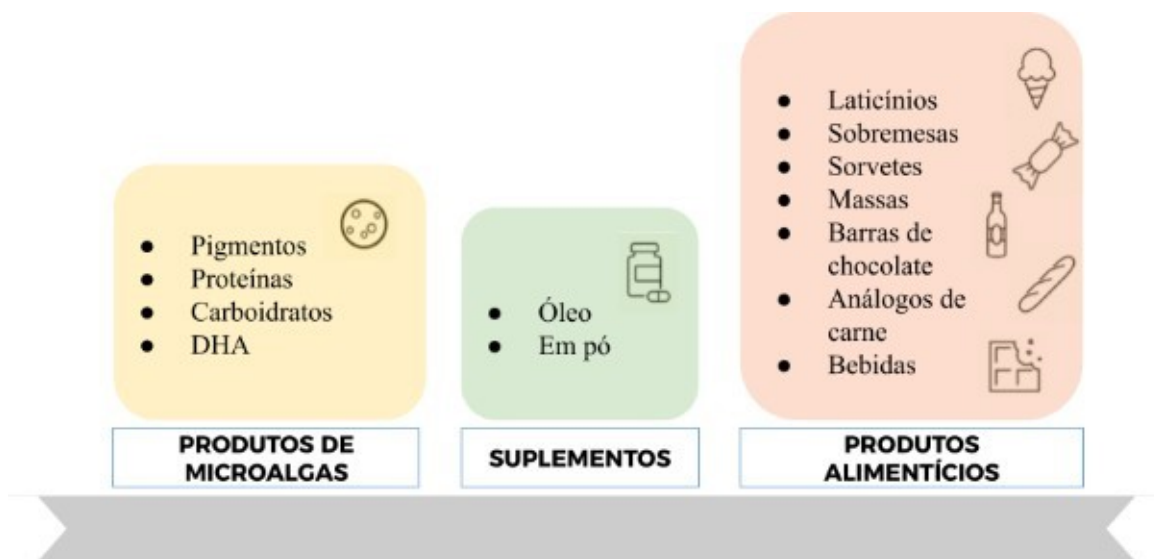
disso, elas ganharam atenção significativa devido à sua facilidade de crescimento e sua composição bioquímica inerente composta por lipídios, carboidratos, proteínas e compostos bioativos que podem ser explorados para vários produtos de valor agregado, de acordo com Banu *et al.* (2020). Também é válido destacar que os compostos de microalgas possuem alto valor agregado e podem também ser usados como matéria-prima verde para muitos produtos importantes (TANG *et al.*, 2020).

Diversos estudos têm destacado a importância desses organismos na promoção da saúde e prevenção de doenças, principalmente devido aos compostos bioativos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas encontrados em algumas espécies (UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017; SANTGAKUMARAN; AYYAPPAN; RAY, 2020; CHEN *et al.*, 2020; DENG *et al.*, 2021; MUNIR *et al.*, 2021).

Por apresentarem muitos benefícios, os metabólitos secundários de microalgas podem ser utilizados em diversas aplicações. A *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA) aprovou espécies de microalgas alimentares como “*Generally Regarded As Safe*” (GRAS) (OLIVEIRA; BRAGOTTO, 2022), que as rotula como seguras para utilização em composições alimentícias, cosmeceúticas e farmacêuticas. Por conta disso, a biomassa de algumas espécies pôde ser aplicada em formulações nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (MICHALAK *et al.*, 2020; CARRASCO-REINADO *et al.*, 2019; LEVINE; FLEURENCE, 2018).

A diversidade existente de espécies de microalgas permite a produção de diferentes tipos de produtos e aplicações. Como uma fonte alternativa promissora de novas substâncias bioativas, as microalgas receberam grande atenção de pesquisadores e se desenvolveram nas indústrias de alimentos, aquicultura, biocombustíveis, nutracêuticos e cosméticos (PATRAS *et al.*, 2019; RICCIO; LAURITANO, 2020). Alguns dos exemplos de utilização da biomassa microalgal são a sua comercialização como suplemento, ingrediente ou aditivo alimentar e nutracêutico (URIBE-WANDURRAGA *et al.*, 2021), frequentemente utilizado em formulações de bebidas, pães e massas (NICCOLAI *et al.*, 2020; VERVERIS *et al.*, 2020) (**Figura 4**). Um exemplo disso, é a utilização do ácido docosahexaenóico (DHA) em formulações de sucos, leite e outras bebidas, especialmente para bebês lactentes e crianças (ARAÚJO; PETEIRO, 2021; SINGH *et al.*, 2020; CERÓN-GARCÍA *et al.*, 2018).

Figura 4. Produtos alimentares à base de algas e microalgas.



Fonte: Adaptado de Oliveira e Bragotto (2022).

Nesse contexto, o gênero *Chlorella* é um dos mais reconhecidos por abranger espécies de microalgas verdes amplamente utilizadas para suplementação e nutrição humana e animal (SATHASIVAM *et al.*, 2019). Segundo Boukid e Castellari (2021), entre os anos de 2015 e 2019, aproximadamente 13.090 novos produtos alimentícios contendo algas/microalgas e/ou componentes derivados foram registrados, sendo 79% em alimentos e 21% em bebidas.

As microalgas também exercem papel fundamental em outros segmentos da indústria, como o de biocombustíveis. Elas compõem a chamada “3ª geração de biocombustíveis” (MARTÍN; GROSSMANN, 2012), um tipo de combustível cuja matéria-prima provém de uma fonte biológica e pode aliviar os problemas alimentares e de uso da terra associados aos biodiesel de 1ª e 2ª geração (MAHLIA *et al.*, 2020), que utilizam como matéria-prima, respectivamente, culturas alimentares (como cana-de-açúcar) e resíduos agrícolas e alimentares, mas que atua, principalmente, como alternativa aos combustíveis fósseis, que atualmente representam aproximadamente 80% da demanda total mundial de energia primária (AHMAD; ZHANG, 2020; ISAAC *et al.*, 2022).

Os biocombustíveis ajudam a reduzir as emissões de carbono, tendo um impacto positivo no meio ambiente (SANTOS, 2020), colocando em prática os objetivos do Acordo de Paris, que visa “manter a temperatura média global bem abaixo de 2 °C acima dos níveis pré-industriais” (SOVACOOOL *et al.*, 2021). Por sua vez, os biocombustíveis de 3ª geração apresentam a vantagem de produzir maiores rendimentos por área (m²) do que as culturas

tradicionais (HOSSAIN *et al.*, 2020), contribuindo significativamente para a redução da emissão de gases do efeito estufa e para o desenvolvimento simultâneo de um suprimento inesgotável de matéria-prima para biocombustíveis (DE MENDONÇA *et al.*, 2022; MOSHOOD *et al.*, 2021).

As microalgas têm o potencial de sequestrar até 90% de CO₂ quando cultivadas em condições de cultivo fechado, e entre 25% e 50% quando cultivadas em *raceway ponds* (PAUL *et al.*, 2021), e esse potencial influencia diretamente na produção de lipídios na biomassa microalgal. Os ácidos graxos presentes na biomassa são decompostos para produzir triglicerídeos (TGA), colesterol e lipídios (MIMOUNI *et al.*, 2018). Devido à capacidade das microalgas de armazenar uma quantidade significativa de lipídios mesmo quando expostas a condições ambientais adversas, o processo de transesterificação pode ser utilizado de forma eficaz na produção de biodiesel (DEVI; PARTHIBAN, 2020). Como consequência disso, o lipídio é um dos compostos biológicos mais importantes necessários para a produção de biodiesel (ADEKUNLE *et al.*, 2020; ARAGONÉS *et al.*, 2022).

Os parâmetros de cultivo, como composição das águas residuais, concentração de CO₂, temperatura e taxa de aeração têm efeito na produção de lipídios das microalgas (ALI *et al.*, 2022). Sendo assim, a utilização de resíduos, advindos das estações de tratamento de água, no cultivo de microalgas pode vir a aumentar a quantidade de recursos que são “reciclados” de forma eficiente (VADIVELLOO *et al.*, 2021), tornando o tratamento de águas residuais e a produção sustentável de combustíveis demandas combinadas (AFIFY; SHALABY; SHANAB, 2010). A **figura 5** ilustra esse processo.

Figura 5. Tratamento de águas residuais e produção de biocombustível como demandas combinadas.



Fonte: Adaptado de Ali *et al.* (2022).

Outra característica atrativa das microalgas, é que algumas espécies têm capacidade de remover matéria orgânica e nutrientes de efluentes de águas residuais (SHAHID *et al*, 2020). Estudos, como o realizado por Lu *et al* (2024) demonstrou que estes organismos também são capazes de absorver e reduzir o teor de poluentes, como fósforo e amônia, em águas residuais. Estudos apontam que espécies cultivadas em águas residuais possuem altas taxas de fixação de carbono (1,83 Kg CO₂/ Kg de biomassa) e rendimentos de produção de 40 a 50% superiores aos das culturas terrestre, com taxas de utilização de nutrientes próximas a 100% (SHAHID *et al*, 2020). De acordo com Sial *et al* (2020), culturas mistas de microalgas e bactérias apresentam efeito sinérgico e obtêm bons rendimentos de produção de biomassa e absorção de nutrientes.

Devido a essa capacidade de remoção de nutrientes, adsorção e natureza renovável e sustentável, as microalgas apresentam uma vantajosa relação custo-benefício para biorremediação, uma vez que é capaz de suportar condições adversas, formar relações simbióticas com outros microrganismos dentro de um consórcio, adaptar-se a diferentes ambientes e ser utilizada em escala industrial (OKEKE *et al.*, 2022).

1.5 Microalgas como fonte para prospecção de biomoléculas

As microalgas podem produzir uma ampla gama de compostos bioativos de alto valor agregado, como vitaminas, carotenóides, esteróis, proteínas, lipídios, polissacarídeos e alguns outros bioprodutos (OKEKE *et al*, 2022), e com o desenvolvimento da biotecnologia, o isolamento e identificação de componentes de microalgas e sua pesquisa e desenvolvimento têm sido profundamente pesquisados (ZHOU *et al*, 2022).

A composição bioquímica das microalgas, no entanto, varia de acordo com a espécie. Por exemplo: *Arthrospira platensis* é conhecida por conter maior teor de proteínas, enquanto microalgas do gênero *Chlorella* apresentam baixo teor de fibras (CANELLI *et al.*, 2020; URIBE-WANDURRAGA *et al.*, 2020). *Nannochloropsis oceanica* é uma boa fonte de vitamina D (LJUBIC *et al*, 2020), enquanto *Dunaliella salina* acumula vitamina C em quantidades consideráveis (OKEKE *et al*, 2020) e β -caroteno (MEHARIYA *et al*, 2021).

Os compostos bioativos oriundos de microalgas possuem diversas atividades biológicas comprovadas e, portanto, podem ser utilizados em aplicações biomédicas, farmacêuticas, cosmeceúticas e nutracêuticas (RIZWAN *et al*, 2018), enquanto agentes antioxidante, antiinflamatório, antimicrobiano e anticancerígeno (AMBATI *et al.*, 2019;

ARCHER *et al.*, 2021). Os lipídios são o composto extraído de microalgas mais estudado, com maior potencial para aumento de escala de processo e comercialização (MALTSEV; MALTSEVA, 2021) e incluem ceras, esteróis, hidrocarbonetos de cadeia curta e longa, pigmentos e ácidos graxos (ZHOU *et al.*, 2022). Os ácidos graxos incluem os poliinsaturados (PUFAs), como o ácido linoleico (C18:2 ou ômega-6), e o ácido linolênico (C18:3 ou ômega-3), que ocupam de 20 a 60% da composição lipídica total (LIANG *et al.*, 2019) e desempenham papel vital na regulação do metabolismo humano (SHARMA *et al.*, 2020).

Outra classe de compostos bioativos de microalgas com potencial aplicação são os pigmentos (ZITTELLI *et al.*, 2023). Eles desempenham um papel importante na fotossíntese e são divididos em três grupos principais: clorofilas, carotenóides e ficocianinas (SILVA *et al.*, 2020). A alta diversidade estrutural desses pigmentos faz com que seu potencial de aplicação seja vasto (LEE *et al.*, 2021) nas indústrias farmacêutica e cosmética devido às suas atividades biológicas e cores intensificadas (PATEL *et al.*, 2022; CHEIRSILP *et al.*, 2023).

Quanto aos outros componentes da biomassa microalgal, normalmente há um alto teor de carboidratos (50% do seu peso seco) e eles estão nas formas de celulose, amido e polissacarídeos (CHEIRSILP *et al.*, 2023). Entre essas formas, o amido de microalgas é geralmente aplicado como matéria-prima para a produção de bioenergia, como bioetanol, biogás e bio hidrogênio, enquanto os polissacarídeos podem ser aplicados como ingredientes funcionais, aditivos para cosméticos e agentes farmacêuticos naturais. Eles também têm capacidade de melhorar o sistema imunológico e as respostas inflamatórias (CHEW *et al.*, 2017).

As microalgas também são uma rica fonte de outros compostos bioativos de interesse medicinal, como proteínas, vitaminas, entre outros. Alguns exemplos de vitaminas encontradas em microalgas, são: vitamina A (retinóides e caroteno), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B6 (piridoxina), B7 (biotina), B9 (ácido fólico), B12 (cobalamina), C (ascórbico ácido) e E (alfa-tocoferol) (PISTELLI *et al.*, 2021; DE SOUZA *et al.*, 2018).

1.5.1 Proteínas de Microalgas

As microalgas são uma fonte de proteína sustentável, atraente e promissora em comparação às atuais fontes vegetais e animais (CANELLI *et al.*, 2020). A busca intensificada dos consumidores por alimentos ricos em proteínas, que têm aumentado consistentemente devido à explosão populacional nos últimos anos. Com a população global projetada para

atingir 9,6 mil milhões até 2050 (WU *et al.*, 2014), estima-se que a procura de alimentos deverá aumentar 73%, para 455 milhões de toneladas (KELL, 2022).

Por terem capacidade de crescimento rápido e eficiente (HAMIDI *et al.*, 2019), boa adaptação ecológica (KUMAR *et al.*, 2022) e capacidade de prosperar em águas residuais com elevadas concentrações de nitrogênio, fósforo e outros contaminantes (AMARAL *et al.*, 2023), as microalgas ganham destaque e surgem como fonte alternativa para obtenção de proteínas para utilização em alimentos e exploração comercial.

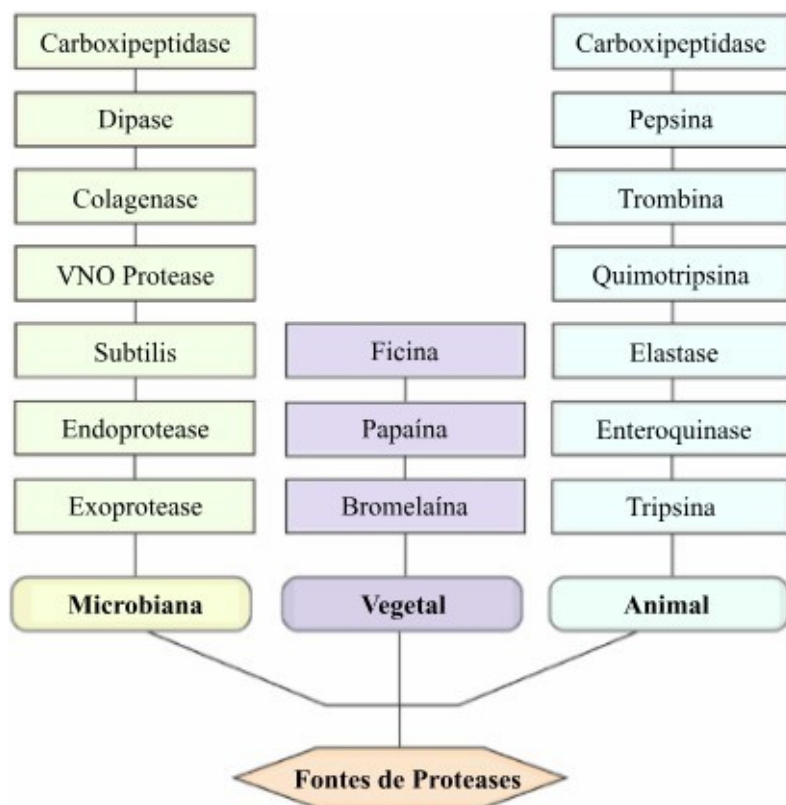
De acordo com Janssen *et al* (2022), o teor de proteína na biomassa de microalgas varia de 30 a 80% da massa total, a depender do gênero e espécie. O teor total de proteínas de algumas espécies, como *Arthrospira sp*, já consolidada enquanto fonte de proteína sustentável (MORELLI, 2023), pode ultrapassar 50% do peso seco (AMORIM *et al*, 2020) e, geralmente, apresenta um perfil equilibrado de aminoácidos (CHRONAKIS e MADSEN, 2011).

Em termos de benefícios para a saúde, essas proteínas são ricas em peptídeos bioativos, que têm uma variedade de impactos quando consumidos (ARAÚJO *et al*, 2021) e apresentam diversas propriedades bioativas, tais como antioxidantes, imunomoduladoras, anticancerígenas e cardioprotetoras (EJIKE *et al.*, 2017; SATHYA *et al.*, 2021; SKJANES *et al.*, 2021). No entanto, mesmo apresentando características nutricionais e funcionais equivalentes às proteínas convencionais, a biomassa de microalgas ainda não foi totalmente explorada nesse sentido. À luz da literatura, em comparação com a prospecção e aplicação de outros compostos microalgais, nota-se que ainda há poucos trabalhos envolvendo proteínas de microalgas, demonstrando que esse é um setor com potencial a ser explorado.

1.6 Proteases: consideração gerais e presença nas microalgas

As proteases ou peptidases (EC 3.4) constituem um amplo grupo de enzimas que catalisam a clivagem da ligação peptídica em proteínas e peptídeos (ZHU; WU; WANG, 2011), e podem ser encontradas em diversos organismos. Elas são agrupadas em três classes (**Figura 6**), com base na fonte onde são obtidas, sendo: 1) proteases animais; 2) proteases microbianas; e 3) proteases vegetais (HASAN; HAQUE; RAHMAN, 2022). Atualmente o banco de dados MEROPS conta com 1.142.788 milhão de sequências de proteases depositadas.

Figura 6. Representação esquemática da obtenção de proteases de fontes diferentes.



Fonte: Adaptado de (HASAN; HAQUE; RAHMAN, 2022).

Além disso, elas podem ser classificadas com base em diversos parâmetros, como: pH e sítio ativo. As proteases com pH ótimo de 8,0 a 9,0 são consideradas proteases alcalinas, enquanto as que atuam no seu ótimo na faixa de 2,0 a 6,0 são consideradas proteases ácidas. As proteases neutras funcionam em um nível de pH de 6,0 a 7,0 (MAITIG *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2015; HASAN; HAQUE; RAHMAN, 2022; RAO *et al.*, 1998).

Podem ser classificadas ainda de acordo com a região da cadeia polipeptídica que clivam, em exopeptidases (3.4.11-19) e endopeptidases (3.4.21-99). As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades da cadeia polipeptídica liberando um único aminoácido, di ou tripeptídeo (NAVEED *et al.*, 2021). Com base no local de clivagem, seja na porção N (amino-) ou C (carboxi-), essas enzimas são classificadas em aminopeptidases ou carboxipeptidases, respectivamente. (SANI *et al.*, 2017; SAWANT; NAGENDRAN, 2014).

As endopeptidases catalisam a hidrólise dentro da cadeia liberando peptídeos,

podendo em alguns casos desencadear processos de digestão proteica, sendo esses peptídeos alvos de exopeptidases (KUMAR, 2020; SAWANT; NAGENDRAN, 2014). As endopeptidases são classificadas em vários tipos com base na influência da presença de um grupo funcional específico no sítio ativo, por exemplo, protease serínica (EC 3.4.21), protease aspártica (EC 3.4.23), protease cisteínica (EC 3.4.22) e metaloprotease (EC 3.4.24) (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008).

As proteases têm uma ampla gama de funções metabólicas e aplicações industriais, principalmente nas indústrias de detergentes, farmacêutica e alimentícia (RAO *et al.*, 1998) e, também, na indústria de couro e lavanderia (VELOORVALAPPIL *et al.*, 2013). De acordo com Freitas *et al.* (2015), a maioria das proteases disponíveis no mercado são derivadas de fontes microbianas, representando aproximadamente 40% de todas as proteases vendidas globalmente.

Atualmente, as proteases representam 60% do mercado de enzimas e a estimativa é de que esse segmento cresça de US\$ 3,32 bilhões em 2023 para US\$ 4,45 bilhões até 2028, com um CAGR de 6% durante o período de previsão (2023-2028) (MARKETS, 2023b). A aplicação de proteases em processos industriais está se expandindo devido às suas vantagens percebidas, como condições operacionais mais amenas, utilização eficiente de recursos, redução no número de etapas de produção e redução da poluição (SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

De acordo com a literatura, as microalgas possuem grande capacidade de síntese de enzimas para aplicações industriais como amilases, galactosidases, fitases, dentre outras (BRASIL *et al.*, 2017). De acordo com Ghattavi & Homaei (2023), muitas enzimas comerciais significativas foram extraídas do fitoplâncton marinho (DEBANISH *et al.*, 2005), como a L-asparaginase de *Spirulina maxima* e *Chlamydomonas sp.* (PAUL, 1982; BAKY; BAROTY, 2016), lipases de *Tisochrysis lutea*, *Nannochloropsis oculata* (BALDUYCK *et al.*, 2015) e *Chlorella sp.* (KOVÁCS; HANCSÓK, 2009) e superóxido dismutases, de *Porphyridium cruentum* (ZEINALI; HOMAEI; KAMRANI, 2015), no entanto, até o presente momento, há poucos registros na literatura envolvendo a prospecção de enzimas proteolíticas a partir de microalgas.

Silva *et al.* (2017) avaliaram a produção de protease em *Chlorella vulgaris* cultivada em *Bold's Basal Medium* (BBM) suplementado com resíduo agroindustrial de baixo custo. A atividade enzimática máxima obtida foi de 292 UAP/mL, em meio contendo 0,5% de água de maceração de milho. Niven (1995) separou por filtração em cromatografia em gel duas proteases de *Anabaena variabilis*, com diferentes especificidades de substrato. Uma das proteases tem peso molecular de 188 kDa e hidrolisa tri e dipeptídeos, enquanto a outra tem 59 kDa e realiza a hidrólise de oligopeptídeos que contêm uma cadeia maior. *A. variabilis* produz

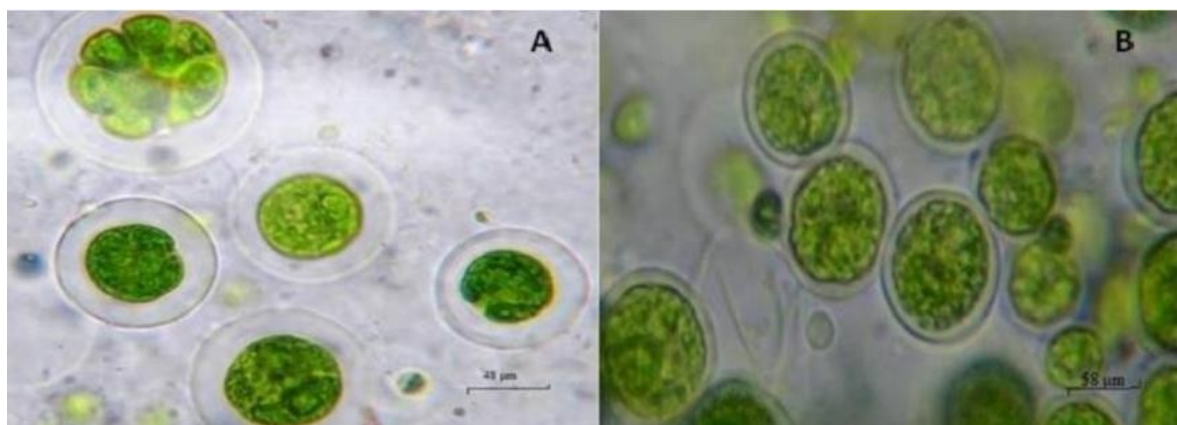
uma protease dependente de cálcio, semelhante à tripsina (Lockau et al., 1988). Nanni et al. (2001) e Yada et al. (2005) realizaram estudos sobre a produção de proteases pela espécie *Arthrospira platensis*.

Sabendo do potencial de aplicação das proteases em diversos processos industriais, e sabendo que, atualmente, a produção dessas enzimas não supre a demanda atual do mercado (Mogharabi e Faramarzi, 2016), entende-se que esse é um campo com potencial a ser explorado.

1.7 Microalgas do gênero *Chlorococcum*

As microalgas do gênero *Chlorococcum* pertencem ao filo Viridiplantae, divisão *Chlorophyta* e família *Chlorococcaceae* (LOURENÇO, 2006), vivem como células vegetativas solitárias ou em grupos temporários de forma indefinida. Trata-se de uma microalga verde unicelular, com potencial de acumulação e armazenamento de lipídios no interior da sua célula (MAHAPATRA; RAMACHANDRA, 2013). A morfologia celular pode variar entre esférica ou elipsoidal (com tamanho variável e parede celular áspera) e é de natureza solitária com mucilagem fina, como relatado por Watanabe e Lewis (2017) e apresentado na **Figura 7**. Seu ciclo reprodutivo ocorre, principalmente, de forma assexuada, por zoósporos (ou aplanósporos desprovidos de flagelos) ou sexuada, por isogametas, sob condições ambientais de estresse, como limitação de luz e de nutrientes (WATANABE; LEWIS, 2017; GUIRY, 2019).

Figura 7. Micrografia de *Chlorococcum humicola* célula solitária (A) e células coloniais (B).



Fonte: Santhoshkumar et al. (2016).

Trata-se de um gênero de microalga que se apresenta de forma cosmopolita e que pode ser coletada de ambientes marinhos e dulcícolas, aéreos e terrestres e nas superfícies rochosas (WATANABE; LEWIS, 2017; GUIRY, 2019). Segundo o *Algaebase*, até o momento

foram descritos, taxonomicamente, 33 espécies e 3 variedades aceitas no banco de dados (MOLINARI NOVOA *in* GUIRY, 2023).

Chlorococcum sp. é uma espécie de microalgas com capacidade de acumular alto teor de lipídios (em média 18,3%) e carboidratos (em média 63,7%), que também são encontradas em efluentes secundários (MATHIMANI *et al.*, 2023; ARAVANTINOU; THEODORAKOPOULOS, 2013; CHINNASAMY *et al.*, 2010; RENUKA; SOOD; PRASANNA, 2014) e vem sendo investigada por sua excelente natureza autofloculante, que facilita a colheita de biomassa, bem como a eficiência de remoção de enxofre e nitrogênio de águas residuais como agente de biorremediação (REHMAN; ANAL, 2018).

Devido ao seu alto conteúdo lipídico, tornou-se promissora para a geração de biodiesel (ABOMOHRRA *et al.*, 2013; LOFTUS; JOHNSON, 2017). Além disso, é um gênero rico em vários compostos bioativos, tornando-se uma fonte potencial de metabólitos naturais com atividade funcional (ELSHOBARY, *et al.*, 2020).

Chlorococcum sp. foram estudados e relatados como tendo ácidos graxos, alcalóides, flavonóides, saponinas, aminoácidos e carboidratos (BHAGAVATHY *et al.*, 2011; BHAGAVATHY; SUMATHI, 2012). Também foi relatado que esta microalga contém levoglucosenona e ácido hexadecanóico (RAI *et al.*, 2018) e compostos fenólicos (CHOOCHOTE *et al.*, 2014). No entanto, as composições fitoquímicas e o perfil proteico, bem como as atividades biológicas de microalgas pertencentes a esse gênero tiveram estudos pouco explorados até então. Mathimani *et al.* (2023) revelou que o conteúdo de proteínas totais em *Chlorococcum* sp. é de 27,3%, no entanto a qualidade dessas proteínas, determinada pelo seu conteúdo de aminoácidos, ainda não é conhecida.

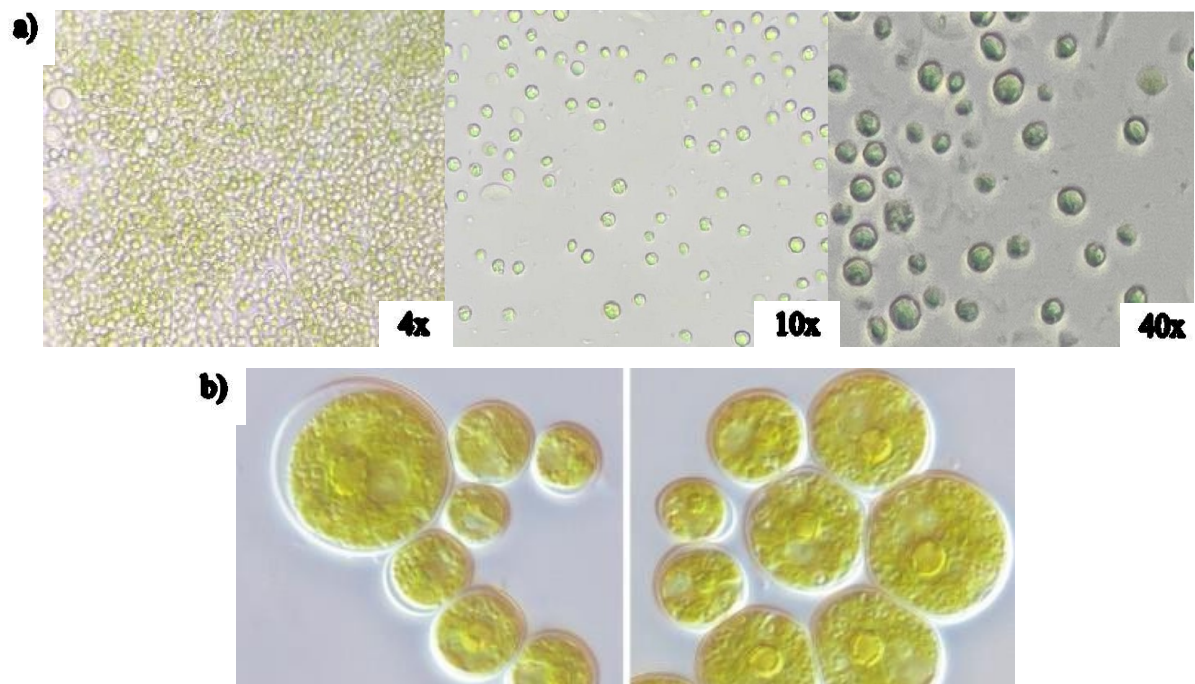
As aplicações industriais de *Chlorococcum* sp. têm experimentado um crescimento significativo, impulsionado por sua notável taxa de crescimento, facilidade de cultivo e resistência a variações extremas de pH e temperatura (YUAN *et al.*, 2002). Embora haja um enfoque na utilização da biomassa de *Chlorococcum* sp. para a bioprospecção de lipídios, visando à produção de biodiesel, biofixação de CO₂ e extração de carotenóides para aplicação nas indústrias cosmética e farmacêutica, é importante destacar que a prospecção, extração e aplicação de proteínas também estão se tornando relevantes para determinados segmentos da indústria, como o de alimentos e rações (CHEW *et al.*, 2017).

1.7.1 *Chlorococcum infusionum*

As microalgas da espécie *Chlorococcum infusionum*, **Figura 8**, são do tipo únicas,

podendo ter dois pirenóides cercados por segmentos de amido, e são morfologicamente semelhantes a *Chlorococcum echinozygotum* (TEMRALEEVA e BUKIN, 2022). De acordo com o *AlgaeBase*, *C. infusionum* é uma espécie que habita água doce, embora na literatura haja registros de trabalho envolvendo cepas coletadas em água salobra (KAREMORE, PAL e SEN, 2013).

Figura 8. Micrografias ópticas de cepas de *C. infusionum*.



Fonte: a) elaborado pela autora; b) adaptado de Temraleeva e Bukin (2022).

Karemore, Pal e Sen (2013) realizaram estudos sistemáticos sobre a triagem de componentes críticos do meio para aumentar a biomassa e os rendimentos lipídicos em *C. infusionum*. Yadav, Dash e Sen (2019) apresentaram um processo verde para remediação de resíduos, fixação de CO₂ e produção de biomassa rica em lipídios e carboidratos para o desenvolvimento de uma biorrefinaria de microalgas verdes, incluindo *C. infusionum*. Embora muito se tenha a respeito de algumas biomoléculas da biomassa de *Chlorococcum* sp., uma abordagem voltada para o estudo de suas proteínas e do seu potencial ainda é bastante exígua. Há poucas informações na literatura sobre *C. infusionum*, principalmente com relação ao seu conteúdo proteico e possíveis aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair, isolar e avaliar as características físico-químicas e enzimáticas de proteases presentes na biomassa da microalga *Chlorococcum infusionum* produzida em fotobiorreator fechado.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Padronizar o cultivo de microalga *C. infusionum* em fotobiorreator fechado para a produção de biomassa;
- b) Determinar rendimento, composição fitoquímica e elementar da biomassa da microalga *C. infusionum*;
- c) Padronizar a extração e determinar o teor de proteínas solúveis da biomassa microalgal
- d) Isolar as proteases das frações proteicas da biomassa de *C. Infusionum*
- e) Determinar a atividade proteolítica total e específica das proteases obtidas da biomassa microalgal;
- f) Determinar a estabilidade conformacional de proteases frente às variações de temperatura e pH;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

1.1.1 Material Biológico

A microalga *C. infusionum* utilizada no presente trabalho é mantida na algoteca do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus do Pici, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), e possui como registro no Sisgen o número: ADA415C.

1.1.2 Reagentes químicos

Acrilamida, N, N' – bisacrilamida, persulfato de amônio, N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), Coomassie Brilliant Blue G-250, dodecil sulfato de sódio (SDS), albumina sérica bovina (BSA), ácido tricloroacético (TCA), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), pepstatina A, fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF), iodoacetamida (IAA), azocaseína, β -mercaptoetanol, uréia, gelatina e triton X-100 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Os marcadores de massa molecular (LMW-SDS Marker Kit), ditioneitol (DTT) e a matriz cromatográfica DEAE-Sephacel foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (NY, EUA). Todos os demais reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

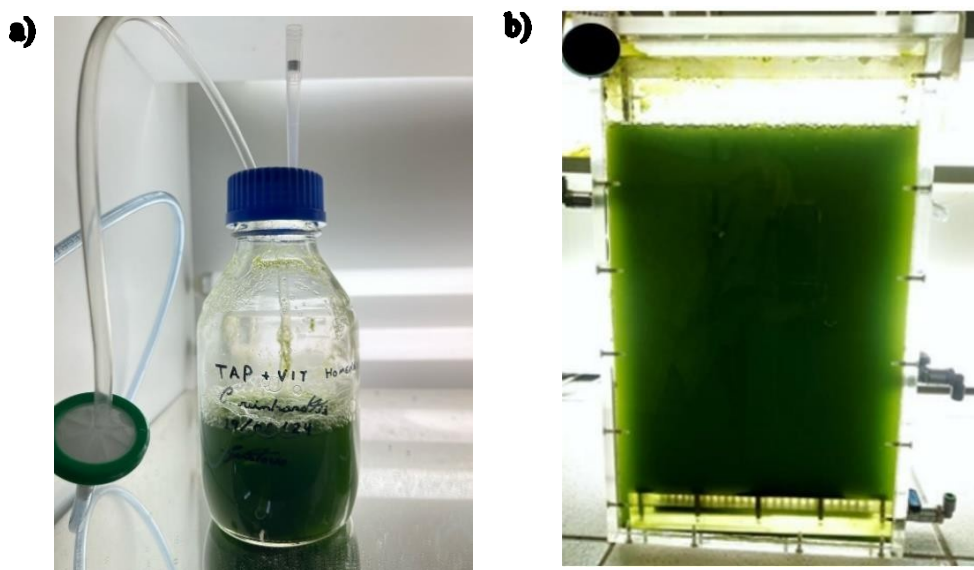
3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo da microalga *C. infusionum* em fotobiorreator fechado

Inicialmente, as células de *C. infusionum* foram inoculadas, sob condições assépticas, em um fotobiorreator cilíndrico (Figura 9A) contendo 100 mL de meio BBM – *Bold's Basal Medium* (NICHOLS e BOLD, 1965) (Anexo 1) com pH ajustado para 6,8. Esse fotobiorreator foi mantido por 4 dias em uma câmara de crescimento (B.O.D.) sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 4000 Lux e aeração estéril constante (mantida por aerador elétrico e filtros de 0,25 μ m). Após esse período, um inóculo da microalga (com uma densidade óptica a 690 nm = 0,5) foi adicionado num fotobiorreator retangular de placas planas (Figura 9 B) contendo 4 L do meio BBM pH

6,8. A cultura foi mantida por 14 dias na plataforma de crescimento usando as seguintes condições: temperatura de 25 ± 2 °C; intensidade luminosa de 50.000 Lux; fotoperíodo de 12 h e aeração estéril constante.

Figura 9 - Cultivo de microalga em fotobiorreator cilíndrico (A) e retangular de placas planas (B).



Fonte: elaborado pela autora.

3.2.2 Determinação da curva de crescimento das microalgas

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

Depois de homogeneizar a suspensão celular com auxílio de uma pipeta, a amostra foi aplicada na câmara de contagem, preenchendo todo espaço referente a área demarcada, esperando pelo tempo de 2 min para sedimentarem. Usando um microscópio, a área demarcada foi focalizada na lente de 40X para iniciar a contagem de cada quadrante médio. Foram adotados critérios de contagem para delinear corretamente o experimento, como a visualização

de um núcleo visível das células contadas; contar como um único grupo as células agrupadas que tinham difícil distinção uma das outras, entre outros critérios. A área total da câmara de Neubauer, ocupada por 25 quadrados pequenos de contagem, corresponde a uma área total de 1 mm² (1 mm de cada lado), ou seja, cada quadrante pequeno corresponde a 0,0025 mm². Um quadrado grande possui 400 quadrados pequenos (25 x 16 = 400). Então, a área do quadrado grande é de 1 mm² (400 x 0,0025 mm² = 1 mm²). Assim, cada quadrante comporta um volume de 0,1 mm³ (LUCARINI *et al.*, 2004), então (Equação 1):

$$Volume = \text{área} \times \text{profundidade} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: Volume = 1mm² x 0,1mm = 0,1 mm³. Sendo assim, é possível inferir o número de células por mL de solução através da equação 2:

$$n^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ total de quadrantes contados}} \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (\text{Equação 2})$$

A contagem ocorreu diariamente até o 14º dia de cultivo. Os valores obtidos da contagem de células foram plotados em um gráfico, com a assistência do programa *ORIGIN* 8.5, para observar o crescimento celular da microalga *C. infusionum* por tempo decorrido do experimento.

3.2.3 Determinação da clorofila *a*

Para determinação do teor de clorofila microalgal, inicialmente 1 g de células frescas será macerado com nitrogênio líquido, sendo, em seguida, adicionado 5 mL de acetona (P.A.) refrigerada. O produto da maceração será filtrado em fibra de vidro e coletado em balão volumétrico de 50 mL. A acetona será adicionada sobre o macerado restante na fibra de vidro, até atingir o volume final de 50 mL de filtrado. Esse procedimento será realizado sem a presença de luz. As absorbâncias das clorofilas *a* e *b* serão medidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 664 e 630 nm, respectivamente. A concentração dos pigmentos será determinada de acordo com a equação definida por Clesceri *et al.* (1989), descrita na equação 3:

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 11,85(Abs_{664}) - 1,54(Abs_{647}) - 0,08(Abs_{630}) \quad (\text{Equação 3})$$

3.2.4 Coleta e processamento da biomassa microalgal

As microalgas coletadas no décimo dia de cultivo foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 10 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa resultante foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 100 mM e EDTA 10 mM para o clareamento das células através de quatro etapas alternadas de ressuspensão da biomassa e centrifugação a 10.000 rpm por 20 min. A biomassa fresca clarificada foi transferida para uma placa de Petri, contendo cinco folhas de papel filtro, onde ficou por 1 h para que o excesso de umidade fosse removido. Após isso, a biomassa foi pesada e armazenada em tubos Falcon, acondicionada a 4 °C, para uso nas etapas posteriores. Para o cálculo do rendimento da biomassa, foi utilizada a seguinte equação 4:

$$PM = PT - P_{placa} - P_{pf} \quad \text{(Equação 4)}$$

Em que:

PM = Peso da microalga (em gramas);

PT = Peso total (obtido na balança analítica, em gramas);

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

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

O resultado é correlacionado ao volume inicial de cultura que tinha no recipiente (Equação 5):

$$PM \text{ em gramas de biomassa} - mL \text{ de meio de cultura} \quad \text{(Equação 5)}$$

3.2.5 Análise elementar da biomassa microalgal

3.2.5.1 Umidade

Amostras de 1 g da biomassa microalgal foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente tarados em balança analítica. As referidas amostras foram colocadas em estufa com temperatura entre 100 e 105 °C por 24 h (NAGAKURA, 1972). Depois os cadinhos foram retirados e transferidos para dessecador com auxílio de pinça, até atingir a temperatura ambiente, sendo pesados posteriormente. O resultado da umidade foi encontrado pela diferença de peso inicial e final gerando uma resultante em percentagem. A equação utilizada foi a

descrita abaixo (equação 6):

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

Em que:

U = Umidade;

V0 = peso do cadinho seco;

V2 = peso do cadinho com amostra;

V1 = peso do cadinho com amostra após secagem.

3.2.5.2 Cinzas

Nessa etapa, amostras de 1 g de biomassa microalgal seca foram adicionadas em cadinhos previamente tarados, que foram posteriormente pesados e transferidos para mufla a 600 °C por 4 horas. Depois, os cadinhos foram para o dessecador até atingir a temperatura ambiente para em seguida serem pesados (BRASIL, 2011). Para o cálculo final do teor de cinzas expresso em porcentagem, utilizou-se a equação 7:

$$\%C = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100 \quad \text{(Equação 7)}$$

Em que:

C = Cinza;

V0 = peso do cadinho;

V1 = peso do cadinho mais cinza;

V2 = peso do cadinho mais amostra.

3.2.5.3 Proteínas totais

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada conforme o método de Micro-Kjeldahl (MAPA, 2013), no qual foi utilizado papel vegetal contendo 0,2 g de amostra macerada, acondicionados em tubos com 2 g do catalisador, contendo uma mistura de sulfato de cobre (CuSO₄), selênio metálico (Se) e sulfato de potássio (K₂SO₄), e adicionados 4 mL de

ácido sulfúrico. Em seguida, os tubos 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 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) até completar 50 mL.

Desse modo, a mistura destilada foi titulada com solução padrão de ácido clorídrico (HCl) a 0,04 N em bureta até a coloração rosada e assim, anotou-se o volume de ácido gasto. A porcentagem de nitrogênio total foi obtida através da equação 8:

$$\%NT = \frac{(Volume\ de\ amostra - volume\ do\ branco) \times 0,01 \times 0,04}{Peso\ da\ amostra} \times 100 \quad \text{(Equação 8)}$$

A conversão do nitrogênio total (NT) para proteína total (PT) foi obtida a partir da equação 9:

$$\%PT = \%NT \times 6,25 \quad \text{(Equação 9)}$$

3.2.5.4 Lipídeos totais

O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet (IUPAC, 1979). O hexano foi utilizado como solvente orgânico para extração dos lipídios totais. Seguidamente, os balões foram colocados em estufa a 100 °C durante 1 hora. Logo após, os balões foram levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesados (BRASIL, 2011). Posteriormente, foram pesadas amostras de 1 g de biomassa para serem colocadas nos cartuchos de extração (papel filtro) e tampadas com algodão. Os balões contendo 100 mL de solvente foram levados ao determinador de gordura para a extração a 90 °C por 2 h. Logo após a extração, a amostra gotejou por 30 min (para a recuperação do solvente o aparelho foi calibrado para 150 °C) e seguidamente os balões contendo o lipídio foram transferidos ao dessecador até atingir a temperatura ambiente para serem pesados. O cálculo para obtenção da porcentagem de lipídeos foi realizado conforme a equação 10:

$$\%L = \frac{(\text{Peso do bal\~ao} + \text{gordura}) - (\text{Peso do bal\~ao vazio}) \times 100}{\text{Peso da amostra}} \quad (\text{Equa\~c\~ao 10})$$

3.2.5.5 Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais presentes na biomassa microalgal foi obtido por diferença (PEARSON, 1976) empregando a seguinte equa\~c\~ao 11:

$$\%Carboidratos = (100\% \text{ da MA}) - [(\%L) + (\%C) + (\%PT)] \quad (\text{Equa\~c\~ao 11})$$

3.2.5.6 Fibra bruta

O teor de fibra bruta foi determinado pelo m\~etodo de Henneberg (WINTON; WINTON, 1958). Inicialmente, amostras de 1 g da biomassa delipidada foram adicionadas a uma solu\~c\~ao de \~acido sulf\~urico 1,25% e, ap\~os a homogeneiza\~c\~ao, foram mantidas em banho seco por 30 min at\~e alcan\~car a fervura. Em seguida, as amostras foram filtradas em pap\~eis de filtro quantitativo, previamente aquecidos em estufa a 105 °C por 1 h e pesados. Em seguida, cada papel de filtro contendo o res\~duo foi lavado com \~agua quente at\~e n\~ao haver rea\~c\~ao b\~asica com o papel indicador de pH. Posteriormente, os res\~duos foram lavados por 3 vezes com 3 mL \~alcool et\~ilico (P.A) e 2 vezes com 3 mL de \~eter et\~ilico (P.A). Ap\~os a evapora\~c\~ao dos solventes, os pap\~eis de filtro com o res\~duo foram colocados em estufa a 105 °C, para secagem, at\~e alcan\~carem um peso constante. Os pap\~eis com o res\~duo foram colocados em cadinhos de porcelana previamente tarados, e em seguida, foram incinerados em forno mufla a uma temperatura de 600 °C. O c\~alculo da fibra bruta foi calculado atrav\~es das equa\~c\~oes 12 e 13:

$$[(P + F + C) - P] - C = F \quad (\text{Equa\~c\~ao 12})$$

$$\%F = \frac{F \times 100}{P} \quad (\text{Equa\~c\~ao 13})$$

Em que:

P = peso do papel;

F = fibra;

C= cinza;

3.2.6 Lise celular para obtenção do extrato bruto de *C. infusionum*

A biomassa microalgal (2 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 20 mL do tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM, EDTA 10 mM e Triton X-100 1%) e homogeneizada sob agitação. A amostra foi submetida a três ciclos de congelamento lento em freezer a -20 °C e descongelamento à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, a mistura foi submetida a um ciclo de ultrassonicação usando 100 pulsos de 10 s e intervalos de 5 s e, posteriormente, macerada vigorosamente por 10 min em nitrogênio líquido. Após isso, o lisado foi centrifugado a 12.000 rpm por 50 min a 4 °C. O sobrenadante (denominado EBCi) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EBCi foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C para utilização nas análises posteriores.

3.2.7 Determinação de fenóis totais no EBCi

O conteúdo de fenóis totais presentes no EBCi foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu modificado (SINGLETON *et al*, 1999). O extrato bruto liofilizado foi solubilizado em álcool etílico (P.A) nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 µg/mL. A cada 0,5 mL de extrato nas diferentes concentrações, foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, 1 mL de solução de Na₂CO₃ 1,89 M foi adicionada e a mistura foi incubada por 2 h no escuro e a temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata e a absorbância foi mensurada a 760 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de peso seco (PS).

3.2.8 Precipitação das proteínas do EBCi com sulfato de amônio

A precipitação de proteínas de EBCi foi feita pela adição, de forma lenta, de (NH₄)₂SO₄ de acordo com a fórmula: Fração 0/60 = 390 g de (NH₄)₂SO₄ para 1000 mL de EBCi. Após adição de sulfato de amônio, EBCi foi mantido sob agitação por 30 min e,

posteriormente, mantido em descanso, na geladeira, por 15 h (*overnight*). Decorrido o tempo de precipitação, EBCi foi centrifugado a 12.000 rpm por 50 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 100 mM e EDTA 10 mM. A ressuspensão proteica foi dialisada por 24 h, em ambiente refrigerado, contra água destilada, num processo que se repetiu cinco vezes. Ao final do processo, a fração protéica, denominada FPCi, foi armazenada em tubos Falcon e mantida a -20 °C para uso posterior.

3.2.9 Determinação do teor de proteínas solúveis do FPCi

O teor de proteínas solúveis de FPCi foram determinados seguindo o método proposto por Bradford (1976), utilizando-se de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para tanto, foram aplicados 2,5 mL do reagente de Bradford em 100 µL das amostras. As leituras das absorbâncias foram feitas em triplicata em comprimento de onda igual a 595 nm em espectrofotômetro.

3.2.10 Cromatografia de exclusão molecular da FPCi

A FPCi, obtida conforme descrito no item 4.7, foi aplicada em coluna de Sephadex G-100 (0,8 X 100 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 100 mM. Em seguida, cada coluna da matriz foi eluída com o mesmo tampão, utilizando um fluxo de 1 mL/min. As frações referentes aos picos cromatográficos obtidos foram coletadas, quantificadas em espectrofotômetro, pela medida da absorbância a 280 nm, e analisadas por ensaios eletroforéticos. Após essas análises, somente as frações referentes ao pico majoritário foram reunidas numa única fração (denominada FPCiE-P1), dialisada contra água destilada e usada nas demais etapas *downstream*.

3.2.11 Cromatografia de troca-iônica da FPCiE-P1 para o isolamento de proteases.

A fração FPCiE-P1, obtida após diálise, foi centrifugada a 15.000 x g por 5 min e aplicada a uma coluna DEAE-Sepharose™ *Fast Flow* (2,1 cm de diâmetro x 15 cm) acoplada ao sistema FPLC *AKTA pure* (GE). A matriz cromatográfica foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (denominado Tampão A). A cromatografia foi realizada utilizando um gradiente linear de 0 a 1,0 M NaCl em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (Tampão B). As frações

foram coletadas com um fluxo de 1 mL/min e a concentração proteica dessas frações foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm. As frações correspondentes aos picos de absorbância obtidos foram reunidas e armazenadas a -20 °C. Somente as frações referentes ao pico majoritário foram reunidas numa única fração (denominada FPCiT-P3). Essa fração foi dialisada contra água destilada, liofilizada e armazenada a -20 °C para uso nas análises posteriores.

3.2.12 SDS-PAGE das frações proteicas de *C. infusionum*

Os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 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 10% e 12,5% 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 150 V. As amostras 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 p/ 25 μ L. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 2 min e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Aplicar de 15 a 20 μ L de amostra em cada poço do gel. Foram usados marcadores moleculares no primeiro e no último poço. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético: água (1:3,5:8, v/v/v).

3.2.13 Determinação da atividade proteolítica total da FPCiT-P3

A atividade proteolítica de FPCiT-P3 foi determinada utilizando azocaseína 1% como substrato (XAVIER-FILHO et al, 1989). Foram misturados 40 μ L de DTT 3 mM, 20 μ L de FpMCTi-P1 (4 μ gP), 240 μ L de tampão PBS pH 7,0, 200 μ L de azocaseína 1% e incubados a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de TCA 20%. Para o branco, o substrato foi adicionado somente após a precipitação com TCA. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, 500 μ L do sobrenadante foram coletados e acrescidos de 500 μ L de NaOH 2,0 M. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm.

Uma unidade de atividade proteolítica (UAP) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01. Os ensaios foram realizados em

triplicata e os resultados expressos como média da atividade proteolítica específica (UAP/mgP).

3.2.13.1 Zimograma - detecção *in gel* da atividade proteolítica.

Para a detecção *in gel* da atividade proteolítica, amostras de FPCiT-P3 (10 µg de proteínas/poço) foram submetidas SDS-PAGE, seguido os mesmos parâmetros de corrida citados anteriormente, mas utilizando géis de poliacrilamida 12,5%, contendo gelatina 0,1% como substrato, de acordo com a metodologia descrita por Macedo *et al.* (2004). Após a corrida eletroforética, os géis foram incubados por 1h em uma solução de Triton X-100 2,5%, a 25 °C, para retirada do SDS e renaturação das proteínas. Essa etapa foi repetida uma vez para a completa retirada do SDS. Em seguida, os géis passaram por sucessivas (3 ao todo) lavagens em tampão glicina-NaOH 50 mM, pH 9,0 para remoção do Triton X-100 e foram novamente incubados em tampão glicina-NaOH pH 9,0 por 12 h a 37 °C. Para avaliar o efeito do SDS sobre a atividade proteolítica de FPCiT-P3, a etapa de renaturação das enzimas com a adição de Triton X-100 foi eliminada e os géis foram apenas incubados em tampão glicina-NaOH pH 9,0 por 12 h a 37 °C. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,025%, dissolvido em metanol (40%), ácido acético (10%).

3.2.14 Dicroísmo circular e termoestabilidade da FPCiT-P3

A avaliação do padrão conformacional da FPCiT-P3 foi feita utilizando a técnica espectrofotométrica de dicroísmo circular (CD). As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO. Inicialmente foi utilizada uma alíquota de 100 µL de fração proteica (contendo aproximadamente 30 µg da fração FPCiT-P3 em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 100 mM). As medidas foram feitas numa cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, à temperatura controlada de 25 °C. Primeiro, foi obtido um espectro do branco, ou seja, apenas da solução do tampão de solubilização da proteína, para que não haja interferência do tampão. As contribuições do tampão, obtidas sob condições idênticas, foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído. Foi feita então, uma varredura de 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando 8 acumulações. Os programas utilizados para processar os dados foram *Spectra Manager*TM II, *Origin*® e *Protein Secondary Structure Estimation Program Jasc for windows* (que faz parte do pacote de *softwares* adquiridos junto ao equipamento).

A termoestabilidade da FPCiT-P3 também será avaliada por CD, utilizando um intervalo de temperatura de 10 a 90 °C. A predição quantitativa das contribuições da estrutura secundária será realizada pela desconvolução dos espectros de CD usando o programa *SELCON 3*, desenvolvido por Sreemana e Woody (2000).

3.2.15 Caracterização da atividade proteolítica da FPCiT-P3

3.2.15.1 Determinação de pH ótimo da atividade proteolítica

Para determinação do pH ótimo da atividade hidrolítica da FPCiT-P3, foi utilizado azocaseína como substrato de reação. O substrato foi solubilizado em diferentes tampões (50 mM), a saber: glicina-HCl, pH 3,0; acetato de sódio, pH 4,0; acetato de sódio, pH 5,0; fosfato de sódio, pH 6,0; fosfato de sódio, pH 7,0; Tris-HCl, pH 8,0 e glicina-NaOH, pH 9,0. O ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína foi conduzido de acordo com a metodologia descrita no item 3.14, utilizando amostras de FPCiT-P3 (1 mg/mL), solubilizadas em água destilada, realizado em triplicata e o resultado foi expresso como valores de atividade específica (UAP/mg). O pH ótimo, aqui determinado, foi adotado nos ensaios posteriores.

3.2.15.2 Determinação de temperatura ótima da atividade proteolítica

Para determinação da temperatura ótima de reação da FPCiT-P3, foi utilizado azocaseína como substrato e o ensaio foi conduzido nas mesmas condições da metodologia descrita no item 3.14, porém variando-se apenas a temperatura de reação. Amostras de FPCiT-P3 (1 mg/mL), solubilizadas em água destilada foram incubadas em meio reacional nas temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso como valores de atividade específica (UAP/mg/min).

3.2.15.3 Estabilidade da atividade proteolítica em função da temperatura

Para análise da estabilidade em função do pH, uma amostra da FPCiT-P3 (1 mg/mL) foi incubada previamente por 30 min, nas temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Em seguida, essa amostra de FpMCTi-P1 foi submetida ao ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, tal como descrito. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados expressos como atividade proteolítica residual (%), sendo comparados com o controle (sem incubação), onde a atividade proteolítica foi considerada 100%.

3.2.15.4 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

Para avaliação dos tipos de peptidases presentes na biomassa de *C. infusionum*, uma amostra da FPCiT-P3 (1 mg/mL) foi previamente incubada, por 30 min a 25 °C, com diferentes inibidores na proporção de 1:1 (v:v), a saber: PMSF 5 mM (fenilmetanosulfonilfluoreto - inibidor de peptidase serínica), EDTA 10 mM (ácido etilenodiaminotetraacético - inibidor de metalopeptidases), pepstatina A 0,05 mM (inibidor de peptidases aspárticas) e iodoacetamida 0,1 mM (inibidor de peptidase cisteínica). Em seguida, as amostras foram ensaiadas em triplicata com relação à sua atividade proteolítica utilizando azocaseína 1% como substrato tal como descrito anteriormente e os dados expressos como atividade proteolítica residual (%), sendo comparados com o controle (sem inibidores), onde a atividade proteolítica foi considerada 100%.

3.16 Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média e foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism v.5.03* (GraphPad Inc., San Diego, CA). Para comparação de médias foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados como significativos os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

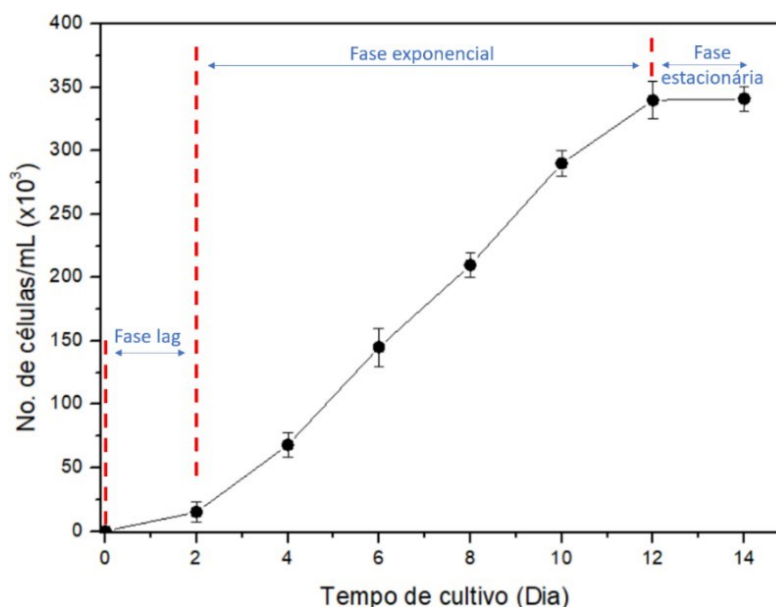
4.1 Cultivo de *C. infusionum* em fotobiorreator de placa planar

Inicialmente, as células de *C. infusionum* foram inoculadas em um fotobiorreator cilíndrico contendo 100 mL de meio BBM, suplementado com biotina e cianocobalamina (vitamina B12) (**Anexo I**) mantido por quatro dias em uma câmara de crescimento (BOD) e, posteriormente, transferido para um fotobiorreator de placas planas contendo 4 L do mesmo meio de cultura utilizado anteriormente. A composição do meio BBM consiste em quatorze soluções diferentes, tornando-o complexo e ideal para o início do crescimento de diversas espécies de microalgas, uma vez que fornece macro e micronutrientes necessários para uma boa produtividade e composição bioquímica celular adequada para a bioprospecção de insumos de interesse biotecnológico.

O cultivo em fotobiorreator de placas planas permite uma ampla distribuição da iluminação, melhor homogeneização para a absorção de nutrientes, facilita os procedimentos de coleta da biomassa e evita a sedimentação da biomassa microalgal. Estudos científicos relataram que esse manejo se mostrou relevante para cultivos cujo objetivo seja a produção de biomassa microalgal e biocompostos de alto valor agregado para diferentes finalidades industriais (RICHMOND *et al.*, 2013; LOURENÇO, 2006).

O **gráfico 1** mostra o resultado da curva de crescimento de *C. infusionum* cultivada em sistema fotobiorreator fechado até o 14º dia de cultivo. As coletas e as contagens foram realizadas como descrito na metodologia. A curva padrão observada ilustra as fases de crescimento (*log*, *lag* e estacionária) até o 14º dia de cultivo.

Gráfico 1 - Curva de crescimento da microalga *C. infusionum* cultivada em fotobiorreator fechado sob condições controladas.



Fonte: Elaborado pela autora.

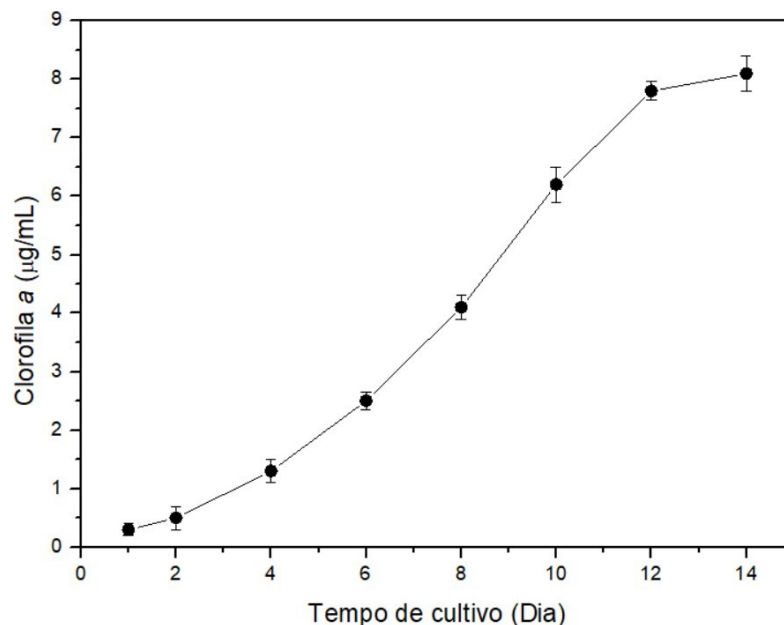
O curto período da fase *lag* indica uma rápida adaptação do inóculo inicial ao meio BBM e às condições de cultivo pré-estabelecidas. A fase *log*, observada do 2º ao 12º dia de cultivo, aponta um crescimento exponencial de células, resultando em acúmulo de uma biomassa rica em compostos bioativos. Nesta fase, o número de células cresceu de, aproximadamente, 10×10^3 células/mL a 325×10^3 células/mL. A duração da fase exponencial depende, principalmente, da disponibilidade de nutrientes essenciais presentes no meio e de luz (LOURENÇO, 2006). Após a redução desses nutrientes, inicia-se um decréscimo relativo da taxa de crescimento das células, fato que foi observado a partir do 12º dia de cultivo. A esse decréscimo dá-se o nome de fase estacionária. Nesta fase, o rendimento máximo do cultivo é obtido e a coleta da biomassa deve ser feita o quanto antes. Após a fase estacionária, o cultivo entra em fase declínio, onde há um esgotamento de nutrientes e taxas de crescimento negativas, em decorrência da presença de substâncias auto inibidoras de crescimento (LOURENÇO, 2006). Sendo assim, com base nos resultados do gráfico 1, optou-se por realizar a colheita da biomassa ao 12º dia de cultivo, onde obteve-se um rendimento médio de $2,35 \text{ g. L}^{-1}$ de biomassa fresca produzida. Até o presente momento, não há dados na literatura referente ao rendimento de biomassa microalgal, fresca ou seca, de espécies pertencentes ao gênero *Chlorococcum*.

Embora a contagem de células seja fundamental para a compreensão da dinâmica do desenvolvimento de um cultivo, trata-se de um método que possui uma considerável

margem de erro (THIVIYNATHAN *et al.*, 2024). Sendo assim, convém utilizar um outro método de monitoramento do crescimento de células como validação dos resultados obtidos no primeiro método realizado, como a medição de densidade óptica (DO) (NIELSEN e HANSEN, 2019; THORÉ *et al.*, 2021).

O uso de densidade óptica (DO) baseia-se na obstrução física da luz pelas células microalgais. Quanto mais células houver numa amostra, maior será a sua absorção de luz, entretanto, antes de realizar a leitura da amostra em aparelho espectrofotométrico, é necessário estar atento a alguns detalhes. Uma vez que as microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, convém, no momento da leitura, utilizar comprimentos de onda que não correspondam ao pico de absorção de luz pelos pigmentos (LOURENÇO, 2006). Além disso, pode-se utilizar procedimentos analíticos simples, como a medição de clorofila, para obtenção de informações a respeito do estado fisiológico das células e da resposta dessas aos fatores do cultivo.

Gráfico 2 - Concentração de clorofila *a* determinada durante os diferentes dias de crescimento da microalga *C. infusionum* cultivada em fotobiorreator fechado e sob condições controladas



Fonte: Elaborado pela autora.

O resultado obtido no **gráfico 2** corrobora com os resultados apresentados no **gráfico 1**. O acúmulo de substâncias, ao longo do cultivo, pode funcionar também como um indicador de crescimento. Uma vez que a clorofila *a* é o principal pigmento que participa do processo fotossintético (LOURENÇO, 2006), a partir da sua medição, pode-se prever o estado

geral das células de uma cultura de microalgas (TAKAHASHI, 2019). A partir disso, pode-se fazer uma correlação direta entre a disponibilidade de clorofila *a* observada na amostra e o crescimento no número de células presentes no meio, tornando este método de medição um método indireto de análise de crescimento da biomassa de um cultivo (SANTOS-BALLARDO *et al.*, 2015).

4.2 Caracterização da biomassa microalgal

A análise elementar da biomassa de *C. infusionum* revelou que, nas condições de cultivo utilizadas, o percentual de proteínas totais obtidas foi de, em média, 27,32% (**Tabela 2**). O dado corrobora com trabalhos encontrados na literatura envolvendo a biomassa de espécies pertencentes ao gênero *Chlorococcum*, como o de Mathimani *et al.* (2023), que obteve um percentual de 27,3% de proteínas totais. No entanto, é um grau percentual baixo, quando comparado ao obtido por outras espécies, como *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* (MOLINO *et al.*, 2018).

De acordo com Soto-Sierra, Stoykova e Nikolov (2018), o acúmulo de proteínas em sistemas fotoautotróficos depende da fonte de nitrogênio e da proporção de carbono e nitrogênio disponíveis no meio de cultivo. No entanto, não só a presença, como a quantidade de nitrogênio disponível também irá influenciar no rendimento de alguns compostos. Em baixas concentrações, pode ocasionar condições de estresse, favorecendo o acúmulo de lipídios na biomassa. Em altas concentrações, causa envenenamento por amônio, podendo causar danos às células microalgais (DAI, QIU e FORCHHAMMER, 2014).

Por sua vez, a biomassa apresentou um elevado teor de lipídios (37,82%). O índice de obtenção de determinados compostos pode ser justificado com base na quantidade de macro e micronutrientes disponibilizados pelo meio de cultivo utilizado (KAREMORE, PAL e SEN, 2013). O trabalho de Kirrolia, Bishnoi e Singh (2012) fez uma análise comparativa do crescimento de *Chlorococcum sp.* em cinco meios diferentes. O maior teor lipídico foi alcançado pela cepa cultivada em meio BBM, em decorrência de uma concentração de nitrato inferior aos outros meios, favorecendo o acúmulo lipídico. Isso sugere que a escolha do meio possa ter favorecido o acúmulo de lipídios na biomassa de *C. infusionum*. O teor de carboidratos obtido foi inferior ao obtido pelo trabalho de Mathimani *et al.* (2023), que obteve um índice de 63,7% de uma cepa de *Chlorococcum sp.* cultivada por 24 dias em meio BBM.

Tabela 2 – Análise elementar da biomassa microalga de *C. infusionum* com base na massa seca.

Constituinte	Teor na biomassa (%)
Umidade	4,15 $\pm$ 0,51
Cinzas	5,68 $\pm$ 0,32
Fibra bruta	8,13 $\pm$ 0,28
Lipídeos	37,82 $\pm$ 0,63
Proteínas totais ^a	27,23 $\pm$ 0,98
Carboidratos ^b	16,99

Fonte: Elaborado pela autora (2024). Legenda: ^aNitrogênio total x 6,25; ^bValor obtido por diferença.

4.3 Determinação de fenóis totais

O EBCi apresentou 2.91 $\pm$ 0,27 mg de EAG/g de peso seco (valores em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de peso seco). A maior parte da literatura sobre compostos fenólicos de microalgas concentra-se no conteúdo total de fenóis. Del Mondo *et al.* (2021) realizou análises comparativas do conteúdo fenólico total (CFT) em microalgas disponíveis na literatura atual e observou uma alta variabilidade do CFT entre microalgas pertencentes ao mesmo gênero e entre cepas da mesma espécie. É o que se observa no trabalho desenvolvido por Choochote e Suklampoo (2013), em que foram encontrados valores variáveis de CFT para cepas de *Chlorococcum* sp. (7 mg de EAG/g a 29,1 mg de EAG/g).

Essas variações quanto ao conteúdo de CFT podem ser atribuídas a diversos motivos, como: a quimiodiversidade entre espécies, diferentes metodologias analíticas de extração, estado fisiológico das cepas, modo de cultivo, entre outros (DEL MONDO *et al.*, 2021). Os compostos fenólicos estão envolvidos na resposta ao estresse ambiental (SMERILLI *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2020), ou seja, seu rendimento está associado a fatores que afetam o crescimento e o estado fisiológico das células de microalgas, como salinidade, irradiação UV, intensidade da luz e disponibilidade de nutrientes (CONNAN *et al.*, 2006). No entanto, o número reduzido de estudos neste campo, especialmente envolvendo microalgas, impede a possibilidade de tirar conclusões mais robustas.

4.4 Extração de proteínas solúveis do extrato bruto de *C. infusionum*

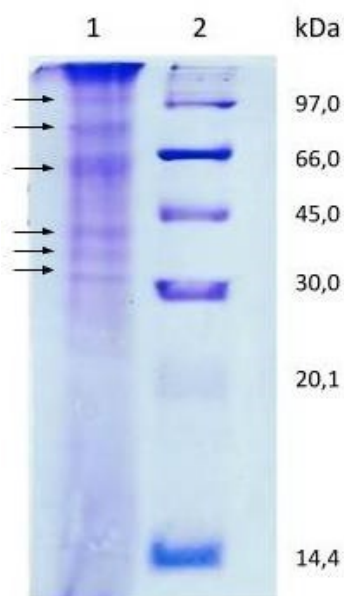
A preparação do extrato bruto de *C. infusionum*, EBCi, envolveu a combinação de diferentes métodos de lise celular, como ciclos de congelamento/descongelamento, ultrassonicação e maceração com nitrogênio líquido, fato que favorece o processo de rompimento celular (WANG e ZHANG, 2012).

O ciclo de congelamento/descongelamento é um método de lise ameno e envolve a formação de cristais de gelo que causam injúrias à parede celular microagal, e iniciam o processo de rompimento da parede celular. Por sua vez, o processo de sonicação da amostra, um método de lise baseado na cavitação de bolhas por ondas de ultrassom que promovem uma ruptura inespecífica da barreira da superfície celular (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2023), é capaz de causar um aumento significativo na porcentagem de proteína recuperada durante o processo de extração. (PHONG *et al.*, 2018) e é uma das técnicas que apresenta elevada eficiência na extração de compostos bioativos das microalgas (AL-ZUHAIR *et al.*, 2017).

A eficiência do processo de extração foi avaliada a partir da concentração de proteínas solúveis do extrato bruto, obtida pelo método de Bradford (1976), e da análise qualitativa do perfil proteômico, feita a partir da análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em diferentes concentrações e em condições desnaturantes.

A concentração de proteínas solúveis no EBCi foi de 1,12 mg de proteína/mL de extrato, indicando um teor de proteína de 22,4 mg no extrato bruto total. A **figura 10** exibe o perfil eletroforético de FPCi, onde é possível visualizar regiões de proteínas mais abundantes na parte superior do gel, com massas moleculares aparentes entre 97 e 45 kDa. O *background* aparente no gel foi formado pela possível presença de compostos interferentes, como lipídios e/ou carboidratos, predominantes do processo de extração.

Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes, do extrato de proteínas solúveis de *C. infusionum*.



Legenda. Raia 1: FpCi (20 µg). Raia 2: Marcadores de massa molecular (fosforilase B – 97,0 kDa; albumina sérica bovina – 66,0 kDa; ovoalbumina – 45,0; anidrase carbônica bovina – 29,0; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 e α -lactalbumina – 14,4 kDa. Fonte: elaborado pela autora.

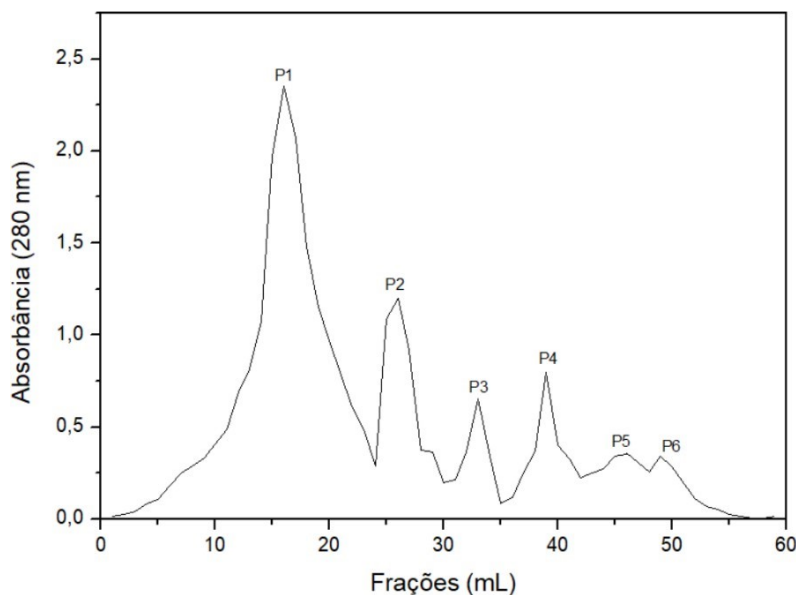
4.5 Obtenção das proteases de *C. infusionum*

A purificação parcial da fração proteásica, FPCiT-P3, se deu pela utilização de técnicas de cromatografia em etapas subsequentes, sendo cromatografia de exclusão molecular, para separação de proteínas com base no seu tamanho, e cromatografia do tipo troca-iônica, para separação com base na sua carga.

O cromatograma obtido pela exclusão molecular (**Gráfico 3**) apresenta um primeiro pico de coleta ainda no início do processo de purificação da amostra. Esse dado corrobora com o perfil proteômico do extrato bruto de *C. infusionum*, observado por SDS- PAGE (12,5%) na etapa anterior, que indicou uma predominância de proteínas com maior massa molecular. Uma vez que o tempo para desenvolvimento do trabalho era curto, foi estabelecido que o primeiro pico observado no cromatograma, denominado FPCiE-P1, seria utilizado nas etapas posteriores por apresentar uma maior concentração de proteínas com relação aos outros picos. Sendo assim, FPCiE-P1 foi coletado, dialisado e submetido a uma segunda etapa cromatográfica. As frações correspondentes ao pico FPCiE-P1 foram analisadas por SDS-PAGE (12,5%) na **Figura 11**. Conforme o resultado obtido, foi observado no gel um padrão de bandas proteicas com massas moleculares aparentes variando de 35 a valores superiores a 97 kDa. As proteases, assim como

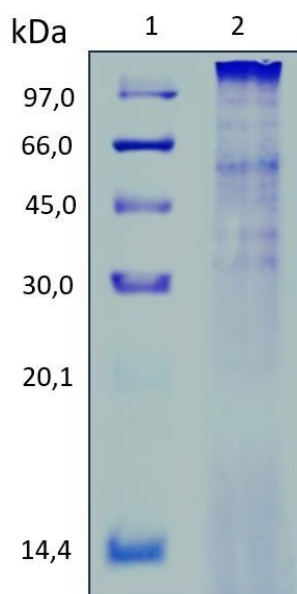
outras enzimas de origem vegetal, podem ter uma ampla gama de massas moleculares, dependendo da sua natureza específica e de sua estrutura (GONÇALVES *et. al*, 2016).

Gráfico 3 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 (0,8 X 100 cm) acoplada ao sistema FPLC *AKTA pure*.



Legenda: A matriz previamente foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 100 mM e eluída com o mesmo tampão. As frações foram coletadas com um fluxo de 1 mL /min. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 11 – SDS-PAGE (12,5 %) sob condições redutoras da FPCiE-P1.

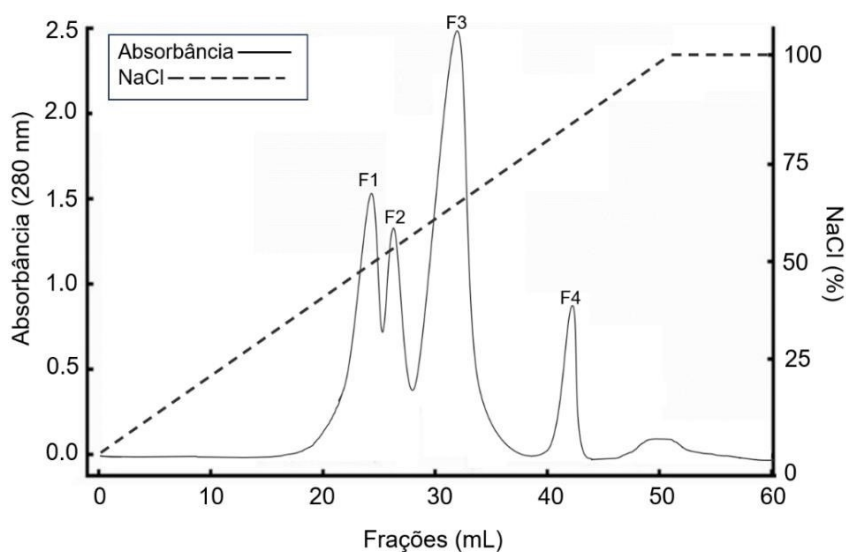


Legenda: Raia 1: Marcadores de massa molecular (fosforilase B – 97,0 kDa; albumina sérica bovina – 66,0 kDa; ovoalbumina – 45,0; anidrase carbônica bovina – 29,0; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 e α -lactalbumina – 14,4 kDa. Raia 2: frações referentes ao FPCiE-P1. Fonte: Elaborado pela autora.

A aplicação de FPCiE-P1 em cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, para a obtenção de uma fração proteásica purificada, obteve um maior rendimento observado no pico F3 (Gráfico 4), o qual apresentou um rendimento de 76,95 $\mu\text{gP/mL}$. Por conta do tempo de trabalho, os demais picos não foram explorados nas etapas posteriores deste trabalho. Portanto, o pico F3, denominado FpCiT-P3, foi dialisado, para a retirada do tampão de eluição, liofilizado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para utilização nas etapas posteriores.

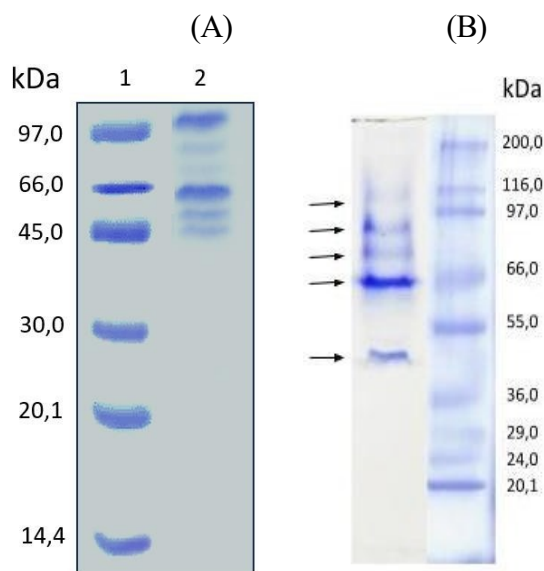
Foi observada a presença de quatro bandas na raia correspondente à fração FPCiT-P3 (Figura 12), indicando a presença de mais de uma protease na fração parcialmente purificada. De acordo com o cromatograma apresentado no **Gráfico 4**, observa-se que o perfil de eluição apresenta picos muito próximos, o que pode indicar a presença de isoformas e/ou sobreposições de proteases correspondentes aos outros picos não utilizados neste trabalho. Para comprovação desta hipótese, seria necessária a realização de protocolo de atividade proteolítica em cada pico coletado, para a observação da presença de atividade enzimática ou não. A presença de mais de uma banda no gel pode, ainda, sugerir que a FPCiT-P3 possui mais de uma subunidade. Na presença de β -mercaptoetanol, essas subunidades são separadas devido à quebra das ligações dissulfeto e, por isso, aparecem separadas no gel.

Gráfico 4 - Cromatografia de troca iônica da fração FPCiT-P3 em coluna de DEAE-SephacelTM Fast Flow (2,1 cm x 15 cm) acoplada ao sistema FPLC AKTA pure.



Legenda: Foi usado um gradiente linear de 0 a 1,0 M NaCl em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0. Fonte: elaborado pela autora.

Figura 12 – SDS-PAGE 12,5 % (A) e 10% (B) sob condições redutoras da FPCiT-P3.



Legenda: **(A)**: Raia 1 - Marcadores de massa molecular (fosforilase B – 97,0 kDa; albumina sérica bovina – 66,0 kDa; ovoalbumina – 45,0; anidrase carbônica bovina – 29,0; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 e α -lactalbumina – 14,4 kDa); Raia 2: FPCiT-P3 (30 μ g). **(B)**: Raia 1 - FPCiT-P3 (24 μ g); Raia 2: Marcadores de massa molecular (Miosina de coelho – 200,0 kDa; betagalactosidade – 116,0 kDa; fosforilase B – 97,0 kDa; albumina sérica bovina – 66,0 kDa; desidrogenase glutâmica – 55,0; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – 36,0 kDa; anidrase carbônica bovina – 29,0 kDa; tripsinogênio bovino – 24,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 kDa. Fonte: Elaborado pela autora.

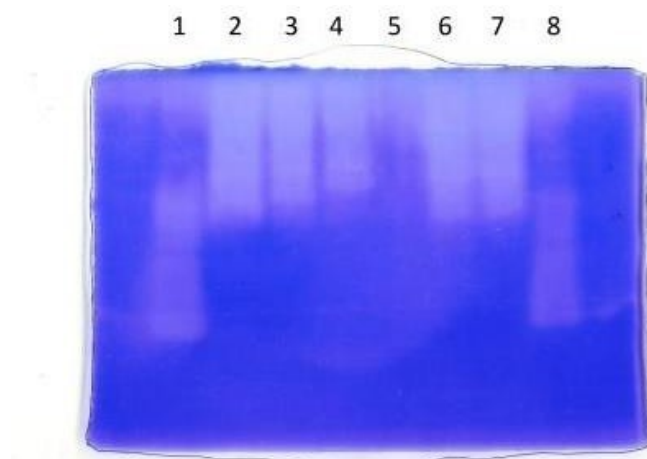
4.6 Atividade proteolítica de FPCiT-P3

A fração FPCiT-P3 exibiu uma atividade proteolítica específica de 116,38 UAP/mg/min e rendimento de 6982,95 unidades de atividade proteolítica por grama de biomassa fresca (**Tabela 3**). A análise do padrão de bandas da fração FPCiT-P3, conforme ilustrado na **Figura 12**, sugere a possível presença de isoformas dentro da fração investigada. A **Figura 13** exhibe o zimograma, um gel SDS-PAGE onde a gelatina atua como substrato, no qual as proteases foram previamente tratadas sob diferentes condições antes de sua aplicação na matriz de poliacrilamida. O resultado obtido (indicado pelo perfil em claro no gel escuro) revela que, mesmo em baixas concentrações (2,5 μ g), FPCiT-P3 demonstra uma considerável atividade proteolítica, resultando em uma aparência "arrastada" no gel, ao invés de um padrão de bandas mais distintas. Além disso, o resultado indica que o FPCiT-P3 mantém sua atividade na presença de SDS e mesmo após aquecimento até 50 °C.

Tabela 3 - Atividade Proteolítica de FPCiT-P3 e suas diluições em tampão PBS, pH 7,0.

Amostra	UAP	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg de Proteína)	Atividade específica (UAP/mg/min)
FPCi	0,800 ± 0,089	40 ± 2,88	30,27 ± 0,657	0,5045 ± 0,119
FPCiT-P3 (1 mg/mL)	21,467 ± 1,49	1073,33 ± 19,98	6982,95 ± 22,73	116,3852 ± 4,55
FPCiT-P3 (0,5mg/mL)	9,367 ± 0,52	468,33 ± 30,41	7202,66 ± 39,43	120,0443 ± 6,73
FPCiT-P3 (0,25mg/mL)	4,233 ± 0,81	211,66 ± 40,41	8501,43 ± 47,04	141,6905 ± 9,62

Legenda: Média ± desvio padrão de três análises, cada uma em triplicata. Fonte: elaborado pela autora.

Figura 13 – Zimograma em gel de poliacrilamida (12,5%) acrescido de gelatina 0,1% de FPCiT-P3.

Legenda: Raia 1: Tripsina (controle) - 3 µg; Raia 2: FPCiT-P3, em tampão nativo + SDS (10 µg); Raia 3: FPCiT-P3, em tampão nativo + SDS (5 µg); Raia 4: FPCiT-P3, em tampão nativo + SDS (2,5 µg); Raia 5: - ; Raia 6: FPCiT-P3, pré-aquecida a 50 °C (10 µg); Raia 7: FPCiT-P3, em tampão nativo (10 µg); Raia 8: Tripsina (controle) - 3 µg. Fonte: elaborado pela autora.

A literatura apresenta poucos estudos conduzidos sobre enzimas proteolíticas biossintetizadas por microalgas, entre eles, o trabalho de Costa e Silva *et al.* (2017), que avaliou a produção de enzimas proteolíticas em *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BBM suplementado com resíduo agroindustrial de baixo custo. As proteases obtidas apresentaram uma atividade máxima total de 292 UAP/mL, um valor inferior ao obtido por FPCiT-P3, que teve uma atividade máxima total de 1073,33 UAP/mL.

Lockau *et al.* (1988) investigaram a produção de uma protease em *Anabaena variabilis*, dependente de cálcio e com características semelhantes às da tripsina. Em estudos posteriores, Nanni *et al.* (2001) e Yada *et al.* (2005) caracterizaram proteases isoladas de *A. platensis*, que demonstraram capacidade de realizar a proteólise seletiva de ficobiliproteínas. É importante ressaltar que os resultados dessas pesquisas não podem ser diretamente comparados ao presente estudo devido à utilização de metodologias distintas. No entanto, eles destacam o potencial das microalgas como fonte de prospecção de proteases e indicam a escassez de estudos nesse campo de pesquisa no período atual.

4.7 Caracterização da Atividade Proteolítica de FPCiT-P3

4.7.1 Efeito de Inibidores

O ensaio de inibição foi conduzido em duas faixas de pH para uma avaliação mais precisa de cada grupo inibidor. Conforme apresentado na **Tabela 4**, observou-se que a FPCiT-P3 não sofreu inibição significativa na presença de Iodoacetamida (94,43% de atividade proteolítica residual) e Pepstatina A (93,72% de atividade residual), sugerindo que FPCiT-P3 não pertence aos grupos de proteases cisteínicas e aspárticas, respectivamente. Por outro lado, constatou-se que o FPCiT-P3 teve sua atividade proteolítica inibida em 51,98% e 61,90% quando incubada previamente com EDTA (10 mM) e PMSF (5 mM), respectivamente. Este resultado sugere que a fração FPCiT-P3 pode possuir proteases pertencentes a duas classes: metaloproteases e proteases serínicas.

Uma outra possibilidade considerada é que FPCiT-P3 corresponda a uma protease multimérica, possuindo mais de uma subunidade (NELSON e COX, 2019), uma vez que o padrão de bandas observado em SDS-PAGE não foi homogêneo (**Figura 12**). Nesse contexto, cada subunidade poderia exibir diferentes perfis de especificidade de substrato e respostas aos inibidores enzimáticos. Outra hipótese levantada é que a inibição parcial de FPCiT-P3 possa não estar diretamente relacionada à química do sítio ativo, mas sim à estrutura da proteína terciária, que pode estar limitando a interação entre a enzima e o inibidor.

Resultados semelhantes foram relatados por Niven (1995), que separou por filtração em cromatografia de exclusão molecular duas proteases de *Anabaena flos-aquae* com diferentes especificidades de substrato entre si. Uma das proteases apresentou caráter multimérico e não foi inibida totalmente por nenhum dos inibidores enzimáticos utilizados no ensaio. Portanto, mais investigações são necessárias para determinar o mecanismo de

resistência de FpCiT-P3 aos inibidores ou para elucidar a química do seu sítio ativo.

Tabela 4 - Atividade Proteolítica contra inibidores, em pH 5,0.

Amostra	UAP	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg)	Atividade específica (UAP/mg/min)	Atividade proteolítica residual (%)	Redução (%)
PMSF	32,500	1625	10203,22	170,05	58,3 ^d	41,6
EDTA	26,700	1335	8382,34	139,70	47,9 ^c	52,1
Iodoacetamida	52,600	2630	16513,52	275,22	94,4 ^b	5,6
Pepstatina A	52,200	2610	16387,94	273,13	93,7 ^b	6,3
Ativ. Proteolítica (s/ inibidor)	55,700	2785	17486,75	291,44	100 ^a	-

Legenda: Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5 - Atividade Proteolítica contra inibidores, em pH 9,0.

Amostra	UAP (média)	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg)	Atividade específica (UAP/mg/min)	Atividade proteolítica residual (%)	Redução (%)
PMSF	28,800	1440	9041,62	150,69	38,1 ^d	61,9
EDTA	36,300	1815	11396,21	189,93	48,0 ^c	52,0
Iodoacetamida	68,300	3415	21442,46	357,37	90,3 ^b	9,7
Pepstatina A	69,900	3495	21944,77	365,74	92,5 ^b	7,5
Ativ. Proteolítica (s/ inibidor)	75,600	3780	23734,26	395,57	100 ^a	-

Legenda: Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.7.2 Determinação do pH e da temperatura ótimos de FPCiT-P3

Para a determinação do pH ótimo, foi utilizado o substrato inespecífico azocaseína. A maior taxa de hidrólise foi alcançada quando a reação se deu em pH 7,0 (136,08 UAP/mg/min), não apresentando diferença significativa em pH 8,0 (132,82 UAP/mg/min) e pH 9,0 (134,45 UAP/mg/min) (**Tabela 6**), sugerindo que as proteases presentes em FPCiT-P3 operam sob seu ótimo em faixas de pH neutra e/ou alcalinas. Sob condições de pH mais ácido

a fração FPCiT-P3 apresentou baixa atividade proteolítica.

Proteases neutras são ativas e estáveis em pH neutro ou fracamente ácido/alcalino. Proteases cisteínicas, metaloproteases e algumas proteases serínicas são classificadas como proteases neutras (AHANGARI *et al.*, 2021). Esse grupo de enzimas possui aplicação na indústria alimentícia (DOS SANTOS AGUILAR e SATO, 2018), principalmente no ramo da panificação (SINGH *et al.*, 2016). No entanto, são menos aplicáveis que proteases alcalinas, que têm papéis essenciais nas indústrias alimentícias e em aplicações terapêuticas (BANERJEE e RAY, 2017).

Tabela 6 - Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica de FPCiT-P3

Amostra	UAP (média)	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg)	Atividade específica (UAP/mg/min)
pH 5,0	13,8	690	4489,03	74,81 ^a
pH 6,0	17,5	873,35	5692,62	94,87 ^b
pH 7,0	25,1	1255	8164,84	136,08 ^c
pH 8,0	24,5	1225	7969,67	132,82 ^c
pH 9,0	24,8	1238	8067,26	134,45 ^c

Legenda: pH 5,0 (acetato de sódio, 50 mM); pH 6,0 e 7,0 (fosfato de sódio, 50 mM); pH 8,0 (Tris-HCl, 50 mM); pH 9,0 (glicina NaOH, 50 mM). 4 ug de FPCiT-P3 utilizados no ensaio. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: elaborado pela autora.

Para a determinação da temperatura ótima de catálise de FPCiT-P3 também foi utilizada a azocaseína como substrato de reação. Na **Tabela 7** é possível observar que as proteases exibiram baixa atividade catalítica, 24,67 e 29,84 UAP/mg/min quando a reação ocorreu nas temperaturas de 70 e 80 °C, respectivamente. Diferentemente, nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C foram obtidas atividades específicas de 146,43, 141,10 e 142,83 UAP/mg/min, respectivamente. FPCiT-P3 atingiu um máximo de atividade na temperatura de 60 °C (152,75 UAP/mg/min).

A atividade proteolítica aumentou progressivamente com o aumento da temperatura até um ponto máximo em 60 °C, decaindo em temperaturas superiores (Tabela 7). A atividade enzimática geralmente aumenta com o incremento da temperatura devido às mudanças conformacionais em seu sítio ativo (SALEHI, 2024). Em linhas gerais, é comum observar que a velocidade da reação aumenta de aproximadamente duas a três vezes para cada aumento de 10 °C na temperatura (SALEHI, 2024). No entanto, a partir de um certo ponto, a atividade

enzimática tende a diminuir, indicando que um aumento na temperatura nem sempre é vantajoso (DUMAN & TEKIN, 2020). Isso se deve ao fato de que as estruturas tridimensionais das enzimas são sensíveis ao calor, podendo tornar-se instáveis e suscetíveis à desnaturação em temperaturas excessivamente elevadas. A desnaturação das enzimas em ambientes térmicos extremos resulta em reduções substanciais em suas taxas de reação, frequentemente levando à perda significativa de sua atividade catalítica (DUMAN & TEKIN, 2020).

Destaca-se, portanto, que a temperatura ótima para uma determinada protease deve estar dentro de sua faixa de estabilidade térmica. Por conta disso, a temperatura ideal para proteases varia consideravelmente e abarca uma ampla gama de valores. Na literatura, encontram-se registros de proteases operando em temperaturas ótimas de 40 °C (da SILVA *et al.*, 2018), 45 °C (LO PIERO *et al.*, 2002) e 50 °C (de OLIVEIRA *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2020; da SILVA *et al.*, 2018; da SILVA *et al.*, 2020; BADGUJAR; MAHAJAN, 2012).

Para esta análise, foram considerados apenas estudos que empregaram o mesmo tempo de reação e substrato adotados no presente trabalho. Trabalhos envolvendo parâmetros distintos indicam proteases com temperatura ótima de reação variando de 40 a 85 °C (SALEHI, 2024).

Tabela 7 - Determinação da temperatura ótima da atividade proteolítica de FPCiT-P3

Amostra	UAP (média)	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg)	Atividade específica (UAP/mg/min)
25 °C	22,300	1115	5519,25	91,98
30 °C	35,500	1775	8786,25	146,43
40 °C	32,700	1635	8466,46	141,10
50 °C	33,100	1655	8570,02	142,83
60 °C	35,400	1770	9165,52	152,75
70 °C	6,200	310	1480,42	24,67
80°C	7,500	375	1790,84	29,84

Legenda: Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. 4 µg de FPCiT-P3 utilizados no ensaio. Fonte: elaborado pela autora.

4.7.3 Estabilidade de FPCiT-P3 em função do pH e temperatura

A alta estabilidade em função da temperatura e do pH é um importante critério na escolha de proteases para serem utilizadas em processos industriais (VIEILLE; ZEIKUS, 1996).

Quando incubadas durante 30 min em todas as condições de pH testadas, a fração FPCiT-P3 apresentou reduções em suas atividades catalíticas (**Tabela 8**). A maior redução ocorreu em pHs mais ácidos: 36,98% de redução da atividade proteolítica total em pH 3,0, 39,89% em pH 4,0 e 41,53% em pH 5,0. Em pH neutro (7,0), a atividade proteolítica foi reduzida em 28,42% após incubação por 30 minutos. Diferentemente do observado em valores de pH mais ácidos, em pHs mais alcalinos houve menor redução na atividade proteolítica total. Nos pHs 8,0 e 9,0 as atividades foram reduzidas em 26,96% e 10,56%, respectivamente, após 30 minutos de incubação nessas condições.

Tabela 8 - Estabilidade de FPCiT-P3 em função do pH.

Amostras	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg)	Atividade específica (UAP/mg/min)	Atividade proteolítica residual (%)	Redução (%)
pH 3,0	1728,35	9352,71	155,87	63,0 ^d	37,0
pH 4,0	1651,65	8920,21	148,67	60,1 ^d	39,9
pH 5,0	1603,35	8676,94	144,61	58,5 ^d	41,5
pH 6,0	1938,35	10488,01	174,80	70,7 ^c	29,3
pH 7,0	1965	10623,17	177,05	71,6 ^c	28,4
pH 8,0	2005	10839,41	180,65	73,0 ^c	27,0
pH 9,0	2455	13272,20	221,20	89,4 ^b	10,6
S/ incubação	2743,35	14840,001	247,33	100 ^a	-

Legenda: Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

Por sua vez, a incubação prévia de FPCiT-P3 em diferentes temperaturas também ocasionou reduções na sua atividade proteolítica. Essa redução foi proporcional ao aumento da temperatura. Tais perdas de efeitos foram observadas a partir de 50 °C (52,25%), sendo ainda mais pronunciadas na temperatura de 60 °C (87,84%). A partir da temperatura de 70 °C pode-se dizer que houve perda total da atividade proteolítica de FPCiT-P3 (**Tabela 9**). Este fato pode estar associado à ocorrência de autólise, visto que esse processo é bastante comum em

proteases, e depende de fatores como concentração, temperatura, tempo e ativadores (TOMAR *et al.*, 2008).

Tabela 9 - Termoestabilidade de FPCiT-P3.

Amostras	Atividade total (UAP/mL)	Atividade total (UAP/mg de Proteína)	Atividade específica (UAP/mg/min)	Atividade proteolítica residual (%)	Redução (%)
25°C	1605	8897,22	148,28	72,3 ^b	27,7
30°C	1535	8509,18	141,81	69,1 ^b	30,9
40°C	1510	8370,60	139,51	68,0 ^b	32,0
50°C	1060	5876,05	97,93	47,7 ^c	52,2
60°C	270	1496,73	24,94	12,1 ^d	87,8
70°C	80	443,47	7,39	3,6 ^e	96,4
80°C	30	166,30	2,77	1,3 ^e	98,6
s/ incubação	2220	12306,44	205,10	100 ^a	0%

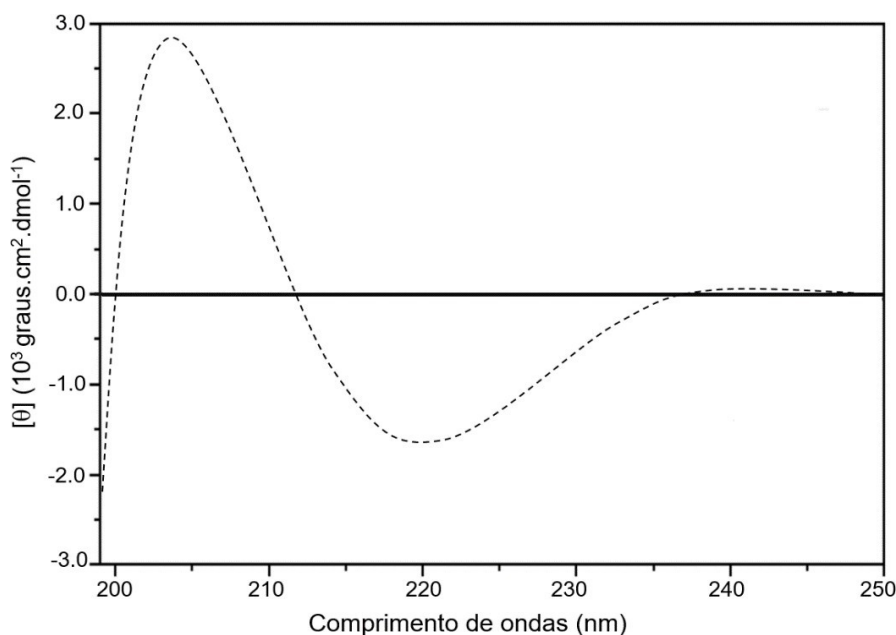
Legenda: Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.7.4 Análise de dicroísmo circular

Como resultados das análises de CD, o espectro de dicroísmo circular de FPCiT-P3 apresentou duas bandas, uma banda positiva com um máximo de amplitude em 203 nm e outra banda negativa com um máximo de amplitude em torno 209 nm. Segundo a literatura, este espectro é característico de proteínas com predominância de estruturas em folhas- β (KELLY e PRICE, 1997; WOODY, 1994). O cruzamento com a linha positiva ocorre próximo a 211 nm.

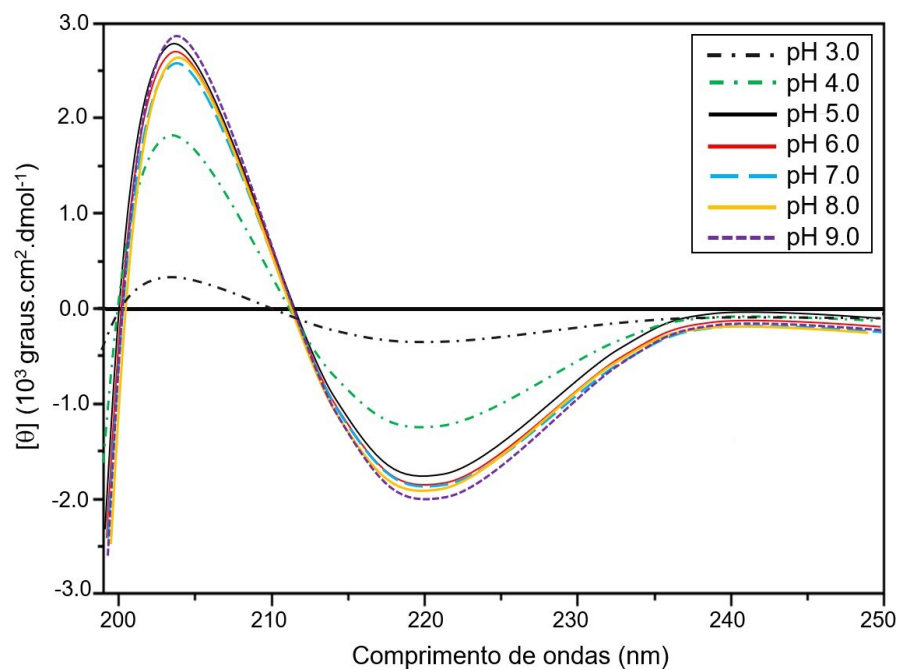
Gráfico 5 – Dicroísmo circular (CD) de FPCiT-P3 de *C. infusionum*.



Legenda: As medidas foram realizadas utilizando alíquotas de 100 μ L de solução proteica (contendo 30 μ g de FPCiT-P3) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0. Foram realizadas varreduras de 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando uma média 8 acumulações. As medidas foram realizadas a 25 °C, utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm. Fonte: Elaborado pela autora.

No **Gráfico 6** foram observadas significativas alterações nas intensidades das bandas negativas e positivas dos espectros de CD obtidos em pH 3,0 e pH 4,0. Nestes espectros, nota-se a redução (em pH 4,0) e perda (em pH 3,0) da banda negativa com a intensidade mínima (219 nm) característica de estruturas em folhas- β . Sabe-se que o pH afeta a forma, as propriedades de carga, o posicionamento correto do substrato e a ionização das cadeias laterais dos aminoácidos, tanto no local ativo, como em toda a estrutura enzima (PURICH, 2010). Notadamente, em pH 3,0 a fração protease apresentou um espectro com perfil característico de desordenamento da estrutura secundária, indicando que, neste pH, a protease sofreu desnaturação (KELLY e PRICE, 1997; WOODY, 1994). No entanto, na faixa de pH de 5 a 9 foram constatadas pequenas modificações nos espectros de CD, indicando que a fração protease apresenta uma boa estabilidade conformacional, principalmente em condições básicas, dado que corrobora com os obtidos no item 4.6.3.

Gráfico 6 - Espectros de dicroísmo circular (CD) de FPCiT-P3 em diferentes valores de pH.



Legenda: As medidas foram realizadas utilizando alíquotas de 100 μL de solução proteica (contendo 30 μg da fração protease) em tampão acetato-fosfato-borato 50 mM ajustado para diferentes valores de pH. Foram realizadas varreduras de 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando uma média 8 acumulações. As medidas foram realizadas a 25 $^{\circ}\text{C}$, utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm. Fonte: elaborado pela autora.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a aplicação de métodos combinados de lise, incluindo congelamento e descongelamento, maceração e ultrasonicação, foi eficaz na extração de proteínas hidrossolúveis da biomassa de *Chlorococcum infusionum*. A abordagem de purificação parcial adotada destacou o potencial desta biomassa como fonte de enzimas proteolíticas. As características físico-químicas e a atividade enzimática dessas proteases foram parcialmente elucidadas através de análises bioquímicas e espectroscópicas. Testes de inibição indicaram que a fração foi parcialmente inibida por inibidores específicos de proteases do tipo serínicas e metaloproteases, sugerindo a presença de diversas proteases na fração estudada. Além disso, esta fração exibiu maior atividade catalítica em um ambiente de pH neutro a alcalino, mas mostrou redução significativa da atividade em condições ácidas e em temperaturas elevadas. As estruturas predominantes da fração rica em proteases foram identificadas como folhas- β .

REFERÊNCIAS

- ABD EL BAKY, H. H.; EL BAROTY, G. S. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2016, p. 1–7, 2016.
- ABE, K. *et al.* Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor from rice (oryzacystatin). **Journal of Biology Chemistry**, [s. l.], v. 262, p.16793-16797, 1987.
- ABOMOHRA, A. E.-F. *et al.* Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 931–936, 13 out. 2012.
- ADEKUNLE, A. S. *et al.* Biodiesel potential of used vegetable oils transesterified with biological catalysts. **Energy Reports**, [s. l.], v. 6, p. 2861–2871, nov. 2020.
- AHANGARI, H. *et al.* An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychrotrophic bacterial proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 35, p. 102051, ago. 2021.
- AHMAD, T.; ZHANG, D. A critical review of comparative global historical energy consumption and future demand: The story told so far. **Energy Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1973–1991, nov. 2020.
- AL-ZUHAIR *et al.* Enzymatic pretreatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 175 – 185, 2017.
- ALI, S. S. *et al.* Recent advances in wastewater microalgae-based biofuels production: A state-of-the-art review. **Energy Reports**, [s. l.], v. 8, p. 13253–13280, nov. 2022.
- AMARAL, E. T. *et al.* Removal of organic contaminants in water bodies or wastewater by microalgae of the genus *Chlorella*: a review. **Case Studies In Chemical And Environmental Engineering**, [s. l.], v. 8, p. 100476, dez. 2023.
- AMBATI, R. R. *et al.* Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 1880–1902, 16 fev. 2018.
- AMORIM, M. L. *et al.* Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], p. 1–27, 28 maio 2020.
- ANDRADE, D. S.; TELLES, T. S.; LEITE CASTRO, G. H. The Brazilian microalgae production chain and alternatives for its consolidation. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 250, p. 119526, mar. 2020.
- ANJOS, M. *et al.* Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*.

Bioresource Technology, [s. l.], v. 139, p. 149–154, jul. 2013.

ARAGONÉS *et al.* Bioenergy production side-streams availability assessment as decision making driver for sustainable valorisation technologies development. Case study: Bioethanol and biodiesel industries. **Energy Reports**, [s. l.], v. 8, p. 6856–6865, 1 nov. 2022.

ARAÚJO, R. *et al.* Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 7, 27 jan. 2021.

ARAÚJO, R.; PETEIRO, C. **Algae as Food and Food Supplements in Europe**. EUR 30779 EN. Luxemburgo: Publications Office of the European Union, 2021.

ARAVANTINOU, A. F.; THEODORAKOPOULOS, M. A.; MANARIOTIS, I. D. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 147, p. 130–134, nov. 2013.

ARCHER, L. *et al.* Antioxidant Bioprospecting in Microalgae: Characterisation of the Potential of Two Marine Heterokonts from Irish Waters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 193, n. 4, p. 981–997, 20 nov. 2020.

ASSUNÇÃO, J.; MALCATA, F. X. Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review. **Algal Research**, [s. l.], v. 52, p. 102107, dez. 2020.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Comparison of cysteine peptidases of four laticiferous plants and characterization of *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. latex glycosylated cysteine peptidase. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 152–160, 2012.

BALDUYCK, L. *et al.* Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 118, p. 152–158, 1 nov. 2015.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 119–143, 3 jul. 2017.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2010.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

BELOHLAV, V. *et al.* Assessment of hydrodynamics based on Computational Fluid Dynamics to optimize the operation of hybrid tubular photobioreactors. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 105768, 1 out. 2021.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5a ed. London: W. H. Freeman and Company, 2002.

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P. Evaluation of antigenotoxic effects of carotenoids from

green algae *Chlorococcum humicola* using human lymphocytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 109–117, fev. 2012

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY SHERENE BELL, I. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. S1–S7, set. 2011.

BOUKID, F.; CASTELLARI, M. Food and beverages containing algae and derived ingredients launched in the market from 2015 to 2019: a front-of-pack labeling perspective with a special focus on Spain. **Foods**, [s. l.], v. 10, 2021.

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

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 39, p. 90–98, 25 out. 2017.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 557–577, fev. 2010.

BURKI, F. *et al.* The New Tree of Eukaryotes. **Trends in Ecology & Evolution**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 43–55, 1 jan. 2020.

CANELLI, G. *et al.* Biochemical and Nutritional Evaluation of *Chlorella* and *Auxenochlorella* Biomasses Relevant for Food Application. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 7, 30 set. 2020.

CARDOSO, C. *et al.* Lipid composition and some bioactivities of 3 newly isolated microalgae (*Tetraselmis* sp. IMP3, *Tetraselmis* sp. CTP4, and *Skeletonema* sp.). **Aquaculture Internation**, [s. l.], v. 28, p. 711–727, 2020.

CARRASCO-REINADO, R. *et al.* Valorization of microalgae biomass as a potential source of high-value sugars and polyalcohols. **LWT**, [s. l.], v. 114, p. 108385, nov. 2019.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology progress**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1490–506, 2006.

CERÓN-GARCÍA, M. C. *et al.* Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 257, p. 316–324, 2018.

CEZARE-GOMES, E. A. *et al.* Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 188, n. 3, p. 602–634, 1 jul. 2019.

CHANG *et al.* Photobioreactors. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], p. 313–352, 2017.

CHEIRSILP, B. *et al.* Microalgae as Tools for Bio-Circular-Green Economy: Zero-waste Approaches for Sustainable Production and Biorefineries of Microalgal Biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 387, p. 129620, 1 nov. 2023.

CHEN, C. *et al.* Biodiesel production from heterotrophic oleaginous microalga *Thraustochytrium sp.* BM2 with enhanced lipid accumulation using crude glycerol as alternative carbon source. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 306, p. 123113, 1 jun. 2020.

CHEW, K. W. *et al.* Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 229, p. 53–62, abr. 2017.

CHINNASAMY, S. *et al.* Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 9, p. 3097–3105, maio 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 294–306, maio 2007.

CHOOCHOTE, W.; SUKLAMPOO, L.; OCHAIKUL, D. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 43–48, 20 jul. 2013.

CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. Algal proteins. **Handbook of Food Proteins**, [s. l.], p. 353–394, 2011.

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

CONNAN *et al.* Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. **Botanica Marina**, [s. l.], v. 1, p. 39–46, 2006.

COSTA E SILVA, M. *et al.* Enhanced production of fibrinolytic protease from microalgae *Chlorella vulgaris* using glycerol and corn steep liquor as nutrient. **Annals of Microbiology and Research**, [s. l.], v. 1, n. 1, 16 set. 2017.

DA SILVA, O. *et al.* Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 109, p. 1039–1044, abr. 2018.

DAI, G.-Z.; QIU, B.-S.; FORCHHAMMER, K. Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 and the role of the *psbA* multigene family. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 840–851, 24 out. 2013.

DASAN, Y. K. *et al.* Cultivation of *Chlorella vulgaris* using sequential-flow bubble column photobioreactor: A stress-inducing strategy for lipid accumulation and carbon dioxide fixation. **Journal of CO2 Utilization**, [s. l.], v. 41, p. 101226, out. 2020.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 58, p. 832–841, maio 2016.

DE MENDONÇA, H. V. *et al.* Biofuel recovery from microalgae biomass grown in dairy wastewater treated with activated sludge: The next step in sustainable production. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 824, p. 153838, jun. 2022.

DE OLIVEIRA, R. L. *et al.* Use of a sequential fermentation method for the production of *Aspergillus tamaritii* URM4634 protease and a kinetic/thermodynamic study of the enzyme. **Catalysts**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 963, 11 ago. 2021.

DE OLIVEIRA, A. P. F.; BRAGOTTO, A. P. A. Microalgae-based products: food and public health. **Future Foods**, [s. l.], p. 100157, jun. 2022.

DE SOUZA, M. P. *et al.* Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 2139–2156, 8 mar. 2018.

DEBASHISH, G. *et al.* Marine Enzymes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, [s. l.], p. 189–218, 26 ago. 2005.

DEL MONDO, A. *et al.* Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 155–171, 2 fev. 2021.

DESHMUKH, S.; KUMAR, R.; BALA, K. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**, [s. l.], v. 191, p. 232–247, ago. 2019.

DEVI, T. E.; PARTHIBAN, R. Hydrothermal liquefaction of *Nostoc ellipsosporum* biomass grown in municipal wastewater under optimized conditions for bio-oil production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 316, p. 123943, nov. 2020.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, [s. l.], v. 103, p. 253–262, jan. 2018

DUMAN, Y. A.; TEKIN, N. Kinetic and thermodynamic properties of purified alkaline protease from *Bacillus pumilus* Y7 and non-covalent immobilization to poly(vinylimidazole)/clay hydrogel. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 1-2, p. 36–49, 24 out. 2019.

E.A. MOLINARI NOVOA. *In*: GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **Algae base**. Galway: National University of Ireland, 2023. Disponível em: <https://www.algaebase.org>. Acesso em: 21 ago. 2023.

EJIKE, C. E. C. C. *et al.* Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 59, p. 30–36, jan. 2017.

- ELSHOBARY, M. E. *et al.* Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 35, p. 100567–100567, 1 jun. 2020.
- ERBLAND, P. *et al.* Design and performance of a low-cost, automated, large-scale photobioreactor for microalgae production. **Aquacultural Engineering**, [s. l.], v. 90, p. 102103, ago. 2020
- FARROKHZAD ZEINALI; HOMAEI, A.; EHSAN KAMRANI. Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. **Journal of Ocean University of China**, [s. l.], v. 79, p. 627–637, 1 ago. 2015.
- FERNANDES, L. M. G. *et al.* Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 317, p. 113957, nov. 2020.
- FERNÁNDEZ, F. G. A. *et al.* The role of microalgae in the bioeconomy. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 61, p. 99–107, mar. 2021.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Roma: FAO, 2020.
- FREITAS, A. C. *et al.* Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 95, p. 173–182, jul. 2015.
- GARCÍA, J. L. *et al.* Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1017–1024, 15 ago. 2017.
- GHATTAVI, S.; HOMAEI, A. Marine enzymes: Classification and application in various industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 230, p. 123136, 1 mar. 2023.
- GONÇALVES *et al.* Proteases from *Canavalia ensiformis*: Active and Thermostable Enzymes with Potential of Application in Biotechnology. **Biotechnology Research International**, [s. l.], 2016.
- GOUVEIA, L; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production, **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, [s. l.], v. 36, p. 269–274, 2009.
- GREETHAM, D. *et al.* A brief review on bioethanol production using marine biomass, marine microorganism and seawater. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 14, p. 53–59, 1 dez. 2018.
- GUIRY, M.D; How Many Species of Algae Are There? **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 48, p. 1057–1063, 2012.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **Algae Base**. Galway: National University of Ireland, 2019.

Disponível em: <https://www.algaebase.org>. Acesso em: 27 set. 2019. (site)

GUPTA, P.L., CHOI, S.L.H. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 31, p. 1409–1417, 2015.

GUTIÉRREZ-PLIEGO, L. E. *et al.* Effect of Supplementation with n-3 Fatty Acids Extracted from Microalgae on Inflammation Biomarkers from Two Different Strains of Mice. **Journal of Lipids**, [s. l.], v. 2018, p. 1–10, 2018.

HAMIDI, M. *et al.* Marine Bacteria versus Microalgae: Who Is the Best for Biotechnological Production of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties and Other Biological Applications? **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 28, 29 dez. 2019.

HARPER, M. Phylum Ochrophyta: brown and golden-brown algae, diatoms, silicoflagellates, and kin. *In: New Zealand Inventory of Biodiversity*, Vol. 3, Kingdoms Bacteria, Protozoa, Chromista, Plantae, Fungi, Christchurch: Canterbury University Press, 2012. p. 114–163.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], 2009.

HASAN, M. J.; HAQUE, P.; RAHMAN, M. M. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 365, p. 132826, 10 set. 2022.

HASHEMI, A. *et al.* Beta-carotene production within *Dunaliella salina* cells under salt stress condition in an indoor hybrid helical-tubular photobioreactor. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 69–74, 22 ago. 2020

HOSSAIN *et al.* Feasibility of microalgae as feedstock for alternative fuel in Malaysia: A review. **Energy Strategy Reviews**, [s. l.], v. 32, p. 100536, 1 nov. 2020.

HUANG *et al.* Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. **Engineering**, [s. l.], v. 3, p. 318–329, 2017.

HU, Q. *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 621–639, maio 2008.

HÜTTNER, E. K.; ARENDT, E. K. Recent advances in gluten-free baking and the current status of coats. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 21, n. 30, p. 303–312, 2010.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis** – Principles and Applications. Valparaíso: Springer, 2008. 398 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Standard methods for analyses of oils, fats and derivatives**. Oxford: Pergamon Press, 1979.
Disponível em: <https://books.google.com.br>. Acesso em: 10 dez. 2023.

ISAAC, O. T. *et al.* Surfactants employed in conventional and unconventional reservoirs for enhanced oil recovery—A review. **Energy Reports**, [s. l.], v. 8, p. 2806–2830, nov. 2022.

JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. Microalgae based production of single-cell protein. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 75, p. 102705, 1 jun. 2022.

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

KAREMORE, A.; PAL, R.; SEN, R. Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. **Algal Research**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 113–121, mar. 2013.

KELL, S. Editorial foreword for “environment, development and sustainability” journal. **Environment, Development and Sustainability**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 2983–2985, 29 jan. 2022.

KELLY, S.M.; PRICE, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1338, p. 161-185, 1997

KHOR, W. H. *et al.* Microalgae cultivation in offshore floating photobioreactor: State-of-the-art, opportunities and challenges. **Aquacultural Engineering**, [s. l.], v. 98, p. 102269, ago. 2022.

KIRROLIA, A. *et al.* Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum sp.* **J. Algal Biomass Utilization**, [s. l.], n. 3, p. 46–53, 2012.

KOVACS, S.; HANCOSOK, J. Investigation of the Transesterification Efficiency of Different Immobilized Lipase Enzymes. **Chemical Engineering Transactions**, [s. l.], v. 17, p. 1185–1190, 20 maio 2009.

KRISHNAMOORTHY *et al.* Optimisation of ultrasonication pretreatment on microalgae *Chlorella Vulgaris* & *Nannochloropsis Oculata* for lipid extraction in biodiesel production. **Energy**, [s. l.], v. 278, p. 128026–128026, 1 set. 2023.

KUMAR, M. Industrial applications of protease: a review. **Journal of Natural Remedies**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 01-06, 2020.

KUMAR, R. *et al.* Microalgae as a sustainable source of edible proteins and bioactive peptides – Current trends and future prospects. **Food Research International**, [s. l.], v. 157, p. 111338, jul. 2022.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, p. 680-685, 1970.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, [s. l.], v. 10, p. 456–469, set. 2012.

LEE, A-HYEON. *et al.* Fucoxanthin from microalgae *Phaeodactylum tricornutum* inhibits pro-inflammatory cytokines by regulating both NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation.

Scientific Reports, [s. l.], v. 11, n. 1, 12 jan. 2021.

LEVASSEUR *et al.* A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 41, p. 107545, 2020.

LEVINE, I.A., FLEURENCE, J. **Microalgae in Health and Disease Prevention**. London: Academic Press, 2018.

LIANG, M.-H. *et al.* High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 15, p. 2423–2441, 2019.

LJUBIC, A. *et al.* Microalgae *Nannochloropsis oceanica* as a future new natural source of vitamin D3. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 320, p. 126627, ago. 2020.

LO PIERO *et al.* Characterization of “lettucine”, a serine-like peptidase from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, p. 2439–2443, 2002.

LOCKAU *et al.* Purification and partial characterization of a calcium-stimulated protease from the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 172, p. 433–438, 1988.

LOFTUS, S. E.; JOHNSON, Z. I. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production. **Algal Research**, [s. l.], v. 24, p. 154–166, jun. 2017.

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

MACEDO, M. L.; AS, C. M.; FREIRE, M. D.; PARRA, JR. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran peptidases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal and Agricultural Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 2533–2540, 2004.

MAHAPATRA, D. M.; RAMACHANDRA, T. V. Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococcum* sp. proliferating in municipal wastewater. **Current Science**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 47–55, 2013.

MAITIG, A.M.A.; ALHOOT, M.A.M; TIWARI, K. Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Fungal Isolates of Soil. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 2059–2067, 30 dez. 2018.

MAKKAR, H. P. S. *et al.* Seaweeds for livestock diets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], v. 212, p. 1–17, fev. 2016.

MALTSEV, Y.; MALTSEVA, K. Fatty acids of microalgae: diversity and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 515–547, 10 abr. 2021.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl. Brasília: MAPA, 2013.

MARKETS, Research and. **Microalgae: Global Strategic Business Report** - Global Market Trajectory & Analytics. Dublin: Research and Markets, 2021. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com>. Acesso em: 1 dez. 2023.

MARKETS, Research and. **Proteases Market Size & Share Analysis** - Growth Trends & Forecasts (2023 - 2028). Dublin: Research and Markets, 2023. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com>. Acesso em: 1 dez. 2023.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, NIDIA. S. Microalgae for Biodiesel Production and Other applications: a Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

MATHIMANI *et al.* Assessment of taxonomically diverse *Chlorococcum* species and *Chroococcus* species for cell density, pigments, biochemical components, and fatty acid composition for fuel/food applications. **Algal Research**, [s. l.], v. 74, p. 103228–103228, 1 jul. 2023.

MATSUNAGA, T. *et al.* Marine Microalgae. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, [s. l.], p. 165–188, 25 ago. 2005.

MEHARIYA, S. *et al.* Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. **Chemosphere**, [s. l.], v. 280, p. 130553, out. 2021.

MICHALAK *et al.* Algae cosmetics. **Encyclopedia of Marine Biotechnology**, [s. l.], p. 65–85, 2020.

MIMOUNI, V. *et al.* Lipids from microalgae. *In: Microalgae in Health and Disease Prevention*. London: Academic Press, 2018. p. 109-131.

MOLINA, E. *et al.* Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 113–131, 28 dez. 2001.

MOLINO, A. *et al.* Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1 – 21. 2018.

MOSHOOD, T. D.; NAWANIR, G.; MAHMUD, F. Microalgae biofuels production: A systematic review on socioeconomic prospects of microalgae biofuels and policy implications. **Environmental Challenges**, [s. l.], p. 100207, jul. 2021.

N. JISHA, V. *et al.* Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 39–51, 2013.

NABI, F. *et al.* Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 1809 – 1818, 25 abr. 2020.

NAGAKURA,, K. General analysis. *In*: OKADA, M. *et al.* **Utilization of marine products**. Tokyo: Overseas Technical Cooperation Agency, 1972. p. 159-169.

NANNI, B. *et al.* Characterisation of a specific Phycocyanin-hydrolysing protease purified from *Spirulina platensis*. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 156, p. 259–266, 2001.

NARALA, R. R. *et al.* Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. **Frontiers in Energy Research**, [s. l.], v. 4, 2 ago. 2016.

NAVEED, M. *et al.* Protease - A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi- Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**, [s. l.], 11 jul. 2020.

NELSON, D. L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7a ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NICCOLAI *et al.* Lactic Acid fermentation of *Arthrospira platensis* (Spirulina) in a vegetal soybean drink for developing new functional lactose-free beverages. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

NIELSEN, S. L; HANSEN, B. W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: the effects of growth conditions and physiological state. **Aquaculture Research**, [s. l.], 2019.

NIVEN, G. W. The characterization of two aminopeptidase activities from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1253, p. 193- 198, 1995.

OKEKE, E. S. *et al.* Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. **Energy Conversion and Management: X**, [s. l.], v. 16, p. 100323, 1 dez. 2022.

PAGELS, F. *et al.* Pigments from microalgae. *In*: **Bioactive Molecules from Marine Microalgae**. London: Academic Press, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 11 dez. 2023.

PATEL, A. K. *et al.* Algae as an emerging source of bioactive pigments. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 351, p. 126910, 1 maio 2022.

PATRAS, *et al*, C. Bioactive Ingredients from Microalgae: Food and Feed Applications. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 1, 7 jun. 2019.

PAUL, J. H. Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* L-asparaginase. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 203, n. 1, p. 109–115, 1 abr. 1982.

PAUL, S. *et al.* Review on the recent structural advances in open and closed systems for carbon capture through algae. **Energy Nexus**, [s. l.], v. 4, p. 100032, dez. 2021.

PEARSON, D. **Chemical Analysis of Foods**. 7. ed. London: Churchill Livingstone, 1976.
Disponível em: <https://www.scirp.org>. Acesso em: 10 dez. 2023.

PHONG, W. N. *et al.* Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae - Recent developments and future perspectives. **Algal Research**, [s. l.], v. 31, p. 506–516, abr. 2018.

PISTELLI, L. *et al.* Microalgal Co-Cultivation Prospecting to Modulate Vitamin and Bioactive Compounds Production. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1360–1360, 26 ago. 2021.

PLACZEK, M.; PATYNA, A.; WITCZAK, S. Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation. **E3S Web of Conferences**, [s. l.], v. 19, p. 02032, 2017.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 165–177, jun. 2009.

RAI, M. P. *et al.* Pivotal role of levoglucosenone and hexadecanoic acid from microalgae *Chlorococcum sp.* for corrosion resistance on mild steel: Electrochemical, microstructural and theoretical analysis. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 266, p. 279–290, set. 2018.

RAMACHANDRAN SIVARAMAKRISHNAN *et al.* Response of *Scenedesmus sp.* to microwave treatment: Enhancement of lipid, exopolysaccharide and biomass production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 312, p. 123562–123562, 1 set. 2020.

RAMMUNI, M. N. *et al.* Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 277, p. 128–134, mar. 2019.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

REHMAN, Z. U.; ANAL, A. K. Enhanced lipid and starch productivity of microalga (*Chlorococcum sp.* TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 21, p. e00298, mar. 2019.

RENUKA, N. *et al.* Influence of seasonal variation in water quality on the microalgal diversity of sewage wastewater. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 90, p. 137–145, 1 jan. 2014.

REVIERS, B. DE. **Biologia e Filogenia das Algas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

RICCIO; LAURITANO. Microalgae with Immunomodulatory Activities. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 2, 18 dez. 2019.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: John Wiley and Sons, 2013.

RICHMOND, A.; CHENG-WU, Z. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* outdoors. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 259–269, fev. 2001.

RICHMOND, A.; CHENG-WU, Z.; ZARMI, Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. **Biomolecular Engineering**, [s. l.], v. 20, n. 4-6, p. 229–236, jul. 2003

RIZWAN, M. *et al.* Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 92, p. 394–404, set. 2018.

SAFI, C. *et al.* Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 225, p. 151–158, 1 fev. 2017.

SAJJADI, B. *et al.* Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 97, p. 200–232, dez. 2018.

SALEHI, M. Evaluating the industrial potential of naturally occurring proteases: A focus on kinetic and thermodynamic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 254, p. 127782–127782, 1 jan. 2024

SÁNCHEZ MIRÓN, A. *et al.* Mixing in Bubble Column and Airlift Reactors. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 82, n. 10, p. 1367–1374, out. 2004.

SANI, J. T.; GHARIBI, S. O. S.; SHARIATI, M. A. The Importance of Alkaline Protease Commercial Applications: a Short Review. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology**, [s. l.], v. 5, p. 5-8, 2017.

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

SANTOS-BALLARDO *et al.* A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. **Aquaculture**, [s. l.], v. 448, p. 87-92, 2015.

SANTOS, I. Confronting governance challenges of the resource nexus through reflexivity: A cross-case comparison of biofuels policies in Germany and Brazil. **Energy Research & Social Science**, [s. l.], v. 65, p. 101464, jul. 2020.

SATHASIVAM, R.; KI, J.-S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 26, 12 jan. 2018.

SATHINATHAN, P. *et al.* Photobioreactor design and parameters essential for algal cultivation using industrial wastewater: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 173, p. 113096, mar. 2023.

- SATHYA, R. *et al.* A Systemic Review on Microalgal Peptides: Bioprocess and Sustainable Applications. **Sustainability**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 3262, 16 mar. 2021.
- SAWANT, R; NAGENDRAN, S. Peptidase: an enzyme with multiple industrial applications. **Word Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 568–579, 2014.
- SCHENK, P. M. *et al.* Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **BioEnergy Research**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 20–43, mar. 2008.
- SHAHID, A. *et al.* Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 704, p. 135303, fev. 2020.
- SILVA *et al.* Production, biochemical characterization, and kinetic/ thermodynamic study of novel serine protease from *Aspergillus avenaceus* URM 6706, **Biotechnology Progress**, [s. l.], 2020.
- SILVA, S. C. *et al.* Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 15, p. 3406, 28 jul. 2020.
- SINGH *et al.* Microbial proteases in commercial applications. **J Pharm Chem Biol Sci**, [s. l.], v. 4, p. 365–374, 2016.
- SINGH, J.; PANESAR, P. S. Industrial enzymes: Basic information, assay, and applications. *In: Industrial Enzyme Applications*. London: Academic Press, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 1 dez. 2023.
- SINGH, N. *et al.* Microalgae based biorefinery: Assessment of wild fresh water microalgal isolate for simultaneous biodiesel and β -carotene production. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 11, p. 100440, 1 set. 2020.
- SINGH *et al.* Vitamin E TPGS based palatable, oxidatively and physically stable emulsion of microalgae DHA oil for infants, children and food fortification. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 1674–1689, 2020.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phospholipid-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 16, p. 144-158, 1965.
- SIROHI, R. *et al.* Design and applications of photobioreactors- a review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 349, p. 126858, 1 abr. 2022.
- SIVARAMAKRISHNAN, R. *et al.* Response of *Scenedesmus sp.* to microwave treatment: Enhancement of lipid, exopolysaccharide and biomass production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 312, 2020.
- SKJÅNES, K. *et al.* Bioactive peptides from microalgae: Focus on anti-cancer and immunomodulating activity. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 173, n. 2, p. 612–623, 16 jun.

2021.

SLEGERS, P. M. *et al.* Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, [s. l.], v. 105, p. 395–406, maio 2013.

SMERILLI, *et al.* Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom *Skeletonema marinoi*. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, p. 154, 2019.

SOTO-SIERRA, L.; STOYKOVA, P.; NIKOLOV, Z. L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. **Algal Research**, [s. l.], v. 36, p. 175–192, dez. 2018.

SOVACOOOL, B. K. *et al.* Climate change and industrial F-gases: A critical and systematic review of developments, sociotechnical systems and policy options for reducing synthetic greenhouse gas emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 141, p. 110759, maio 2021.

SRIVASTAVA, B. *et al.* Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], p. 119847, dez. 2019.

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

TAKAHASI, T. Routine management of microalgae using autofluorescence from chlorophyll. **Molecules**, [s. l.], v. 24, p. 4441, 2019.

TANG *et al.* Evaluation of CO₂-induced azole-based switchable ionic liquid with hydrophobic/hydrophilic reversible transition as single solvent system for coupling lipid extraction and separation from wet microalgae. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 296, p. 122309, jan. 2020.

TEMRALEEVA, A. D.; BUKIN, YU. S. Morphology, molecular phylogeny, and species delimitation within microalgal genera *Eubrownia*, *Spongiococcum*, and *Chlorococcum* (Chlorophyceae, Chlorophyta). **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 151, p. 396–409, dez. 2022.

THIVIYANATHAN *et al.* Microalgae biomass and biomolecule quantification: Optical techniques, challenges and prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 189, p. 113926–113926, 1 jan. 2024.

THORÉ *et al.* Real-Time Monitoring of Microalgal Biomass in Pilot-Scale Photobioreactors Using Nephelometry. **Sensors**, [s. l.], v. 9, p. 1530, 2021.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. *In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: v. 1, p. 3 – 19, 2004.

TREDICI, M.R.; ZITELLI, G. C. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 187–197, 1998.

URIBE-WANDURRAGA, Z. N. *et al.* Effect of Microalgae (*Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*) Addition on 3D Printed Cookies. **Food Biophysics**, [s. l.], 21 jul. 2020.

VADIVELLOO, A. *et al.* Microalgae cultivation for the treatment of anaerobically digested municipal centrate (ADMC) and anaerobically digested abattoir effluent (ADAE). **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 775, p. 145853, jun. 2021.

VALENTI, W. C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 19, p. 100611, 1 mar. 2021.

VERMELHO, A. B. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.

VERVERIS *et al.* Novel foods in the European Union: scientific requirements and challenges of the risk assessment process by the European Food Safety Authority. **Food Research International**, [s. l.], v. 137, p. 109515, 2020.

WANG *et al.* Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 30, p. 904–912, 2012.

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

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

WINTON, A.L.; WINTON, K.B. **Análise de alimentos**. 2. ed. Barcelona: Hispano Americano, 1958.

WOODY, R.W. Circular dichroism of peptides and proteins. In: Nakanishi, K.; Berova, N; Woody, R.W. (eds.) **Circular Dichroism**. Principles and Aplications. VCH Publishers, Inc., New York, p. 473-521, 1994.

WU, G. *et al.* Production and supply of high-quality food protein for human consumption: sustainability, challenges, and innovations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1321, n. 1, p. 1–19, ago. 2014.

XAVIER-FILHO, J. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 1139-1143, 1989.

XIONG *et al.* Microalgae-based technology for antibiotics removal: From mechanisms to application of innovational hybrid systems. **Environmental Internation**, [s. l.], 2021.

YADA *et al.* An arginine specific protease from *Spirulina platensis*. **Marine Biotechnology**, [s. l.], v. 7, p. 474–480, 2005.

YADAV, G.; DASH, S. K.; SEN, R. A biorefinery for valorization of industrial waste- water and flue gas by microalgae for waste mitigation, carbon-dioxide sequestration and algal biomass production. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 688, p. 129–135, 20 out. 2019.

YASUHARA-BELL, J. *et al.* In vitro evaluation of marine-microorganism extracts for anti-viral activity. **Virology Journal**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 182, 2010.

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

ZHOU, L. *et al.* Bioactive compounds in microalgae and their potential health benefits. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 49, p. 101932, out. 2022.

ZITELLI *et al.* Photobioreactors for mass production of microalgae. **Algae Biofuels Energy**, [s. l.], 2013.

ZITELLI, G. *et al.* Valuable pigments from microalgae: phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [s. l.], 10 abr. 2023.

ZIYAEI, K. *et al.* An insight to the therapeutic potential of algae-derived sulfated polysaccharides and polyunsaturated fatty acids: Focusing on the COVID-19. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], mar. 2022.

APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA BBM

Tabela 1 – Composição do meio de cultura BBM

Soluções	Componente	Estoque	mL de Estoque/L
1	KH ₂ PO ₄	0,75g/100mL	10
2	K ₂ HPO ₄	1,75g/100mL	10
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75g/100mL	10
4	NaNO ₃	2,5g/100mL	10
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25g/100mL	10
6	NaCl	0,25g/100mL	10
7	Na ₂ EDTA•2H ₂ O KOH	5 g/100 mL 3,1 g/100 mL	1
8	FeSO ₄ .7H ₂ O+ SO ₄ H ₂ (d=1,8g/mL) H ₃ BO ₃	0,498 g/100 mL 0,1 mL/100 mL	1
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,142 g/100 mL	1
10	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,441 g/25 mL	0,1
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,73 g/25 mL	0,1
12	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,79 g/25 mL	0,1
13	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 g/25 mL	0,1
14	Vitaminas F/2	0,59 g/25 mL Ver	0,1
15		solução estoque	1

Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄); Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄); Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O); Nitrato de sódio (NaNO₃); Cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O); Cloreto de sódio (NaCl); EDTA di-hidratado (Na₂EDTA•2H₂O); Hidróxido de potássio (KOH); Sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄.7H₂O); Ácido sulfúrico (SO₄H₂); Ácido bórico (H₃BO₃). Solução de metal residual: Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O); Cloreto de manganês tetra-hidratado (MnCl₂.4H₂O); Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O); Molibdato de sódio di-hidratado (Na₂MoO₄.2H₂O); Nitrato de cobalto (II) (Co(NO₃)₂.6H₂O). Fonte: elaborado pela autora.

ANEXO A – COMPOSIÇÃO VITAMÍNICA DO MEIO BBM

Tabela 1 – Composição vitamínica do meio de cultura BBM

Substância	Solução estoque (g/L)	Concentração final no meio (mg/L)
Vitamina B12 (cianocobalamina)	0,0001	0,001
Biotina	0,0001	0,001
Thiamina	0,0200	0,200

Fonte: Stein, J. (ED.) Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. 448 pp.