

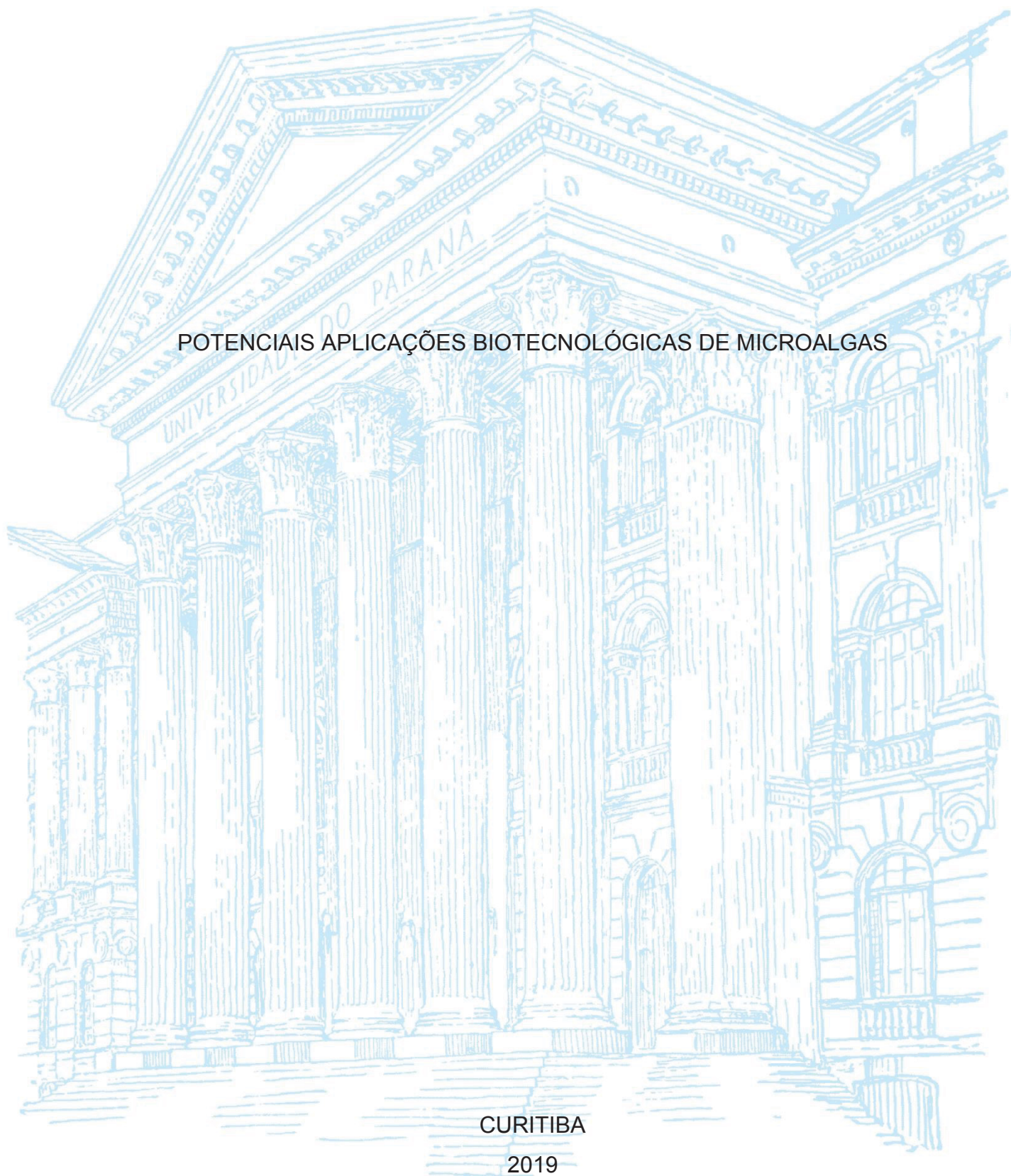
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA MARIA ZANETTE

POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROALGAS

CURITIBA

2019



CRISTINA MARIA ZANETTE

POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROALGAS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Michele Rigon Spier

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

Z28p

Zanette, Cristina Maria

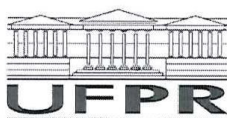
Potenciais aplicações biotecnológicas de microalgas [recurso eletrônico] / Cristina Maria Zanette, 2019.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Profa. Dra. Michele Rigon Spier

1. Microalgas – cultivo. 2. Compostos bioativos. 3. Antibacterianos. 4. Antioxidantes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Spier, Michele Rigon. III. Título

CDD 589.3

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CRISTINA MARIA ZANETTE** intitulada: **Potenciais Aplicações Biotecnológicas de Microalgas.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Maio de 2019.

MICHELE RIGON SPIER
Presidente da Banca Examinadora

CRISTINE RODRIGUES
Avaliador Externo (UFPR)

REGINA MARIA MATOS JORGE
Avaliador Interno (UFPR)

EDUARDO BITTENCOURT SYDNEY
Avaliador Externo (UFPR)

ANDRE BELLIN MARIANO
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais Vitor Hugo e Maria Cristina, meu irmão João Vitor, minha cunhada Maryana, aos meus sobrinhos Vitor e Lívia e ao meu amor Felipe. Vocês são meu alicerce!

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por sempre iluminarem meus passos, por todas as bênçãos recebidas e por permitir a realização de mais essa etapa.

Aos meus pais Vitor e Maria Cristina pelo exemplo de vida e pelo amor incondicional. A vocês que sempre se esforçaram para que eu tivesse a melhor educação e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão João Vitor e minha cunhada-irmã Maryana pelo incentivo, pelo exemplo de determinação e por sempre estarem ao meu lado.

Ao Vitor e a Lívia, que enchem minha vida de alegria!!

A meu noivo Felipe por todo amor, carinho e compreensão. Por sempre me incentivar e apoiar meus sonhos.

A minha orientadora, Prof^a Michele Rigon Spier pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, compreensão e amizade durante esta caminhada.

Às minhas amigas do LENGEBIO Fran, Tati, Suelen e Luana por todos os momentos de descontração, apoio e companheirismo. Levo vocês no coração!!

Ao professor André Bellin Mariano pelo apoio e pela disponibilização da infraestrutura do NPDEAS-UFPR para o cultivo e análises das microalgas.

A Beatriz Santos por toda ajuda no cultivo das microalgas e pela troca de conhecimentos.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo e a Universidade Federal de São Carlos pela doação das cepas de microalgas.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), Júlio Félix, Guilherme Zemke e os técnicos Israel Mendes e André Belan pela realização das análises de CG-MS e CLAE-MS.

Ao professor Bruno da Silva do Departamento de Química (UFPR) pela disponibilização do equipamento CG-MS e ao técnico Thiago pela realização das análises.

Ao Professor Najeh e ao Eduardo do Departamento de Farmácia da UNICENTRO pelas análises de atividade antioxidante e ajuda na redação dos artigos.

À Universidade Estadual do Centro-Oeste e aos professores Departamento de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização do Doutorado.

Aos membros da banca de pré-defesa e defesa: professor André Bellin Mariano, professora Regina Matos Jorge, professora Cristine Rodrigues e professor Eduardo Sydney pela participação e pelas valiosas contribuições.

À CAPES e a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

Aos professores do PPPGEAL, técnicos e servidores da UFPR pelos ensinamentos, ajuda na realização dos experimentos e disponibilização da infraestrutura.

Muito obrigada!!!

RESUMO GERAL

As microalgas são organismos fotossintetizantes presentes no solo e em ambientes marinhos e de água doce. Neste grupo estima-se que existam entre 200.000 a 1.000.000 de espécies, no entanto, apenas algumas são utilizadas industrialmente. As microalgas apresentam baixo custo de cultivo quando comparados a outros organismos e apresentam capacidade de produção de diferentes compostos bioativos, pigmentos, lipídios e enzimas (Capítulo 1). Considerando a demanda dos consumidores e da indústria por produtos sustentáveis e naturais, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de diferentes gêneros de microalgas para a produção da enzima β -galactosidase, avaliar da atividade antibacteriana e antioxidante de extratos e lipídios e caracterizar e otimizar a produção dos biocompostos. No Capítulo 2 foi realizado o cultivo mixotrófico de oito espécies de microalgas utilizando lactose como indutora da produção de β -galactosidase. A produção intra e extracelular da enzima foi avaliada durante o cultivo. *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella minutissima* e *Nannochloropsis oculata* foram capazes de crescer sob condições mixotróficas. *D. tertiolecta* apresentou a maior atividade enzimática ($33,5 \text{ U L}^{-1}$) no 11º dia de cultivo e maior rendimento de produto em relação ao substrato. Foram empregadas duas técnicas de rompimento celular, sendo que a sonicação apresentou os melhores resultados. No Capítulo 3 foi avaliada a atividade antibacteriana, antioxidante e a caracterização de extratos aquosos, etanólicos e hexânicos da biomassa microalgal. Os extratos aquosos não apresentaram atividade antibacteriana. Os extratos etanólicos e hexânicos de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *Tetraselmis gracilis* apresentaram atividade no ensaio de difusão em poços e os valores de CIM variaram de 0,40 a $9,55 \text{ mg mL}^{-1}$. Quarenta compostos foram identificados por CG-EM nos extratos etanólicos e hexânico, sendo o fitol, ácidos graxos e fitoesteróis encontrados em maior proporção. O extrato etanólico de *T. gracilis* apresentou a maior capacidade antioxidante no ensaio ABTS^{••} e o extrato de *D. tertiolecta* no ensaio HClO. Observou-se correlação significativa positiva entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos das espécies estudadas. No Capítulo 4 foi realizada a extração dos lipídios da biomassa seca, transesterificação e avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante, quantificação de fenólicos e análise do perfil lipídico. As espécies *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* apresentaram altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e *N. oculata* apresentou o maior teor de ácido palmítico, que são ácidos graxos reconhecidos por seus efeitos antimicrobianos. O extrato de *C. vulgaris* apresentou a maior capacidade antioxidante (ensaios ABTS^{••} e HClO) em comparação aos demais extratos lipídicos. No Capítulo 5 foi realizada a otimização da produção de biomassa da microalga *T. gracilis*, otimização das condições de extração, análise do perfil de ácidos graxos e atividade antibacteriana. Os valores ótimos estimados para maximizar a produção de biomassa foram de $132,56 \text{ mg L}^{-1}$ de NaNO_3 , $25,14 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $19,23 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl . O tempo de extração não teve efeito significativo e a proporção de solvente 3:1 (clorofórmio:metanol) e temperatura de extração de 60°C apresentaram os maiores rendimentos de extração. Todos os extratos testados apresentaram atividade antibacteriana frente aos patógenos em concentrações variando de 0,20 a $1,45 \text{ mg mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Cultivo mixotrófico. β - Galactosidase. Compostos bioativos. Antibacterianos. Antioxidantes.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms present in soil, marine and freshwater habitats. In this group it is estimated that 200,000 to 1,000,000 species exist, however, only a few are used industrially. The microalgae present low cost of cultivation when compared to other organisms and can produce a great variety of bioactive compounds as pigments, lipids and enzymes (Chapter 1). Regarding consumer and industry demand for sustainable and natural products, the present study aimed to evaluate the biotechnological potential of different genera of microalgae for the production of the β -galactosidase enzyme, to evaluate the antibacterial and antioxidant activity of extracts and lipids and to characterize and optimize the production of biocompounds. In Chapter 2, the mixotrophic cultivation of eight species of microalgae using lactose as carbon source was carried out. Intracellular and extracellular production of the enzyme was evaluated during cultivation. *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella minutissima* and *Nannochloropsis oculata* were able to grow under mixotrophic conditions. *D. tertiolecta* presented the highest enzymatic activity (33.5 U L^{-1}) on the 11th day of cultivation and higher yield in relation to the substrate. Two techniques of cell disruption were employed, and sonication presented the best results. In Chapter 3 the antibacterial, antioxidant and characterization of aqueous, ethanolic and hexane extracts of the microalgal biomass were evaluated. The aqueous extracts did not present antibacterial activity. Ethanolic and hexane extracts of *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* and *Tetraselmis gracilis* showed activity in agar well diffusion assay and MIC values ranged from 0.40 to 9.55 mg mL^{-1} . Forty compounds were identified by GC-MS in ethanolic and hexane extracts, with phytol, fatty acids and phytosterols being found in greater proportion. The ethanolic extract of *T. gracilis* presented the highest antioxidant capacity in the ABTS⁺ assay and the *D. tertiolecta* extract in the HClO assay. A significant positive correlation was observed between the antioxidant activity and the total phenolic content of the ethanolic extracts of the studied species. In Chapter 4, lipids were extracted from dry biomass, transesterified and evaluated of antibacterial, antioxidant activity, phenolic quantification and lipid profile analysis. The species *C. vulgaris* and *D. tertiolecta* presented high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and *N. oculata* presented the highest content of palmitic acid (42.85%), which are recognized for their antimicrobial effects. The extract of *C. vulgaris* showed the highest antioxidant capacity (ABTS⁺ and HClO) compared to the other lipid extracts. In Chapter 5 the optimization of the lipid productivity of *T. gracilis*, optimization of extraction conditions and analysis of the fatty acid profile and antibacterial activity were performed. The optimum values estimated to maximize biomass productivity were 132.56 mg L^{-1} of NaNO_3 , 25.14 mg L^{-1} of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 19.23 g L^{-1} of NaCl . The extraction time had no significant effect and the solvent ratio 3:1 (chloroform: methanol) and the extraction temperature of 60°C showed the highest extraction yields. All extracts tested showed antibacterial activity against pathogens in concentrations ranging from 0.20 to 1.45 mg mL^{-1} .

Keywords: Mixotrophic cultivation. β -galactosidase. Bioactive compounds. Antibacterial. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS NO TRABALHO....	18
FIGURA 2-PRINCIPAIS ROTAS METABÓLICAS DO CARBONO EM MICROALGAS E METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS.....	31
FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO DE A) <i>C. MINUTISSIMA</i> , B) <i>N.</i> <i>OCULATA</i> , C) <i>D. TERTIOLECTA</i> EM CULTIVO MIXOTRÓFICO E FOTOAUTOTRÓFICO E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE.....	51
FIGURA 4 – PRODUÇÃO EXTRACELULAR E INTRACELULAR DE β - GALACTOSIDASE E ALTERAÇÕES NO PH DURANTE O CULTIVO MIXOTRÓFICO.....	54
FIGURA 5 – MICROGRAFIA DAS CELULAS DE <i>N. OCULATA</i> ANTES (I) E DEPOIS DO ROMPIMENTO POR PEROLAS DE VIDRO (II) E SONICAÇÃO (III) (X 8500 DE AUMENTO). AS IMAGENS APRESENTAM CÉLULAS INTACTAS (A), CELULAS PARCIALMENTE ROMPIDAS (B) E TOTALEMNTE ROMPIDAS (C).....	55
FIGURA 6 - MICROGRAFIA DAS CELULAS DE <i>C. MINUTISSIMA</i> ANTES (I) E DEPOIS DO ROMPIMENTO POR PEROLAS DE VIDRO (II) E SONICAÇÃO (III) (X 6000 DE AUMENTO). AS IMAGENS APRESENTAM CÉLULAS INTACTAS (A), CELULAS PARCIALMENTE ROMPIDAS (B) E TOTALEMNTE ROMPIDAS (C)	56
FIGURA 7 - MICROGRAFIA DAS CELULAS DE <i>D. TERTIOLECTA</i> ANTES (I) E DEPOIS DO ROMPIMENTO POR PEROLAS DE VIDRO (II) E SONICAÇÃO (III) (X 6000 DE AUMENTO). AS IMAGENS APRESENTAM CÉLULAS INTACTAS (A) E FRAGMENTOS DE CELULAS (B).....	57
FIGURA 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATO ETANÓLICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO ABTS ⁺⁺	75
FIGURA 9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO HCLO	76
FIGURA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO ETANÓLICO E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ABTS ⁺⁺) DAS QUATRO ESPÉCIES DE MICROALGAS ESTUDADAS	77

FIGURA 11- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATO LIPÍDICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO ABTS **	91
FIGURA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATO LIPÍDICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO HOCL	91
FIGURA 13 - GRAFICOS DE ESCORES (A) E LOADINGS (B) DOS DOIS COMPENENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS MICROALGAS <i>C. VULGARIS</i> , <i>D. TERTIOLECTA</i> , <i>N. OCULATA</i> E <i>T. GRACILIS</i>	93
FIGURA 14 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E FOSFATO	104
FIGURA 15 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E CLORETO DE SÓDIO	104
FIGURA 16 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA <i>T. GRACILIS</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E RAZÃO DE SOLVENTE	108
FIGURA 17 - PERFIS DE DESEJABILIDADE PARA O REDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS (%) E NÍVEIS DE DESEJABILIDADE DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA, TEMPO E RAZÃO CLOROFÓRMIO: METANOL	109
FIGURA 18 -COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>T. GRACILIS</i>	110

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS DIFERENTES TIPOS

METABOLISMOS DE MICROALGAS.....22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS GERAIS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS	22
TABELA 2 - CONDIÇÕES DE CULTIVO E MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR PARA RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS INTRACELULARES DE MICROALGAS DE INTERESSE INDUSTRIAL	29
TABELA 3 - COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS DE DIFERENTES MICROALGAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E OS MICRORGANISMOS INIBIDOS .	41
TABELA 4- PARÂMETROS CINÉTICOS DOS CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS (FOTO) E MIXOTRÓFICO (MIXO) DAS MICROALGAS <i>D.</i> <i>TERTIOLECTA</i> , <i>N. Oculata</i> E <i>C. Minutissima</i> E EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR	53
TABELA 5- CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM, MG·ML ⁻¹) DOS EXTRATOS DE MICROALGAS FRENTE A PATÓGENOS GRAM- POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS.....	68
TABELA 6- IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CG-EM E PORCENTAGEM DA ÁREA DOS PICOS (ÁREA NORMALIZADA %) DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (H) E ETANÓLICOS (E) DAS MICROALGAS.....	70
TABELA 7- RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, TEOR DE CLOROFILA, CAROTENOIDES E FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS ETANÓLICOS E HEXÂNICOS.....	74
TABELA 8 – BIOMASSA SECA, LÍPIDIOS TOTAIS E INSAPONIFICÁVEIS, EMAG E CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL.....	86
TABELA 9 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (% DO TOTAL DE AG) DE <i>C.</i> <i>VULGARIS</i> , <i>D. TERTIOLECTA</i> , <i>N. Oculata</i> E <i>T. GRACILIS</i>	88
TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (mg·mL ⁻¹) DE EXTRATOS LÍPIDICOS E EMAG DE MICROALGAS FRENTE A PATÓGENOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS.....	89
TABELA 11 – NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS E DECODIFICADAS UTILIZADAS NO DCCR	97
TABELA 12 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS E DECODIFICADAS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL .	99
TABELA 13 – NÍVEIS CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO DCCR E OS RESULTADOS DA PRODUTIVIDADE LÍPIDICA	100

TABELA 14– EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO DCCR EM FUNÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA	102
TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIANCIA PARA A RESPOSTA BIOMASSA (MODELO SELECIONADO)	103
TABELA 16- NIVEIS CODIFICADOS DAS VARIÁREIS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL (2^3) E OS RESULTADOS DO CONTEÚDO LIPÍDICO	105
TABELA 17- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (2^3) EM FUNÇÃO DA PRODUTIVIDADE LIPIDICA	106
TABELA 18- ANÁLISE DE VARIANCIA PARA A RESPOSTA CONTEÚDO LIPIDICO (MODELO SELECIONADO).....	107
TABELA 19- CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) DE EXTRATOS LIPIDICOS DE <i>T. GRACILIS</i> FRENTE A PATOGENOS GRAM- POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATCC	- American Type Collection (Coleção Americana de Culturas)
ANOVA	- Análise de Variância
ABTS	- 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
CIM	-Concentração Mínima Inibitória
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DMSO	- Dimetil Sulfóxido
FDA	- Food and Drug Administration
HCIO	- Ácido Hipocloroso
IC ₅₀	-Concentração de amostra para inibição de 50% na concentração do
substrato	
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO 1 -REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 MICROALGAS	19
1.1.1 Metabolismo microalgal.....	20
1.1.1.1 Metabolismo fotoautotrófico.....	21
1.1.1.2 Metabolismo heterotrófico	21
1.1.1.3 Metabolismo mixotrófico	21
1.1.2 Parâmetros de cultivo.....	22
1.1.2.1 Nutrientes	23
1.1.2.2 Luz.....	24
1.1.2.3 Temperatura	25
1.1.2.4 Aeração e Agitação	25
1.1.2.5 pH.....	26
1.2 ENZIMAS	26
1.2.1 β -Galactosidase	30
1.3 METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS DE MICROALGAS	31
1.3.1 Metabólitos primários	32
1.3.2 Metabólitos Secundários	34
1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE MICROALGAS.....	37
1.4.1 Atividade Antioxidante	37
1.4.2 Atividade Antimicrobiana	38
1.5 CONCLUSÕES	39
CAPITULO 2 – CULTIVO MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE B- GALACTOSIDASE.....	43
RESUMO.....	43
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.2.1 Espécies de microalgas e cianobactéria, meios e preparo de inóculo	45
2.2.2 Condições de cultivo	46

2.2.3 Parâmetros de cultivo e determinação do pH.....	46
2.2.4 Rompimento celular	47
2.2.5 Determinação da eficiência do rompimento celular	48
2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura	48
2.2.7 Atividade enzimática da β -galactosidase	49
2.2.8 Determinação da concentração de carboidratos no meio de cultivo	49
2.2.9 Análise estatística	50
2.3 RESULTADOS	50
2.3.1 Seleção das espécies de microalgas	50
2.3.2 Parâmetros cinéticos do cultivo mixotrófico.....	50
2.3.3. Produção de β -galactosidase	52
2.3.4 Rompimento celular	54
2.4 DISCUSSÃO	57
2.5 CONCLUSÕES	60
CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E	
CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MICROALGAS	61
RESUMO.....	61
3.1 INTRODUÇÃO	61
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	62
3.2.1 Espécies de microalgas, meios e condições de cultivo	62
3.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana	63
3.2.5 Quantificação de fenólicos totais.....	65
3.2.8 Análise Estatística	67
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.3.1 Atividade antibacteriana: teste de difusão em poços	67
3.4 CONCLUSÕES	77
CAPÍTULO 4 – LIPÍDIOS DE MICROALGAS COMO FONTE DE COMPOSTOS	
ANTIBACTERIANOS E ANTIOXIDANTES PARA A INDÚSTRIA	79
RESUMO.....	79
4.1 INTRODUÇÃO	79
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	81
4.2.1 Espécies de microalgas, meios e condições de cultivo	81
4.2.2 Extração e quantificação de lipídios	82
4.2.3 Transesterificação e avaliação do perfil de EMAG.....	82

4.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CMI).....	82
4.2.5 Determinação da atividade antioxidante.....	83
4.2.6 Quantificação de fenólicos totais.....	84
4.2.7 Análise estatística	84
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.3.1 Biomassa seca, teor de lipídios totais e EMAG.....	84
4.3.2 Perfil de ácidos graxos	86
4.3.3 Atividade antibacteriana de lipídios e EMAG.....	89
4.3.4 Atividade antioxidante e teor fenólico total dos extratos lipídicos.....	90
4.3.5 Análise de Componentes Principais (ACP)	93
4.5 CONCLUSÕES	94
CAPÍTULO 5 – LIPÍDIOS DE TETRAELMIS GRACILIS: OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO, EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	95
RESUMO.....	95
5.1 INTRODUÇÃO	95
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	97
5.2.1 Manutenção da microalga e preparo do inóculo.....	97
5.2.2 Otimização da produção de biomassa	97
5.2.3 Quantificação de Nitrato e Fosfato no meio de cultivo	98
5.2.4 Determinação da biomassa seca	98
5.2.5 Extração e Quantificação de lipídios	98
5.2.6 Otimização da extração de lipídios.....	99
5.2.7 Determinação da atividade antibacteriana dos extratos lipídicos.....	99
5.2.8 Transesterificação e avaliação do perfil de ácidos graxos	99
5.2.9 Análise Estatística	100
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
5.3.2 Otimização da extração de lipídios.....	105
5.4 CONCLUSÕES	111
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO E TERMO DE LICENÇA EDITORA SPRINGER	

1 INTRODUÇÃO

As microalgas compreendem um grupo diversificado de organismos que são encontrados em ambientes diversos. Neste grupo estima-se que existam de 200.000 a 1.000.000 de espécies de cianobactérias procariontes e organismos fotossintéticos eucariontes (VENKATESAN et al., 2015). As principais aplicações das microalgas são a produção de biomassa para consumo humano, fontes de lipídeos para biodiesel, na aquicultura e na síntese de ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides, utilizados como suplemento alimentar. Porém, apenas algumas espécies são utilizadas comercialmente e dessa forma as microalgas apresentam um potencial biotecnológico a ser explorado. Recentes estudos avaliaram o potencial das microalgas na produção de biodiesel, tratamento de águas residuais, síntese de vitaminas, pigmentos, antioxidantes, fitoesteróis, polissacarídeos e enzimas (BRASIL et al., 2017; BULUT et al., 2019)

A diversidade de espécies de microalgas e os diferentes tipos de metabolismo fazem com que seja grande a variedade de produtos naturais e biomoléculas que podem ser extraídos desses organismos e aplicados na indústria de alimentos. Em relação ao cultivo, as microalgas apresentam vantagens quando comparados a micro-organismos como bactérias e leveduras pois o cultivo fotoautotrófico é sustentável uma vez que sequestra CO₂ atmosférico.

Dentre as biomoléculas produzidas pelas microalgas, poucos estudos avaliaram a produção de enzimas e de compostos antibacterianos. A otimização de parâmetros cinéticos de cultivo e de síntese de bioprodutos também é pouco reportada na literatura.

Considerando a necessidade da indústria por novas fontes de enzimas microbianas e de compostos antibacterianos, realizou-se o *screening* de oito espécies de microalgas marinhas e de água doce visando selecionar espécies produtoras da enzima β -galactosidase e de compostos com atividade antibacteriana frente à patógenos de origem alimentar.

1.1 OBJETIVOS

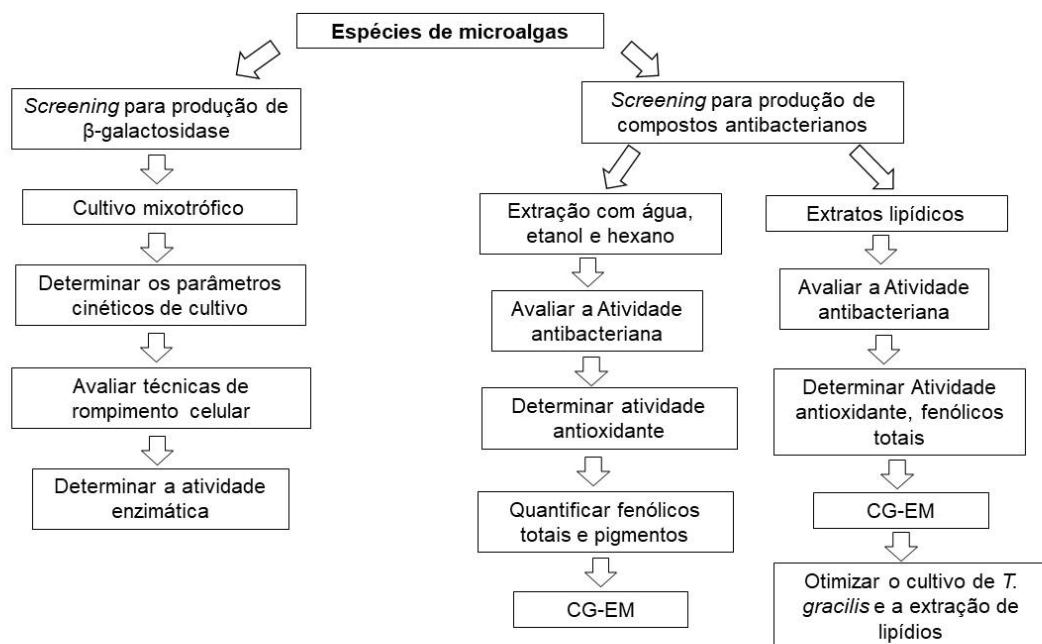
1.1.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de diferentes gêneros de microalgas quanto à produção da enzima β -galactosidase e de compostos antibacterianos e antioxidantes.

1.1.2 Objetivos específicos

- Selecionar cepas capazes de hidrolisar a lactose em cultivo mixotrófico, avaliar a atividade enzimática, determinar os parâmetros cinéticos de cultivo e avaliar técnicas de rompimento celular;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato da biomassa microalgal utilizando diferentes solventes frente a patógenos de origem alimentar;
- Caracterizar os extratos obtidos por CG-EM, avaliar sua capacidade antioxidante, quantificar o teor de fenólicos totais e de pigmentos;
- Avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante de lipídios microalgais, bem como determinar o perfil de ácidos graxos por CG-EM;
- Otimizar as condições de cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis* e otimizar o rendimento de extração de lipídios.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS NO TRABALHO



CAPÍTULO 1 -REVISÃO DE LITERATURA

1.1 MICROALGAS

Microalgas são organismos microscópicos unicelulares fotossintetizantes, dotados de clorofila ou outros pigmentos fotossintéticos e são presentes principalmente em ambientes aquáticos (água doce, marinha ou salobra) (OLAIZOLA, 2003; VENKATESAN *et al.*, 2015). O termo microalgas é utilizado em seu amplo sentido abrangendo tanto cianobactérias procariontes como algas microscópicas eucariontes (MASOJÍDEK E TORZILLO, 2014). As microalgas apresentam uma grande biodiversidade, podendo ser encontradas como células individuais, colônias ou em filamentos (LOURENÇO, 2006).

A classificação taxônomica tradicional é baseada nos seguintes critérios principais: tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva e constituintes da parede celular. Critérios adicionais como aspectos citológicos e morfológicos também são considerados (TOMASELLI, 2007). Atualmente, a utilização de técnicas de biologia molecular tem promovido alterações na classificação dos organismos.

De acordo com a classificação proposta por LEE (2008) as algas estão divididas em dois grupos: Procariontes e Eucariontes. O grupo Procarionte está representado pela divisão Cyanophyta. O grupo Eucarionte está subdividido de acordo com o tipo da membrana do cloroplasto em: Glaucophyta, Rodophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Apicomplexa, Cryptophyta, Heterokontophyta e Haptophytes. As microalgas compreendem um grupo geneticamente diversificado com uma variedade de características fisiológicas e bioquímicas (PRIYADARSHANI E RATH, 2012).

Do ponto de vista biotecnológico, as microalgas são um grupo que apresenta um potencial a ser explorado. Estima-se que existam de 200.000 a 1.000.000 de espécies de microalgas (VENKATESAN *et al.*, 2015) porém, apenas aproximadamente 100.000 foram isoladas e são mantidas em bancos de culturas mundiais (MASOJÍDEK E TORZILLO, 2014).

O uso das microalgas pelo homem data de séculos, porém o cultivo comercial iniciou-se em 1960, no Japão, com o gênero *Chlorella* (SPOLAORE *et al.*, 2006). As aplicações biotecnológicas das microalgas são diversas: nutrição humana e animal, aquicultura, produção de biocombustíveis, biofertilizantes e na indústria farmacêutica e

de cosméticos. As microalgas são fontes de compostos bioativos como ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos (clorofila, astaxantina, betacaroteno, luteína e ficocianina), polissacarídeos, antioxidantes, antimicrobianos e enzimas (SATYANARAYANA et al., 2011; BOROWITZKA, 2013; BRASIL et al., 2017; PINA-PEREZ et al., 2017). No entanto, a produção comercial restringe-se a produção de biomassa para nutrição (*Arthrospira* e *Chlorella*), produção de beta-caroteno (*Dunaliella*), astaxantina (*Haematococcus*) e ácido docosahexaenóico (*Cryptothecodinium*) (OLAIZOLA, 2003).

Os suplementos dietéticos a base de *Arthrospira* e *Chlorella* representam os maiores volumes de produção mundial de microalgas: 2000 e 5000 toneladas/ano de matéria seca, respectivamente. Esta produção corresponde a um valor de mercado de aproximadamente US\$ 78 milhões por ano (ENZING et al., 2014).

Diversos estudos têm sido conduzidos para investigar os produtos do metabolismo de microalgas tanto relacionado à caracterização química como também possíveis aplicações industriais destes compostos. Testes de rastreamento ou *screening* são métodos úteis para determinar a atividade biológica dos metabólitos (ÖRDOG et al., 2004; PLAZA et al., 2010; DE MORAIS et al., 2015).

A utilização de microalgas como biofábricas para a produção de metabólitos de interesse, apresenta vantagens quando comparadas a outras células microbianas principalmente relacionados às exigências nutricionais menores o que faz com que o cultivo seja mais simples e atrativo economicamente (GANGL et al., 2015; BRASIL et al., 2017).

1.1.1 Metabolismo microalgal

As microalgas apresentam grande diversidade metabólica, a qual reflete as diversas condições dos habitats onde podem ser encontradas. As características de crescimento, composição da biomassa e produção de metabólitos são dependentes das condições de cultivo. Dessa forma, o conhecimento do metabolismo é crucial para produção e otimização de biomoléculas em grande escala (CHEN et al., 2011; ANGELO et al., 2015).

As microalgas têm habilidade de utilizar tanto o carbono na forma inorgânica (dióxido de carbono, CO₂) quanto na forma orgânica (glicose, acetato, glicerol). Dessa forma, o metabolismo pode ser dividido em quatro tipos: fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (MARKOU E NERANTZIS, 2013).

1.1.1.1 Metabolismo fotoautotrófico

No metabolismo fotoautotrófico as microalgas utilizam a luz (natural ou artificial) como fonte de energia e o CO₂ como fonte de carbono (CHEN et al., 2011). Atualmente, é o regime de cultivo mais comumente utilizado e economicamente viável para a produção em grande escala de biomassa (SCHADE E MEIER, 2019). A eficiência deste cultivo é dependente da intensidade luminosa e da dispersão da luz dentro da cultura (ALKHAMIS E QIN, 2013).

1.1.1.2 Metabolismo heterotrófico

No metabolismo heterotrófico as microalgas não realizam fotossíntese, e por isto não necessitam de luz. Utilizam o carbono orgânico como fonte de energia e como fonte de carbono, como as bactérias (CHOJNACKA E MARQUEZ-ROCHA, 2004). As microalgas podem metabolizar diferentes fontes de açúcares, como: glicose, acetato, glicerol, frutose, lactose, galactose e manose (CHEN et al., 2011). O cultivo heterotrófico apresenta rendimentos em biomassa superiores ao cultivo fotoautotrófico, porém apresenta como desvantagem o custo elevado da fonte de carbono orgânica. Além disso, poucas espécies de microalgas podem se multiplicar nestas condições (LIANG et al., 2009). Espécies como *Chlorella vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Acutodesmus obliquus*, *Spirulina* e *Haematococcus* foram cultivadas com sucesso heterotroficamente (CHOJNACKA E MARQUEZ-ROCHA, 2004).

1.1.1.3 Metabolismo mixotrófico

O metabolismo mixotrófico é um variante do heterotrófico, em que a microalga realiza fotossíntese e utiliza tanto compostos orgânicos quanto inorgânicos como fonte de carbono (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Algumas espécies de microalgas tem capacidade de se desenvolver sob condições fotoautotróficas, heterotróficas ou ambas (CHEN et al., 2011). O cultivo mixotrófico apresenta como vantagens a utilização de menor intensidade luminosa, menores custos de produção e maior produtividade em biomassa quando comparado ao cultivo fotoautotrófico (CERÓN GARCÍ et al., 2006; LI, T. et al., 2014). A utilização de fontes de carbono alternativas para o cultivo mixotrófico da microalga *Acutodesmus obliquus* foi avaliado por (GIRARD et al., 2014). Soro de leite na concentração de 40% promoveu aumento da

biomassa quando comparado com cultivos heterotrófico e fotoautotrófico. Observou-se o consumo de lactose no meio de cultura, indicando a possibilidade de produção de enzima β -galactosidase extracelular.

1.1.1.4. Metabolismo fotoheterotrófico

O quarto tipo de metabolismo é o fotoheterotrófico, no qual as microalgas utilizam a luz como fonte de energia e composto orgânico como fonte de carbono. Os organismos fotoheterotróficos não conseguem se multiplicar na presença somente de luz ou de fonte orgânica de carbono. É preciso o fornecimento de luz e de fonte orgânica de carbono simultaneamente (CHOJNACKA E MARQUEZ-ROCHA, 2004). O QUADRO 1 resume as principais características dos diferentes metabolismos encontrado nas microalgas.

QUADRO 1 - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS DIFERENTES TIPOS METABOLISMOS DE MICROALGAS

Metabolismo	Fonte de Energia	Fonte de Carbono	Densidade Celular
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânico	Baixa
Heterotrófico	Orgânica	Orgânico	Alta
Mixotrófico	Luz e orgânica	Inorgânico e Orgânico	Média
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânico	Média

FONTE: (CHOJNACKA E MARQUEZ-ROCHA, 2004; CHEN et al., 2011)

1.1.2 Parâmetros de cultivo

Diferentes fatores como nutrientes, luminosidade, fotoperíodo, temperatura, salinidade, pH, agitação podem influenciar a taxa de crescimento das microalgas, rendimento em biomassa e produção de metabólitos (CHOJNACKA E ZIELIŃSKA, 2011). É imprescindível a otimização e manutenção destes parâmetros durante o período de cultivo (SINGH et al., 2015). Na TABELA 1 são apresentadas as faixas de alguns parâmetros para o cultivo de microalgas.

TABELA 1 - PARÂMETROS GERAIS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS

Parâmetro	Faixa	Valor ótimo
Temperatura (°C)	16-27	18-24
Salinidade (%) ¹	12-40	20-24
Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	2-2000	10-250
Fotoperíodo (dia: noite, em horas)	De 12 a 24 de fase clara	12:12 (mínimo) 24:0 (máximo)
pH	7-9	8,2 - 8,7
Aeração (vvm) ²	0 – 6,5	-

¹ Porcentagem em massa/volume

²vvm: volume de ar por volume de meio, por minuto

FONTE: Adaptado de (FÁBREGAS et al., 1994; COUTTEAU, 1996; HAVLIK et al., 2016)

1.1.2.1 Nutrientes

Para o cultivo de microalgas em condições ótimas, devem ser fornecidas quantidades adequadas de nutrientes. Os macronutrientes compreendem carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio e silicato (para as diatomáceas) e elementos traço como minerais (Co, Mo, Mn, Zn, Fe) e vitaminas (cobalamina, tiamina e biotina) (DE LA NOUE E DE PAUW, 1988)

O carbono inorgânico no meio cultura pode estar disponível na forma de dióxido de carbono (CO_2), ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). A forma carbono inorgânico disponível para as microalgas dependerá do pH do meio de cultivo (GRIMA et al., 1999).

A glicose, glicerol e acetato são comumente utilizados como fonte de carbono orgânico no cultivo de microalgas (PEREZ-GARCIA et al., 2011). A utilização de glicose em metabolismo heterotrófico e mixotrófico pelos gêneros *Arthrospira*, *Chlorella*, *Nannochloropsis* e *Scenedesmus* tem sido amplamente reportada (CHOJNACKA E ZIELIŃSKA, 2011; CHEIRSILP E TORPEE, 2012). A metabolização de glicerol em metabolismo mixotrófico foi verificada em *A. platensis* (NARAYAN et al., 2005), *Isochrysis galbana* (ALKHAMIS E QIN, 2013), *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Scenedesmus* sp. (ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

As microalgas e cianobactérias são capazes de metabolizar diferentes fontes de nitrogênio, principalmente amônia, nitrato e uréia. Em condições limitantes de nitrogênio, as microalgas tendem a acumular lipídios e alguns estudos também reportam o acúmulo de amido em *Chlamydomonas*, *Dunaliella* e *Chlorella* (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ E BALLESTEROS, 2012). O acúmulo de lipídios foi observado em *Chlorella* sp, *Chlorococcum littorale*, *Nannochloropsis* sp., *Neochloris oleoabundans*, *Stichococcus bacillaris*, *Tetraselmis suecica* e *Scenedesmus* sp. (REN et al., 2013; BENVENUTI et al., 2015). Quando em condições não limitantes, o tipo de fonte de nitrogênio altera a composição dos açúcares da parede celular e dos exopolissacarídeos produzidos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ E BALLESTEROS, 2012). O nitrogênio tem uma participação importante na composição da biomassa,

correspondendo de 1 a 10% do peso seco, exceto para as diatomáceas nas quais a sílica é o principal componente (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Os micronutrientes metálicos têm como principal função a participação nas estruturas e atividades enzimáticas, bem como na fixação do nitrogênio, respiração e fotossíntese. A tiamina (vitamina B₁) e a cobalamina (vitamina B₁₂) atuam como co-fatores de enzimas. A biotina (vitamina H) é de menor importância que as demais vitaminas e atua no transporte de CO₂ (LOURENÇO, 2006).

1.1.2.2 Luz

A disponibilidade e intensidade da luz são os fatores que controlam a produtividade em biomassa de microalgas fotoautotróficas. A taxa de fotossíntese é função da radiação luminosa (ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2013). A utilização eficiente da luz pelas microalgas está relacionada com algumas restrições. Uma delas está relacionada com a atenuação exponencial da energia luminosa ao passar pelo cultivo, conforme a densidade celular aumenta, a penetração de luz diminui exponencialmente (RICHMOND, 2004).

A atenuação da luz é influenciada por diversos fatores como concentração celular, tamanho da célula, tipos de pigmentos intracelulares e comprimento do caminho ótico (WANG et al., 2014). No fotobiorreator duas zonas de luz podem existir: uma zona iluminada, na qual as células realizam fotossíntese e uma zona escura junto ao fundo do cultivo, na qual a intensidade luminosa está abaixo do ponto de compensação e a fotossíntese líquida é negativa (RICHMOND, 2004).

A intensidade luminosa é fator crítico, pois altas intensidades de luz causam a foto saturação, inibição da fotossíntese e o excesso de energia pode ser liberado na forma de calor (CHISTI, 2007; KUNJAPUR E ELDRIDGE, 2010). A condição ótima de iluminação para o desenvolvimento das microalgas dependerá do comprimento de onda (400-700 nm), da intensidade luminosa e do regime de luz (fotoperíodo). Para a maioria das microalgas a intensidade luminosa ótima varia de 10-250 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, dependendo da espécie e dos fatores ambientais. Esta necessidade pode ser fornecida pela luz solar, que pode atingir até 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HAVLIK et al., 2016).

O fotoperíodo tem grande influência sobre a fotossíntese das algas, metabolismo dos nutrientes, a síntese de compostos orgânicos, e consequentemente a produtividade varia com a mudança de ciclos claros e escuros. Meseck et al., (2005)

avaliaram o efeito do fotoperíodo e da intensidade luminosa no cultivo de *Tetraselmis chui* e concluíram que quanto maior a duração do ciclo claro (24, 16 e 12h) e maior a intensidade luminosa ($220 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), maior a produção de biomassa e mais rápida a utilização de nitrato e fosfato. Os cultivos expostos a 8h de luz apresentaram as menores taxas de crescimento e utilização dos nutrientes.

1.1.2.3 Temperatura

A maioria das espécies de microalgas é capaz de realizar fotossíntese e crescimento celular em uma faixa de temperatura de 15 a 30 °C, porém cada espécie possui uma temperatura ótima de crescimento (RAS et al., 2013). Estudos com o gênero *Chlorella* demonstram a capacidade de multiplicação em faixa de temperatura de 5 a 30 °C e a temperatura ótima de crescimento observada é de 25 °C. Para o gênero *Scenedesmus* a faixa de temperatura é de 10 a 30 °C (SINGH E SINGH, 2015). O gênero *Dunaliella* apresenta uma faixa de temperatura mais ampla, podendo se multiplicar entre 0 a 45 °C. A maioria dos estudos indica como temperatura ótima de crescimento valores entre 25 a 30 °C (HOSSEINI TAFRESHI E SHARIATI, 2009; WU et al., 2016).

Em temperaturas de cultivo abaixo da ótima, um aumento de temperatura tem efeito positivo na fotossíntese e na divisão celular. Isto pode ser justificado pelo aumento da atividade enzimática do ciclo de Calvin. Em temperaturas acima da ótima, a fotossíntese diminui e consequentemente a taxa de multiplicação também decresce (PULZ, 2001; RAS et al., 2013).

1.1.2.4 Aeração e Agitação

A agitação dos cultivos é importante para evitar a sedimentação das células, para distribuição homogênea dos nutrientes, metabólitos, calor e na transferência de gases (CO_2 e O_2) pela interface gás-líquido (ERIKSEN, 2008).

Nos cultivos densos e de grande volume é recomendada a aeração com a injeção de ar atmosférico ou ar enriquecido com CO_2 (1 a 5 % v·v⁻¹), contribuindo no processo de fotossíntese (KUNJAPUR E ELDRIDGE, 2010). Além da adição de carbono inorgânico, a aeração promove a uniformidade do cultivo e manutenção das microalgas em suspensão. Os sistemas mais utilizados nos cultivos de microalgas são

aeração por difusão (dissolução do CO₂ atmosférico) e aeração forçada (injeção de ar atmosférico ou injeção de CO₂) (DASGUPTA et al., 2010).

1.1.2.5 pH

O pH do meio de cultivo desempenha papel muito importante na regulação da absorção de nutrientes incluindo o fosfato e o nitrato. A fonte de carbono, uma vez dissolvida no meio de cultivo, participa do equilíbrio químico $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$, em que a distribuição entre as espécies químicas é determinada pelo pH (ANDRADE et al., 2008). A ionização de metabólitos, precipitação de fosfatos e solubilidade e viabilidade de elementos traço também são dependentes do pH (SINGH et al., 2015). O pH ótimo para a maioria das culturas é entre 8,2 a 8,7, com uma faixa aceitável de 7 a 9. Algumas espécies como *Spirulina* apresentam pH ótimo em meio alcalino, numa faixa de 9,5 a 10,5 (HAVLIK et al., 2016). O crescimento de microalgas em cultivo envolve o consumo de CO₂ dissolvido, aumentando o pH do sistema (9 a 9,5). Em pequenos volumes de cultivo faz-se necessário o uso de tampões e em sistemas de produção medidas como a aeração de ar natural ou enriquecido com CO₂ são utilizados para regular as variações de pH (LOURENÇO, 2006).

1.1.2.6 Salinidade

A tolerância a salinidade em microalgas varia substancialmente. Podem ser agrupadas como microalgas de água doce (que se multiplicam em concentrações salinas de 0 a 2 % (m·v⁻¹), hipotônicas (concentrações de 3 a 5 % (m·v⁻¹) de NaCl) e halotolerantes (geralmente espécies marinhas, que podem se multiplicar em concentrações 6 a 15 %) e halofílicas (>16 % de NaCl). A maioria das diatomáceas, cianobactérias e clorófitas são halotolerantes. Poucas espécies como *D. salina* são halofílicas (MOHEIMANI et al., 2015).

1.2 ENZIMAS

Enzimas microbianas são conhecidas por desempenhar um papel crucial como catalisadores biológicos, com vasta aplicação em diferentes segmentos da indústria (ADRIO E DEMAINE, 2014). O mercado de enzimas industriais foi estimado

em U\$ 4,9 bilhões em 2015 e espera-se um aumento para aproximadamente U\$ 6,3 bilhões em 2021 (BBC, 2017).

O mercado de enzimas está, tradicionalmente, dividido em três segmentos. A maioria das enzimas industriais (65 %) é utilizada pelas indústrias têxtil, papel, amido, couro e produtos de limpeza e de higiene. Enzimas para a indústria de alimentos correspondem a 25 % do mercado e incluem enzimas utilizadas na indústria de laticínios, bebidas, óleos e panificação. O segmento de enzimas para ração animal contribui com 10 % do mercado (KUMAR E SINGH, 2013).

As enzimas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, 1992), as seis classes são: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

As enzimas são componentes de células animal, vegetal e microbiana. Algumas enzimas comerciais como papaína, ficina e bromelina são obtidas de origem vegetal. Outras enzimas são extraídas de órgãos de animais como, pepsina, tripsina, quimotripsina, catalase e renina. Essas fontes apresentam algumas desvantagens tais como sazonalidade e alto custo de produção (VOLESKY et al., 1984).

Dessa forma, os micro-organismos são fontes potenciais de enzimas oferecendo uma série de vantagens: apresentam maior estabilidade que as enzimas animais e vegetais, apresentam ampla diversidade bioquímica, apresentam menor custo de produção, facilidade de *scale-up* e otimização e manipulação genética (RAVEENDRAN et al., 2018).

Mais de 4000 enzimas são conhecidas e 20 enzimas são produzidas em escala industrial. Atualmente, as empresas Novozymes®, DuPont® e Roche® detêm 75 % do comércio mundial de enzimas (LI et al., 2012). As enzimas microbianas podem ser extracelulares (excretadas ao meio de cultivo) ou intracelulares (enzimas produzidas e retidas no interior das células).

Embora não há produção industrial de enzimas a partir de microalgas, diversos estudos reportaram a síntese de enzimas com potencial aplicação industrial. Diferentes classes de enzimas foram reportadas: hidrolases (celulase, amilase, galactosidase, protease, lipase e fitase), oxidoredutase (laccase e superóxido dismutase) e ligase (anidrase carbônica) (BRASIL et al., 2017). Alguns estudos estão reportados na TABELA 2.

De acordo com ZHANG E KIM, (2010) o ambiente marinho apresenta condições ambientais peculiares, como alta salinidade, alta pressão, baixas temperaturas e diferentes intensidades de iluminação que podem fazer com que as enzimas produzidas por microrganismos marinhos seja diferente das enzimas homólogas produzidas por organismos terrestres. Como os organismos marinhos, inclusive as microalgas apresentam uma variedade genética e bioquímica pouco explorada são consideradas uma fonte promissora de enzimas com aplicação industrial.

A produção de metabólitos intracelulares pelas microalgas envolve várias etapas de processamento que iniciam com o cultivo, recuperação da biomassa, seguida das etapas de rompimento celular, extração e purificação do produto (SHOW et al., 2015). Assim como muitos processos para recuperação de metabólitos intracelulares de outros micro-organismos, as etapas de *downstream* para recuperação de produtos de microalgas têm um custo mais elevado do que o cultivo da biomassa (MOLINA GRIMA et al., 2003)

Diferentes técnicas têm sido empregadas para o rompimento celular de microalgas, incluindo métodos mecânicos, químicos e enzimáticos. Dentre estes, as diferentes técnicas de rompimento mecânico são geralmente mais empregadas (prensa Francesa, sonicação, moinho de bolas), pois evitam a contaminação química e preservam a funcionalidade dos bioprodutos (WANG et al., 2015). Algumas técnicas de rompimento podem ser observadas na TABELA 2.

TABELA 2 - CONDIÇÕES DE CULTIVO E MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR PARA RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS INTRACELULARES DE MICROALGAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Microalga	Enzima	Condições de Cultivo	Método de rompimento	Referência
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	α -amilase	Fotoautotrófico a 34 °C e com aeração contínua (2-5 % CO ₂), com ciclos de claro e escuro de 12h.	Quatro ciclos de congelamento e descongelamento utilizando N ₂ , seguido de 4 a 6 ciclos de ultra-som (30s)	(LEVI E GIBBS, 1984)
<i>Poterioochromonas malhamensis</i> Peterfi	α -galactosidase	Meio de cultivo contendo glicose (10 mg·mL ⁻¹), com aeração e temperatura de 27 °C e iluminação com luz fluorescente (2.000 lux)	Foram testados dois métodos: Prensa Francesa (100 kg·cm ⁻²) e ultra-som (4 ciclos de 15 s)	(DEY E KAUSS, 1981)
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Protease	Fotoautotrófico com N ₂ como fonte de nitrogênio	Descongelamento em tampão e passagem em prensa Francesa a pressão de 140 MPa	(LOCKAU <i>et al.</i> , 1988)
<i>Anabaena variabilis</i>	Aminopeptidase	Cultivo em temperatura ambiente sob iluminação constante de 1.300 lux e aeração do meio.	Prensa Francesa a pressão de 80 MPa, 3 ciclos.	(NIVEN, 1995)
<i>A. platensis</i>	Protease	Cultivo em erlenmeyer a 30 °C sob agitação e aeração contínua com ar enriquecido de CO ₂ (5 %) e irradiância de 70 mmol fótons m ⁻² ·s ⁻¹	Agitação em tampão (pH=8) a 4°C/ <i>overnight</i> e centrifugação a 30.000g/1h	(NANNI <i>et al.</i> , 2001)
<i>A. platensis</i> <i>S. nidulans</i> <i>Pseudanabaena</i> sp.	Superóxido dismutase	<i>Arthrospira</i> : Cultivo a 25 °C com irradiância de 28 μ mol fótons m ⁻² s ⁻¹ em frascos de vidro por 10 dias, com aeração de 1,67 vvm <i>Pseudanabaena</i> : Cultivo a 30 °C com aeração de 1,25 vvm e mesmas condições de irradiância	Ultra-som operado com 80 % da potência por 10 minutos (8 ciclos)	(GUNES <i>et al.</i> , 2015)
<i>Tetrademus obliquus</i>	β -galactosidase	Cultivo mixotrófico em erlenmeyer (250 mL) a 21°C , irradiância de 100 mmol fótons m ⁻² ·s ⁻¹ contendo 20 g·L ⁻¹ de lactose e 180mg·L ⁻¹ de nitrato.	Clorofórmio (50 μ L) e Dodecil Sulfato de Sódio (0,1 %) por 5 minutos	(BENTAHAR <i>et al.</i> , 2018)

FONTE: A autora (2018)

1.2.1 β -Galactosidase

β -Galactosidase (β -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.23), também conhecida por lactase, é uma enzima que hidrolisa os resíduos D- galactosil de polímeros e oligossacarídeos (HUSAIN, 2010). A principal aplicação industrial desta enzima é a hidrólise da lactose no leite e em produtos lácteos. É utilizada melhorando a digestibilidade e características tecnológicas como doçura e cristalização (PANESAR et al., 2010). Além de catalisar a conversão da lactose a glicose e galactose, a β -galactosidase catalisa também a reação de transgalactosilação, sendo utilizada para a produção de galactooligossacarídeos (GOS), utilizado como prebióticos em produtos funcionais (OLIVEIRA et al., 2011).

Na literatura são reportados poucos trabalhos que avaliaram a produção de β -galactosidase por microalgas. Davies et al., (1994) avaliaram a atividade de β -galactosidase em macro e microalgas. Oito das nove espécies das divisões Chlorophyceae e Cyanophyceae apresentaram atividade enzimática. Os maiores valores de atividade enzimática foram encontrados em *Cosmarium* sp. e *Tetradismus obliquus*. Girard et al., (2014) realizaram o cultivo mixotrófico de *T. obliquus* em soro de queijo (40 % v.v⁻¹) e observaram uma redução de 54,4 % na concentração de lactose e o acúmulo de glicose e galactose no meio de cultivo. Estes resultados sugerem a produção de β -galactosidase extracelular pela microalga. A atividade de β -galactosidase por *T. obliquus* foi verificada por Bentahar et al., (2018) utilizando cultivo mixotrófico com adição de 20 g.L⁻¹ de lactose (TABELA 2). A atividade máxima foi reportada no 7º dia de cultivo (86,46 U.L⁻¹) e a produção de biomassa foi de 0,46 g.L⁻¹ ao final do cultivo. Os autores verificaram que a produção de lactase está associada diretamente com a produção de biomassa. Até o presente, este é o único trabalho que quantificou ao longo do cultivo a atividade intracelular de β -galactosidase por microalgas.

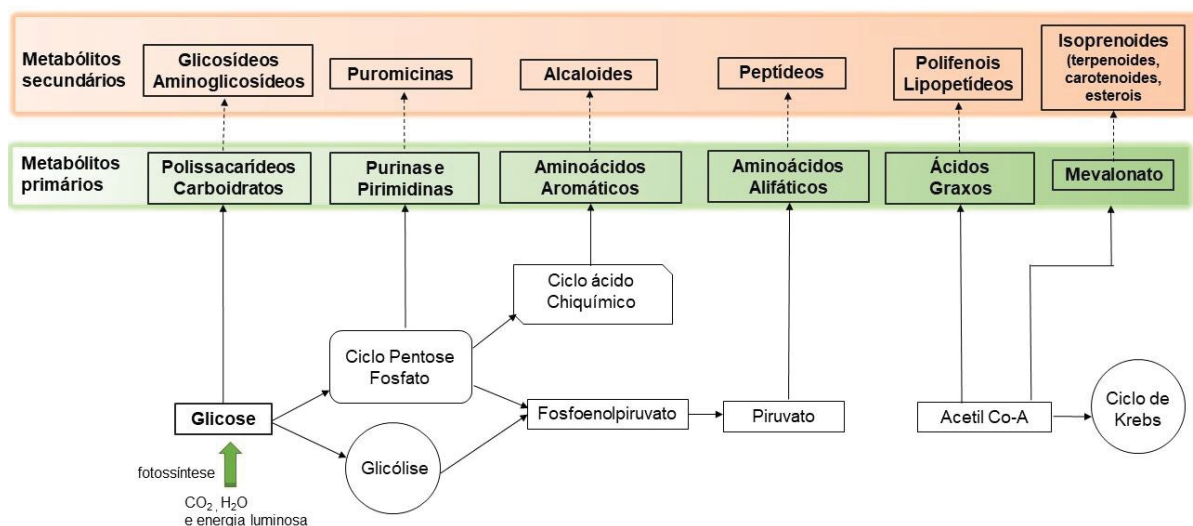
Além de serem uma potencial fonte de lactases para aplicação na indústria de alimentos as microalgas podem ser utilizadas em processos de biorremediação de efluentes da indústria de produtos lácteos. O soro de queijo é um importante subproduto que apresenta alta concentração de lactose (4,5 a 5% m.v⁻¹) uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sendo um poluente ambiental quando não tratado adequadamente (DAS et al., 2016). Girard et al., (2017) realizaram cultivo sequencial de *T. obliquus* e *Chlorella protothecoides* em soro de queijo e obtiveram

percentual de redução de lactose do meio de 62 % e produção de total de biomassa de 13 g·L⁻¹.

1.3 METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS DE MICROALGAS

As microalgas são consideradas uma fonte potencial de compostos bioativos e a biossíntese destes compostos ocorre por duas vias metabólicas distintas: primária e secundária. O metabolismo primário corresponde ao conjunto de processos que desempenham uma função essencial, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Como por exemplo a biossíntese de carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e ácidos nucleicos, como pode ser observado na FIGURA 2. O metabolismo secundário está associado às estratégias de defesa, sendo formados a partir dos metabólitos primários. Os metabólitos secundários são principalmente isoprenoides, glicosídeos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (BURJA et al., 2001; TAIZ E ZEIGER, 2006; RORRER, 2015).

FIGURA 2-PRINCIPAIS ROTAS METABÓLICAS DO CARBONO EM MICROALGAS E METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS



Fonte: Adaptado de Burja et al., (2001) e Skulberg, (2007)

Os metabólitos secundários produzidos por microalgas são extensivamente estudados por apresentarem atividades biológicas como atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e antiviral (DE MORAIS et al., 2015; SATHASIVAM et al., 2017). A síntese de metabólitos secundários é geralmente

favorecida por condições sub-ótimas de cultivo. As condições de cultivo estressantes para microalgas podem ser físicas ou nutricionais. Os fatores nutricionais são considerados as manipulações da composição do meio de cultivo (deficiência de nitrogênio, fosforo e ferro) enquanto que os fatores físicos são os fatores externos que afetam o crescimento microalgal (pH, salinidade, intensidade luminosa e temperatura) (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016).

1.3.1 Metabólitos primários

1.3.1.1 Carboidratos

Os carboidratos são os principais produtos da fotossíntese e do metabolismo de fixação do carbono (Ciclo de Calvin) e atuam como componentes estruturais da parede celular ou são acumulados nos plastídios como componentes de reserva energética. Os carboidratos são um grupo que apresentam estruturas e propriedades funcionais diversas que compreendem: os monossacarídeos (glicose, ramnose, xilose e manose) e seus polímeros (di-, oligo- e polissacarídeos) (MARKOU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013). A composição da parede celular e os carboidratos de reserva são dependentes do gênero das microalgas. Nas microalgas verdes (Chlorophyta e Charophyta) os polímeros de glicose produzidos via celulose/amido são os principais componentes da parede celular e de reserva energética (CHEN *et al.*, 2013). Nas cianobactérias o glicogênio é o carboidrato de reserva energética. Já nas algas vermelhas o carboidrato de reserva é o amido florídeo e nas algas marrons a laminarina (MARKOU *et al.*, 2012; KADAM *et al.*, 2015).

O conteúdo de carboidratos na biomassa microalgal varia de acordo com a espécie, condições de cultivo e fatores ambientais. Vieira Salla *et al.*, (2016) reportou conteúdo de carboidratos de 13,2 % para *A. platensis* utilizando condições fotoautotróficas. Já em cultivo mixotrófico o conteúdo de carboidratos aumentou para 44,0 %. Em condições limitantes de nitrogênio no meio de cultivo o teor de carboidratos da microalga *C. vulgaris* aumentou de 4,8 % para 41 % (DRAGONE *et al.*, 2011).

Os carboidratos extraídos de microalgas apresentam diversas aplicações potenciais na indústria farmacêutica, química e de alimentos. A glicose ou o amido são utilizados para a produção de biocombustíveis como o bioetanol e bio-hidrogênio

(CHEW et al., 2017). Os polissacarídeos apresentam potencial para serem utilizados na indústria de alimentos como estabilizantes de emulsões e espessantes. Também podem ser aplicados como biofloculantes e utilizados na remoção de metais pesados em águas residuárias. Além disso, os polissacarídeos tem a capacidade de modular o sistema imunológico e anti-inflamatório, apresentando atividades biológicas importantes como anti-tumoral, antioxidante e imunoestimulante (MARKOU E NERANTZIS, 2013)

1.3.1.2 Proteínas

As proteínas são constituintes majoritários da biomassa microalgal e seu conteúdo pode variar de 50 a 70 % dependendo da espécie. Possuem perfil de aminoácidos balanceado e boa digestibilidade apresentando assim, potencial para aplicação na nutrição humana e animal (BECKER, 2007; CHEW et al., 2017).

Atualmente as proteínas de microalgas tem atraído grande interesse por parte dos pesquisadores como fonte de peptídeos bioativos para uso terapêutico (RICO et al., 2017). Os peptídeos bioativos são sequências de aminoácidos particulares que podem ter efeitos fisiológicos adicionais ao seu valor nutricional. São produzidos via hidrólise enzimática e apresentam estrutura composta por 2 a 30 resíduos de aminoácidos (BLEAKLEY E HAYES, 2017). Dependendo da sequência de aminoácidos, os biopeptídeos derivados de microalgas podem apresentar várias funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, antitumoral, anti-hipertensiva, antimicrobiana e efeito imunomodulador (FAN et al., 2014; SHANNON E ABU-GHANNAM, 2016)

1.3.1.3 Lipídios

Microalgas podem acumular elevadas quantidades de lipídios que podem variar de 20 a 75 % do peso seco (CHISTI, 2007) e são compostos de lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios) e lipídios não polares (hidrocarbonetos, esteróis, ácidos graxos livres e acilgliceróis) (MARKOU E NERANTZIS, 2013). Mudanças nas condições de cultivo, como deficiência de nitrogênio, altas temperaturas e alta salinidade alteram o metabolismo nas microalgas aumentando o acúmulo de lipídios (D'ALESSANDRO E ANTONIOSI FILHO, 2016; CHEW et al., 2017)

Os lipídios produzidos por microalgas apresentam diversas aplicações como a produção de biodiesel, na nutrição animal e na indústria farmacêutica e de alimentos (BELLOU et al., 2014). Os lipídios produzidos por microalgas apresentam composição rica em ácidos graxos essenciais como ácido alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosa-hexanóico (DHA) (Markou e Nerantzis, 2013). A maioria dos estudos sobre lipídios de microalgas tem como foco a produção de biodiesel e a produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) (CHEW et al., 2017).

1.3.2 Metabólitos Secundários

1.3.2.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis e geralmente tem coloração amarela, laranja ou vermelha e são considerados como pigmentos acessórios. A maioria apresenta estrutura básica de 40 carbonos, formado a partir de unidades de isoprenóides com 5 carbonos. São divididos em dois principais grupos, baseados na constituição molecular: carotenoides (não oxigenados) e xantofilas (oxigenadas) (GONG E BASSI, 2016). A presença de ligações duplas conjugadas permite que os carotenoides aceitem elétrons de espécies reativas, neutralizando os radicais livres (ZULUAGA et al., 2017)

Os principais carotenoides presentes nas microalgas são: β -caroteno, astaxantina, zeaxantina, violaxantina e luteína. Os carotenoides apresentam alta atividade antioxidante e são utilizados como aditivos em cosméticos, alimentos, ração animal e também como suplementos alimentares. Por apresentarem estabilidade são utilizados como corantes naturais. Os pigmentos microalgais mais estudados são o β -caroteno, luteína, ficocianina e astaxantina (MARKOU E NERANTZIS, 2013; AMABATI et al., 2018).

Muitas espécies de microalgas são conhecidas por acumular carotenoides, no entanto, as espécies mais estudadas são *D. salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e *C. vulgaris*, devido a capacidade de produção em escala industrial (MARKOU E NERANTZIS, 2013; D'ALESSANDRO E ANTONIOSI FILHO, 2016). Em condições adversas de cultivo *D. salina* pode acumular até 13 % de sua

biomassa seca em β -caroteno e *H. pluvialis* de 2 a 3 % em astaxantina (IBAÑEZ E CIFUENTES, 2012).

Os carotenoides são notadamente conhecidos por sua alta atividade de pró-vitamina A, que é essencial para a visão e o funcionamento adequado do sistema imunológico (DE JESUS RAPOSO *et al.*, 2013). Recentemente, diversos estudos têm avaliado o potencial antioxidante dos carotenoides e sua capacidade em prevenir o câncer, envelhecimento, doenças coronárias e degenerativas (IBAÑEZ E CIFUENTES, 2012; RAPOSO *et al.*, 2015). Os carotenoides protegem as células do estresse oxidativo por serem agentes quelantes do oxigênio singlete molecular e por sequestrar radicais livres (MICHALAK E CHOJNACKA, 2015).

1.3.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura vários anéis aromáticos característicos, tendo como substituintes hidroxilas. Esta classe de compostos apresenta grande diversidade química e é um dos metabólitos secundários mais importantes. Podem ser divididos em diversos grupos de acordo com o número de subunidades fenólicas: fenóis simples, quinonas, xantonas, cumarinas, flavonoides, taninos e lignina (VERMERRIS E NICHOLSON, 2006; ALDRED *et al.*, 2009).

São conhecidos mais de 8000 compostos fenólicos que apresentam diversas funções biológicas sendo atividade antioxidante a mais importante e estudada. Estes compostos atuam como sequestradores de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio que são formados no metabolismo celular. O aparecimento de doenças como câncer, aterosclerose, Alzheimer, Parkinson e doenças cardiovasculares estão relacionadas com o estresse oxidativo causado pelos radicais livres. Dessa forma, os compostos fenólicos apresentam propriedades farmacológicas, bioquímicas e medicinais que podem contribuir na prevenção das doenças acima citadas (FREILE-PELEGRÍN E ROBLEDO, 2013; RICO *et al.*, 2017).

As diferenças no conteúdo fenólico e composição entre algas têm aspectos taxonômicos, ecológicos e ambientais. Comumente caracterizados como compostos produzidos como resultado de uma condição particularmente estressante, os fenólicos estão envolvidos em mecanismos de proteção química contra agentes estressores abióticos, como a radiação, salinidade e concentração de nutrientes do cultivo (FREILE-PELEGRÍN E ROBLEDO, 2013).

A presença de flavonoides nas microalgas *H.pluvialis*, *C.vulgaris*, *Tetraselmis suecia*, *A.platensis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Diacronema lutheri* e *Porphyridium purpureum* foi reportada por Goiris et al., (2014). Foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas significativas entre as espécies estudadas. Em todas as espécies foi verificada a presença de floroglucionol, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e apigenina. A maior diversidade de flavonóides foi detectada nas microalgas *D. lutheri* e *H. pluvialis*.

1.3.2.3 Fitoesteróis

Os esteróis são triterpenoides tetracíclicos biossintetizados por todos os organismos eucariontes (VOLKMAN, 2016). O colesterol é o esteroide predominante em animais, porém raramente encontrado em plantas. Os fitoesteróis constituem uma classe de moléculas estruturalmente e funcionalmente análogas ao colesterol, porém não são biossintetizados por humanos e são principalmente encontrados nas membranas celulares de plantas e algas. Mais de 100 diferentes tipos de fitoesteróis já foram reportados e o interesse científico nestes compostos surgiu como uma consequência de seus efeitos na saúde como a redução do colesterol sanguíneo e prevenção de doenças coronarianas. São constituintes essenciais das membranas celulares, desempenhando funções importantes no controle da fluidez e permeabilidade da membrana (estabilizando as bicamadas fosfolipídicas) e na transdução de sinal, como hormônios ou precursores hormonais (LOPES et al., 2013; LUO et al., 2015).

Embora exista uma grande diversidade de fitoesteróis, os mais encontrados frequentemente na natureza são β -sitosterol, campesterol e stigmasterol (LOPES et al., 2013). Os fitoesteróis podem ser extraídos de plantas, vegetais, sementes, cereais e árvores coníferas. As algas também são fontes de fitoesteróis e podem ser encontrados em Chlorophyceae, Rhodophyceae e Phaeophyceae. As fontes mais comuns de fitoesteróis vegetais para a produção comercial são os óleos de soja, canola e de árvores coníferas. Os esteróis dessas fontes ocorrem como subprodutos do refinamento de óleos (FERNANDES E CABRAL, 2007; KALLINY E ZAWISTOWSKI, 2019).

As microalgas apresentam maior conteúdo de fitoesteróis quando comparados com fontes vegetais. Ahmed et al., (2015) reportou conteúdo de

fitoesteróis variando entre 0,4 a 2,6 % em peso seco nas espécies *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis* sp. Variando condições de cultivo pode-se atingir conteúdo de 5,1 % para a microalga *Pavlova lutheri*. Francavilla et al., (2010) encontrou conteúdo de fitoesteróis em *D. tertiolecta* e *D. salina* de 1,3 % e 0,89 % em peso seco, respectivamente. Em óleos vegetais os conteúdos de fitoesteróis varia de 0,8 a 3,22 % (em peso do óleo) em óleo de milho e arroz (LUO et al., 2015).

Considerando que os conteúdos de fitoesteróis em peso seco de microalgas são iguais ou superiores aos extraídos de plantas, verifica-se vantagens na utilização do uso da biomassa microalgal em aplicações industriais. Além disso, o cultivo de microalgas é mais rápido, econômico e sustentável quando comparado ao cultivo de plantas (LUO et al., 2015).

Os fitoesteróis são amplamente reportados na literatura por apresentarem atividades biológicas como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e anti hipercolesterolêmica (LOPES et al., 2013; KALLINY E ZAWISTOWSKI, 2019). Apesar das microalgas apresentarem uma diversidade química maior de fitoesteróis quando comparado à plantas, poucos estudos tem avaliado a atividade biológica de fitoesteróis extraídos de microalgas (LUO et al., 2015).

1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE MICROALGAS

1.4.1 Atividade Antioxidante

A biomassa microalgal é considerada uma fonte natural de antioxidantes, com potencial aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica (DE MORAIS et al., 2015). Diferentes metabólitos primários e secundários podem ser utilizados como agentes antioxidantes, entre estes carotenoides, compostos fenólicos, polissacarídeos e ácidos graxos poli-insaturados (MAADANE et al., 2015).

As microalgas apresentam uma grande biodiversidade, porém a atividade antioxidante ainda é pouco explorada. Diversos compostos são sintetizados com uma diversidade química maior do que a encontrada em plantas e apresentam grande potencial para substituir os antioxidantes sintéticos (LI et al., 2007).

A atividade antioxidante das microalgas não é atribuída somente a um grupo de compostos químicos. Geralmente a atividade antioxidante não apresenta uma correlação linear com o conteúdo de carotenoides ou compostos fenólicos e sim existe

efeito sinérgico dos compostos na atividade antioxidante da biomassa microalgal (LI et al., 2007; GOIRIS et al., 2012; BANSKOTA et al., 2018).

1.4.2 Atividade Antimicrobiana

Antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas que podem ser classificados como bactericidas/fungicidas, quando causam a morte celular, ou bacteriostáticos/fungistáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (PANKEY E SABATH, 2004).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARAES et al., 2010).

A resistência bacteriana ocorre como resposta dos microrganismos frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma natural consequência da habilidade da população bacteriana de se adaptar (SANTOS, 2004; VON NUSSBAUM et al., 2006).

O tratamento das infecções bacterianas está cada vez mais difícil e em alguns casos impossível de ser tratado. A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial. O número de relatórios sobre falhas terapêuticas e custos com tratamento de infecções aumentam anualmente. Fatores que tem favorecido a resistência à antibióticos são o uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos, más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunodeprimidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas (VON NUSSBAUM et al., 2006).

Dessa forma, é necessária a busca constante de novos agentes antibióticos. Pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à nova diversidade química (GUIMARAES et al., 2010). Microrganismos fotossintéticos representam uma fonte potencial de antibióticos por produzirem uma grande variedade de metabólitos primários e secundários com comprovada ação

antibacteriana e antifúngica, como pode ser observado na TABELA 3. Embora as microalgas apresentem a capacidade de sintetizar compostos com ação antibacteriana, os estudos nesta área ainda são incipientes (AMARO et al., 2011)

A atividade antimicrobiana de microalgas é atribuída a compostos químicos pertencentes a diferentes classes e incluem fenóis, ácidos graxos, pigmentos, terpenos, indol, proteínas, polissacarídeos e hidrocarbonetos halogenados voláteis (PRADHAN et al., 2014; DE MORAIS et al., 2015; PINA-PEREZ et al., 2017).

A quantidade de estudos que reportam microalgas como produtoras de substâncias antimicrobianas é baixo quando comparados aos estudos com plantas, bactérias e fungos (SENHORINHO et al., 2015; FU et al., 2017). As microalgas apresentam vantagens como potenciais produtoras de novos antibióticos: apresentam uma diversidade genética pouco explorada, podem ser cultivados em larga escala em meios de cultivo de baixo custo e alterações das condições ambientais de cultivo (salinidade, iluminação, nutrientes) podem aumentar a produção dos compostos de interesse (AREMU et al., 2015).

As microalgas apresentam potencial aplicação na indústria de alimentos e na produção de ração animal. Extratos livres de células de microalgas estão sendo testados como aditivos em alimentação humana e animal, com o objetivo de substituir antimicrobianos sintéticos (AMARO et al., 2011). Os compostos antimicrobianos de microalgas também podem ser aplicados em filmes biodegradáveis para o acondicionamento de alimentos (SHANNON E ABU-GHANNAM, 2016).

1.5 CONCLUSÕES

As microalgas apresentam um potencial biotecnológico ainda pouco explorado. Os metabólitos primários e secundários produzidos possuem comprovada ação antimicrobiana e antioxidante e podem ser uma alternativa aos aditivos químicos e aos antibióticos existentes no mercado.

As microalgas podem apresentar metabolismo fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. Devido a essa diversidade metabólica, as microalgas podem ser utilizadas na produção de diferentes bioprodutos de alto valor agregado como lipídeos, proteínas, pigmentos e carboidratos. O cultivo mixotrófico de algumas espécies de microalgas permite a exploração da síntese de enzimas muito utilizadas pela indústria de alimentos como a β -galactosidase.

Por serem micro-organismos fotossintéticos, sequestradores e fixadores de carbono o cultivo da biomassa microalgal é um processo sustentável e a biomassa produzida é fonte de moléculas biológicas de alto valor agregado.

TABELA 3 - COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS DE DIFERENTES MICROALGAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E OS MICRORGANISMOS INIBIDOS

continua

Microalga	Composto antimicrobiano	Método de extração	Microorganismos inibidos	Referência
<i>Nannochloropsis oculata</i> <i>Tetraselmis suecica</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Coccolithus pelagicus</i> <i>Cricosphaera elongata</i> <i>Ochrosphaera neapolitana</i> <i>Desmoccocus olivaceus</i> <i>Chlorella minutissima</i> <i>Scenedesmus</i> sp.	Extrato hexanólico, não foi realizada análise de composição do extrato.	Biomassa úmida foi extraída com metanol e posteriormente com hexano por 20 min e depois o extrato foi filtrado.	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	(Kellam e Walker, 1989)
<i>D. salina</i>	Extrato etanólico, não foi realizada análise de composição do extrato.	Biomassa seca foi extraída com etanol (100 %) por 2 h e centrifugado. O extrato foi purificado em coluna cromatográfica C18	<i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas syringiae</i> , <i>Alternaria</i> sp	(Ordög et al., 2004)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	PUFAs, Neofitadieno, derivados indólicos, β -ionona Ácidos Graxos de cadeia curta	Extração sub e supercrítica com CO ₂ por 100 min	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus niger</i>	(Mendiola et al., 2008)
<i>Synechocystis</i> sp.	Ácido mirístico (C14:0) e palmitoleico (C16:1), zeaxantina e clorofila	Extração pressurizada da biomassa seca com etanol e hexano por 20min nas temperaturas de 50, 100, 150 e 200 °C	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> e <i>A. niger</i>	(Santoyo et al., 2009)
<i>Chlorococcum humicola</i>	β -caroteno, clorofila a e b, ácido caprílico (C8:0)	Extração pressurizada da biomassa seca com etanol, hexano e água por 20 min nas temperaturas de 50, 100, 150 e 200 °C Pigmentos: extração da biomassa seca com acetona (80 %) Ácidos graxos: extração da biomassa úmida com benzeno e acetato de etila (1:2 m/v)	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	(Plaza et al., 2010)
<i>C. vulgaris</i>	Neofitadieno, fitol, fitoesteróis e ácidos graxos	Extração pressurizada da biomassa seca com etanol, acetona e água por 20 min nas temperaturas de 50, 100, 150 e 200 °C	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i>	(Bhagavathy et al., 2011)
			<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> e <i>A. niger</i>	(Plaza et al, 2012)

TABELA 3 - COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS DE DIFERENTES MICROALGAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E OS MICRO-ORGANISMOS INIBIDOS

Microalga	Composto antimicrobiano	Método de extração	Micro-organismos inibidos	Referência
<i>Anabaena sphaerica</i> <i>Chroococcus turgidus</i> <i>Oscillatoria limnetica</i> <i>A. platensis</i> <i>Synechocystis</i> sp., <i>Anabaena</i> sp., <i>Arthrospira</i> <i>fusiformis</i> , <i>Porphyridium</i> <i>aeruginosum</i> e <i>Porphyridium</i> <i>cruentum</i>	Carboidratos, pigmentos e quercitina Ácidos graxos (AG), exopolissacarídeos (EPS)	Biomassa seca foi extraída com metanol e posteriormente com água EPS: extração do cultivo com etanol (1:3) AG: extração da biomassa com etanol (1:20 m/v) quente por 30min. Após foi realizada a transesterificação com KOH em etanol (96 %) por 2h Biomassa seca foi extraída com metanol (70 %) por maceração e centrifugada	<i>E. coli</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium <i>B. cereus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i>	(Abdo et al., 2012) (Najdenski et al., 2013)
<i>A. platensis</i>	SFA, PUFA's e hidrocarbonetos		<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	(Hetta et al., 2014)
<i>D. salina</i>	Ácidos Graxos (C16:0) e extratos etanólico e hexanólico	AG: extração da biomassa seca com clorofórmio e metanol (2:1 v/v) e após realizada a transesterificação com NaOH e BF ₃ em metanol Extratos: extração da biomassa seca em hexano e sonicado em banho de ultrassom	<i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>C. albicans</i>	(Cakmak et al., 2014)
<i>Moorea</i> sp.	Malingamida C, I e J Isomanlingamida Antillatoxina Laxaficina	Biomassa seca foi extraída com diclorometano e metanol/isopropanol (50:50 v/v) e purificado em CLAE coluna C18	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> e <i>S. aureus</i>	(Dussault et al., 2016)
<i>Senedesmus intermedius</i>	Ácido palmítico (C16:0)	Biomassa seca foi extraída com clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e a fração lipídica recuperada	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	(Davoodbasha et al., 2018)

FONTE: A autora (2019)

conclusão

CAPÍTULO 2 – CULTIVO MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE β - GALACTOSIDASE

Este capítulo foi publicado na forma de artigo na revista Journal of Applied Phycology: Zanette, C.M., Mariano, A.B., Yukawa, Y.S., Mendes, I., Spier, M.R. Microalgae mixotrophic cultivation for β -galactosidase production. J Appl Phycol (2019). <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1720-y> (ANEXO 1)

RESUMO

As microalgas apresentam um potencial biotecnológico pouco explorado assim como a habilidade de metabolizar diferentes fontes de carbono em cultivo mixotrófico. Considerando a necessidade de processos industriais de baixo custo e eficientes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de microalgas e cianobactérias de produzir β -galactosidase intra e extracelular. Oito espécies dos gêneros Chlorophyta e Cyanophyta foram cultivados em condições mixotróficas utilizando lactose como fonte de carbono. *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella minutissima* e *Nannochloropsis oculata* foram capazes de crescer sob condições mixotróficas, apresentando produção de biomassa e taxas de crescimento maiores do que as culturas fotoautotróficas. A produção extracelular de β -galactosidase foi de $33,5 \text{ U L}^{-1}$ no 11º dia de cultivo para *D. tertiolecta*. Para *N. oculata* e *C. minutissima*, os valores foram 29,6 e $11,02 \text{ U L}^{-1}$ no 14º e 7º dias de cultivo, respectivamente. Este estudo demonstra a habilidade das microalgas em hidrolisar a lactose em regime mixotrófico e o grande potencial para produção de biomassa e de β -galactosidase.

Palavras-chave: micro-organismos fotossintetizantes, enzimas, lactose, β -galactosidase

2.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são um grupo versátil e diverso de micro-organismos encontrados em uma ampla variedade de habitats, porém poucas espécies são utilizadas para o benefício humano (ODJADJARE et al., 2015). As aplicações biotecnológicas das microalgas são diversas: nutrição humana e animal, aquicultura, tratamento de águas residuais, biofertilizantes, produção de biocombustíveis e

indústrias cosméticas e farmacêuticas. As microalgas são fonte de compostos bioativos, como antioxidantes, compostos antimicrobianos, ácidos graxos poli-insaturados, pigmentos (clorofila, astaxantina, β -caroteno e ficocianina), polissacarídeos e enzimas (PULZ E GROSS, 2004; SATYANARAYANA *et al.*, 2011; BOROWITZKA, 2013; PINA-PÉREZ *et al.*, 2017). Embora muitas cepas de microalgas sejam cultivadas em todo o mundo para diferentes fins, apenas a cianobactéria *Arthrospira* e as microalgas verdes *Chlorella*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são usadas para a produção industrial de biomassa (BENEMANN *et al.*, 2018).

Atualmente, o cultivo fotoautotrófico é o principal método usado para a produção de biomassa de algas em larga escala (BENEMANN *et al.*, 2018). No entanto, o cultivo fotoautotrófico em fotobiorreatores apresenta produção limitada de biomassa e requer longos períodos de cultivo (CERON GARCIA *et al.*, 2006). Devido a essas limitações, nos últimos anos, além do cultivo fotoautotrófico, foram desenvolvidos estudos que destacam o cultivo heterotrófico e mixotrófico para esses micro-organismos (ANGELO *et al.*, 2014). No cultivo mixotrófico, CO₂ e carbono orgânico são simultaneamente assimilados, e ambos os metabolismos respiratório e fotossintético ocorrem (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). As vantagens do cultivo mixotrófico são: menor exigência de irradiância, menores custos de produção e maior produtividade em biomassa quando comparado ao cultivo fotoautotrófico (CERON GARCIA *et al.*, 2006; LI, T. *et al.*, 2014). Embora o cultivo mixotrófico possa ser eficiente, existem algumas limitações. Apenas um pequeno grupo de espécies é capaz de utilizar o carbono orgânico como substrato, pode ocorrer a contaminação por bactérias e fungos, e é possível a inibição do crescimento pelo excesso de substrato orgânico (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011; PIRES, 2015).

A glicose é o monossacarídeo mais estudado no metabolismo mixotrófico (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). O uso de glicose pelos gêneros *Arthrospira*, *Chlorella*, *Nannochloropsis* e *Scenedesmus* foi relatado por Cheirsilp e Torpee, (2012) e Chojnacka e Zielińska, (2012). No entanto, poucos estudos relataram a assimilação de dissacarídeos como lactose por microalgas. Algumas das espécies relatadas são *Tetradismus obliquus*, *Arthrospira platensis* e *Neochloris oleoabundans* (GIRARD *et al.*, 2014; VIEIRA SALLA *et al.*, 2016). A assimilação da lactose pela microalga requer a síntese da β -galactosidase (β -D- galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23), que hidrolisa os resíduos de D-galactosil dos oligossacarídeos.

As microalgas apresentam um potencial inexplorado para sintetizar enzimas para diversas aplicações industriais (BRASIL et al., 2017). O ambiente aquático apresenta características únicas, como alta salinidade, baixa temperatura e condições especiais de iluminação, que podem contribuir para as diferenças significativas entre enzimas de microalgas e enzimas homólogas de leveduras e bactérias (ZHANG E KIM, 2010).

A principal aplicação industrial da β -galactosidase tem sido a hidrólise da lactose no leite e produtos lácteos (HUSAIN, 2010). A indústria demanda cada vez mais por enzimas novas, melhoradas, versáteis, juntamente com processos de produção sustentáveis e econômicos. Portanto, este estudo explorou o cultivo mixotrófico de *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetrasselmis gracilis*, *A. platensis*, *Synechococcus subsalsus* e *Scenedesmus ecornis* para produção de β -galactosidase. As espécies estudadas incluem microalgas marinhas e de água doce e cianobactérias. Algumas microalgas já foram estudadas em cultivo mixotrófico, mas este é o primeiro relato sobre a assimilação de lactose por estas espécies. A síntese de β -galactosidase foi avaliada em condições extra e intracelulares durante o cultivo, e duas técnicas de rompimento celular foram empregados.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Espécies de microalgas e cianobactéria, meios e preparo de inóculo

As cepas *C. minutissima* (código 26a), *D. tertiolecta* (código 117), *N. oculata* (código 131), *T. gracilis* (código 72), *A. platensis* (código 159), e *Synechococcus subsalsus* (código 164) foram cedidas pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (WDCM 728). As cepas *C. vulgaris* (código 012) e *Scenedesmus ecornis* (código 088) foram doadas pela Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835).

Os cultivos de *N. oculata*, *T. gracilis*, *A. platensis* e *S. subsalsus* foram mantidos em meio líquido em água do mar artificial enriquecida com nutrientes f/2 (GUILLARD, 1975). *C. vulgaris*, *C. minutissima* e *S. ecornis* foram mantidas em meio Bold's Basal Medium (ANDERSEN, 2005) e *D. tertiolecta* no meio Johnson's modificado (0,4 M NaCl) (BOROWITZKA, 1998).

Cada cepa foi cultivada em erlemmeyers de 500 mL de capacidade contendo 125 mL do meio de cultivo em condições assépticas e axênicas e sob regime fotoautotrófico. Foram cultivadas em temperatura de 25 °C, intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e aeração contínua de 0,5 vvm.

2.2.2 Condições de cultivo

O cultivo mixotrófico foi realizado com proporção carbono: nitrogênio de 15:1, de acordo com o proposto na literatura para cultivo de microalgas (Silaban et al., 2014). A solução de lactose foi esterilizada separadamente por filtração (0,2 μm , Millipore) e adicionada ao meio de cultivo suplementado com telurito de potássio (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Vetec, Brasil) para as cianobactérias *A. platensis* e *S. subsalsus* e cloranfenicol (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Vetec, Brasil) para as microalgas verdes. A concentração inicial de lactose foi de $5 \pm 0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

O cultivo foi realizado em Erlenmeyers com capacidade de 1000 mL, contendo 800 mL do meio de cultivo e uma contagem inicial de $1 \times 10^5 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ (dia 0) utilizando uma câmara de Neubauer para contagem. A aeração foi realizada com ar atmosférico (sem adição de CO_2) a 0,5 vvm utilizando ar filtrado (0,22 μm , Sartorius). A perda de água por evaporação foi compensada adicionando água deionizada estéril com o objetivo de manter o volume de meio inicial. A iluminação contínua foi realizada com lâmpadas fluorescentes e a intensidade luminosa foi de 70 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. O pH inicial foi de 6,5 e a temperatura foi mantida em $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. O experimento foi realizado por 14 dias.

O cultivo fotoautotrófico, nas mesmas condições descritas acima, sem fonte de carbono orgânico, foi realizado como controle. Condições de cultura axênica foram confirmadas durante o período de cultivo por microscopia óptica e pela técnica de espalhamento em placas contendo os meios f/2, BBM ou Johnson's modificado adicionado de ágar (15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e lactose (5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.3 Parâmetros de cultivo e determinação do pH

A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer. A velocidade específica de crescimento (μ) dos cultivos foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_2}{t_1 - t_2} \quad (1)$$

Em que N_1 e N_2 são as concentrações celulares no início (dia 0, t_1) e no final do período de cultivo (dia 14, t_2), respectivamente.

A biomassa seca foi determinada por filtração utilizando filtros GF/F (0,7 μ m, Macherey- Nagel, Alemanha). A amostra foi previamente centrifugada (1800 x g, 10 min). As células foram lavadas com solução de bicarbonato de sódio (0,5 M) e o sobrenadante descartado para evitar a interferência dos sais na quantificação da biomassa. Os filtros foram secos em estufa à 60 °C até peso constante (ZHU E LEE, 1997).

O rendimento de biomassa em função do substrato ($Y_{X/S}$) foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$Y_{X/S} = \frac{C_X - C_{X0}}{C_{S0} - C_S} \quad (2)$$

O rendimento de produto em função do substrato (lactose) foi calculado utilizando a Equação 3:

$$Y_{P/S} = \frac{C_P - C_{P0}}{C_{S0} - C_S} \quad (3)$$

Em que C_S é a concentração de lactose, C_X é a concentração celular, C_P é a concentração de β -galactosidase (U L⁻¹) e C_{S0} , C_{X0} e C_{P0} são os valores iniciais (tempo 0) (KATOH E YOSHIDA, 2009; DORAN, 2013). Os rendimentos foram calculados entre os dias 0 e 14° de cultivo. O pH foi monitorado durante o cultivo utilizando um pHmetro (Lucadema, Brasil).

2.2.4 Rompimento celular

As células foram primeiramente centrifugadas 1800 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi testado para a produção de β -galactosidase extracelular. A biomassa

foi lavada em tampão fosfato com concentração de 1 mM ou 200 mM (pH 6,8) e ressuspendida no mesmo tampão. Finalmente, dois métodos de rompimento celular foram testados individualmente: sonicação e pérolas de vidro.

Para o rompimento com pérolas de vidro, 1,5 mL da suspensão contendo a biomassa microalgal foi agitada em vórtex em tubos Falcon contendo 0,6 g mL⁻¹ de pérolas de vidro (1 mm de diâmetro) por 5 minutos seguido de resfriamento em banho de gelo. Foram realizados 3 ciclos, totalizando 15 minutos.

O rompimento por sonicação foi realizado utilizando 50 mL da suspensão em processador ultrasônico (400 W, 20 kHz, UIP 500hdT, Hielscher, Alemanha) por 30 segundos seguido de resfriamento em banho de gelo por 30 segundos. As etapas foram repetidas por 15 ciclos. As amostras foram mantidas em temperatura inferior à 15°C durante o processo de rompimento celular.

A suspensão contendo as células rompidas foi centrifugada (1800 x g por 10 min) e atividade enzimática intracelular foi avaliada a partir do sobrenadante livre de células.

2.2.5 Determinação da eficiência do rompimento celular

Após o rompimento celular as células foram observadas em microscópio ótico (Olympus, CX22, Japão) para determinar a eficiência das técnicas empregadas. Foram contabilizadas as células intactas utilizando câmara de Neubauer. Apenas as células não danificadas foram contadas como intactas. A eficiência (%) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$E = \frac{C_0 - C}{C} \times 100 \quad (4)$$

2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Foi realizada a observação morfológica das células microalgais antes e após o rompimento celular. As amostras foram fixadas em glutaraldeído (2,5 % v·v⁻¹) em tampão fosfato (pH 7,5) por 1h. Após a fixação 500 µL foram filtrados em membrana de polycarbonato (1µm, Nucleopore, Whatman) em seguida lavada com tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) por 3 vezes. Após a lavagem, as células foram desidratadas

com diferentes soluções de etanol (30 %, 50 %, 75 %, 95 %) em tampão fosfato por 3-5 minutos em cada concentração. Em seguida as amostras foram submetidas ao ponto crítico, metalização com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA 3) no Centro de Microscopia eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME-UFPR).

2.2.7 Atividade enzimática da β -galactosidase

A atividade enzimática da β -galactosidase foi realizada conforme metodologia do Food Chemical Codex (1981) com algumas modificações. Orto-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG, Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado como substrato sintético para a análise de atividade enzimática. A atividade foi quantificada pela hidrólise do ONPG em concentrações de 13, 40 e 82 mM preparadas em tampão fosfato em concentrações de 1, 100 e 200 mM. O pH do tampão foi ajustado de acordo com o pH do sobrenadante livre de células (extrato enzimático). Em seguida, 500 μ L do extrato enzimático foram incubados com 2,5 mL do substrato ONPG à 30°C por 15 min. A reação foi interrompida com adição de 1mL de solução de carbonato de sódio 0,1M. Foi realizada a leitura da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a curva padrão de o- nitrofenol (ONP). A unidade de atividade enzimática (U_{ONP}) foi definida como a quantidade de ONP (μ mol $\cdot$ min⁻¹) liberada nas condições do ensaio. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.8 Determinação da concentração de carboidratos no meio de cultivo

As concentrações de glicose, galactose e lactose no meio de cultivo foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent 1260 equipado com detector de índice de refração (G1362A RID) e coluna Sodex KS-801. Foi realizada eluição isocrática utilizando água ultrapura como eluente e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 50 μ L e a temperatura da coluna de 82 °C. O tempo de corrida foi de 16 minutos. Os açúcares foram identificados pelo tempo de retenção a concentração foi calculada pela área do pico.

2.2.9 Análise estatística

Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram submetidos aos testes de Anderson-Darling e Levene para analisar o ajuste dos resíduos à distribuição normal e à homogeneidade das variâncias. Significâncias estatísticas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e os valores médios foram comparados com o teste de Tukey usando o software Microsoft Excel (versão 2016). Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Seleção das espécies de microalgas

As espécies *A. platensis* e *S. ecoris* sofreram dano celular permanente durante o cultivo mixotrófico, ocorrendo 70 % de morte celular após 3 dias. *Tetraselmis gracilis*, *S. subsalsus* e *C. vulgaris* apresentaram um pequeno aumento na contagem celular atingindo 8×10^5 células·mL⁻¹ após 14 dias de cultivo. No cultivo fotoautotrófico as espécies apresentaram contagens superiores (2×10^6 a 8×10^6 células·mL⁻¹) quando comparadas aos cultivos mixotróficos. Os resultados demonstram que as espécies *A. platensis*, *S. ecoris*, *T. gracilis*, *S. subsalsus* e *C. vulgaris* não são capazes de se desenvolver em regime mixotrófico com lactose como fonte de carbono.

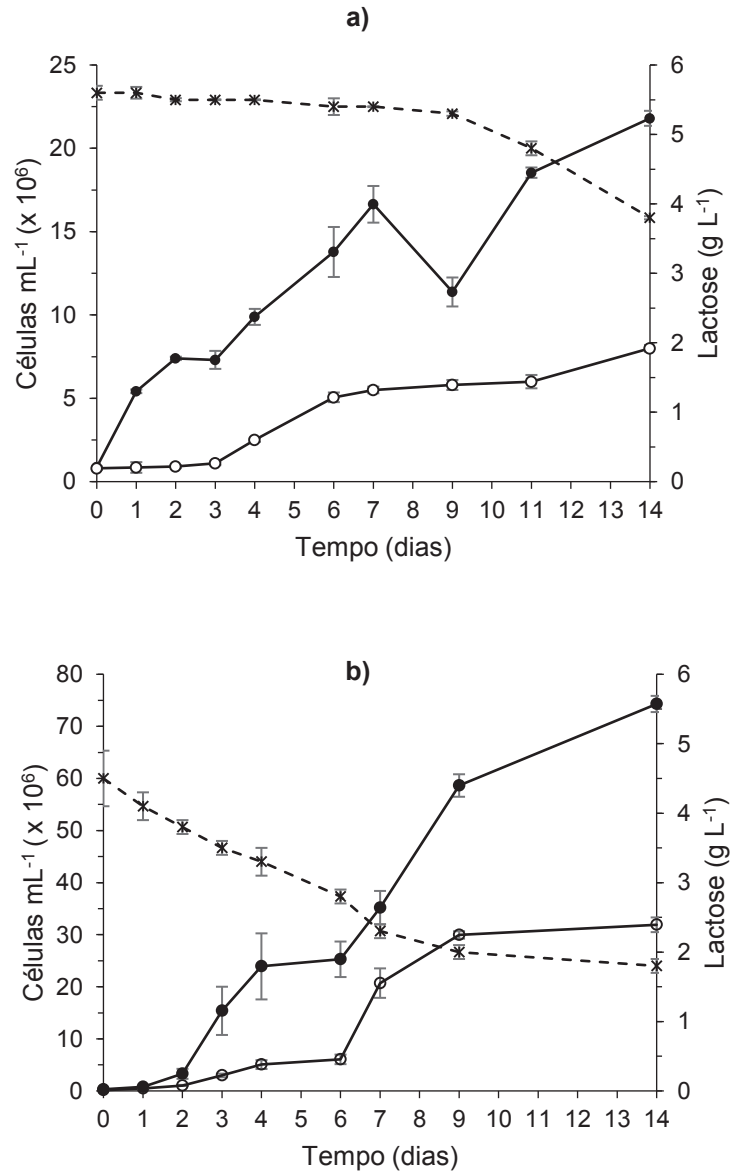
Chlorella minutissima, *D. tertiolecta* e *N. oculata* apresentaram crescimento celular em regime mixotrófico estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao cultivo fotoautotrófico (FIGURA 2). *Nannochloropsis oculata* apresentou contagem celular de $7,44 \times 10^7$ células·mL⁻¹ ao término do cultivo (14 dias), seguido por *C. minutissima* com $2,18 \times 10^7$ células·mL⁻¹ e *D. tertiolecta* $1,57 \times 10^7$ células·mL⁻¹.

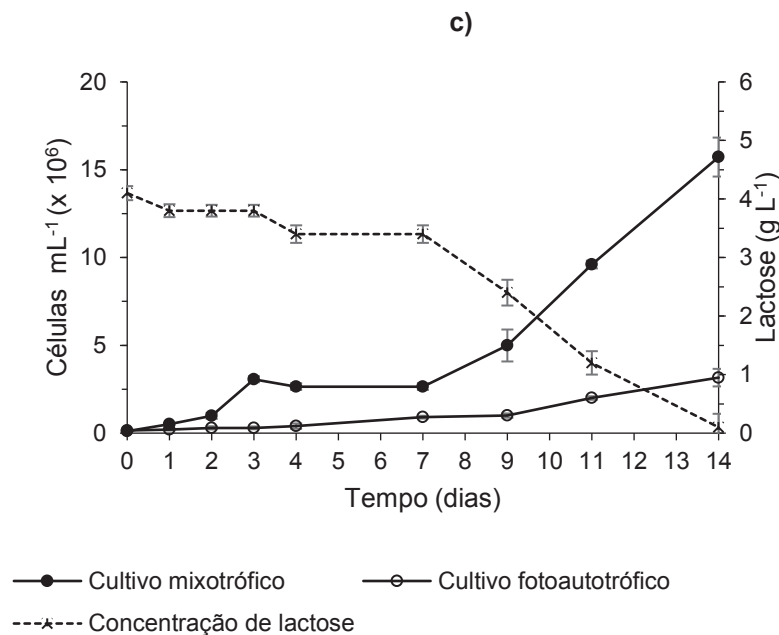
2.3.2 Parâmetros cinéticos do cultivo mixotrófico

A concentração inicial de lactose diminuiu no meio durante o cultivo das três espécies estudadas (FIGURA 3). *Dunaliella tertiolecta* apresentou maior consumo de lactose, foi observado redução de 97,7 % da concentração inicial ao final do período de cultivo. *Nannochloropsis oculata* apresentou 60 % de redução e *C. minutissima*

32,1 %. As concentrações de glicose e galactose mantiveram-se abaixo de $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em todos os períodos analisados, indicando que as microalgas metabolizaram estes monossacarídeos.

FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO DE **A)** *C. MINUTISSIMA*, **B)** *N. OCULATA*, **C)** *D. TERTIOLECTA* EM CULTIVO MIXOTRÓFICO E FOTOAUTOTRÓFICO E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE





FONTE: A autora (2019)

A velocidade específica de crescimento e a biomassa seca das microalgas *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *C. minutissima* cultivadas em regime fotoautotrófico e mixotrófico estão apresentadas na TABELA 4. A maior velocidade específica de crescimento e de produção de biomassa seca foram observados nos cultivos mixotróficos. Além disso, um aumento de 8,57; 3,47 e 3,34 vezes foi observado na produção de biomassa seca quando comparados os cultivos mixotróficos e fotoautotróficos para *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *C. minutissima*, respectivamente.

O maior rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) em relação à lactose consumida foi de 0,59 g biomassa·g⁻¹ lactose observado para *D. tertiolecta* (TABELA 4). O maior rendimento em produto ($Y_{P/S}$) também foi observado para *D. tertiolecta* (8,42 U·g⁻¹ lactose)

2.3.3. Produção de β -galactosidase

A produção de β -galactosidase foi avaliada durante o cultivo das microalgas. A produção de enzima extracelular foi avaliada ao longo dos 14 dias de cultivo e a produção da enzima intracelular nos dias 7, 9, 11 e 14. Os maiores valores de atividade enzimática foram observados nas reações conduzidas com 82 mM de ONPG e tampão fosfato 1 mM para *C. minutissima* e *N. oculata* e 200 mM para *D. tertiolecta*.

Foi observada a precipitação da enzima quando as reações foram realizadas com tampão nas concentrações de 100 e 200 mM.

Dunaliella tertiolecta apresentou a maior atividade enzimática extracelular ($p < 0,05$) quando comparado com *N. oculata* e *C. minutissima*. O maior valor verificado para *D. tertiolecta* foi de $33,5 \pm 0,24 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ no 11º dia de cultivo. Para *N. oculata* e *C. minutissima* os valores encontrados foram $29,6 \pm 0,49$ e $11,02 \pm 0,62 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ no 14º e 7º dia de cultivo, respectivamente (FIGURA 4). Foi observado aumento do pH durante o cultivo; para a microalga *C. minutissima* o aumento foi observado a partir do 3º dia sendo que ao final do cultivo o pH foi de 10,28. O aumento do pH dos cultivos de *D. tertiolecta* e *N. oculata* foi menor atingindo valores de 7,13 e 8,35, respectivamente, nos quais os picos de atividade enzimática foram observados.

TABELA 4- PARÂMETROS CINÉTICOS DOS CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS (FOTO) E MIXOTRÓFICO (MIXO) DAS MICROALGAS *D. TERTIOLECTA*, *N. OCULATA* E *C. MINUTÍSSIMA* E EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR

		μ (dia ⁻¹)	X _{máx} ^a (g·L ⁻¹)	Y _{X/S}	Y _{P/S}	% eficiência rompimento	
				(g	(U·g ⁻¹	celular	
				biomassa·g ⁻¹	substrato)	Pérolas	Sonicação
				substrato) ^b	^b	de vidro	
D.	Mixo	0,35 ± 0,04	2,4 ±0,1	0,59	8,42	93,4 ± 7,4	100 ± 0,0
tertiolecta	Foto	0,21 ± 0,03	0,28 ±0,1	-	-	-	-
N. oculata	Mixo	0,38 ± 0,05	1,46 ±0,03	0,53	4,7	64,7 ± 7,5	76,8 ± 2,5
	Foto	0,29 ± 0,1	0,42 ±0,07	-	-	-	-
C.	Mixo	0,28 ± 0,05	1,07 ±0,03	0,57	5,87	70,0 ± 0,8	84,2 ± 3,9
minutissima	Foto	0,16 ± 0,02	0,32 ±0,01		-	-	-

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3)

^a Biomassa seca ao final do cultivo

^b Rendimento de biomassa e de produto baseados no consumo de lactose

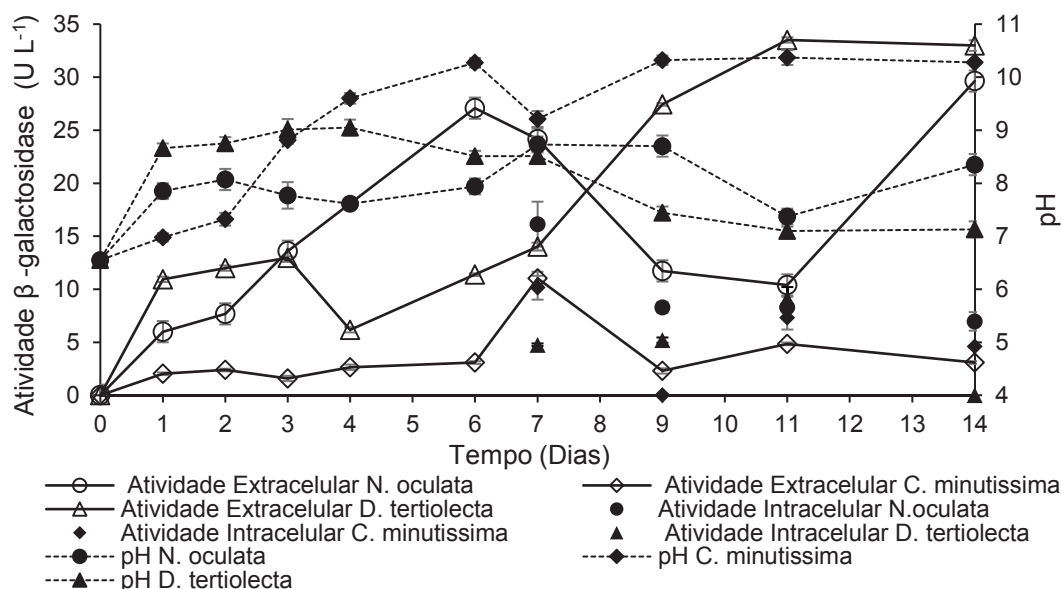
- Não pode ser determinado

FONTE: A autora (2019)

Na quantificação da produção de β - galactosidase intracelular, realizada após o rompimento celular, não foi observada diferença estatística significativa entre as amostras rompidas por sonicação ou pérolas de vidro. Os resultados da atividade intracelular (FIGURA 4) são apresentados como média dos tratamentos. Os maiores

valores de atividades encontrados foram de $16,13 \pm 2,1$ e $10,14 \pm 1,12 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ para *N. oculata* e *C. minutissima*, respectivamente.

FIGURA 4 – PRODUÇÃO EXTRACELULAR E INTRACELULAR DE β -GALACTOSIDASE E ALTERAÇÕES NO PH DURANTE O CULTIVO MIXOTRÓFICO



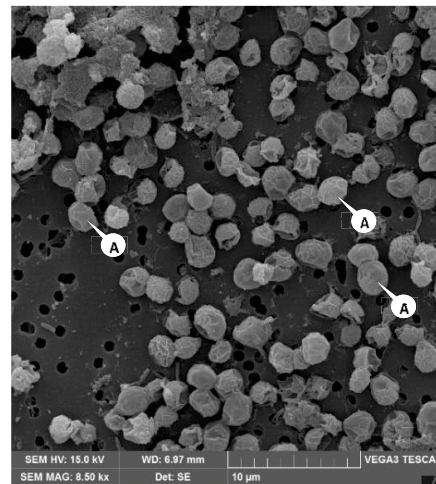
FONTE: A autora (2019)

2.3.4 Rompimento celular

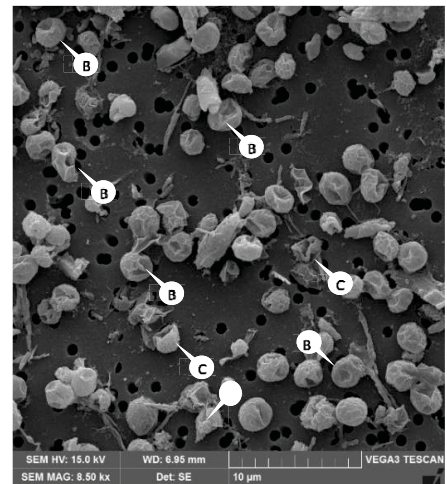
A sonicação apresentou maior eficiência no rompimento celular das três espécies estudadas quando comparado ao rompimento por pérolas de vidro. Para *D. tertiolecta* todas as células foram rompidas após o tratamento de ultrassom por 5 ciclos (5 minutos). Para *N. oculata* e *C. minutissima*, 10 e 15 ciclos foram necessários para obter eficiência de 84,2 e 76,8 %, respectivamente.

Os efeitos do rompimento celular por sonicação e pérolas de vidro podem ser observados pela microscopia eletrônica de varredura (FIGURAS 5, 6 e 7). Uma maior proporção de células totalmente rompidas pode ser observada nos tratamentos utilizando sonicação para as três espécies estudadas, corroborando os resultados apresentados na TABELA 4.

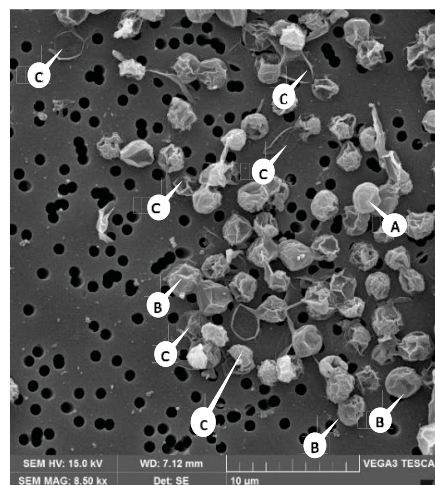
FIGURA 5 – MICROGRAFIA DAS CELULAS DE *N. OCULATA* ANTES (I) E DEPOIS DO ROMPIMENTO POR PEROLAS DE VIDRO (II) E SONICAÇÃO (III) (X 8500 DE AUMENTO). AS IMAGENS APRESENTAM CÉLULAS INTACTAS (A), CELULAS PARCIALMENTE ROMPIDAS (B) E TOTALEMNTE ROMPIDAS (C)



(I)

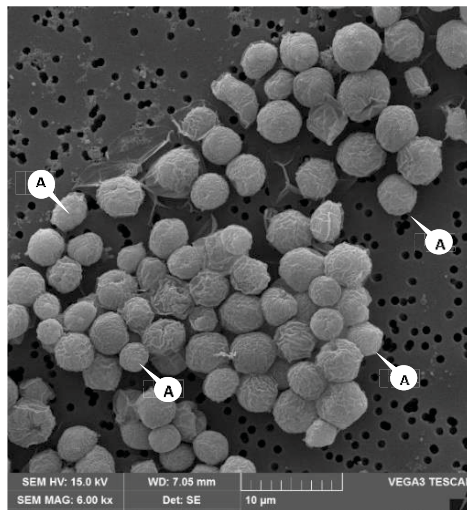


(II)

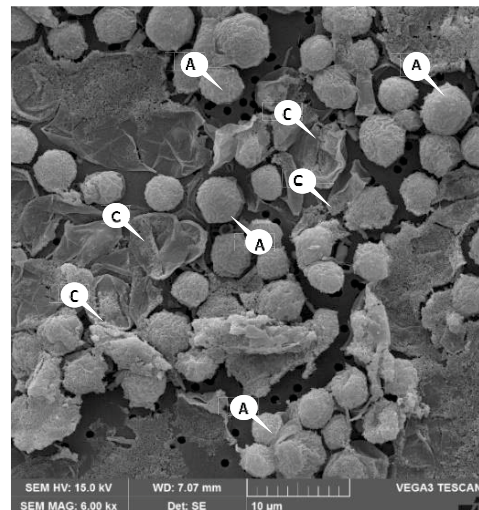


(III)

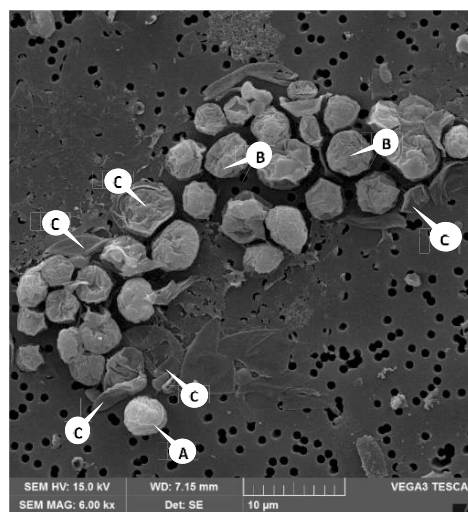
FIGURA 6 - MICROGRAFIA DAS CELULAS DE *C. MINUTISSIMA* ANTES (I) E DEPOIS DO ROMPIMENTO POR PEROLAS DE VIDRO (II) E SONICAÇÃO (III) (X 6000 DE AUMENTO). AS IMAGENS APRESENTAM CÉLULAS INTACTAS (A), CELULAS PARCIALMENTE ROMPIDAS (B) E TOTALEMNTE ROMPIDAS (C)



(I)

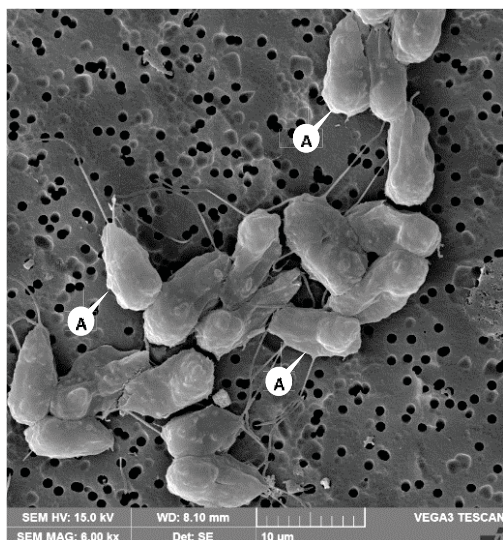


(II)

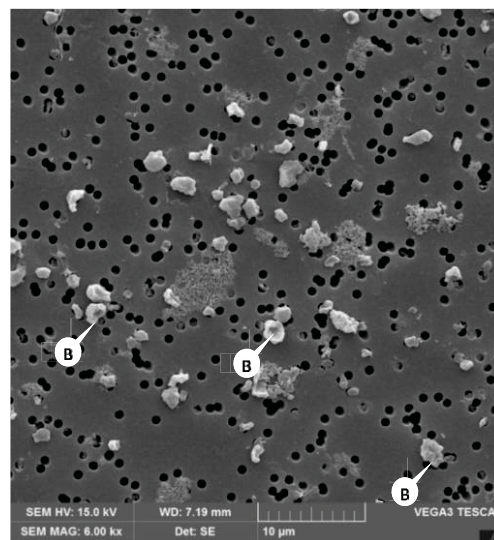


(III)

FIGURA 7 - MICROGRAFIA DAS CELULAS DE *D. TERTIOLECTA* ANTES (I) E DEPOIS DO ROMPIMENTO POR PEROLAS DE VIDRO (SONICAÇÃO (II) (X 6000 DE AUMENTO). AS IMAGENS APRESENTAM CÉLULAS INTACTAS (A) E FRAGMENTOS DE CELULAS (B)



(I)



(II)

FONTE: A autora (2019)

2.4 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou o cultivo mixotrófico de oito espécies de microalgas para a produção de β -galactosidase. Somente três espécies foram capazes de metabolizar lactose e produzir β -galactosidase. Até o presente, nenhum estudo avaliou o cultivo de *C. minutissima*, *D. tertiolecta* e *N. oculata* em meio suplementado com lactose.

Algumas espécies de microalgas são obrigatoriamente fotoautotróficas devido à falta de mecanismo de internalização de açúcares para as células e por apresentarem o ciclo incompleto do ácido tricarboxílico (CHEN E CHEN, 2006). Girard et al. (2014) avaliou o cultivo de *Chlorella* spp. em meio suplementado com lactose (5 g L⁻¹) e não observou o crescimento das espécies *C. vulgaris* e *C. protothecoides*. O mesmo resultado foi reportado por Ribeiro et al., (2017): *C. protothecoides* apresentou menor concentração de biomassa no cultivo mixotrófico suplementado com lactose quando comparado ao cultivo sem adição de açúcar.

O metabolismo microalgal geralmente se assemelha ao de plantas superiores, porém é muito menos estudado do que o metabolismo de bactérias, fungos ou plantas. Geralmente, não é possível prever qual substrato será metabolizado por cada espécie (NEILSON E LEWIN, 1974). O metabolismo mixotrófico de microalgas é

pouco explorado e os estudos são limitados a espécies como *A. platensis*, *T. obliquus*, *Chlorella* spp., e *Chlamydomonas reinhardtii* (HEREDIA-ARROYO et al., 2011). Estudos reportaram o crescimento de *T. obliquus*, *C. vulgaris* e *A. platensis* em subproduto da indústria de laticínios (ABREU et al., 2012; GIRARD et al., 2014; VIEIRA SALLA et al., 2016) como uma alternativa à produção de biomassa microalgal e o tratamento de efluentes da indústria de laticínios.

Abreu et al. (2012) reportou o cultivo de *C. vulgaris* utilizando subproduto da indústria de produtos lácteos. Os melhores resultados foram utilizando hidrolisado de soro de queijo ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de galactose e glicose) quando comparados com o soro não hidrolisado ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactose).

Uma das vantagens do cultivo mixotrófico é a maior produtividade em biomassa. Os resultados do presente estudo são similares aos reportados por Cheirsilp e Torpee, (2012), espécies de *Chlorella* de água doce e marinha e *Nannochloropsis* sp. apresentaram maior produtividade em biomassa no cultivo mixotrófico suplementado com glicose ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) quando comparado ao cultivo fotoautotrófico.

Poucos estudos avaliaram o cultivo mixotrófico de *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *C. minutissima*. Velu et al., (2015) realizou o cultivo mixotrófico de *D. tertiolecta* utilizando lactose ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como fonte de carbono e não observou diferença na velocidade específica de crescimento no cultivo mixotrófico ($\mu = 0,23 \text{ dia}^{-1}$) e fotoautotrófico ($\mu = 0,25 \text{ dia}^{-1}$). Os valores de biomassa seca da microalga *D. tertiolecta* encontrados neste estudo foram superiores quando comparados a cultivos mixotróficos suplementados com glicose. (Rizwan et al., 2014) reportou produtividade de $1,7 \text{ g}$ de biomassa seca $\cdot \text{L}^{-1}$ em cultivo mixotrófico de *D. tertiolecta* suplementado com baixas concentrações de glicose (1 e 5% $\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$). Li et al., (2014) realizou cultivo mixotrófico de *C. sorokiniana* utilizando $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose e reportou rendimento de biomassa em produto de $0,82 \text{ g}$ biomassa $\cdot \text{g}^{-1}$ glicose e produção de $3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomassa seca.

O mecanismo de utilização de dissacarídeos em algas verdes ainda não está totalmente elucidado. Os dissacarídeos precisam ser hidrolisados em monossacarídeos por uma enzima específica ou os dissacarídeos são transportados através da membrana plasmática por um carreador (ZHANG et al., 2014). A síntese de β -galactosidase pelas microalgas é necessária para a hidrólise da lactose. Esta enzima hidrolisa os resíduos D-galactosil em glicose e galactose os quais precisam

ser internalizados pela célula (GIRARD et al., 2014). O transporte de pentoses e hexoses para o citosol depende de um sistema transportador monossacarídeo/H⁺. Na microalga *C. kessleri* três genes de cotransporte H⁺/hexose foram identificados (HUP1, HUP2 e HUP3) apresentando diferentes afinidades para glicose e galactose (STADLER et al., 1995; GAO et al., 2014).

Embora os resultados da atividade enzimática da β -galactosidase das microalgas tenham sido baixos quando comparados com bactérias e leveduras (DAGBAGLI E GOKSUNGUR, 2008; CAREVIĆ et al., 2015) este é o primeiro estudo que avaliou a produção de β -galactosidase por *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *C. minutissima* em cultivo mixotrófico. β -Galactosidase foi sintetizada em meio contendo NaCl (400 mM) em pH alcalino e neutro, apresentando características diferentes das enzimas produzidas por leveduras e bactérias. β -Galactosidasas com pH ótimo neutro apresentam aplicação industrial na hidrólise da lactose em leite e soro doce (PANESAR et al., 2010). Bentahar et al., (2018) reportou a síntese de β -galactosidase por *T. obliquus* utilizando lactose como fonte de carbono e a produção máxima foi verificada no 7º dia de cultivo (86,45 U L⁻¹).

Quando comparada a outros micro-organismos para a produção de enzimas industriais, as microalgas apresentam vantagens devido ao baixo custo e a necessidade de poucos nutrientes para o cultivo (luz natural ou artificial, CO₂, água, fonte de nitrogênio e alguns sais) (BRASIL et al., 2017).

As técnicas de rompimento celular empregadas apresentaram maior eficiência no rompimento da microalga *D. tertiolecta*. As microalgas possuem diferentes tamanhos e estruturas de parede celular, fatores que influenciam diretamente a taxa de rompimento celular. *Dunaliella tertiolecta* apresenta tamanho variando de 5 a 18 μ m de comprimento e 3 a 13 μ m de largura e ausência de parede celular rígida, sendo característica do gênero (BOROWITZKA E SIVA, 2007). No caso da microalga *N. oculata* o rompimento celular é dificultado pelo pequeno tamanho da célula (2 a 5 μ m) (FIGURA 4-I) e pela composição da parede celular (SHENE et al., 2015). A parede celular é composta por uma parede interna celulósica que é protegida por uma camada hidrofóbica de algaenano (*algaenan*), que confere resistência à ruptura celular (SUKARNI et al., 2014; MONTALESCOT et al., 2015)

Os resultados reportados na literatura sobre a eficiência do rompimento por sonicação são bastante divergentes. Estudos anteriores relatados por Zheng et al., (2011) e Safi et al., (2014) apresentaram menor eficiência utilizando sonicação para

C. vulgaris quando comparada ao rompimento manual com areia de quartzo e homogeneização a alta pressão. Resultados semelhantes foram obtidos por Mcmillan et al., (2013) ao comparar diferentes métodos de rompimento celular para *N. oculata*, 67,7 % de eficiência foi observada utilizando o ultra-som.

2.5 CONCLUSÕES

O cultivo mixotrófico de *D. tertiolecta*, *C. minutissima* e *N. oculata* apresentou maior produção de biomassa e maiores velocidades de crescimento do que os cultivos fotoautotróficos. Foi observado a redução de 97,7 % na concentração de lactose para *D. tertiolecta*, 60 % para *N. oculata* e 32,1% para *C. minutissima*. A metabolização de galactose e glicose pelas microalgas no meio de cultivo também foi observada. A produção extracelular de β -galactosidase foi de 33,5 U·L⁻¹ no 11º dia de cultivo para *D. tertiolecta*. Para *N. oculata* e *C. minutissima*, os valores foram 29,6 e 11,02 U·L⁻¹ no 14º e 7º dia de cultivo, respectivamente. Embora os valores de atividade enzimática foram baixos, o cultivo mixotrófico de microalgas demonstrou um excelente potencial biotecnológico para contribuir para a produção de biomassa e biomoléculas e para utilização de coprodutos da indústria de laticínios.

CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MICROALGAS

RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana de diferentes extratos (água, etanol e hexano) da biomassa de sete espécies de microalgas. Os extratos etanólicos e hexânicos de *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis gracilis* apresentaram atividade no ensaio de difusão em poços e foram submetidos às análises de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), atividade antioxidante, quantificação de pigmentos, fenólicos e caracterização por CG-EM. Os valores de CIM variaram de 0,40 a 9,55 mg·mL⁻¹ e os extratos de *N. oculata* apresentaram os maiores valores quando comparados às outras microalgas estudadas. Quarenta compostos foram identificados por CG-EM nos extratos etanólicos e hexânico, sendo o fitol, ácidos graxos e fitoesteróis encontrados em maior proporção. Em relação à atividade antioxidante, os extratos hexânicos não apresentaram atividade nas concentrações testadas. O extrato etanólico de *T. gracilis* apresentou a maior capacidade antioxidante no ensaio ABTS⁺ e o extrato de *D. tertiolecta* no ensaio HClO. O maior conteúdo de fenólicos totais foi encontrado no extrato etanólico de *T. gracilis* contendo $4,54 \pm 0,05$ mg EAG·g bs⁻¹. Observou-se correlação significativa positiva entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais e o teor de clorofila total dos extratos etanólicos das espécies estudadas.

Palavras - chave: extração por solventes; teor fenólico; CG-EM

3.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são um grupo diverso e inexplorado de microrganismos fotossintéticos que compreende cianobactérias procarióticas e microalgas eucarióticas. Estima-se que existam 200.000 a 1.000.000 de espécies de microalgas (VENKATESAN et al., 2015). No entanto, cerca de 100.000 são mantidas em coleções de culturas mundiais e apenas cinco espécies são utilizadas para a produção industrial de biomassa (MASOJÍDEK E TORZILLO, 2014).

As microalgas são consideradas uma fonte potencial de compostos bioativos e a biossíntese desses compostos ocorre por meio de duas vias metabólicas distintas:

primária e secundária. Metabolitos primários, como carboidratos, proteínas e ácidos graxos são os principais constituintes da biomassa de microalgas. O metabolismo secundário está associado às estratégias de defesa e condições adversas de cultivo. Os metabólitos secundários são principalmente isoprenoides, glicosídeos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (RORRER, 2015, BURJA et al., 2001).

Condições extremas de cultivo como alta irradiação, salinidade, temperatura e depleção de nutrientes, estimulam a biossíntese de uma grande variedade de metabólitos secundários com estruturas químicas e atividades biológicas que geralmente não são identificados em outros organismos (DE MORAIS et al., 2015, RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2010). A crescente demanda por alimentos funcionais e a substituição de aditivos alimentares sintéticos aumentam a necessidade de pesquisas de novas fontes de compostos antibacterianos e antioxidantes naturais (SANTOYO et al., 2009).

Assim, as microalgas são de grande interesse devido à produção de uma gama diversificada de compostos fenólicos, ácidos graxos, pigmentos, polissacarídeos, alcaloides, fitoesteróis e peptídeos que apresentam atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (PINA- PÉREZ et al., 2017, SATHASIVAM et al., 2017, DE MORAIS et al., 2015).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana dos extratos (aquosos, etanólicos e hexânicos) de sete espécies de microalgas marinhas e de água doce frente à patógenos de origem alimentar. Os extratos que apresentaram inibição foram caracterizados por CG-EM. As análises de atividade antioxidante (ABTS^{•+} e HClO), quantificação de fenólicos totais e conteúdo de pigmentos também foram realizadas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Espécies de microalgas, meios e condições de cultivo

C. minutissima, *D. tertiolecta*, *N. oculata*, *T. gracilis*, e *S. subsalsus* foram cedidas pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (WDCM 728). As cepas *C. vulgaris* e *S. ecoris* foram doadas pela Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835).

Os cultivos de *N. oculata*, *T. gracilis* e *S. subsalsus*, foram mantidos em meio líquido em água do mar artificial enriquecida com nutrientes f/2 (GUILLARD, 1975). *C. vulgaris*, *C. minutissima* e *S. ecoris* foram mantidas em meio Bold's Basal Medium (ANDERSEN, 2005) e *D. tertiolecta* no meio Johnson's modificado (0,4 M NaCl) (BOROWITZKA, 1998).

O inóculo de cada cepa foi cultivado em erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 125 mL do meio de cultivo em condições assépticas e axênicas em condições fotoautotróficas a 25 °C e intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e aeração continua de 0,5 vvm. O cultivo foi realizado em Erlenmeyers com capacidade de 2000 mL, contendo 1600 mL do meio de cultivo e 10 % (v·v⁻¹) de inóculo. O pH inicial foi de 6,5. As culturas foram cultivadas nas condições descritas acima por 14 dias.

3.2.2 Preparação dos extratos

A biomassa microalgal foi separada por centrifugação (1800 x g por 10 min) e seca em estufa à 60°C por 24h. Três diferentes solventes foram utilizados para avaliação da atividade antibacteriana da biomassa microalgal. Os extratos foram preparados utilizando 1 g de biomassa seca e 10 mL de etanol anidro (Qhemis, Brasil), água deionizada ou n-hexano (99,5 %, Vetec, Brasil). As amostras foram submetidas a banho de ultra-som (36 kHz, modelo L200, Schuster, Brasil) por 30 minutos. As amostras foram continuamente agitadas *overnight* em um agitador para melhorar o processo de extração. Após a centrifugação (3.900 x g por 10 min), os extratos foram secos e o rendimento dos extratos individuais foi determinado como porcentagem do peso seco da biomassa (AREMU et al., 2015).

3.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana

Os extratos obtidos foram testados individualmente frente aos patógenos *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os patógenos foram mantidos em ágar Nutriente (BD DIFCO, EUA) à 4°C.

3.2.3.1 Método de difusão em poços

As cepas de bactérias foram reativadas em caldo Mueller-Hinton à 37°C por 24h e diluídas em solução salina (0,85 % m·v⁻¹) até concentração final de 10⁷ UFC·mL⁻¹. Trinta microlitros de cada suspensão bacteriana foram adicionados em 20 mL de ágar Nutriente (BD Difco, EUA) e distribuídos em placa de Petri (90 x15 mm). Os extratos secos de etanol e hexano foram diluídos em DMSO (P.A, Synth, Brasil) e o extrato aquoso foi diluído em água deionizada estéril, em concentração final de 10 mg·mL⁻¹. Os extratos foram filtrados em membrana 0,22 µm (Millipore, EUA).

Poços de 5 mm de diâmetro foram feitos nas placas com auxílio de ponteira estéril e 40 µL dos extratos foram adicionados. As placas foram mantidas a 4°C por 1h para promover a difusão dos extratos no ágar. Após este período, as placas foram incubadas à 37 °C por 24h. DMSO e cloranfenicol (1 mg·mL⁻¹, VETEC, Brasil) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A atividade antibacteriana foi avaliada pela medida do halo de inibição (mm) (KELLAM E WALKER, 1989).

Os extratos da biomassa microalgal que apresentaram atividade antibacteriana em ensaio de difusão em ágar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima, atividade antioxidante, quantificação de fenólicos totais e pigmentos, e caracterização por CG-EM.

3.2.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo foi utilizado de acordo com a metodologia descrita por Rodríguez-Meizoso *et al.* (2008) e Wiegand *et al.* (2008). Foi utilizado o Caldo Mueller-Hinton (MH, Kasvi, Brasil) suplementado com Tween 80 a 0,5 % (Vetec, Brasil) nos testes. Os inóculos bacterianos foram cultivados a 37 °C por 24 h e diluídos em solução salina estéril (0,85% NaCl m·v⁻¹) para obtenção de uma densidade final de 10⁷ UFC mL⁻¹. Os extratos de microalgas (etanol e hexano) foram diluídos em DMSO para atingir concentrações finais variando de 0,2 mg·mL⁻¹ a 10·mg mL⁻¹. Em cada poço foram adicionados 175 µL de caldo MH, 5 µL do inóculo bacteriano e 20 µL de diferentes diluições dos extratos de microalgas. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. O crescimento bacteriano foi confirmado pela adição de 10 µL de solução aquosa estéril (20 mg·mL⁻¹) de cloreto de trifêniltetrazólio (TTC, Inlab, Brasil) após incubação a 35 °C por 30 min. As bactérias reduzem o corante TTC de

amarelo para vermelho, indicando o crescimento bacteriano (RADAELLI et al., 2016). Os testes de MIC foram realizados em triplicata.

3.2.4 Determinação da atividade antioxidante

3.2.4.1 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS^{•+}

A capacidade dos extratos para sequestrar o cátion radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Re et al., (1999) com algumas modificações. Os extratos foram avaliados em concentrações de 125 µg·mL⁻¹, 62,5 µg·mL⁻¹ e 31,25 µg·mL⁻¹ e incubados em solução de ABTS^{•+} na ausência de luz por 30 min. A absorbância a 734 nm foi medida usando uma leitora de microplacas.

3.2.4.2 Atividade antioxidante sobre o ácido hipocloroso (HClO)

A atividade dos extratos sobre HClO foi realizada conforme Costa et al., (2004) com algumas modificações. Os extratos foram avaliados em concentrações de 125 µg·mL⁻¹, 62,5 µg·mL⁻¹ e 31,25 µg·mL⁻¹ diluídos em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) e incubados com 0,08 mM de HOCl por 10 minutos. Após o período de incubação, foi utilizado 3,3',5,5', tetrametilbenzidina (TMB) como revelador. Após 5 min a absorbância a 642 nm foi medida utilizando espectrofotômetro. Em ambos os ensaios (ABTS^{•+} e HClO), as atividades antioxidantes foram calculadas como a porcentagem de inibição.

3.2.5 Quantificação de fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais os extratos foi realizada com o reagente Folin-Ciocalteu conforme metodologia de Spanos e Wrolstad (1990). Primeiramente, 1 mL da amostra diluída foi adicionada à 5mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma) diluído (1:10) e mantido a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 4 mL da solução de carbonato de sódio foi adicionada (75 g·L⁻¹) e a leitura de absorbância (765 nm) foi realizada após 2h. Ácido gálico (20 -150 µg·mL⁻¹) foi utilizado como padrão

para a curva de calibração. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) mg de ácido gálico por g biomassa seca (mg EAG·g bs⁻¹).

3.2.6 Quantificação de clorofila e carotenoides

A quantidade de clorofila total e total de carotenoides nos extratos foi determinada espectrofotometricamente de acordo com as equações propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os espectros de absorção dos extratos foram medidos a 470 nm, 652,4 nm e 665,2 nm em espectrofotômetro (PerkinElmer UV-Vis, Lambda 25, USA). Os teores de clorofila total e de carotenoides foram expressos em peso seco.

3.2.7 Análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

O extrato hexânico foi analisado em um CG-EM triplo quadrupolo (Shimadzu TQ8040) com coluna capilar SH-RtxTM-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme) e gás hélio a um fluxo de 1 mL·min⁻¹. A injeção foi realizada a 250 °C em modo split (razão de 1: 5). O volume da amostra injetada foi de 1 µL. A temperatura do forno foi programada para uma temperatura inicial de 60 °C mantida por 3 min, seguida de rampa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ até 260 °C por 17 min. Os compostos separados foram tentativamente identificados por EM no modo Q3 Scan, usando um intervalo de massa variando de 50 a 550 m/z e comparando seus espectros de massa com os compostos de referência da biblioteca NIST14 MS (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Gaithersburg, MD, EUA).

O extrato etanólico foi analisado em CG Agilent-7890B acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo (Agilent-7000C, Palo Alto, CA). Os compostos foram separados em coluna capilar HP-5ms (15 m x 0,25 mm, 0,25 de espessura de filme) utilizando Hélio como gás de arraste (8 psi). A injeção foi realizada a 250 °C em modo split (razão de 1: 10). O volume da amostra injetada foi de 1 µL. A programação de temperatura do forno foi de: 40° C por 2 min, seguida de rampa de aquecimento de 5 °C·min⁻¹ até 150 °C e 15 °C·min⁻¹ até 300 °C (SANTOYO et al., 2009). Os compostos foram identificados por EM no Full Scan usando um intervalo de massa variando de 35 a 450 m/z.

3.2.8 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e todas as análises foram realizadas em triplicata. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) utilizando o software Excel®. A análise de regressão e o coeficiente de Pearson foram calculados utilizando o software STATISTICA 8 para avaliar a relação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de carotenoides e fenólicos totais.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Atividade antibacteriana: teste de difusão em poços

Os extratos aquosos, etanólicos e hexânicos obtidos da biomassa das sete espécies de microalgas foram inicialmente avaliados para a atividade antibacteriana pelo teste de difusão em poços. Nenhum dos extratos aquosos das espécies microalgas apresentou atividade antibacteriana frente aos patógenos de origem alimentar. Não foi detectada atividade antibacteriana nos extratos etanólico e hexanólico de *C. minutissima*, *S. subsalsus* e *S. ecornis*. Os resultados encontrados foram semelhantes aos reportados por Dantas et al. (2019), que não verificaram atividade antibacteriana de extratos etanólicos de *Scenedesmus subspicatus* e, por Najdenski et al., (2013) em que os extratos aquosos de *Chlorella* sp e *Scenedesmus obliquus* também não apresentaram inibição frente à patógenos Gram positivos e negativos.

Os extratos etanólico e hexanólico de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* apresentaram zona de inibição (diâmetro) variando de 2 mm a 17 mm frente à todos os patógenos Gram-positivos e Gram-negativos testados. Os menores halos de inibição foram observados em *S. aureus* e os maiores em *B. cereus*. O antibiótico cloranfenicol, utilizado como controle positivo, apresentou zona de inibição (diâmetro) variando de 18 mm a 24 mm. Além disso, o DMSO puro (controle negativo) não teve efeito inibitório sobre as bactérias patogênicas avaliadas. Os extratos que apresentaram atividade antibacteriana foram avaliados quanto a concentração inibitória mínima.

3.3.2 CIM e análise dos extratos por CG-EM

Os valores de CIM dos extratos etanólicos e hexânicos das microalgas *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* frente à cinco patógenos de origem alimentar estão apresentados na TABELA 5. *S. aureus* apresentou os maiores valores de CIM (1,8 a 9,55 mg·mL⁻¹) quando comparado as outras bactérias e o extrato etanólico de *N. oculata* não inibiu o patógeno na concentração máxima testada (10 mg mL⁻¹). Os extratos etanólicos de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta* e *N. oculata* apresentaram os menores valores de CIM frente a *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis quando comparados aos extratos hexânicos. Os extratos de *N. oculata* (etanol e hexano) apresentaram maiores valores de CIM para todos os patógenos testados quando comparados a outros extratos de microalgas.

Herrero *et al.*, (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e hexânicos de *D. salina* frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus* e encontraram valores de CIM que variaram entre 6 e 12 mg·mL⁻¹. Plaza et al., (2012) realizaram a extração de compostos antibacterianos da biomassa de *C. vulgaris* com os solventes acetona e etanol e encontraram valores de CIM que variaram entre 7 e 12 mg·mL⁻¹, ambos os trabalhos encontraram valores de CIM superiores aos encontrados no presente estudo.

A extração de compostos antibacterianos pode estar relacionada à polaridade do solvente empregado. Herrero et al., (2006) e Santoyo et al., (2006) relataram que solventes orgânicos com baixa polaridade, como hexano e éter de petróleo, foram mais efetivos na extração dos compostos antimicrobianos de *D. salina* e *Arthospira platensis*.

TABELA 5- CONCENTRAÇÃO INIBITORIA MINIMA (CIM, MG·ML⁻¹) DOS EXTRATOS DE MICROALGAS FRENTE A PATOGENOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS

Patógenos	Extrato Hexânico				Extrato Etanólico			
	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>N. oculata</i>	<i>T. gracilis</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>N. oculata</i>	<i>T. gracilis</i>
<i>B. cereus</i>	1,00	0,35	1,60	1,20	1,00	0,65	4,75	1,00
<i>E. coli</i>	0,70	0,35	1,60	0,90	0,40	0,75	1,65	1,45
<i>L. monocytogenes</i>	0,85	0,95	8,55	0,90	1,00	0,75	1,65	1,00
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,45	0,45	6,65	0,90	0,80	0,75	1,40	0,95
<i>S. aureus</i>	1,80	1,95	9,55	1,80	2,00	3,00	>10	2,40

FONTE: A autora (2019)

Na TABELA 6 estão apresentados os compostos identificados pela análise de CG-EM dos extratos hexânicos e etanólicos. Diversos compostos químicos foram identificados nos extratos, pertencentes a uma ampla gama de classes químicas, incluindo hidrocarbonetos, terpenos, fitol, fenóis, ácidos graxos, fitoesteróis e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A maioria desses compostos identificados nos extratos de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* foi descrita em diferentes espécies de microalgas como potenciais agentes antimicrobianos *in vitro* (PLAZA et al., 2012; RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2008; Herrero et al., 2006)

Um dos principais compostos nos extratos hexânico e etanólico de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta* e *T. gracilis* foi o fitol. Nos extratos hexânicos, o conteúdo de fitol representou 33,1 %, 25,22 % e 20,66 %, de área normalizada, respectivamente. Nos extratos etanólicos, o conteúdo de fitol foi maior que no hexânico, representando cerca de 87,57 %, 34,23 % e 41,47 % da área normalizada. Para *N. oculata*, a variação no teor de fitol foi maior, de 0,89 % no extrato hexânico para 28,48 % no etanólico. A polaridade e solubilidade dos solventes utilizados no processo de extração reflete a composição do extrato e, portanto, a atividade antimicrobiana (AREMU et al., 2015). O fitol é um constituinte da clorofila e é amplamente descrito em algas verdes (HERRERO et al., 2006; PLAZA et al., 2012). A atividade antimicrobiana do fitol foi relatada contra *Pseudomonas aeruginosa* (Lee, Woo e Lee, 2016), *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *S. aureus* (PEJIN et al., 2014).

Vários autores correlacionaram a atividade antibacteriana com a presença de ácidos graxos (PLAZA et al., 2012, DAVOODBASHA et al., 2018, HERRERO et al., 2006). Nos extratos hexânicos de *N. oculata*, o ácido palmítico; ácido hexadecanóico, gliceril 2-palmitato, e o ácido α -linolênico foram os principais compostos identificados, representando 75,79 % da área total. Destaca-se a presença dos ácidos graxos cis-4,7,10,13,16,19-ácido docosahexaenoico (DHA) e cis-5,8,11,14,17-ácido Eicosapentaenoico (EPA) no extrato etanólico de *D. tertiolecta* em concentrações de 14,93 % e 3,32 %, respectivamente.

Outros compostos especialmente abundantes nos extratos hexânicos de *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* foram os fitoesteróis. Campesterol, epicolesterol, estigmaste-4,7,22-trien-3beta-ol e 3,5-ciclo-6,8 (14), 22-ergostatrieno foram identificados. Campesterol foi detectado em grandes quantidades no extrato de *T. gracilis* (51,35%). Patterson et al., (1993) também relataram a presença de campesterol em espécies de *Tetraselmis*. Os fitoesteróis são moléculas bioativas

relacionadas a muitos efeitos benéficos à saúde em humanos, como a redução do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), reduzindo o risco de aterosclerose e proteção contra os cânceres mais comuns (cólon, mama e próstata) (AWAD E FINK , 2000; LUO, SU E ZHANG, 2015).

TABELA 6- IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CG-EM E PORCENTAGEM DA ÁREA DOS PICOS (ÁREA NORMALIZADA %) DOS EXTRATOS HEXANICOS (H) E ETANOLICOS (E) DAS MICROALGAS

(continua)

Composto	Área normalizada (%)							
	<i>C. vulgaris</i>		<i>D. tertiolecta</i>		<i>N. oculata</i>		<i>T. gracilis</i>	
	H	E	H	E	H	E	H	E
1-3-dimetil-benzeno	-	-	-	0,96	-	-	-	-
2-Pentanona, 4-hidroxi-4-metil-	-	-	-	-	-	-	2,37	-
Etilbenzeno	1,38	-	-	-	-	-	0,19	-
o-xileno	-	-	-	-	-	-	0,21	-
3-metil-acetato-1-butanol	-	-	-	0,25	-	2,29	-	-
3-Etil-3-metil-2-pentanol	22,27	-	-	-	-	-	-	-
3-Tetradecanol	1,03	-	-	-	-	-	-	-
Nonano	2,76	-	-	-	-	-	0,16	-
7-Tetradeceno	0,92	-	-	-	-	-	-	-
Nonano -2- metil	1,38	-	-	-	-	-	-	-
5-etil -2-metil- Heptano	1,51	-	-	-	-	-	-	-
Decano	8,93	-	-	-	-	-	-	-
Ciclohexano	1,41	-	-	-	-	-	-	-
Undecano	2,92	-	-	-	-	-	-	-
Dodecano	0,72	-	-	-	-	-	0,18	-
Tetradecano	-	-	-	-	-	-	0,11	-
8-heptadecano	-	-	1,11	-	0,36	-	-	-
Hexadecano	-	-	-	-	0,40	1,12	-	-
Metil éster ácido 10-Heptadecenoico	-	-	-	-	-	0,23	-	0,36
D-limoneno	-	-	-	0,12	-	-	-	1,24
1,7-dimetil -Naftaleno	-	-	-	-	-	-	-	0,92
Fenol, 2,5-bis (1,1-dimetiletil)-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,49
3-Heptadeceno	1,50	2,23	-	2,24	-	-	-	-
Fitol acetato	-	-	4,20	-	-	-	-	-
Neofitadieno	11,04	-	-	-	2,91	-	2,80	-
Ácido Octanoico etil ester	-	1,60	-	0,09	-	1,6	-	-
Fitol	33,11	87,57	25,22	34,23	0,89	28,48	20,66	41,47
3,7,11-trimetil-1-Dodecanol	-	-	-	0,04	-	2,17	-	-
7-Hexadecenal	-	-	-	-	1,43	2,51	-	-
1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetil Naftaleno, (α -lonona)	-	1,42	-	0,99	-	0,38	-	1,79
Ácido Decanoico etil ester	-	5,73	-	0,31	-	4,18	-	-
1,4-dimetil-naftaleno	-	1,45	-	0,35	-	-	-	-
Ácido n-Hexadecanoico (ácido Palmítico)	3,03	-	4,10	-	27,45	-	0,72	13,54
cis-5,8,11,14,17-Ácido Eicosapentaenoico	-	-	1,79	-	-	-	3,92	-
Ácido Nonadecanoico, derivado	-	-	-	-	-	-	5,41	-

TABELA 6- IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CG-EM E PORCENTAGEM DA ÁREA DOS PICOS (ÁREA NORMALIZADA %) DOS EXTRATOS HEXANICOS (H) E ETANOLICOS (E) DAS MICROALGAS

Composto	(conclusão)							
	Área normalizada (%)							
	<i>C. vulgaris</i>		<i>D. tertiolecta</i>		<i>N. oculata</i>		<i>T. gracilis</i>	
	H	E	H	E	H	E	H	E
Ácido Hexadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil éster	-	-	-	-	41,36	7,6	0,73	1,49
1-pentadeceno	-	-	-	0,83	-	-	-	-
1,2,3,4-tetrahidro-2,5,8-trimetil-1-Naftalenol	-	-	-	0,35	-	-	-	-
9-Hexadecenoato de etila	-	-	-	-	-	9,41	-	-
Cis-13-ácido eicosenoico	-	-	-	-	-	3,96	-	-
Ácido 9-Hexadecenoico	-	-	-	-	-	3,81	-	-
Ácido Hexadecanoico etil éster	-	-	-	-	-	15,25	-	1,39
25-hidroxicolesterol	1,49	-	-	-	-	-	-	-
5,8,11- Ácido Eicosatrienoico (Z)-, derivado	-	-	-	-	-	-	0,85	-
Ácido Octadecanoico 2-propenil éster	-	-	-	-	-	2,87	-	-
9-Hexacosano	-	-	-	-	4,03	-	-	-
cis-5,8,11,14,17-ácido Eicosapentaenoico (EPA)	-	-	-	3,32	-	-	-	-
Etil oleato	-	-	-	-	-	3,20	-	-
DL- α -tocoferol(Vitamina E)	-	-	-	-	-	-	10,10	-
cis-4,7,10,13,16,19-ácido Docosaheptaenoico (DHA)	-	-	-	14,93	-	-	-	-
Ergosterol-derivado	-	-	2,18	-	-	1,44	-	-
Estigmasta-4,7,22-trien-3-beta,-ol	-	-	11,70	-	-	-	-	-
3,5-Ciclo-6,8(14),22-ergostatriene	-	-	26,52	-	-	-	-	-
Ergost-5-en-3-beta-ol (Campesterol)	-	-	-	-	-	-	51,35	15,05
Colest-5-en-3-ol (Epicolesterol)	1,78	-	-	-	10,60	-	-	-
Ácido Oleico3-(octadeciloxi) propil éster	-	-	-	-	-	2,43	-	-
17- Pentatrioconteno	-	-	-	-	-	7,07	-	-
α -Tocoferol acetato	-	-	2,45	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2019).

3.3.3 Rendimento de extração, teor de fenólicos totais e carotenoides

Hexano e etanol foram utilizados para a extração da biomassa de microalgas para avaliar a influência da polaridade do solvente no rendimento e no perfil químico dos compostos bioativos. Como pode ser observado na TABELA 7, os extratos etanólicos apresentaram os maiores rendimentos para *C. vulgaris*, *D. tertiolecta* e *T. gracilis* quando comparados aos extratos hexânicos. Estes resultados indicam que compostos de média e alta polaridade estão presentes na biomassa microbiana.

Resultados semelhantes foram relatados por Plaza et al., (2012) na extração de compostos bioativos de *C. vulgaris*. Para *N. oculata* não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os rendimentos dos extratos etanólico e hexânico. Os extratos de *N. oculata* apresentam alta quantidade de compostos não polares como ácidos graxos, principalmente ácido hexadecanóico, como apresentado na TABELA 6. Na triagem de compostos bioativos de microalgas, é importante o uso de diferentes solventes para extrair substâncias químicas de polaridades diferentes. As atividades antioxidante e antimicrobiana são dependentes das características do solvente de extração (AREMU et al., 2015).

Os compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários em microalgas e a diversidade química e a quantidade contribuem para suas propriedades antioxidantes (AREMU et al., 2015). O maior conteúdo fenólico foi encontrado em *T. gracilis* com 4,54 mg EAG·g bs⁻¹ seguido por *D. tertiolecta* 4,00 mg EAG·g bs⁻¹. Os resultados encontrados no presente estudo são superiores aos relatados por Goiris et al., (2012) para *C. vulgaris*, *N. oculata* e *Tetraselmis* sp. As diferenças no conteúdo fenólico entre as microalgas têm aspectos taxonômicos, ecológicos e ambientais (FREILE-PELEGRÍN E ROBLEDO, 2013). Para todas as espécies estudadas, o maior conteúdo fenólico foi encontrado nos extratos etanólicos variando de 2,58 a 4,54 mg EAG·g·bs⁻¹ (TABELA 7). Os extratos hexânicos apresentaram o menor teor de fenólicos ($p < 0,05$) quando comparados aos extratos etanólicos. Estes resultados eram esperados uma vez que os compostos fenólicos são geralmente mais hidrofílicos que lipofílicos (MOJZER BRGLEZ et al., 2016).

Os valores de conteúdo de clorofila total e de carotenoides variaram entre as espécies e o solvente utilizado na extração, como mostra a TABELA 7. As maiores quantidades de clorofila total foram encontradas nos extratos etanólicos de *D. tertiolecta* (18,04 mg·g bs⁻¹) e *C. vulgaris* (16,94 mg·g bs⁻¹). Os extratos etanólicos de *D. tertiolecta* e *T. gracilis* apresentaram maior teor de carotenoides que o extrato hexânico ($p < 0,05$). A extração utilizando hexano em *N. oculata* foi mais eficiente na extração de carotenoides que o etanol. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os extratos etanólico e hexânico de *C. vulgaris*.

As diferenças entre conteúdos de carotenoides entre as extrações com etanol e hexano é explicada pela diferença de polaridade e solubilidade dos carotenoides. Carotenoides não-polares e xantofilas esterificadas são melhor extraídas com solventes orgânicos como hexano e éter de petróleo, enquanto que solventes polares

como etanol são mais recomendados para a extração de carotenoides polares (luteína e astaxantina).

TABELA 7- RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, TEOR DE CLOROFILA, CAROTENOIDES E FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS ETANÓLICOS E HEXÂNICOS

	Extrato Etanólico				Extrato Hexânico			
	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>N. oculata</i>	<i>T. gracilis</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>N. oculata</i>	<i>T. gracilis</i>
Rendimento (%)	4,85 ± 0,63 ^a	12,41 ± 0,85 ^a	19,37 ± 0,31 ^a	5,59 ± 0,52 ^a	2,45 ± 0,28 ^b	5,52 ± 0,60 ^b	17,64 ± 1,47 ^a	3,32 ± 0,13 ^b
Teor de clorofila (mg·g bs ⁻¹)	16,94 ± 0,52 ^a	18,04 ± 0,40 ^a	6,06±0,03 ^a	14,20 ± 0,93 ^a	9,41 ± 0,02 ^b	14,24 ± 0,08 ^b	4,82 ± 0,48 ^b	8,37 ± 0,01 ^b
Teor de carotenoides (mg·g bs ⁻¹)	1,28 ± 0,16 ^a	1,99 ± 0,06 ^a	1,11 ± 0,02 ^b	2,87 ± 0,30 ^a	0,98 ± 0,02 ^a	1,66±0,02 ^b	1,42± 0,02 ^a	1,11 ± 0,16 ^b
Fenólicos totais (mg EAG·g bs ⁻¹)	3,88 ± 0,08 ^a	4,00 ± 0,07 ^a	2,58 ± 0,02 ^a	4,54 ± 0,05 ^a	0,56 ± 0,01 ^b	0,71 ± 0,02 ^b	0,52 ± 0,05 ^b	0,68 ± 0,01 ^b

Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os extratos etanólicos e hexânicos para a mesma espécie.

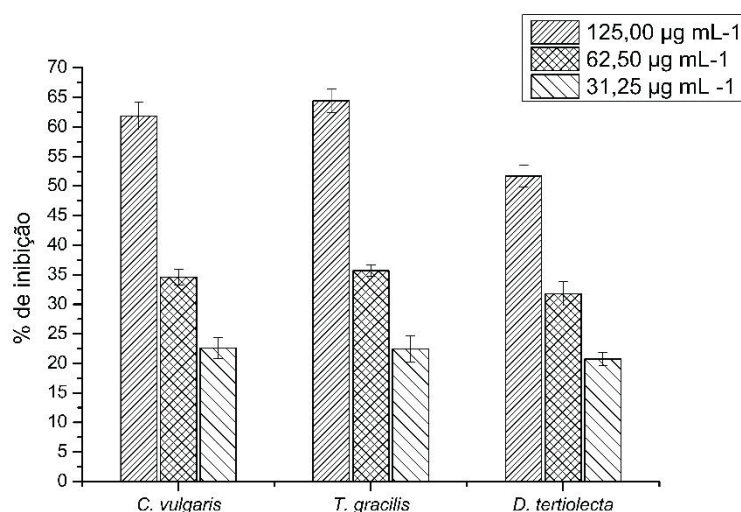
FONTE: A autora (2019).

3.3.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos hexânicos e etanólicos extraídos de microalgas foi avaliada pela capacidade de inibição do radical ABTS^{•+} e pela capacidade de sequestro de HClO. Os extratos hexânicos não apresentaram atividades antioxidantes nas concentrações testadas.

Verificou-se que os extratos etanólicos testados apresentaram moderada atividade antioxidante e dose-dependente nas duas metodologias avaliadas, conforme pode ser observado nas FIGURAS 8 e 9. O extrato etanólico de *N. oculata* não apresentou potencial de atividade antioxidante pois nas concentrações testadas não atingiu o IC₅₀. O valor de IC₅₀ expressa a quantidade de extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical.

FIGURA 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATO ETANÓLICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO ABTS **

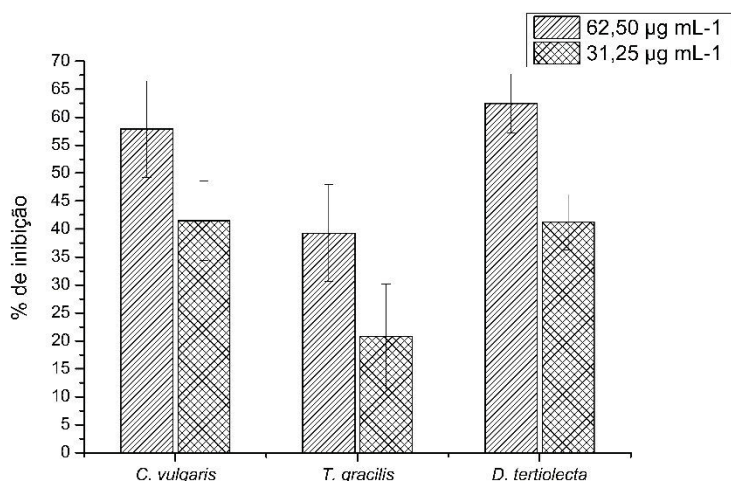


FONTE: A autora (2019).

O extrato de *T. gracilis* na concentração de 125 µg·mL⁻¹ apresentou a maior capacidade antioxidante (64,46 %) no ensaio ABTS^{•+} seguido do extrato de *C. vulgaris* com 61,8 % de inibição. O extrato *D. tertiolecta* na concentração de 125 µg·mL⁻¹ inibiu a formação de HClO em 62,42 %, seguida do extrato de *C. vulgaris* que inibiu 57,86 %. A atividade antioxidante de extratos de microalgas tem sido reportada na literatura como *C. vulgaris* (LI et al., 2006), *D. salina* (HERRERO et al., 2006), *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis gaditana* (MAADANE et al., 2015). Os resultados de atividade

antioxidante do presente estudo foram superiores aos reportados por Jayshree et al. (2016) para extratos metanólicos de *C. vulgaris* e por Maandane et al., (2015) para os extratos etanólicos de *Tetraselmis* sp e *D. salina*.

FIGURA 9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO HCLO



FONTE: A autora (2019).

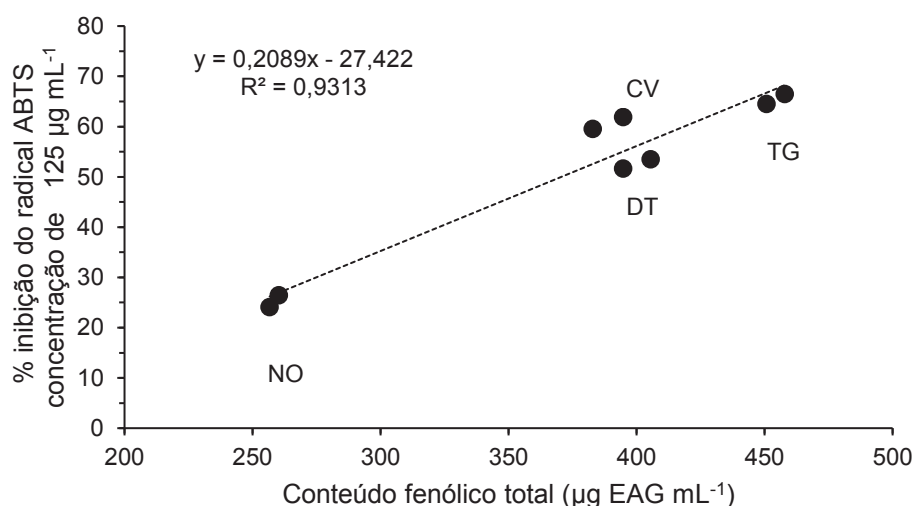
3.3.4 Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos e carotenoides

Foram determinados os coeficientes de determinação (R^2) entre as atividades antioxidantes (ABTS⁺ e HClO) e os conteúdos de fenólicos totais, clorofila total e carotenoides das quatro espécies de microalgas. O valor de R^2 entre a atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos etanólicos foi significativo ($R^2 = 0,931$ e $p = 0,0014$), como pode ser observado na FIGURA 10. A correlação entre a atividade antioxidante pelo método HClO e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos etanólicos também foi significativo, porém o valor de R^2 foi menor ($R^2 = 0,55$ e $p = 0,035$). Banskota et al., (2018) também reportou a correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante para nove espécies de microalgas.

Foi verificada correlação estatística significativa entre os teores de clorofila e a atividade antioxidante pelos métodos ABTS⁺ ($R^2 = 0,767$ e $p = 0,026$) e HClO ($R^2 = 0,89$ e $p = 0,014$). Não foi verificada correlação entre o conteúdo de carotenoides e a atividade antioxidante pelos dois métodos avaliados para as quatro espécies

estudadas. O mesmo resultado foi verificado por Bulut et al., (2019) para a microalga *Scenedesmus* sp, a correlação entre o conteúdo de carotenoides e as atividades antioxidantes pelos métodos DPPH e FRAP não foram estatisticamente significantes.

FIGURA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO ETANÓLICO E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ABTS^{•+}) DAS QUATRO ESPÉCIES DE MICROALGAS ESTUDADAS



Legenda: CV: *C. vulgaris*; DT: *D. tertiolecta*; TG: *T. gracilis* e NO: *N. oculata*.

FONTE: A autora (2019)

3.4 CONCLUSÕES

Dentre os extratos e espécies estudadas, os extratos etanólicos e hexânicos de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* apresentaram atividade antibacteriana frente à patógenos alimentares. *S. aureus* apresentou os maiores valores de CIM e o extrato etanólico de *N. oculata* não inibiu o micro-organismo na concentração estudada. Os extratos foram analisados por CG-EM e 40 compostos diferentes foram identificados. Compostos com comprovada ação antibacteriana como fitol e ácidos graxos foram identificados nos extratos. Os maiores teores de clorofila, carotenoides, fenólicos totais e rendimento de extração foram observados nos extratos etanólicos. Em relação à atividade antioxidante, os extratos hexânicos não apresentaram atividade nas concentrações testadas. O extrato etanólico de *T. gracilis* apresentou a maior capacidade antioxidante no ensaio ABTS^{•+} e o extrato de *D. tertiolecta* no ensaio HClO. Observou-se correlação significativa positiva entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais e de clorofila total dos extratos das espécies estudadas. Os extratos etanólicos apresentam-se como potenciais

antioxidantes e antibacterianos naturais para utilização pela indústria farmacêutica e de alimentos.

CAPÍTULO 4 – LÍPIDIOS DE MICROALGAS COMO FONTE DE COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS E ANTIOXIDANTES PARA A INDÚSTRIA

RESUMO

A biomassa de microalgas representa uma fonte potencial de compostos bioativos, no entanto, suas atividades biológicas têm sido pouco exploradas. Este estudo avaliou o perfil de ácidos graxos e a atividade antioxidante e antibacteriana de extratos lipídicos e ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) de *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis gracilis*. As espécies *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* exibiram altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e *N. oculata* apresentou o maior teor de ácido palmítico (C16:0) (42,85 %), que são reconhecidos por seus efeitos antimicrobianos. Os patógenos Gram-negativos (*E. coli* e *Salmonella Enteritidis*) foram mais sensíveis a todos os extratos testados que os patógenos Gram-positivos. *S. aureus* apresentou os maiores valores de CIM (0,40 a 6,40 mg mL⁻¹). Os extratos de EMAG apresentaram maior atividade inibitória contra todos os patógenos quando comparados aos extratos lipídicos. O maior conteúdo de fenólicos totais foi encontrado no extrato de *N. oculata* com 6,68 ± 0,11 mg de EAG g bs⁻¹. O extrato de *C. vulgaris* (125 µg·mL⁻¹ e 62,5 µg·mL⁻¹) apresentou a maior capacidade antioxidante (ABTS⁺ e HClO, respectivamente) em comparação aos demais extratos lipídicos. Pelos resultados das atividades antibacterianas e antioxidantes encontrados, os extratos lipídicos e EMAG de microalgas podem ser utilizados como alternativa natural e segura aos antioxidantes sintéticos e antibióticos nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Palavras-chave: compostos bioativos; patógenos alimentares; perfil de ácidos graxos

4.1 INTRODUÇÃO

O número de cepas de bactérias resistentes a antibióticos aumentou na última década e constitui um problema de saúde pública global (CAPITA E ALONSO-CALLEJA, 2013). Nos Estados Unidos da América, estima-se que a cada ano dois milhões de pessoas sofram de uma infecção resistente a antibióticos e que pelo menos 23.000 pessoas venham à óbito (CDC, 2018). Na União Europeia são

estimadas 33.000 mortes por ano em decorrência de bactérias resistentes (CASSINI et al., 2019).

Atualmente, existe uma tendência mundial de consumidores que procuram por alimentos funcionais e naturais. Assim, há uma demanda para o desenvolvimento de novas fontes de compostos antimicrobianos e antioxidantes para substituir antibióticos convencionais e antioxidantes sintéticos (PINA-PÉREZ et al., 2017). Os pesquisadores estão se concentrando em fontes naturais que são pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à diversidade química. Micro-organismos fotossintéticos, particularmente microalgas, representam uma fonte potencial de compostos bioativos, pois produzem diferentes metabólitos primários e secundários (AMARO et al., 2011; PRADHAN et al., 2014).

A atividade antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral das microalgas é atribuída a compostos químicos pertencentes a diferentes classes, que incluem proteínas, lipídios, pigmentos, vitaminas, carboidratos e terpenos (PLAZA et al., 2009; FALAISE et al., 2016; CHEW et al., 2017).

Entre os principais metabólitos produzidos pelas microalgas, os lipídios são a principal classe. As microalgas podem acumular grandes quantidades de lipídios que podem variar de 20 a 65 % do peso seco; são compostos de lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios) e lipídios não polares (hidrocarbonetos, esteróis, ácidos graxos livres, acilgliceróis) (MARKOU E NERANTZIS, 2013; PEREZ et al., 2016). Condições de cultivo desfavoráveis como baixa concentração de nitrogênio, altas temperaturas e alta concentração de sal aumentam o conteúdo de lipídios e alteram o perfil lipídico das microalgas (D'ALESSANDRO E ANTONIOSI FILHO, 2016; CHEW et al., 2017; HESS et al., 2018).

Lipídios e ácidos graxos de microalgas podem ser usados em aplicações industriais como produção de biodiesel e ração animal, bem como nas indústrias alimentícia e farmacêutica (BELLOU et al., 2014). Os lipídios produzidos por microalgas são ricos em ácidos graxos essenciais como o ácido α -linolênico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexanóico (Markou e Nerantzis, 2013). O foco da maioria dos estudos é a produção de biodiesel e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (CHEW et al., 2017; STEINRÜCKEN et al., 2017).

A atividade antibacteriana e antioxidante dos lipídios de microalgas são pouco exploradas. A capacidade dos ácidos graxos para inibir o crescimento bacteriano é conhecida há décadas (KABARA et al., 1972; KABARA, 1984) e os estudos recentes

reportam que a atividade antibacteriana é dependente do tamanho da cadeia e do grau de insaturação (ZHENG et al., 2005; AMARO et al., 2011). O mecanismo da ação antibacteriana dos ácidos graxos ainda não foi totalmente elucidado. Acredita-se que, devido à estrutura anfifílica dos ácidos graxos, interagem com a membrana celular das bactérias, promovendo danos à membrana, redução da absorção de nutrientes e inibição da produção de energia, interferindo na cadeia transportadora de elétrons (DESBOIS E SMITH, 2010).

Embora alguns estudos tenham investigado as atividades antimicrobiana e antioxidante dos ácidos graxos de microalgas, este é o primeiro estudo das espécies *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis*. Este estudo avaliou a atividade antioxidante e antibacteriana de extratos lipídicos de microalgas (lipídios totais e ésteres metílicos de ácidos graxos) frente a patógenos veiculados por alimentos. Além disso, foram determinados: biomassa, produtividade lipídica, composição de ácidos graxos e conteúdo fenólico total. Os resultados deste estudo podem levar ao uso de uma fonte alternativa de compostos bioativos nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Espécies de microalgas, meios e condições de cultivo

As cepas *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* foram cedidas pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (WDCM 728). A cepa *C. vulgaris* foi doada pela Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835).

Os cultivos de *N. oculata* e *T. gracilis*, foram mantidos em meio líquido em água do mar artificial enriquecida com nutrientes f/2 (Guillard, 1975). *C. vulgaris* foi mantidas em meio Bold's Basal Medium (ANDERSEN, 2005) e *D. tertiolecta* no meio Johnson's modificado (0,4 M NaCl) (BOROWITZKA, 1998).

O inóculo de cada cepa foi cultivado em erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 125mL do meio de cultivo em condições assépticas e axênicas em condições fotoautotróficas a 25 °C e intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e aeração contínua de 0,5 vvm. O cultivo foi realizado em Erlenmeyers com capacidade de 2000 mL, contendo 1600 mL do meio de cultivo e 10 % (v·v⁻¹) de inóculo. O pH

inicial foi de 6,5. E as culturas foram cultivadas nas condições descritas acima por 14 dias.

A biomassa microalgal foi separada por centrifugação (1800 x g por 10 min) e seca em estufa à 60 °C por 24h. A biomassa seca foi determinada por filtração utilizando filtros GF/F (0,7µm, Macherey- Nagel, Alemanha) de acordo com metodologia proposta por ZHU E LEE (1997).

4.2.2 Extração e quantificação de lipídios

Os lipídios totais foram extraídos e quantificados utilizando o método gravimétrico conforme proposto por CORRÊA et al., (2017). O conteúdo de lipídios totais compreende os lipídios saponificáveis e insaponificáveis (que não são convertidos em EMAG) (LAW et al., 2018).

4.2.3 Transesterificação e avaliação do perfil de EMAG

Os EMAG foram preparados a partir do extrato lipidico por transesterificação pelo método ácido conforme BREUER *et al.*, (2013). A fração contendo hexano foi recuperada e evaporada até peso constante para quantificar os EMAG (lipídios saponificáveis). O conteúdo de EMAG foi expresso em porcentagem de biomassa seca (% bs).

Os EMAG foram separados em cromatógrafo à gás (CG-MS, Agilent 3800) com detector de ionização de chama. A temperatura do detector foi mantida a 260°C e os gases de chama mantidos a taxa de 30 mL·min⁻¹ para o gás H₂ e 290 mL·min⁻¹ para ar sintético. O volume injetado de amostra foi de 2 µL em coluna DB-23 (Agilent, 60 m×0,25 mm ID x 0,25 µm) em razão 1:50. A programação de temperatura inicial foi de 190°C por 15 min aumentando a taxa de 3 °C·min⁻¹ até 240°C, sendo mantido por 6,5 min. A identificação foi realizada pela comparação dos tempos de retenção de EMAG padrão com os das amostras.

4.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CMI)

Os extratos lipídicos e os EMAG foram testados individualmente frente aos patógenos de origem alimentar: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC

25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As cepas bacterianas foram mantidas estocadas em ágar Nutriente (DIFCO) à 4 °C.

O método de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com Rodríguez-Meizoso et al., (2008) e Wiegand et al., (2008). O caldo Muller-Hinton suplementado com Tween 80 (0,5 % v·v⁻¹) foi utilizado nos ensaios. Os inóculos bacterianos foram reativados à 37°C por 24h e diluídos em solução salina (NaCl 0,85 % m·v⁻¹) obtendo concentração celular de 5 x 10⁵ UFC mL⁻¹. Os lipídios e os EMAG microalgais foram diluídos em DMSO (Synth) em concentrações finais de 0,175 mg·mL⁻¹ a 10 mg·mL⁻¹. Em cada poço da placa foi adicionado 175 µL do caldo Muller-Hinton, 5 µL do inóculo bacteriano e 20 µL de diferentes concentrações dos extratos lipídicos e dos EMAG. As placas foram incubadas à 37 °C por 24h. O crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de 10 µL de solução aquosa estéril de cloreto de trifêniltetrazólio (TTC, Inlab) e incubação a 35 °C por 30 min. As bactérias reduzem o corante TTC de amarelo para vermelho, indicando o crescimento bacteriano (RADAELLI et al., 2016).

4.2.5 Determinação da atividade antioxidante

4.2.5.1 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS^{•+}

A capacidade dos extratos lipídios para sequestrar o cátion radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Re et al., (1999) com algumas modificações. Os extratos lipídicos foram avaliados em concentrações de 125 µg·mL⁻¹, 62,5 µg·mL⁻¹ e 31,25 µg mL⁻¹ e incubados em solução de ABTS^{•+} na ausência de luz por 30 min. A absorbância a 734 nm foi medida usando uma leitora de microplacas.

4.2.5.2 Atividade antioxidante sobre o ácido hipocloroso (HClO)

A atividade dos extratos lipídicos sobre HClO foi realizada conforme Costa et al., (2004) com algumas modificações. Os extratos lipídicos foram avaliados em concentrações de 62,5 µg·mL⁻¹, 31,25 µg·mL⁻¹ e 15,62 µg·mL⁻¹ diluídos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e incubados com 0,08 mM de HClO por 10 minutos. Após o período de incubação, foi utilizado 3,3',5,5', tetrametilbenzidina (TMB) como revelador.

Após 5 min a absorbância a 642 nm foi medida utilizando espectrofotômetro. Em ambos os ensaios (ABTS^{•+} e HClO), as atividades antioxidantes foram calculadas como a porcentagem de inibição.

4.2.6 Quantificação de fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais os extratos lipídicos foi realizada com o reagente Folin-Ciocalteu conforme metodologia de Spanos e Wrolstad, (1990). Primeiramente, 1 mL da amostra diluída foi adicionada a 5mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma) diluído (1:10) e mantido a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 4 mL da solução de carbonato de sódio foi adicionada ($75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e a leitura de absorbância (765 nm) foi realizada após 2 h. Ácido gálico ($20 - 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi utilizado como padrão para a curva de calibração. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) mg de ácido gálico por g biomassa seca ($\text{mg EAG} \cdot \text{g bs}^{-1}$)

4.2.7 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e todas as análises foram realizadas em triplicata. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) utilizando o software Excel®. A análise de componentes principais (ACP) foi aplicada para separar as espécies de microalgas de acordo com seu perfil lipídico, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante e antibacteriana. A análise de ACP foi realizada utilizando o software MATLAB (7.0) e o escalonamento foi utilizado como pré-tratamento dos resultados.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Biomassa seca, teor de lipídios totais e EMAG

Na TABELA 8 estão apresentados os resultados de produção de biomassa após 14 dias de cultivo, o conteúdo lipídico total, o rendimento de EMAG e o teor de lipídeos insaponificáveis das espécies estudadas. A maior produtividade em biomassa seca foi observada para a espécie *C. vulgaris* ($0,537 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), sendo estatisticamente

maior ($p < 0,05$) que as demais espécies. *N. oculata* apresentou os maiores teores de lipídios (37,78 %) e EMAG (33,37 %) quando comparada às demais espécies estudadas.

O processo de transesterificação converteu de 70,9 % a 88,3 % dos lipídios totais em EMAG e altos teores de EMAG foram observados nas espécies estudadas. Com relação ao teor de insaponificáveis, os maiores valores foram observados na microalga *N. oculata* seguido por *D. tertiolecta*, *T. gracilis* e *C. vulgaris*.

Os resultados do teor de lipídios totais encontrados no presente estudo são similares aos descritos na literatura. O gênero *Nannochloropsis* destaca-se por apresentar alto conteúdo lipídico, variando de 37 a 60 %, conteúdo superior as demais espécies de microalgas (MA et al., 2014). Ohse et al., (2015) encontraram conteúdo lipídico de 16,1 % em *C. vulgaris*. O conteúdo lipídico encontrado para *D. tertiolecta* foi de 25,0 % no estudo realizado por Francavilla et al., (2015). Selvakumar e Umadevi, (2014) reportaram conteúdo lipídico variando de 12,7 a 15,3 % para a microalga *T. gracilis*.

A produção e o acúmulo de lipídios pelas microalgas dependem de vários fatores, como espécie, concentração de nutrientes no meio de cultivo, temperatura, pH, salinidade e regime de luz (GUSCHINA E HARWOOD, 2006). As técnicas de extração e os diferentes solventes utilizados também são fatores que influenciam consideravelmente o rendimento da extração de lipídios em microalgas (AXELSSON E GENTILI, 2014; HUSSAIN et al., 2015; MORADI-KHEIBARI et al., 2017).

Os lipídios de microalgas incluem lipídios saponificáveis como triacilgliceróis, ácidos graxos livres e alguns lipídios polares que podem ser convertidos em EMAG (LAW et al., 2018). O conteúdo de EMAG encontrado neste estudo (TABELA 6) foi semelhante ao relatado por Tang et al., (2011), que verificaram teor de 21,7 % para *D. tertiolecta*, e por Li et al., (2014) que obtiveram conteúdo de EMAG de 8,33 % para *T. gracilis*. Os solventes polares usados na extração de lipídios, como o metanol e o clorofórmio, co-extraem componentes insaponificáveis como o fitol, carotenóides, esteróis, proteínas e hidrocarbonetos (YAO et al., 2015; HUANG et al., 2016).

TABELA 8 – BIOMASSA SECA, LIPÍDIOS TOTAIS E INSAPONIFICÁVEIS, EMAG E CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

Microalgas	Biomassa (g·L ⁻¹)	Lipídios totais (% bs)	EMAG (% bs)	Lipídios insaponificáveis (%)	Fenólicos totais (mg EAG·g bs ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	0,537±0,01 ^a	10,44±0,35 ^d	8,05± 0,12 ^d	2,38±0,23 ^c	2,14±0,03 ^b
<i>D. tertiolecta</i>	0,372±0,03 ^b	18,16±0,1 ^b	14,96 ± 0,27 ^b	3,19±0,33 ^b	2,26±0,04 ^b
<i>N. oculata</i>	0,421±0,07 ^b	37,78±1,63 ^a	33,37±1,44 ^a	4,40±0,18 ^a	6,68±0,11 ^a
<i>T. gracilis</i>	0,344±0,01 ^b	13,59±0,39 ^c	9,64 ± 0,12 ^c	3,94±0,27 ^{a,b}	2,09±0,03 ^b

Valores expressos como média e desvio padrão ($n = 3$).

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$)

FONTE: A autora (2019)

4.3.2 Perfil de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos dos lipídios obtidos de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* é apresentada na TABELA 9. Dezesete diferentes ácidos graxos foram identificados entre as microalgas estudadas, incluindo ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados, (AGM) e poliinsaturados (AGPI). Nas microalgas *N. oculata* e *T. gracilis* os AGS foram encontrados em maior proporção, com porcentagens relativas de 54,90 % e 51,14 %, respectivamente. O ácido palmítico (C 16:0) foi encontrado em grande proporção nas quatro espécies estudadas, com seu conteúdo variando entre 19,55 % e 42,85 %. *N. oculata* apresentou 43,82 % de AGM e os principais ácidos graxos identificados foram palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1(9)). *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* apresentaram o maior conteúdo de AGPI, 48,49 % e 61,56 %, respectivamente. Em relação aos AGPI, o principal ácido graxo encontrado foi o ácido α -linolênico (C18:3 (9,12,15)) com conteúdo de 46,49 % em *D. tertiolecta*, 28,25 % em *C. vulgaris* e 19,47 % em *T. gracilis*.

A composição de ácidos graxos (AG) encontrada neste estudo é comum à maioria do gênero Chlorophyta, sendo o ácido α -linolênico o mais abundante (VOLKMAN et al., 1989). O perfil de AG de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta* e *T. gracilis* foi similar aos reportados em estudos anteriores. Avaliando a composição de AG de *C. vulgaris*, PLAZA et al., (2012) verificaram teores de 28,85 % de ácido palmítico, 17,39 % de ácido linoléico e 21,36 % de ácido α -linolênico. VOLKMAN et al., (1989) também verificaram uma predominância de ácido palmítico (14,7 %) e ácido α -linolênico (43,5 %) em *D. tertiolecta*. Já HUERLIMANN et al., (2010), relataram maior teor de ácido

oleico (37,4 %) do que o presente estudo (16,3 %), porém as quantidades dos outros AG foram semelhantes.

No presente estudo, os ácidos graxos predominantes para *N. oculata* foram o ácido palmítico (C16:0) e o ácido palmitoleico (C16:1). O ácido eicosapentaenóico (C20: 5), que é frequentemente encontrado em *N. oculata*, em concentrações que variam de 5,41 % a 27,6 % (MA et al., 2014), não foi detectado no presente estudo. O perfil de AG em microalgas pode variar dependendo de fatores como condições de cultivo, salinidade, temperatura, pH e composição do meio (DARKI et al., 2017; CHAISUTYAKORN et al., 2018).

TABELA 9 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (% DO TOTAL DE AG) DE *C. VULGARIS*, *D. TERTIOLECTA*, *N. OCULATA* E *T. GRACILIS*

Fórmula	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>N. oculata</i>	<i>T. gracilis</i>
C 8:0	Ácido octanoico	Ácido caprílico	-	-	0,160±0,002	-
C 10:0	Ácido decanoico	Ácido cáprico	1,231±0,021	1,070±0,012	0,270±0,079	2,906±0,054
C 12:0	Ácido dodecanoico	Ácido láurico	2,878±0,041	0,102±0,004	-	0,764±0,032
C 13:0	Ácido tridecanoico	Ácido tridecílico	2,947±0,117	2,235±0,074	0,096±0,004	1,160±0,070
C 14:0	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	0,636±0,039	0,329±0,060	5,138±0,057	0,732±0,188
C 15:0	Ácido pentadecanoico	Ácido pentadecílico	1,075±0,050	0,864±0,007	-	0,568±0,092
C 16:0	Ácido hexadecanoico	Ácido Palmítico	24,221±0,213	19,557±0,044	42,852±0,007	29,615±0,137
C 17:0	Ácido heptadecanoico	Ácido margárico	2,643±0,168	2,024±0,033	0,333±0,028	3,854±0,054
C 18:0	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	3,961±0,100	2,343±0,002	1,309±0,005	4,559±0,019
C 20:0	Ácido eicosanoico	Ácido arídico	-	-	-	0,182±0,006
C 22:0	Ácido docosanoico	Ácido behênico	-	-	4,742±0,036	6,802±0,065
C 16:1	Ácido 9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	-	5,235±0,030	31,600±0,099	-
C 18:1 (9)	Ácido <i>cis</i> -9-Octadecenoico	Ácido oleico	11,921±0,072	4,685 ±0,072	12,220±0,074	16,390±0,001
C 20:1 (9)	Ácido 11- Eicosenoico	Ácido gondoico	-	-	-	0,716±0,002
C 18:2 (9,12)	Ácido 9,12-Octadecadienoico	Ácido linoleico	14,019±0,107	9,154±0,083	1,283±0,101	10,903±0,004
C 18:3 (6,9,12)	Ácido 6,9,12-Octadecatrienico	Ácido γ-linolênico	6,215±0,063	5,917±0,004	-	1,377±0,003
C18:3 (9,12,15)	Ácido 9,12,15-Octadecatrienico	Ácido α-linolênico	28,255±0,153	46,490±0,016	-	19,477±0,055

FONTE: A autora (2019)

4.3.3 Atividade antibacteriana de lipídios e EMAG

Os valores de CIM dos lipídeos de microalgas e EMAG frente a cinco patógenos de origem alimentar são apresentados na TABELA 10. *S. aureus* apresentou valores os maiores valores de CIM (0,40 a 6,40 mg·mL⁻¹) que as demais bactérias, e o extrato lipídico de *N. oculata* não inibiu o patógeno na concentração testada (10 mg·mL⁻¹). Os valores de CIM para as bactérias Gram-negativas variaram de 0,25 a 0,60 mg·mL⁻¹, enquanto que para bactérias Gram-positivas foi de 0,25 a valores maiores que 10 mg·mL⁻¹. Os patógenos Gram-negativos (*E. coli* e *Salmonella* Enteritidis) foram mais sensíveis, apresentaram menores MIC, frente a todos os extratos testados do que os patógenos Gram-positivos.

A transesterificação de lipídios de microalgas para EMAG aumentou a atividade antibacteriana dos extratos. Os resultados mais expressivos foram verificados para *S. aureus*. O MIC para *S. aureus* foi reduzido em 11,75 vezes comparando os extratos lipídicos e EMAG de *C. vulgaris* e em 2,7 vezes para os extratos de *T. gracilis*.

TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (mg·mL⁻¹) DE EXTRATOS LIPIDICOS E EMAG DE MICROALGAS FRENTE A PATOGENOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS

Patógenos	Extrato lipídico				EMAG			
	C.	D.	N.	T.	C.	D.	N.	T.
	<i>vulgaris</i>	<i>tertiolecta</i>	<i>oculata</i>	<i>gracilis</i>	<i>vulgaris</i>	<i>tertiolecta</i>	<i>oculata</i>	<i>gracilis</i>
<i>B. cereus</i>	0,75	0,35	0,75	0,35	0,25	0,30	0,40	0,25
<i>E. coli</i>	0,60	0,35	0,35	0,35	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>L. monocytogenes</i>	0,40	0,40	0,40	0,40	0,30	0,35	0,30	0,35
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,35	0,35	0,35	0,35	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>S. aureus</i>	4,75	4,30	>10	1,35	0,40	3,25	6,40	0,50

FONTE: A autora (2019)

Os resultados da CIM encontrados no presente estudo foram inferiores aos reportados anteriormente para os mesmos patógenos avaliados. Najdenski et al., (2013) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos lipídicos de *Synechocystis* sp. e encontraram valores de CIM de 2,50 mg·mL⁻¹ para *B. cereus* e 1,25 mg·mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*. Cakmak et al., (2014) reportaram valores de CIM que variaram de 2,5 mg·mL⁻¹ a 10 mg·mL⁻¹ para ácidos graxos de *D. salina*.

A atividade antibacteriana de AG tem sido geralmente atribuída a ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa (C10-C20). Ácidos graxos C10:0, C12:0, C14:1, C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3 apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus* (KABARA, 1984; HUANG E EBERSOLE, 2010; DAVOODBASHA et al., 2012; BELLOU et al., 2014; YOON et al., 2018). Já para *L. monocytogenes* foi reportada a inibição pelos AG C12:0, C18:2 e C18:3 (WANG E JOHNSON, 1992).

Para os patógenos Gram-negativos, os estudos que reportam a atividade antibacteriana dos AG apresentam resultados contraditórios. Zheng et al., (2005) e Bergsson et al., (2002) relataram que AGS e AGI não apresentaram inibição frente a *E. coli* e *Salmonella*. No entanto, Ruffell et al., (2016) e Davoodbasha et al., (2018) reportaram a inibição de *E. coli* pelos AG C10:0, C16:0, C18:3 (9,12,15) e C22:2 (13,16).

Os resultados da atividade antibacteriana dos extratos de EAMG são consistentes com estudo recente conduzido por Davoodbasha et al., (2018) que investigaram extratos de EAMG de *Scenedesmus intermedius* e encontraram valores de CIM de 12-24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para bactérias Gram-negativas e 24-48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para bactérias Gram-positivas. A transesterificação de ácidos graxos em EAMG geralmente aumenta a atividade antimicrobiana quando comparada a ácidos graxos livres e lipídios (HUANG E EBERSOLE, 2010; DAVOODBASHA et al., 2012; YOON et al., 2018).

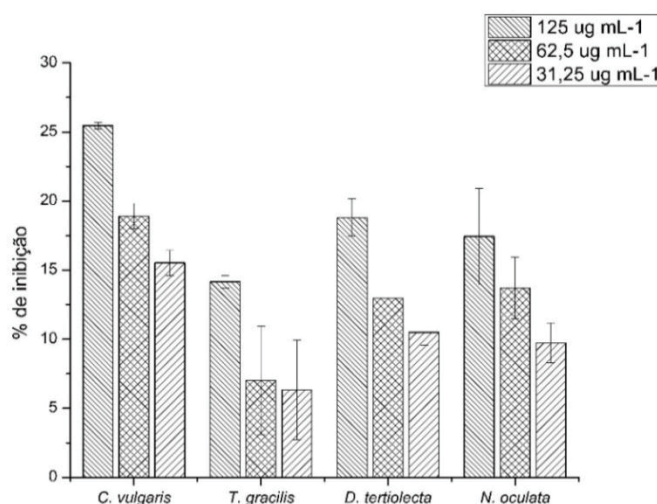
As quatro espécies de microalgas analisadas no presente estudo apresentaram elevado teor de ácidos graxos com reconhecida atividade antibacteriana, como C16:0, C18:1 (9), C18:2 (9,12) e C18:3 (9,12,15) (TABELA 11). É importante ressaltar que os ácidos graxos saturados (C8-C18:0) e C18:1(9) são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA) e são autorizados a usar como aditivo alimentar (FDA, 2017). Dessa forma, as espécies de microalgas estudadas são uma fonte potencial de agentes antibacterianos para o controle de patógenos veiculados por alimentos.

4.3.4 Atividade antioxidante e teor fenólico total dos extratos lipídicos

A atividade antioxidante dos extratos lipídicos extraídos de microalgas foi avaliada pela capacidade de inibição do radical ABTS^{•+} e pela capacidade de

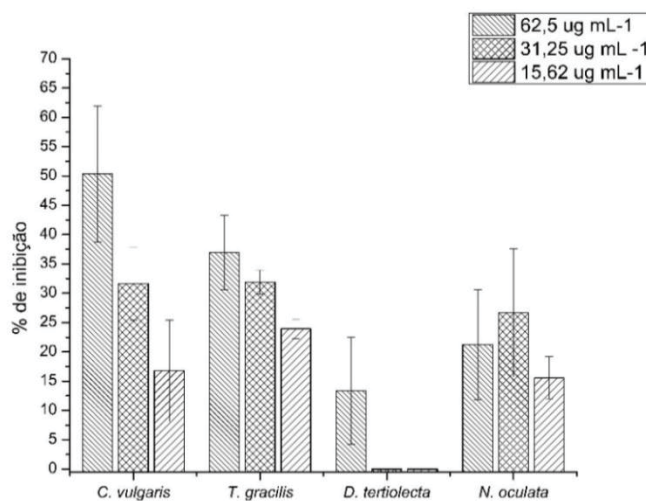
sequestro de HClO. Verificou-se que todos os extratos testados apresentaram moderada atividade antioxidante e dose-dependente nas duas metodologias avaliadas, conforme pode ser observado nas FIGURAS 11 e 12. O extrato de *C. vulgaris* na concentração de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou a maior capacidade antioxidante (ABTS^{•+} e HClO, respectivamente) em comparação aos demais extratos lipídicos. Constatou-se que o extrato lipídico de *C. vulgaris* inibiu a formação de HClO em 50,35%, seguida do extrato de *T. gracilis* que inibiu 36,9 %.

FIGURA 11- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATO LIPÍDICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO ABTS^{•+}



FONTE: A autora (2019)

FIGURA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRATO LIPÍDICOS DE MICROALGAS PELO MÉTODO HClO



FONTE: A autora (2019)

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos lipídicos está apresentado na TABELA 8. O maior teor de fenólicos totais foi observado no extrato de *N. oculata*, ($6,68 \pm 0,11$ mg EAG·g bs⁻¹). Não houve diferença estatística significativa no teor fenólico dos extratos lipídicos de *D. tertiolecta*, *C. vulgaris* e *T. gracilis*.

A atividade antioxidante da biomassa de microalgas é geralmente atribuída a carotenoides e compostos fenólicos. Vários autores concluíram que não há correlação significativa entre atividade antioxidante e conteúdo fenólico total em microalgas (LI et al., 2007; GOIRIS et al., 2012). Recentemente Banskota et al., (2018) e Huang et al., (2016) relataram que os AGPI, devido ao maior grau de insaturação, principalmente da série ômega-3, aumentam a atividade antioxidante dos extratos de microalgas. Na TABELA 9 pode ser observado que o teor de AGPI nas espécies estudadas variou de 1,28 a 61,55 %.

Considerando os resultados do presente estudo quanto ao teor de AGPI, fenólicos e os resultados atividade antioxidante (ABTS^{•+} e HClO), além desses compostos, carotenoides, proteínas, fitoesteróis e polissacarídeos também contribuem para a atividade antioxidante da biomassa de microalgas (BANSKOTA et al., 2018).

A análise de atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} é amplamente utilizada na avaliação da capacidade antioxidante de diversos tipos de compostos, como fenólicos (AUGUSTO et al., 2014), flavonoides, taninos (ROSALES-CASTRO et al., 2014) e lipídios (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2014). O ensaio ABTS^{•+} é amplamente aplicado para extratos de microalgas e plantas, porque a absorção do comprimento de onda a 734 nm elimina a interferência da cor (LI et al., 2007). O método de análise por ABTS baseia-se na geração do ABTS^{•+} de cor azul esverdeado, por meio da reação do sal ABTS e persulfato de potássio. A adição de agentes antioxidantes reduz o ABTS^{•+} ao longo do tempo promovendo a perda da coloração do meio reacional (RE et al., 1999).

Não há estudos na literatura que reportem a atividade de extratos lipídicos de microalgas sobre HClO. O HClO é uma espécie reativa de oxigênio produzida in vivo (principalmente em neutrófilos ativos) durante a oxidação de Cl⁻ por H₂O₂ catalisada pela mieloperoxidase (BUT et al., 2003; ROBASZKIEWICZ et al., 2014). O HClO é um potente agente oxidante que pode causar danos ao tecido ou componentes celulares em sistemas biológicos, como lipídios, proteínas e DNA (WHITEMAN et al., 1999; PULLAR et al., 2000). O excesso de HClO, ou sua geração equivocada, está

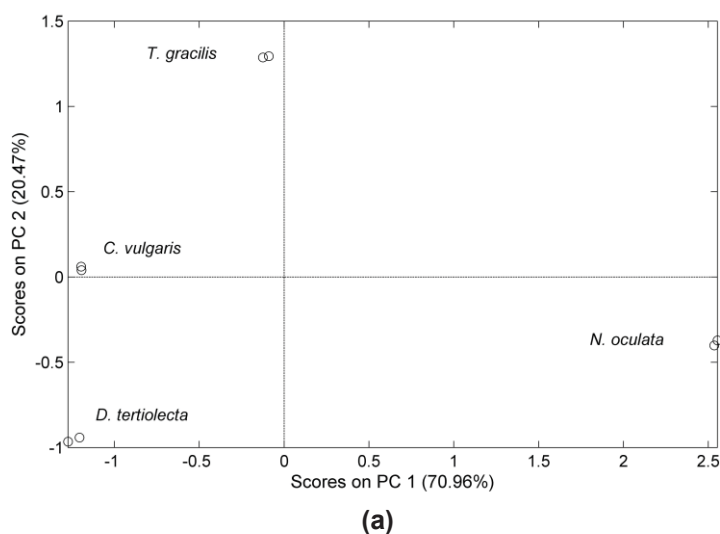
relacionado à aterosclerose, doenças inflamatórias e alguns tipos de câncer (HAWKINS et al., 2003; KHALIL et al., 2012).

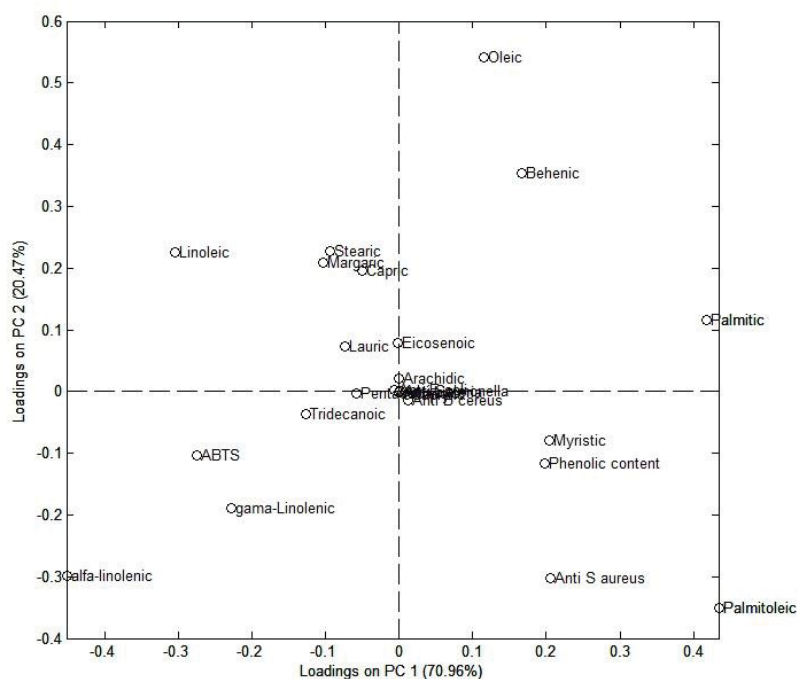
4.3.5 Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise de ACP foi realizada para estabelecer relações entre a atividade antibacteriana e antioxidante, o conteúdo fenólico e o perfil de ácidos graxos das quatro espécies de microalgas estudadas. O componente principal 1 (CP1) explicou 70,96% da variância total e o componente principal 2 (CP2) explicou 20,47 % da variabilidade inicial dos dados. As FIGURAS 13 (A) e (B) apresentam os gráficos de escores e *loadings* (pesos), respectivamente, dos dois componentes principais.

Esta análise diferenciou as amostras em dois grupos. O gráfico dos escores (FIGURA 13A) mostra a projeção das quatro espécies de microalgas nos espaços multivariados de CP1 e CP2. O CP1 nitidamente separou *N. oculata* de todas as outras espécies no lado positivo da parcela devido à sua alta concentração de ácido palmítico e palmitoleico. No lado esquerdo, *T. gracilis*, *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* apresentaram as maiores concentrações de ácido α -linolênico e γ -linolênico, ácido linoléico e atividade antioxidante contra o radical ABTS⁺, como pode ser observado na FIGURA 13 (B).

FIGURA 13 - GRAFICOS DE ESCORES (A) E LOADINGS (B) DOS DOIS COMPENENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS MICROALGAS *C. VULGARIS*, *D. TERTIOLECTA*, *N. OCULATA* E *T. GRACILIS*





(b)

FONTE: A autora (2019)

4.5 CONCLUSÕES

Os extratos lipídicos e EMAG de *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*, *N. oculata* e *T. gracilis* apresentaram atividade antibacteriana frente à patógenos alimentares. *S. aureus* apresentou os maiores valores de CIM e verificou-se que o processo de transesterificação aumentou a atividade antibacteriana dos extratos. As espécies *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* apresentaram as maiores porcentagens de AGPI e *N. oculata* apresentou o maior teor de ácido palmítico (C16:0) (42,85 %). *C. vulgaris* apresentou a maior capacidade antioxidante nos ensaios ABTS⁺⁺ e HClO, no entanto, o maior teor fenólico total foi observado no extrato de *N. oculata*. Os lipídios e compostos fenólicos provavelmente agem juntos, de forma independente ou sinérgica, em termos de atividade antioxidante. As espécies estudadas apresentam grande potencial de uso como alternativa segura aos antioxidantes sintéticos e compostos antibacterianos nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

CAPÍTULO 5 – LIPÍDIOS DE *TETRASELMIS GRACILIS*: OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO, EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

RESUMO

As microalgas apresentam grande capacidade de acúmulo de lipídios e a produtividade é influenciada pelas condições de cultivo e o rendimento e o perfil de ácido graxos é influenciado pelas condições de extração. Dessa forma, este estudo objetivou otimizar a produtividade lipídica de *T. gracilis*, avaliando o efeito das concentrações de nitrato, fosfato e de cloreto de sódio no meio de cultivo. Posteriormente, um planejamento fatorial foi aplicado para avaliar o efeito da temperatura, dos solventes e do tempo no rendimento da extração dos lipídios a partir da biomassa microalgal. O perfil dos ácidos graxos foi avaliado por CG-EM e também a atividade antibacteriana frente a patógenos de origem alimentar. A concentração de nitrato, cloreto de sódio e a interação entre a concentração de fosfato e a salinidade do meio de cultivo foram significativos na produção de biomassa. Os valores ótimos estimados para maximizar a produção de biomassa foram de 132,56 mg·L⁻¹ de nitrato, 25,1 mg·L⁻¹ de fosfato e 19,23 g·L⁻¹ de NaCl. O tempo de extração não teve efeito significativo e a proporção de solvente 3:1 (clorofórmio:metanol) e temperatura de extração de 60°C apresentaram os maiores rendimentos de extração. Todos os extratos testados apresentaram atividade antibacteriana frente aos patógenos em concentrações variando de 0,20 a 1,45 mg mL⁻¹. Analisando o perfil de ácidos graxos dos extratos pode-se verificar que os ácidos graxos saturados C16:0 e C 18:0 e os ácidos graxos insaturados como C 18:1(9), C 18:2 (9,12) C18:3 (9,12,15) são os principais responsáveis pela atividade bacteriana dos extratos. Os resultados mostram a possibilidade de aumento do rendimento de extração de lipídios de *T. gracilis* e a utilização como antibacterianos naturais em alimentos.

Palavras-chave: microalgas; perfil de ácidos graxos; planejamento experimental

5.1 INTRODUÇÃO

As microalgas do gênero *Tetraselmis* sp. são microalgas marinhas largamente utilizadas na aquicultura como fonte de alimento e apresentam potencial para a

produção de ácidos graxos poli-insaturados. Também apresentam a capacidade de crescimento diversas condições físicas e químicas de cultivo (LOURENÇO et al., 1997).

A produção de biomassa e de lipídios pelas microalgas é afetada pelas condições de cultivo como concentração de nutrientes, luz, temperatura, pH e salinidade. Em relação aos nutrientes do meio de cultivo, o fosfato e o nitrogênio apresentam maior influência no crescimento e produção de lipídios pelas microalgas. A limitação de nitrogênio e fosfato alteram o metabolismo microalgal, devido ao seu importante papel estrutural para clorofilas, proteínas e ácidos ribonucleicos (nitrogênio) e devido ao seu envolvimento no metabolismo energético, sinalização e partes estruturais dos ácidos ribonucleicos (fosfato) (KIM et al., 2016; HESS et al., 2018).

Apesar de vários estudos terem verificado o aumento do acúmulo de lipídios por microalgas em condições adversas de cultivo, verificou-se também a diminuição do crescimento celular, afetando a produtividade lipídica (CONVERTI *et al.*, 2009). Dessa forma, o uso do planejamento experimental como o delineamento composto central rotacional (DCCR) e o planejamento fatorial são ferramentas úteis para avaliar os efeitos da composição do meio, suas interações e maximizar a produção de lipídios pelas microalgas diminuindo os custos de produção.

Os lipídios são acumulados pelas microalgas intracelularmente e para a extração são necessários a aplicação de técnicas de rompimento celular e o uso de solventes. Diferentes métodos de rompimento celular e de extração são reportados na literatura. O rompimento celular por ultrassom em microalgas tem sido amplamente utilizado apresentando resultados superiores a tratamentos como micro-ondas, choque osmótico, alta pressão e tratamento enzimático (PRABARAKAN et al., 2011). Entre os métodos de extração o mais utilizado é o Bligh e Dyer que usa clorofórmio, metanol e água como co-solventes para extração e purificação de lipídios. Outros sistemas solventes são utilizados incluindo diclorometano, n-hexano e etanol (GAROMA et al., 2016).

Em estudos prévios, os lipídios extraídos de *T. gracilis* apresentaram atividade antibacteriana frente à patógenos de origem alimentar, com baixos valores de CIM variando entre 0,35 e 1,35 mg·mL⁻¹. Considerando o potencial antimicrobiano e que poucos estudos relacionados a otimização de biomassa e extração de lipídios foram reportados na literatura, a espécie *T. gracilis* foi escolhida para a realização dos

experimentos. O presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições de cultivo da microalga *T. gracilis* para produção de biomassa. Posteriormente, foi realizado a otimização da extração dos lipídios, avaliação da atividade antibacteriana e o perfil de ácidos graxos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Manutenção da microalga e preparo do inóculo

A microalga *T. gracilis* foi cedida pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (WDCM 728). O inóculo foi cultivado em erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 125 mL do meio de cultivo Walne's (WALNES, 1970) em condições assépticas e axênicas em condições fotoautotróficas a 25 °C e intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol f\acute{o}tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e aeração contínua de 0,5 vvm.

5.2.2 Otimização da produção de biomassa

O efeito das concentrações de nitrogênio, cloreto de sódio e fosfato na produção de biomassa pela microalga *T. gracilis* foram avaliados por meio do Delimitamento Composto Central Rotacional (DCCR *Design*, 2³, com 6 pontos axiais e 4 pontos centrais). Os níveis das concentrações de nitrogênio, cloreto de sódio e fosfato do meio de cultivo Walne's usados na otimização pelo DCCR estão apresentados na TABELA 11. As concentrações dos demais nutrientes mantiveram-se constantes. Como fonte de nitrogênio utilizou-se o nitrato de sódio (NaNO₃) e como fonte de fosfato NaH₂PO₄·2H₂O.

TABELA 11 – NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS E DECODIFICADAS UTILIZADAS NO DCCR

Fator	Nome	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
X ₁	Concentração de Nitrato (mg·mL ⁻¹)	16	50	100	150	184
X ₂	Concentração de Fosfato (mg·mL ⁻¹)	3,2	10	20	30	36,8
X ₃	Concentração de Cloreto de sódio (g·L ⁻¹)	11,7	16,4	23,4	30,4	35,1

FONTE: A autora (2019)

O cultivo foi realizado em Erlenmeyers com capacidade de 2000 mL, contendo 1600 mL do meio de cultivo e 10 % (v·v⁻¹) de inóculo. O pH inicial foi de 6,5. O cultivo foi realizado nas condições descritas no item 5.2.1 por 14 dias. Ao final do cultivo a biomassa foi separada por centrifugação (1800 x g por 10 min) e seca em estufa à 60°C por 24h.

5.2.3 Quantificação de Nitrato e Fosfato no meio de cultivo

Ao término do cultivo foi realizada a quantificação de nitrato (NO₃⁻) e fosfato (PO₄⁻³) dos diferentes ensaios do DCCR. Uma amostra de 50 mL foi centrifugada (1800 x g, 10 min) para separação da biomassa e o sobrenadante foi quantificado segundo metodologia da APHA (2012).

5.2.4 Determinação da biomassa seca

Ao término do período de cultivo, a amostra foi previamente centrifugada (1800 x g, 10 min). As células foram lavadas com solução de bicarbonato de sódio (0,5 M) e o sobrenadante descartado para evitar a interferência dos sais na quantificação da biomassa. A biomassa seca foi determinada por filtração utilizando filtros GF/F (0,7µm, Macherey- Nagel, Alemanha). Os filtros foram secos em estufa à 60 °C até peso constante (ZHU E LEE, 1997).

5.2.5 Extração e Quantificação de lipídios

Os lipídios totais foram extraídos e quantificados a partir da biomassa seca utilizando o método gravimétrico conforme proposto por Corrêa et al., (2017). Em um tubo Falcon foi adicionado 50 mg de biomassa seca e 3 mL de mistura de clorofórmio: metanol (2:1, v·v⁻¹) (Neon, PA). Os tubos foram colocados em banho de ultra-som e sonificados por três ciclos de 15 min (36 kHz, modelo L200, Schuster, Brasil). Após 24 h de incubação a 4 °C, as amostras foram novamente sonificadas (três ciclos de 15 min). As amostras foram centrifugadas a 3.900 x g por 10 min e o sobrenadante foi recuperado. Em seguida, 1,5 mL da mistura de clorofórmio: metanol (2:1, v·v⁻¹) foi adicionado à biomassa e re-centrifugado. Em seguida, 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio (Neon, P.A) foram adicionados ao sobrenadante e centrifugados. A

fase de clorofórmio foi recuperada em um frasco previamente pesado e evaporado. Os lipídios remanescentes no frasco após a evaporação completa do clorofórmio foram pesados.

5.2.6 Otimização da extração de lipídios

O efeito das variáveis temperatura, tempo e razão dos solventes (clorofórmio:metanol) foram estudados na extração dos lipídios da biomassa de *T. gracilis*. Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos. Os níveis de temperatura, tempo e razão de solventes utilizados na otimização estão apresentados na TABELA 12. A biomassa utilizada para a otimização do processo de extração foi obtida a partir das condições ótimas definidas no item 5.2.2. A metodologia utilizada para extração e quantificação de lipídios está descrita no item 5.2.4. A variável resposta utilizada foi a porcentagem de lipídios em base seca (% lipídios b.s).

TABELA 12 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS E DECODIFICADAS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL

Fator	Nome	Níveis		
		-1	0	+1
X ₁	Temperatura (°C)	40	50	60
X ₂	Tempo de extração (min)	30	45	60
X ₃	Razão de solvente (Clorofórmio: Metanol)	1:1	2:1	3:1

FONTE: A autora (2019)

5.2.7 Determinação da atividade antibacteriana dos extratos lipídicos

Os extratos lipídios de *T. gracilis* obtidos pelas diferentes condições de extrações do planejamento fatorial (Item 5.2.6) foram avaliados quanto a atividade antibacteriana pelo método de CIM frente aos patógenos *E. coli* (ATCC 25922), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *S. aureus* (ATCC 25923), conforme descrito no item 4.2.4.

5.2.8 Transesterificação e avaliação do perfil de ácidos graxos

Os extratos lipídicos obtidos pelas diferentes condições de extrações do planejamento fatorial foram analisados quanto ao perfil de ácidos graxos. Os EMAG foram preparados a partir do extrato lipídico por transesterificação pelo método ácido conforme Breuer *et al.*, (2013). O perfil de ácidos graxos dos extratos foi determinado por CG-EM conforme descrito no item 4.2.3.

5.2.9 Análise Estatística

O DCCR para otimização de produção de lipídios e o delineamento fatorial para a otimização da extração de lipídios da biomassa foram desenvolvidos utilizando o Software Statistica 7.0, para Windows (Statsoft®,EUA), incluindo ANOVA (Análise de variância) para obter as interações entre as variáveis e a resposta. O melhor ajuste do modelo foi expresso pelo coeficiente de determinação (R^2) com a verificação da falta de ajuste e a significância estatística foi verificada pelo teste F (Teste de Fischer), utilizando o mesmo programa. As superfícies de resposta tridimensionais foram geradas por meio da plotagem das respostas rendimento de lipídios ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e porcentagem de lipídios (% b.s) no eixo Z contra duas variáveis independentes, mantendo-se a terceira variável independente em seu nível constante (nível 0).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Otimização da produção de lipídios

A matriz dos ensaios do DCCR com as variáveis independentes analisadas (concentração de nitrato, concentração de fosfato e concentração de cloreto de sódio) no meio de cultivo, bem a biomassa seca ao final dos 14 dias de cultivo está apresentada na TABELA 13.

TABELA 13 – NÍVEIS CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO DCCR E OS RESULTADOS DA PRODUTIVIDADE LIPÍDICA

(continua)

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Biomassa seca ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	-1	-1	-1	50
2	-1	-1	+1	170
3	-1	+1	-1	160
4	-1	+1	+1	130

TABELA 13 – NIVEIS CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO DCCR E OS RESULTADOS DA PRODUTIVIDADE LIPÍDICA

				(conclusão)
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Biomassa seca (mg·L ⁻¹)
5	+1	-1	-1	230
6	+1	-1	+1	280
7	+1	+1	-1	350
8	+1	+1	+1	170
9	-1,68	0	0	56
10	+1,68	0	0	330
11	0	-1,68	0	280
12	0	+1,68	0	280
13	0	0	-1,68	340
14	0	0	+1,68	190
15	0	0	0	360
16	0	0	0	320
17	0	0	0	330

Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão

X₁ = Concentração de Nitrato (mg mL⁻¹); X₂ = Concentração de Fosfato (mg mL⁻¹); X₃ = Concentração de Cloreto de sódio (g L⁻¹)

FONTE: A autora (2019).

Os valores de biomassa variaram entre 50 e 360 mg biomassa seca·L⁻¹ de meio de cultivo. Os menores valores observados entre as respostas do planejamento foram de 50 mg biomassa·L⁻¹ (Ensaio 1) e 56 mg biomassa·L⁻¹ de meio de cultivo (Ensaio 9). Assim como observado por Converti et al., (2009), Dammak et al., (2017) e Menegol et al., (2017) a deficiência de nitrogênio no meio de cultivo influenciou negativamente a produção de biomassa. Os autores destacam que a produtividade lipídica deve ser considerada para a otimização da produção de lipídios e não somente o percentual lipídico na biomassa. A produtividade é importante para posterior aplicação industrial das microalgas.

Na TABELA 14 são apresentados os efeitos das variáveis estudadas nas faixas estudadas. Observou-se que o termo linear da variável X₁ (concentração de nitrato) apresentou efeito positivo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) sobre a resposta estudada. Já o termo quadrático apresentou efeito negativo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$), indicando que a função tem formato parabólico com um ponto de máximo. Resultados semelhantes foram observados por Hadrich et al. (2018) no cultivo da microalga *Chlorella* sp. a variável concentração de nitrato também

apresentou efeito significativo, sendo que o termo linear apresentou efeito positivo e o quadrático efeito negativo.

Os termos linear e quadrático da concentração de fosfato não foram significativos na faixa estudada. O termo linear da concentração de NaCl também não foi significativo na faixa estudada. O termo quadrático apresentou efeito significativo negativo, mostrando que ao aumentar a concentração salina houve um decréscimo na resposta. A interação entre as variáveis concentração de fosfato e concentração de NaCl apresentou efeito negativo significativo.

TABELA 14– EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO DCCR EM FUNÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA

Fator	Efeito	Erro Padrão	Valor t (7)	p (nível de significância)
Média	341,513	27,51285	12,41287	0,000005*
X ₁ (L)	144,393	27,14062	5,32018	0,001099*
X ₁ (Q)	-124,412	28,92626	-4,30101	0,003562*
X ₂ (L)	5,040	25,60601	0,19682	0,849559
X ₂ (Q)	-58,046	29,18945	-1,98858	0,087073
X ₃ (L)	-42,792	25,99469	-1,64618	0,143722
X ₃ (Q)	-75,376	29,17085	-2,58395	0,036263*
X ₁ (L) . X ₂ (L)	-34,159	31,72306	-1,07678	0,317282
X ₁ (L) . X ₃ (L)	-55,000	33,87716	-1,62351	0,148509
X ₂ (L) . X ₃ (L)	-95,000	33,87716	-2,80425	0,026363*

*Significativo para $p < 0,05$

(L) = Termo Linear; (Q)= Termo Quadrático

X₁ = Concentração de Nitrato ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) X₂ = Concentração de Fosfato ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); X₃= Concentração de Cloreto de sódio ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

FONTE: A autora (2019).

Para a construção do modelo foram consideradas as variáveis estatisticamente significativas: X₁ (L) e (Q), X₂ (L) e (Q), X₃ (L) e (Q) e a interação X₂ (L). X₃ (L). A variável X₂ (Q) apesar de não ser estatisticamente significante, quando adicionada ao modelo diminuiu o valor de F_{calc} do *lack of fit* e apresentando o melhor valor de R². As demais variáveis foram incorporadas aos resíduos para o cálculo da ANOVA, apresentada na TABELA 15. O modelo apresentou R² (R² = 0,85 e R²_{ajustado} = 0,73).

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIANCA PARA A RESPOSTA BIOMASSA (MODELO SELECIONADO)

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tabelado}
Regressão	143.509,4	7	20.501,3	7,44	3,29
Resíduos	24.779	9	2.753,18		
<i>Lack of fit</i>	2.4311,9	7	3.473,13	14,88	19,35
Erro puro	466,7	2	233,3		
Total	168288,0	16			

SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrados médios

FONTE: A autora (2019).

Pela análise da ANOVA da TABELA 15, verificou-se que o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} indicando que o modelo é válido e o coeficiente de determinação (R^2) é bom, com o modelo explicando 85% dos resultados. O valor de F obtido pela falta de ajuste (14,88) não foi significativo ($F_{tab.7;2}=19,35$), confirmando que os dados experimentais se ajustam de maneira satisfatória ao modelo. Dessa forma, a equação que fornece a estimativa da biomassa seca em função das concentrações de nitrato, fosfato e NaCl está apresentada abaixo:

$$Biomassa\ seca\ (mg \cdot mL^{-1}) = -839,24 + 6,14 X_1 - 0,023 X_1^2 + 27,69 X_2 - 0,29 X_2^2 + 47,302 X_3 - 0,78 X_3^2 - 0,67 X_2 X_3 \quad (6)$$

Em que:

X_1 = Concentração de Nitrato ($mg \cdot mL^{-1}$)

X_2 = Concentração de Fosfato ($mg \cdot mL^{-1}$)

X_3 = Concentração de Cloreto de sódio ($g \cdot L^{-1}$)

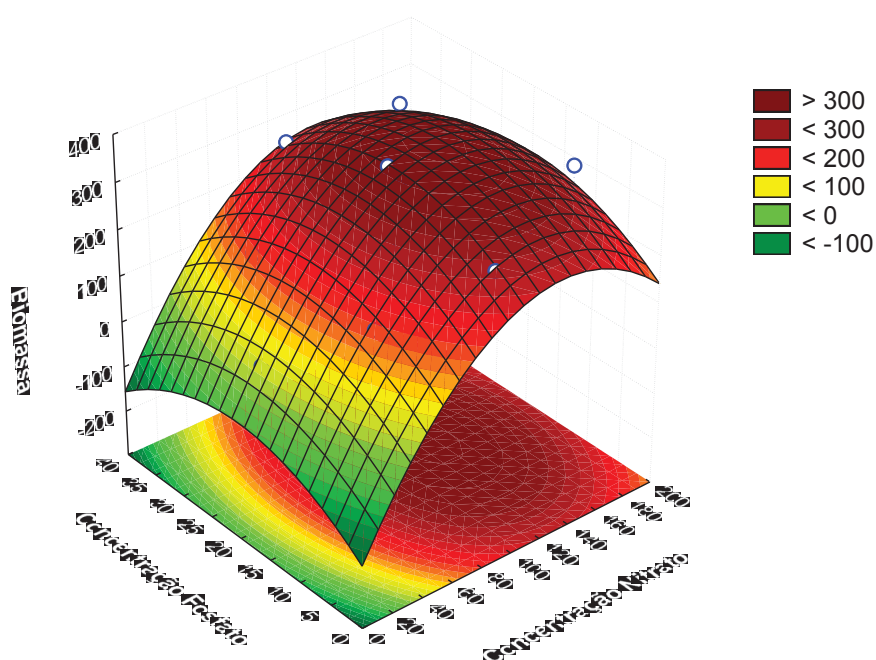
A equação do modelo foi utilizada para construção das superfícies de resposta utilizando as variáveis concentração de nitrogênio e fosfato, mantendo a concentração de NaCl no ponto central, como pode ser observado na FIGURA 14. E utilizando as variáveis concentração de nitrogênio e concentração de cloreto de sódio, mantendo a concentração de fosfato no ponto central (FIGURA 15).

Com base no modelo foi possível verificar que os valores ótimos para maximizar a produtividade de biomassa foram de $132,56 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ de Nitrato, $25,1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ de fosfato e $19,23 \text{ g} \cdot L^{-1}$ de NaCl. Foram realizados experimentos para validação

externa do modelo utilizando os valores ótimos das variáveis, o valor de biomassa seca foi de $405,4 \pm 5,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. O valor de biomassa previsto pelo modelo foi de $372 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (erro de 9,0 %).

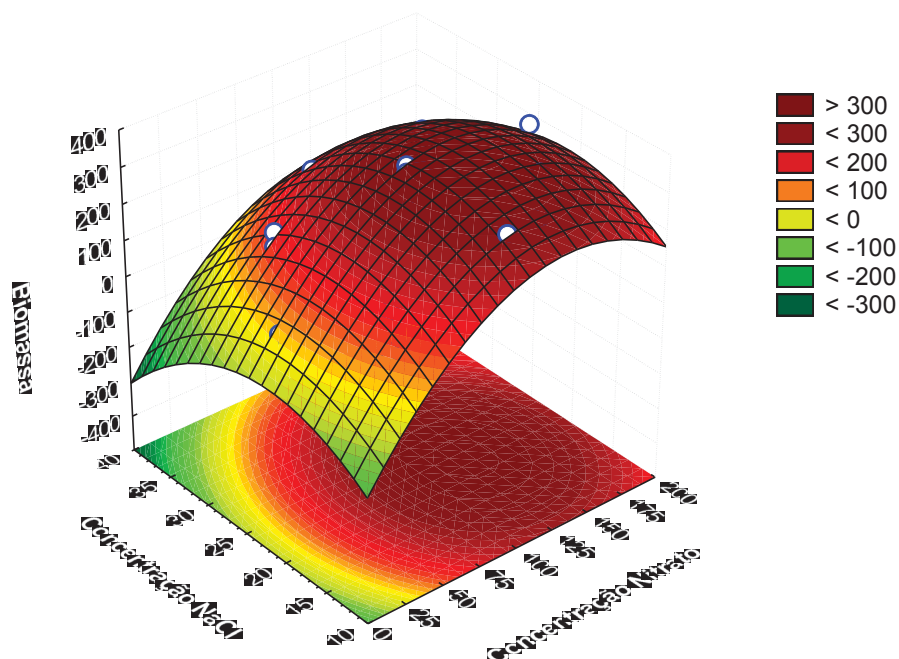
Ao final dos 14 dias de cultivo foram determinadas as concentrações residuais de nitrato e fosfato. Em todos os ensaios a concentração final de nitrato foi menor que $0,01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, indicando que todo o nitrato foi consumido. As concentrações de fosfato variaram entre $< 0,01$ e $0,17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. E o valor porcentual do fosfato consumido variou entre 98 a 100 %. As concentrações residuais indicam que a relação C:N utilizada para o delineamento experimental utilizadas foram adequadas, sendo que não houve excesso dos nutrientes nitrato e fosfato no meio de cultivo.

FIGURA 14 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E FOSFATO



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 15 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E CLORETO DE SÓDIO



FONTE: A autora (2019).

5.3.2 Otimização da extração de lipídios

A partir dos resultados do DCCR para a produção de lipídios foi realizado o cultivo otimizado da microalga *T. gracilis* e ao final do 14º dia de cultivo a biomassa foi separada por centrifugação e submetida a secagem. Foi realizado um planejamento fatorial $2^3 + 3$ PC para avaliar a influência das variáveis tempo, temperatura de extração e razão dos solventes clorofórmio:metanol no rendimento da extração dos lipídios. A matriz dos ensaios do planejamento fatorial com as variáveis independentes analisadas, bem como o rendimento lipídico está apresentada na TABELA 16. Os valores do rendimento da extração de lipídios em base seca variaram de 6,84 a 27,72 %.

TABELA 16- NIVEIS CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL (2^3) E OS RESULTADOS DO CONTEÚDO LIPÍDICO

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Conteúdo lipídico (% b.s)
1	-1	-1	-1	7,89 ± 0,41

2	-1	-1	+1	11,42 ± 0,88
3	-1	+1	-1	6,84 ± 0,73
4	-1	+1	+1	13,67 ± 0,93
5	+1	-1	-1	7,50 ± 0,35
6	+1	-1	+1	22,76 ± 0,87
7	+1	+1	-1	9,90 ± 0,25
8	+1	+1	+1	27,72 ± 0,91
9	0	0	0	10,11 ± 0,41
10	0	0	0	9,52 ± 0,22
11	0	0	0	11,34 ± 0,37

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão

X₁ = Temperatura; X₂ = Tempo; X₃ = Razão Clorofórmio:Metanol

FONTE: A autora (2019).

Na TABELA 17 são apresentados os efeitos das variáveis nas faixas estudadas. Observou-se que as variáveis X₁ (Temperatura) e X₃ (Razão Solvente) apresentaram efeito positivo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) sobre a resposta estudada, indicando que o aumento da temperatura e o aumento da proporção de clorofórmio aumentam a extração de lipídios na biomassa microalgal. A interação entre as variáveis também apresentou positivo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).

TABELA 17- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (2³) EM FUNÇÃO DA PRODUTIVIDADE LIPÍDICA

Fator	Efeito	Erro Padrão	Valor t (4)	p (nível de significância)
Média	12,80218	0,568953	22,50129	0,000023
X ₁	10,85175	1,334314	8,13283	0,001243*
X ₂	2,13125	1,334314	1,59726	0,185446
X ₃	7,00675	1,334314	5,25120	0,006292*
X ₁ . X ₂	1,45975	1,334314	1,09401	0,335412
X ₁ . X ₃	5,67525	1,334314	4,25331	0,013123*
X ₂ . X ₃	1,53475	1,334314	1,15022	0,314142

*Significativo para $p < 0,05$

X₁ = Temperatura (°C); X₂ = Tempo (min) X₃ = Razão solvente (clorofórmio: metanol)

FONTE: A autora (2019).

A variável tempo de extração não teve efeito estatístico significativo no rendimento de extração de lipídios. Dessa forma, o tempo de 30 minutos pode ser

utilizado nos processos de extração por ultrassom diminuindo o consumo de energia sem prejudicar a eficiência da extração de lipídios.

Pela análise da ANOVA da TABELA 18, verificou-se que o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} indicando que o modelo é válido. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,944 e o $R^2_{\text{ajust}} = 0,892$, confirmando a validade do modelo. O valor de F obtido pela falta de ajuste (9,24) não se apresentou significativo ($F_{\text{tab},5;2} = 19,29$), confirmando que os dados experimentais se ajustam de maneira satisfatória ao modelo. Dessa forma, a equação que fornece a estimativa do rendimento na extração de lipídios é representada por:

$$\text{Rendimento (\%)} = 12,802 + 10,851 \cdot X_1 + 7,006X_3 + 5,675 X_1 \cdot X_3 \quad (7)$$

Em que:

X_1 = Temperatura (°C)

X_3 = Razão solvente (clorofórmio: metanol)

TABELA 18- ANÁLISE DE VARIANCIA PARA A RESPOSTA CONTEÚDO LIPIDICO (MODELO SELECIONADO)

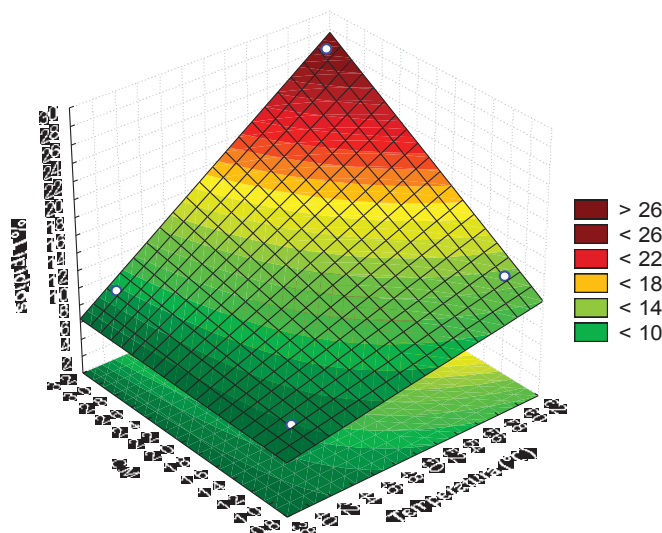
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tabelado}
Regressão	398,12	3	132,70	28,76	4,34
Resíduos	32,30	7	5		
<i>Lack of fit</i>	30,96	5	6,19	9,24	19,29
Erro puro	1,33	2	0,67		
Total	430,42	10			

SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrados médios

FONTE: A autora (2019).

A superfície de resposta considerando as variáveis significativas, temperatura e razão de solvente, está apresentada na FIGURA 16. Pode ser observado que o teor de lipídios extraído aumentou com o aumento da temperatura e da razão clorofórmio:metanol. O efeito da temperatura no rendimento da extração foi avaliado na faixa entre 40 a 60 °C.

FIGURA 16 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *T. GRACILIS* EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E RAZÃO DE SOLVENTE.



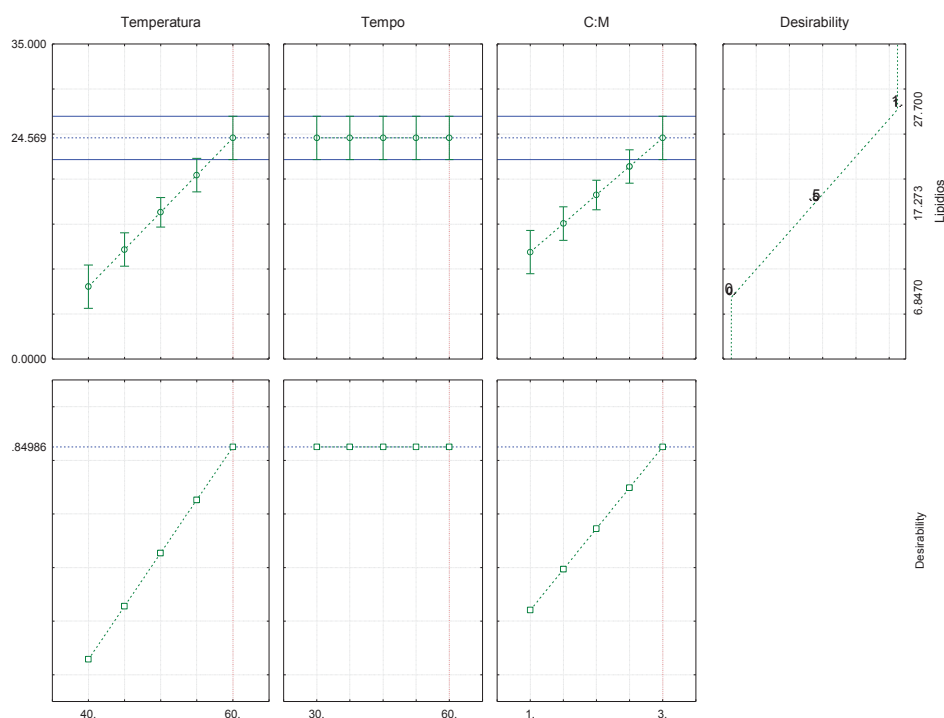
FONTE: A autora (2019).

Como pode ser observado na FIGURA 17 no perfil de desejabilidade, o rendimento máximo encontra-se fora da faixa experimental estudada. O valor máximo de temperatura escolhido (60 °C) baseou-se no ponto de ebulição do clorofórmio que é de 61,2 °C. Lu et al., (2016) também reportaram o aumento do rendimento na extração de lipídios da microalga *Chlorococcum* sp. com o aumento da temperatura, sendo que a temperatura ótima foi de 80°C. A temperatura de extração afeta a viscosidade, solubilidade e a eficiência de difusão do solvente. O aumento da temperatura de extração diminui a tensão superficial e a viscosidade e aumenta o coeficiente de difusão e a permeabilidade do solvente de extração. O aumento da temperatura também pode causar rompimento celular e, como resultado, tornam os compostos celulares mais disponíveis para extração pelo solvente. Por outro lado, com o aumento da temperatura pode ocorrer a oxidação e decomposição dos lipídios (NATAJARAN et al., 2015).

Em relação a razão clorofórmio:metanol, também verificou-se que o rendimento máximo encontra-se fora da faixa experimental estudada. Diferentes proporções devem ser estudadas futuramente para a otimização do processo. Hadrach et al. (2018) realizaram a otimização da extração de lipídios de *Chlorella* sp., utilizando as razões de 1:1, 2:1 e 3:1 e verificaram que o máximo rendimento foi obtido com os solventes na proporção de 2:1 (clorofórmio:metanol). A extração de lipídios de microalgas é basicamente uma operação de transferência de massa, que depende da

natureza do soluto e do solvente, da seletividade do solvente e do nível de convecção e difusão no meio (ARAÚJO et al., 2013).

FIGURA 17 - PERFIS DE DESEJABILIDADE PARA O REDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE LÍPIDIOS (%) E NÍVEIS DE DESEJABILIDADE DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA, TEMPO E RAZÃO CLOROFÓRMIO: METANOL



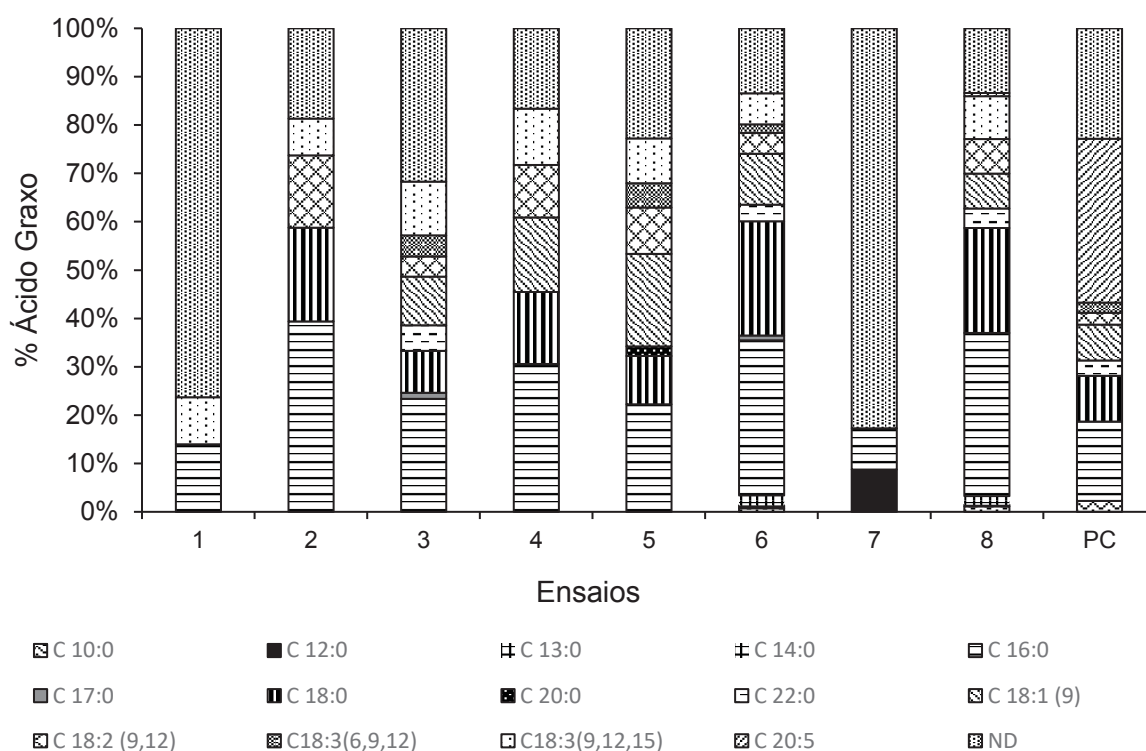
FONTE: A autora (2019).

5.3.3 Avaliação do perfil de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos dos lípidios obtidos em diferentes condições de extração está apresentada na FIGURA 18. Quatorze diferentes ácidos graxos foram identificados, incluindo ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados, (AGM) e poliinsaturados (AGPI). Os resultados da composição de AG entre os ensaios foram diferentes, indicando que a temperatura de extração e a razão de solventes empregados no processo de extração influenciaram no perfil de ácidos graxos. Os ensaios 1 e 7 apresentaram grande quantidade (76,2 e 82,7 %) de picos não identificados. Os ensaios 2, 4, e 8 nos quais a temperatura de extração foi de 60 °C, apresentaram maior quantidade de ácidos graxos saturados quando comparados aos demais tratamentos.

As concentrações de ácido palmítico (C 16:0) variaram entre 8,5 a 39,4 %, sendo que o ensaio 4 apresentou a maior concentração do ácido graxo. A concentração de AGPI variou entre 9,71 a 45,83 %, destacando-se a presença do ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5) encontrado na concentração de 33,9 % no ensaio PC. Selvakumar e Umadevi (2014) encontraram 14,0 % de EPA em *T. gracilis* cultivada com 50 mg·L⁻¹ de nitrato e extração com clorofórmio:metanol na proporção 2:1.

FIGURA 18 -COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE *T. GRACILIS*



FONTE: A autora (2019).

5.3.4 Atividade bacteriana dos extratos lipídicos

Os diferentes extratos lipídicos obtidos na etapa de otimização da extração (5.3.2), ensaios 1 a 8 e uma amostra do ponto central, foram avaliados quanto a atividade antibacteriana frente à quatro patógenos de importância em alimentos. Observou-se que todos os extratos avaliados inibiram os patógenos em concentrações que variaram entre 0,20 a 1,45 mg·mL⁻¹ (TABELA 19). Os menores resultados de CIM foram observados para *E. coli* quando comparado aos demais

micro-organismos. Analisando o perfil de ácidos graxos dos extratos pode-se verificar que os ácidos graxos saturados C16:0 e C 18:0 e os ácidos graxos insaturados como C 18:1(9), C 18:2 (9,12) e C18:3 (9,12,15) podem ser principais responsáveis pela atividade bacteriana dos extratos. Estes ácidos graxos são tradicionalmente encontrados em microalgas, dessa forma, as microalgas em geral podem produzir compostos com potencial antimicrobiano. Resultados semelhantes foram reportados por Guedes et al. (2011) que avaliaram a atividade antibacteriana e o perfil lipídico de *C. vulgaris* e *S. obliquus*.

TABELA 19- CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (mg·mL⁻¹) DE EXTRATOS LIPIDICOS DE *T. GRACILIS* FRENTE A PATÓGENOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS

Patógenos	Extrato lipídico								
	1	2	3	4	5	6	7	8	PC
<i>S. aureus</i>	0,80	1,00	0,75	1,35	1,00	0,85	0,50	1,45	0,80
<i>L. monocytogenes</i>	0,40	0,95	0,95	0,75	0,95	0,85	0,50	0,95	0,95
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,50	0,50	0,50	0,95	0,50	0,95	0,50	1,45	0,50
<i>E. coli</i>	0,20	0,20	0,20	0,40	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

PC = amostra referente ao ensaio do ponto central

FONTE: A autora (2019).

5.4 CONCLUSÕES

Entre os fatores estudados para otimização das condições de cultivo para produção de biomassa da microalga *T. gracilis*, a concentração de nitrato, cloreto de sódio e a interação entre a concentração de fosfato e a salinidade do meio de cultivo apresentaram efeitos estatisticamente significativos.

No processo de otimização da extração de lipídios, observou-se que o rendimento de extração é dependente da proporção de solvente e da temperatura. As maiores extrações foram obtidas com os solventes na proporção de 3:1 (clorofórmio:metanol) e temperatura de extração de 60 °C. A análise do perfil de ácidos graxos dos extratos otimizados permitiu verificar uma grande diferença de composição de ácidos graxos entre os ensaios. Destaca-se a presença do ácido graxo C20:5 encontrado na concentração de 33,9 % no ensaio com condições de 50 °C e proporção 2:1 (clorofórmio:metanol). Todos os extratos testados apresentaram atividade antibacteriana frente aos patógenos. Os resultados mostram a possibilidade

de aumento do rendimento de extração de lipídios de *T. gracilis* e a utilização como antibacterianos naturais em alimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As microalgas *C. vulgaris*, *C. minutissima*, *D. tertiolecta* e *N. oculata* apresentaram potencial biotecnológico para produção de β -galactosidase, na produção de metabólitos e de lipídios com atividade antibacteriana e antioxidante.

Algumas espécies de microalgas não apresentaram a capacidade de crescimento no cultivo mixotrófico com lactose como fonte de carbono. Foi observada a produção da enzima extracelular sendo que a microalga *D. tertiolecta* apresentou maior atividade enzimática de β -galactosidase, hidrolisando 97,7% da lactose presente no meio de cultivo. O cultivo mixotrófico apresentou maior produtividade de biomassa quando comparado ao cultivo fotoautotrófico.

Os solventes hexano e etanol foram utilizados para a extração de compostos bioativos da biomassa de microalgas. Verificou-se maior rendimento de extração, quantidade de pigmentos e fenólicos dos extratos etanólicos. A atividade antioxidante pelos ensaios ABTS^{••} e HOCl foi dependente da concentração dos extratos e somente foi observada nos extratos etanólicos. Quarenta compostos foram identificados por CG-EM nos extratos etanólicos e hexânico, sendo o fitol, ácidos graxos e fitoesteróis encontrados em maior proporção.

As microalgas são fontes de lipídios e a atividade biológica destes compostos é pouco explorada. Verificou-se que o processo de transesterificação de lipídios aumentou a atividade antibacteriana frente a patógenos alimentares. Os patógenos Gram-negativos (*E. coli* e *Salmonella* Enteritidis) foram mais sensíveis a todos os extratos testados que os patógenos Gram-positivos. As espécies *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* exibiram altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e *N. oculata* apresentou o maior teor de ácido palmítico, que são reconhecidos por seus efeitos antimicrobianos.

O delineamento composto central rotacional foi utilizado na otimização da produção de biomassa da microalga *T. gracilis*, otimizando as concentrações de nitrato, fosfato e cloreto de sódio no meio de cultivo. Para otimização do rendimento de extração de lipídios foi utilizado um planejamento fatorial em que as variáveis temperatura, tempo e proporção de solvente foram estudados. Os ensaios de otimização são importantes para o escalonamento, aplicação industrial e redução de custos do cultivo de microalgas.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para futuros trabalhos relacionados a este tema, recomenda-se:

- Avaliar as condições de cultivo para otimizar a produção de β -galactosidade pelas microalgas *C. minutissima*, *N. oculata* e *D. tertiolecta*;
- Utilizar co-produtos da indústria de produtos lácteos no cultivo mixotrófico das microalgas
- Otimizar as condições de extração de compostos antibacterianos e antioxidantes com os solventes hexano e etanol;
- Realizar a separação das frações lipídicas da microalga *T. gracilis*, analisar o perfil de ácidos graxos e atividade antibacteriana de cada fração;
- Realizar testes *in vivo* da atividade antioxidante dos compostos;
- Aplicar os compostos extraídos com etanol e os lipídios em biofilmes, produtos alimentícios e cosméticos e avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante;

REFERÊNCIAS

- ABDO, S. M. et al. Phytochemical and antibacterial study of five freshwater algal species. **Asian Journal of Plant Sciences**.v. 11, p.109-116, 2012.
- ABREU, A. P. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61-66, 2012. ISSN 0960-8524.
- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 131-151, 2013.
- ADRIO, J.; DEMAİN, A. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117, 2014. ISSN 2218-273X.
- AHMED, F.; ZHOU, W.; SCHENK, P. M. Pavlova lutheri is a high-level producer of phytosterols. **Algal Research**, v. 10, p. 210-217, 2015. ISSN 2211-9264.
- ALDRED, E. M.; BUCK, C.; VALL, K. Chapter 21 - Phenols. In: ALDRED, E. M.;BUCK, C., *et al* (Ed.). **Pharmacology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009. p.149-166.
- ALKHAMIS, Y.; QIN, J. G. Cultivation of *Isochrysis galbana* in Phototrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 9, 2013.
- ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Antioxidant activity and prevention of pork meat lipid oxidation using traditional Mexican condiments (pasilla dry pepper, achiote, and mole sauce). **Food Science and Technology**, v. 34, p. 371-378, 2014.
- AMARO, H. A.; GUEDES, C.; MALCATA, X. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens:communicating current research and technological advances**. Spain: Formatex, v.2, 2011. p.1272-1284. ISBN 978-84-939843-2-8.
- AMBATI, R. R. et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-22, 2018.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the determination of water and wastewater. Washington: APHA, 2012.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. USA: Elsevier Academic Press, 2005. 589 ISBN 0-12-088426-7.
- ANDRADE, M. D. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, p. 2031-2034, 2008.

ANDRULEVICIUTE, V. et al. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 83-90, 2014. ISSN 1573-5176.

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Non-photoautotrophic cultivation of microalgae: an overview. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 125-136, 2014.

ARAUJO, G.S; MATOS, L.B.; FERNANDES, J.O *et al.* Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.20, p.95-98, 2013.

AREMU, A. O. et al. Changes in phytochemical content and pharmacological activities of three *Chlorella* strains grown in different nitrogen conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 149-159, 2015. ISSN 1573-5176.

AUGUSTO, T. R. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtila (*Ugni molinae* Turcz.). **Food Science and Technology**, v. 34, p. 667-679, 2014. ISSN 0101-2061.

AWAD, A. B., FINK, C.S. 2000. Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. **The Journal of Nutrition** 130 (9):2127-2130, 2000. doi: 10.1093/jn/130.9.2127.

AXELSSON, M.; GENTILI, F. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89643, 2014.

BANSKOTA, A. H. et al. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. **Journal of Applied Phycology**, 2018.

BBC. Global markets for enzymes in industrial applications. 2017. Disponível em: < <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html> >. Acesso em: 19 jul.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007. ISSN 0734-9750.

BELLOU, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1476-1493, 2014.

BENAVENTE-VALDÉS, J. R. et al. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 117-125, 2016. ISSN 2215-017X.

BENEMANN, J.; WOERTZ, I.; LUNDQUIST, T. Autotrophic Microalgae Biomass Production: From Niche Markets to Commodities. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 3-10, 2018.

BENTAHAR, J. et al. Investigation of β -galactosidase production by microalga *Tetradasmus obliquus* in determined growth conditions. **Journal of Applied Phycology**, 2018. ISSN 1573-5176.

BENVENUTI, G. et al. Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1425-1431, 2015. ISSN 1573-5176.

BERGSSON, G.; STEINGRÍMSSON, Ó.; THORMAR, H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n. 4, p. 258-262, 2002.

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**, v. 1, n. 1, Supplement, p. S1-S7, 2011. ISSN 2221-1691.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. **Foods**, v. 6, n. 5, p. 33, 2017.

BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of cultures. In: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J. (Ed.). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p.456-465.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743-756, 2013. ISSN 1573-5176.

BOROWITZKA, M. A.; SIVA, C. J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 5, p. 567-590, 2007. ISSN 1573-5176.

BRASIL, B. D. S. A. F. et al. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, v. 25, p. 76-89, 2017. ISSN 2211-9264.

BREUER, G. et al. Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 80, p. 50628, 2013.

BULUT, O. et al. Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. **Journal of Applied Phycology**, 2019. doi: 10.1007/s10811-018-1726-5.

BURJA, A. M. et al. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, v. 57, n. 46, p. 9347-9377, 2001. ISSN 0040-4020.

BUT, P. G. et al. Myeloperoxidase from Neutrophil Peroxisomes. **Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences**, v. 30, n. 3, p. 207-211, 2003. ISSN 1608-3059.

CAKMAK, Y. S.; KAYA, M.; ASAN-OZUSAGLAM, M. Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 679-690, 2014.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 11-48, 2013. ISSN 1040-8398.

CAREVIĆ, M. et al. Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. **Hemijaska industrija**, v. 69, n. 3, p. 7, 2015.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 56-66, 2019. ISSN 1473-3099.

CERON GARCIA, M. C. et al. Mixotrophic Production of Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum* on Various Carbon Sources. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 689-694, 2006. ISSN 1738-8872.

CERÓN GARCÍA, M. C. et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 239-248, 2006.

CHAI SUTYAKORN, P.; PRAIBOON, J.; KAEWSURALIKHIT, C. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 37-45, 2018.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516, 2012.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011. ISSN 0960-8524.

_____. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013. ISSN 1369-703X.

CHEN, G.-Q.; CHEN, F. Growing Phototrophic Cells without Light. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 9, p. 607-616, 2006. ISSN 1573-6776.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

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

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.-J. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae **Biotechnology**. 3: 21-34 p. 2004.

CHOJNACKA, K.; ZIELIŃSKA, A. Evaluation of growth yield of *Spirulina* (Arthrospira) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 437-445, 2011. ISSN 1573-0972.

_____. Evaluation of growth yield of *Spirulina* (Arthrospira) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 437-445, February 01 2012. ISSN 1573-0972.

CONVERTI, A. CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M.D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v.48, p.1146-1151, 2009.

CORRÊA, D. O. et al. Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel engine hazardous emissions fixation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 33, p. 21463-21475, 2017.

COSTA, M. D.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. D. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1183-1187, 2004.

COUTTEAU, P. Micro-Algae. In: (Ed.). **Manual on production and use of living food for aquaculture**. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, v.361, 1996. p.295. ISBN 92-5-103934-8.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, 2008.

DANTAS, D.M.M; OLIVEIRA, C.Y.B; COSTA, R.M.P.B; GÁLVEZ, M.G.C.C; BEZERRA, R.S. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. **Food Science and Technology International**, 2019. doi < <https://doi.org/10.1177/1082013218825024>>

DAMMAK M.; HADRICH,B.; MILADI, R. et al. Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp. *Lipids in Health and Disease*, v. 16, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0378-1>.

DARKI, B. Z.; SEYFABADI, J.; FAYAZI, S. Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017. ISSN 1516-8913.

DAS, B. et al. Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, Part A, p. 3253-3257, 2016. ISSN 2214-7853.

DASGUPTA, C. N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10218-10238, 2010. ISSN 0360-3199.

DAVIES, C. et al. Plant and algal interference in bacterial beta-D-galactosidase and beta-D-glucuronidase assays. **Applied and Environmental Microbiology**. 60: 3959-3964 p. 1994.

DAVOODBASHA, M. et al. An evidence of C16 fatty acid methyl esters extracted from microalga for effective antimicrobial and antioxidant property. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 233-238, 2018. ISSN 0882-4010.

_____. New reports on anti-bacterial and anti-candidal activities of fatty acid methyl esters (FAME) obtained from *Scenedesmus bijugatus* var. *bicellularis* biomass. **RSC Advances**, v. 2, n. 30, p. 11552-11556, 2012.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Sciences**, v. 93, n. 15, p. 479-486, 2013. ISSN 0024-3205.

DE LA NOUE, J.; DE PAUW, N. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 6, n. 4, p. 725-770, 1988. ISSN 0734-9750.

DE MORAIS, M. G. et al. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15, 2015.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629-1642, 2010.

DEY, P. M.; KAUSS, H. α -galactosidase of *Poterioochromonas malhamensis*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 45-48, 1981. ISSN 0031-9422.

DORAN, P. M. Chapter 4 - Material Balances. In: (Ed.). **Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)**. London: Academic Press, 2013. p.87-137. ISBN 978-0-12-220851-5.

DRAGONE, G. et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, 2011.

DUSSAULT, D. et al. Antimicrobial effects of marine algal extracts and cyanobacterial pure compounds against five foodborne pathogens. **Food Chemistry**, v. 199, p. 114-118, 2016. ISSN 0308-8146.

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

ENZING, C. et al. **Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe**. Luxembourg: Publications Office of the European Union 2014.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008. ISSN 1573-6776.

FALAISE, C. et al. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. **Marine Drugs**, v. 14, n. 9, p. 159, 2016.

FAN, X. et al. Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 38, p. 9211-9222, 2014.

FDA, F. A. D. A. Code of Federal Regulations - Title 21 - Food and Drugs. **PART 172-FOOD ADDITIVES PERMITTED FOR DIRECT ADDITION TO FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION**, 2017. Disponível em: <
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.860>
 >. Acesso em: 31 jul 2018.

FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. Phytosterols: Applications and recovery methods. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2335-2350, 2007. ISSN 0960-8524.

FRANCAVILLA, M. et al. Cascading microalgae biorefinery: Fast pyrolysis of *Dunaliella tertiolecta* lipid extracted-residue. **Algal Research**, v. 11, p. 184-193, 2015.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4144-4150, 2010. ISSN 0960-8524.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Bioactive Phenolic Compounds from Algae. In HERNADEZ- LEDESMA, B; HERRERO, M. (Ed). **Bioactive Compounds from Marine Foods**, Chicago: John Wiley & Sons, 2013. ISSN 9781118412893.

FU, W. et al. Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v.54, 2017. p.199-225. ISBN 1572-5995.

FÁBREGAS, J. et al. Improvement of growth rate and cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 48, n. 2, p. 107-111, 1994. ISSN 0960-8524.

GANGL, D. et al. Biotechnological exploitation of microalgae. **Journal of Experimental Botany**, September 22, 2015 2015.

GAO, C. et al. Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 582, 2014. ISSN 1471-2164.

GIRARD, J.-M. et al. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research**, v. 5, p. 241-248, 2014. ISSN 2211-9264.

GIRARD, J.-M. et al.. Phycoremediation of cheese whey permeate using directed commensalism between *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides*. **Algal Research**, v. 22, p. 122-126, 2017. ISSN 2211-9264.

GOIRIS, K. et al. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1477-1486, 2012.

GOIRIS, K. et al. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 3, p. 483-492, 2014. ISSN 0022-3646.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396-1412, 2016. ISSN 0734-9750.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1655-1661, 2012. ISSN 0734-9750.

GRIMA, E.M; FERNANDEZ, F.G; GARCIA-CAMANHO, F. CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-247, 1999.

GUILLARD, R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. L. e CHANLEY, M. H. (Ed.). **Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport**. Boston, MA: Springer US, 1975. p.29-60. ISBN 978-1-4615-8714-9.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010. ISSN 0100-4042.

GUNES, S. et al. Determination of Superoxide Dismutase Activities in Different Cyanobacteria for Scavenging of Reactive Oxygen Species. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 5, n. 1, p. 25-32, 2015.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160-186, 2006.

HADRICH, B.; AKREMI, I.; DAMMAK, M. et al. Optimization of lipids ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology. **Lipids in Health and Disease**. v.17, p.87-96, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z>

HAVLIK, I.; SCHEPER, T.; REARDON, K. F. Monitoring of Microalgal Processes. In: POSTEN, C. e FENG CHEN, S. (Ed.). **Microalgae Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p.89-142.

HEREDIA-ARROYO, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245-2253, 2011.

HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; GUILLERMO R.; SANTOYO, S. Dunaliella salina Microalga Pressurized Liquid Extracts as Potential Antimicrobials. **Journal of Food Protection** 69 (10):2471-2477, 2006.

HESS, S. K. et al. Production of chemicals from microalgae lipids – status and perspectives. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 1, p. 1700152, 2018.

HETTA, M. et al. Antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis*. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 3: 31-39 p. 2014.

HOSSEINI TAFRESHI, A.; SHARIATI, M. Dunaliella biotechnology: methods and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009. ISSN 1365-2672.

HUANG, C. B.; EBERSOLE, J. L. A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 75-80, 2010.

HUANG, Y. et al. The Potential of Microalgae Lipids for Edible Oil Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 3, p. 438-451, 2016.

HUERLIMANN, R.; DE NYS, R.; HEIMANN, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 245-257, 2010.

HUSAIN, Q. β Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010. ISSN 0738-8551.

HUSSAIN, J. et al. Effects of Different Biomass Drying and Lipid Extraction Methods on Algal Lipid Yield, Fatty Acid Profile, and Biodiesel Quality. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3048-3057, 2015. ISSN 1559-0291.

IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703-709, 2012. ISSN 0022-5142.

IUBMB. Enzyme Nomenclature. 1992. Disponível em: <
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 19 jul.2017

JAYSHREE, A.; JAYSHREE, S.; THANGARAJU, N. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n.5, p.575-581, 2016.

KABARA, J. J. Antimicrobial agents derived from fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p. 397-403, 1984.

KABARA, J. J. et al. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23-28, 1972.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 24-31, 2015. ISSN 1365-2621.

KALLINY, S.; ZAWISTOWSKI, J. Phytosterols and Phytostanols. In: MELTON, L.; SHAHIDI, F., et al (Ed.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Oxford: Academic Press, 2019. p.289-299. ISBN 978-0-12-814045-1.

KATOH, S.; YOSHIDA, F. **Biochemical Engineering: A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists**. Germany: WILEY-VCH, 2009. 350 ISBN 978-3-527-62765-3.

KELLAM, S. J.; WALKER, J. M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. **British Phycological Journal**, v. 24, n. 2, p. 191-194, 1989.

KIM, G.; MUJTABA, G.; LEE, K. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. **Algae**, v. 31, n.3, p. 257-266, 2016.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365-378, 2013. ISSN 0738-8551.

KUNJAPUR, A. M.; ELDRIDGE, R. B. Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 8, p. 3516-3526, 2010. ISSN 0888-5885.

LAW, S. Q. K. et al. Conversion and recovery of saponifiable lipids from microalgae using a nonpolar solvent via lipase-assisted extraction. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 338-347, 2018.

LEE, R. E. **Phycology**. 4. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

LEE, W.; WOO E-H, LEE, D.G. Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. **Free Radical Research** 50 (12):1309-1318, 2016. doi: 10.1080/10715762.2016.1241395.

LEVI, C.; GIBBS, M. Starch Degradation in Synchronously Grown *Chlamydomonas reinhardtii* and Characterization of the Amylase. **Plant Physiology**, v. 74, n. 3, p. 459-463, 1984.

LI, H.-B. et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 771-776, 2007. ISSN 0308-8146.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, p. e201209017, 2012. ISSN 2001-0370.

LI, T. et al. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 204-213, 2014. ISSN 0961-9534.

LI, Y. et al. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 14, 2014.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009. ISSN 1573-6776.

LOCKAU, W.; MASSALSKY, B.; DIRMEIER, A. Purification and partial characterization of a calcium-stimulated protease from the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 172, n. 2, p. 433-438, 1988.

LOPES, G. et al. Sterols in Algae and Health. In: HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. e HERRERO, M. (Ed.). **Bioactive Compounds from Marine Foods**. Chicago: John Wiley & Sons, 2013. (Wiley Online Books). ISBN 9781118412893.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 ISBN 85-7656-113-1.

LOURENÇO, S.O; MARQUEZ, U.M.L.; MANICI-FILHO, J.; BARBARIANO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparision of two culture media. **Aquaculture**, v.148, p. 153-168, 1997.

LU, W.; ALAM, M.A.; PAN, Y. et al. Optimization of algal lipid extraction by mixture of ethyl acetate and ethanol via response surface methodology for biodiesel production. *Korean Journal of Chemical Eng*, v. 33, n.9, p. 2575-2581, 2016.

LUO, X.; SU, P.; ZHANG, W. Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, p. 4231-4254, 2015. ISSN 1660-3397.

MA, Y. et al. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 503-509, 2014.

MAADANE, A. et al. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13-19, 2015. ISSN 0168-1656.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 631-645, 2012. ISSN 1432-0614.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532-1542, 2013.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae☆. In: (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-409548-9.

MCMILLAN, J. R. et al. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. **Applied Energy**, v. 103, p. 128-134, 2013. ISSN 0306-2619.

MENDIOLA, J. A. et al. Antimicrobial Activity of Sub- and Supercritical CO₂ Extracts of the Green Alga *Dunaliella salina*. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 10, p. 2138-2143, 2008.

MENEGOL, T.; DIPRAT, A.B.; RODRIGUES, E. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*. **Food Science and Technology**, v. 37, p.28-37, 2017.

MESECK, S. L.; ALIX, J. H.; WIKFORS, G. H. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). **Aquaculture**, v. 246, n. 1–4, p. 393-404, 2005.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160-176, 2015.

MOHEIMANI, N. R. et al. Past, Present and Future of Microalgae Cultivation Developments. In: MOHEIMANI, R. N.; MCHENRY, P. M., et al (Ed.). **Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p.1-18. ISBN 978-3-319-16640-7.

MOJZER B.; EVA, KNEZ HRNČIČ M.;ŠKERGET, M.; KNEZ, Z.;BREN, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules** 21 (7):901, 2016.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491-515, 2003. ISSN 0734-9750.

MONTALESCOT, V. et al. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 339-346, 2015. ISSN 0960-8524.

MORADI-KHEIBARI, N.; AHMADZADEH, H.; HOSSEINI, M. Use of solvent mixtures for total lipid extraction of *Chlorella vulgaris* and gas chromatography FAME analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 9, p. 1363-1373, 2017.

NAJDENSKI, H. M. et al. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 7, p. 1533-1540, 2013.

NANNI, B. et al. Characterisation of a specific Phycocyanin-hydrolysing protease purified from *Spirulina platensis*. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 259-266, 2001.

NARAYAN, M. S. et al. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 521-528, 2005. ISSN 0963-7486.

NATAJARAN, R.; CHEN, X.; LAU, R. Ultrasound Applications in Lipid Extractions from Microalgae. In FANG, Z.; SMITH, R.; QI, X. (Ed). **Production of biofuels and chemicals with ultrasound**. Dordrecht: Springer, 2015.

NEILSON, A. H.; LEWIN, R. A. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. **Phycologia**, v. 13, n. 3, p. 227-264, 1974.

NIVEN, G. W. The characterization of two aminopeptidase activities from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1253, n. 2, p. 193-198, 1995.

ODJADJARE, E. C.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 37-52, 2015. ISSN 0738-8551.

OHSE, S. et al. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. **IDESIA**, v. 33, p. 93-101, 2015.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459-466, 2003. ISSN 1389-0344.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 600-609, 2011. ISSN 0734-9750.

ORDÖG, V. et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 309-314, 2004. ISSN 1573-5176.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized beta-Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 16, 2010.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

- PEJIN, B.;SAVIC,A.;SOKOVIC,M.; et al. Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. **Natural Product Research** 28 (6):372-376, 2014. doi: 10.1080/14786419.2013.869692.
- PEREZ, M. J.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 52, 2016. ISSN 1660-3397.
- PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.
- PINA-PÉREZ, M. C. et al. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. **Food Chemistry**, v. 235, p. 34-44, 2017. ISSN 0308-8146.
- PIRES, J. C. M. Chapter 5 - Mass Production of Microalgae. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae**. Boston: Academic Press, 2015. p.55-68. ISBN 978-0-12-800776-1.
- PLAZA, M.; HERRERO M.; CIFUENTES A.; IBANEZ, E. Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7159-7170, 2009.
- PLAZA, M; SANTOYO, S.; JAIME, L. et al. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 245-253, 2012.
- PLAZA, M; SANTOYO, S.; JAIME, L. et al. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010.
- PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A.D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, p. 150-154, 2011.
- PRADHAN, J.; DAS, S.; DAS, B. K. Antibacterial activity of freshwater microalgae: a review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 8, p.809-818 , 2014.
- PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**. v.3, p. 89-100, 2012.
- PULLAR, J. M.; VISSERS, M. C. M.; WINTERBOURN, C. C. Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 259-266, 2000.
- PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 287-293, 2001 2001. ISSN 1432-0614.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004. ISSN 1432-0614.

RADAELLI, M. et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 424-430, 2016.

RAPOSO, M. F. D. J.; DE MORAIS, A.; DE MORAIS, R. Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5128, 2015. ISSN 1660-3397.

RAS, M.; STEYER, J.-P.; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 153-164, 2013. ISSN 1572-9826.

RAVEENDRAN, S. et al. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018. ISSN 1330-9862 1334-2606.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999. ISSN 0891-5849.

REN, H.-Y. et al. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013. ISSN 1754-6834.

RIBEIRO, J. EVANGELISTA S. et al. Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll and carotenoids using the dairy industry by-product scotta as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 207-213, 2017. ISSN 1878-8181.

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia**, v. 512, n. 1, p. 33-37, 2004. ISSN 1573-5117.

RICO, M. et al. Production of Primary and Secondary Metabolites Using Algae. In: TRIPATHI, B. N. e KUMAR, D. (Ed.). **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p.311-326. ISBN 978-981-10-1950-0.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; LEE, K. Influence of Organic Carbon Sources on Growth and Lipid Content of Marine Green Alga *Dunaliella tertiolecta*. **Journal of Marine Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 68-75, 2014.

ROBASZKIEWICZ, A. et al. HOCl-modified phosphatidylcholines induce apoptosis and redox imbalance in HUVEC-ST cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 548, p. 1-10, 2014. ISSN 0003-9861.

RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I. et al. Pressurized Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Phormidium Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3517-3523, 2008.

RORRER, G. L. Bioprocess Engineering of Phototrophic Marine Organisms. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook of Marine Biotechnolog**: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. cap. 9, ISBN 978-3-642-53971-8.

ROSALES-CASTRO, M. et al. Characterization and Antioxidant Properties of the Condensed Tannins from Alaska Cedar Inner Bark. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 3, p. 217-227, 2014. ISSN 13076167.

RUFFELL, S. E.; MÜLLER, K. M.; MCCONKEY, B. J. Comparative assessment of microalgal fatty acids as topical antibiotics. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1695-1704, 2016.

SAFI, C. et al. Extraction of lipids and pigments of *Chlorella vulgaris* by supercritical carbon dioxide: influence of bead milling on extraction performance. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1711-1718, 2014. ISSN 1573-5176.

SAINI, R. K.; KEUM, Y-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry** 240:90-103, 2018.

SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004. ISSN 0104-0707.

SANTOYO, S; HERRERO, M; SEÑORANS, J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; JAIME, L. Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology** 224 (1):75, 2006. doi: 10.1007/s00217-006-0291-3.

SANTOYO, S. et al. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1213-1218, 2009. ISSN 0023-6438.

SATHASIVAM, R. et al. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017. ISSN 1319-562X.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, n. 4, p. 291-311, 2011. ISSN 1099-114X.

SCHADE, S.; MEIER, T. A comparative analysis of the environmental impacts of cultivating microalgae in different production systems and climatic zones: a systematic review and meta-analysis. **Algal Research**, v. 40, 2019. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101485

SELVAKUMAR, P.; UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180-185, 2014.

SENHORINHO, G. N. A.; ROSS, G. M.; SCOTT, J. A. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. **Phycologia**, v. 54, n. 3, p. 271-282, 2015.

SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 81, 2016.

SHENE, C. et al. High pressure homogenization of *Nannochloropsis oculata* for the extraction of intracellular components: Effect of process conditions and culture age. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 631-639, 2015. ISSN 1438-7697.

SHOW, K.-Y. et al. Microalgal drying and cell disruption – Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 258-266, 2015. ISSN 0960-8524.

SILABAN, A. et al. Effect of organic carbon, C:N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 1, p. 47-56, 2014.

SINGH, P. et al. Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook of marine microalgae**. 1st. San Diego: Elsevier, 2015. cap. 4, ISBN 978-0-12-800776-1.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 431-444, 2015. ISSN 1364-0321.

SKULBERG, O. M. Bioactive Chemicals in Microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**: Blackwell Science, 2007.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, 1990.

SPECIFICATIONS, C. O. C. **Food Chemical Codex**. Washington: National Academy Press, 1981.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006. ISSN 1389-1723.

STADLER, R. et al. Subcellular Localization of the Inducible *Chlorella* HUP1 Monosaccharide-H⁺ Symporter and Cloning of a Co-Induced Galactose-H⁺ Symporter. **Plant Physiology**, v. 107, n. 1, p. 33, 1995.

STEINRÜCKEN, P. et al. Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. **Algal Research**, v. 26, p. 392-401, 2017.

SUKARNI et al. Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 5, n. 4, p. 279-290, 2014. ISSN 2251-6832.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719.

TANG, H. et al. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3324-3330, 2011.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p.1-19. ISBN 9780470995280.

VELU, P.; PETER, M. J.; SANNIYASI, E. Effect of Various Carbon Sources on Biochemical Production in Marine Microalgae *Nannochloropsis salina* (Eustigmatophyceae), *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) and *Tetraselmis suecica* (Chlorodendrophyceae). **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 3, p. 8, 2015.

VENKATESAN, J.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S.-K. Chapter 1 - Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. In: (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae**. Boston: Academic Press, 2015. p.1-9. ISBN 978-0-12-800776-1.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In: VERMERRIS, W. e NICHOLSON, R. (Ed.). **Phenolic Compound Biochemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p.1-34. ISBN 978-1-4020-5164-7.

VIEIRA SALLA, A. C. et al. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016. ISSN 0960-8524.

VOLESKY, B.; LUONG, J. H. T.; AUNSTRUP, K. Microbial Enzymes: Production, Purification, and Isolation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 119-146, 1984. ISSN 0738-8551.

VOLKMAN, J. K. Sterols in Microalgae. In: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J., et al (Ed.). **The Physiology of Microalgae**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p.485-505. ISBN 978-3-319-24945-2.

VOLKMAN, J. K. et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 128, n. 3, p. 219-240, 1989.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 31, p. 5072-5129, 2006. ISSN 1521-3773.

WALNE, P.R. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilus*. **Fish. Invest.** v.26,p.1-62, 1970

WANG, D. et al. Combined enzymatic and mechanical cell disruption and lipid extraction of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 4, p. 7707-22, 2015. ISSN 1422-0067.

WANG, L. L.; JOHNSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 624-629, 1992.

WANG, S.-K. et al. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 6, p. 550-559, 2014.

WHITEMAN, M. et al. Hypochlorous Acid-Induced DNA Base Modification: Potentiation by Nitrite: Biomarkers of DNA Damage by Reactive Oxygen Species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, n. 2, p. 572-576, 1999. ISSN 0006-291X.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, p. 163, 2008.

WU, Z. et al. The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 1, p. e26732, 2016. ISSN 2008-3645 2008-4161.

YOON, B. et al. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1114, 2018.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920-1934, 2010. ISSN 1660-3397.

ZHANG, W. et al. Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 52-58, 2014. ISSN 0960-8524.

ZHENG, C. et al. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579, n. 23, p. 5157-5162, 2005.

ZHENG, H. et al. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215-1224, 2011. ISSN 1559-0291.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 2, p. 189-194, 1997.

ZULUAGA, M. et al. Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. **BiolImpacts : BI**, v. 7, n. 1, p. 1-3, 2017.

ÖRDÖG, V. et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 309-314, 2004. ISSN 1573-5176.

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO E TERMO DE LICENÇA EDITORA SPRINGER

Journal of Applied Phycology
<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1720-y>



Microalgae mixotrophic cultivation for β -galactosidase production

Cristina Maria Zanette^{1,2} · André Bellin Mariano³ · Yuri Sussumu Yukawa⁴ · Israel Mendes⁵ · Michele Rigon Spier¹

Received: 5 September 2018 / Revised and accepted: 19 December 2018
 © Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Microalgae present unexplored biotechnological potential and the ability to use different carbon sources in mixotrophic cultivation. Considering the need for efficient and low-cost industrial processes, the aim of this work was to evaluate the ability of microalgae and cyanobacteria to produce intra- and extracellular β -galactosidase. Eight species of Chlorophyta and Cyanophyta were cultivated in mixotrophic conditions with lactose as a carbon source. *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella minutissima*, and *Nannochloropsis oculata* were able to grow under mixotrophic conditions showing biomass production and growth rates higher than those of photoautotrophic cultures. β -Galactosidase extracellular production was 33.5 U L^{-1} on the 11th cultivation day for *D. tertiolecta*. For *N. oculata* and *C. minutissima*, the values were 29.6 and 11.02 U L^{-1} on the 14th and the 7th cultivation days, respectively. This study demonstrates the ability of microalgae to hydrolyze lactose under a mixotrophic regime and to outstanding great potential in the production of biomass and β -galactosidase.

Keywords Photosynthetic microorganisms · Enzyme · Lactose · β -Galactosidase

Introduction

Microalgae are a versatile and diverse group of microorganisms inhabiting a wide range of ecological habitats, but few species are utilized for human benefit (Odjadjare et al. 2015). The biotechnological applications of microalgae are diverse: human and animal nutrition, aquaculture, wastewater treatment, biofertilizers, biofuel production, and the cosmetic and pharmaceutical industries. Microalgae are a source of bioactive compounds such as antioxidants, antimicrobial compounds, polyun-

carotene, and phycocyanin), polysaccharides, and enzymes (Pulz and Gross 2004; Satyanarayana et al. 2011; Borowitzka 2013; Pina-Pérez et al. 2017). Although many microalgae strains are cultivated worldwide for different purposes, only the cyanobacterium *Arthrospira* and the green microalgae *Chlorella*, *Dunaliella salina*, and *Haematococcus pluvialis* are used for industrial biomass production (Benemann et al. 2018).

Currently, photoautotrophic production is the primary method used for large-scale algae biomass production (Brennan and Owende 2010). However, photoautotrophic growth in

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 16, 2019

This Agreement between Prof. Cristina Zanette ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4510731487791
License date	Jan 16, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Journal of Applied Phycology
Licensed Content Title	Microalgae mixotrophic cultivation for β -galactosidase production
Licensed Content Author	Cristina Maria Zanette, André Bellin Mariano, Yuri Sussumu Yukawa et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	yes
Title	POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF MICROALGAE
Institution name	Universidade Federal do Parana
Expected presentation date	Mar 2019
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Prof. Cristina Zanette Capitao Rocha 909
	Guarapuava, Parana 85010270 Brazil Attn: Prof. Cristina Zanette
Billing Type	Invoice
Billing Address	Prof. Cristina Zanette Capitao Rocha 909
	Guarapuava, Brazil 85010270 Attn: Prof. Cristina Zanette
Total	0,00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below: