



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tese de Doutorado

Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas

DANIELLI MATIAS DE MACÊDO DANTAS

Recife
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas

DANIELLI MATIAS DE MACÊDO DANTAS

Tese apresentada para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-Orientador: Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez (UFRPE)

Recife
2013

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

D192a Dantas, Danielli Matias de Macêdo

Atividade biológicas das preparações obtidas das clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas / Danielli Matias de Macêdo Dantas. – Recife: O Autor, 2013.

124. : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: Alfredo Oliveira Gálvez

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Alga 2. Biocombustíveis I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Gálvez, Alfredo Oliveira (coorientador) III. Título.

579.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-147

DANIELLI MATIAS DE MACÊDO DANTAS

Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas

Tese apresentada para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Ranilson de Souza Bezerra
(Interno e Presidente, UFPE)

Maria Tereza dos Santos Correia
(Interno, UFPE)

Ian Porto Gurgel do Amaral
(Externo, UFPE)

Suzan Diniz Santos
(Externo, UFPE)

Dárlcio Inácio Alves Teixeira
(Externo, UFRN)

Data: 28 / 02 / 2013

Recife
2013

À minha sobrinha e afilhada Maria Clara.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

À minha família, por todo amor incondicional;

Ao Dr. Ranilson Bezerra pela orientação e pelas oportunidades;

Ao Dr. Alfredo Olivera pela colaboração e por compartilhar o amor pelas microalgas;

À Dra. Ana Rita Drummond e todos os técnicos do Laboratório de Fluidos do Instituto Tecnológico de Pernambuco pela parceria na realização de projetos e trabalhos desenvolvidos sobre biocombustíveis de microalgas, apesar de não ter sido inserido nesta tese;

À Dra. Maria das Graças e ao Dr. Romero Brandão pela colaboração na realização deste trabalho;

À Dr. Helena Nader, pela oportunidade de desenvolver experimentos e pela experiência adquirida no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) da Universidade Federal de São Paulo.

Ao Dr. Rubem Guedes pela disponibilidade e os valiosos ensinamentos sobre Depressão Alastrante e ao Dr. Ricardo Abadie pela contribuição e paciência na realização do experimento do efeito do extrato da microalga no cérebro;

À Dra. Suzan Diniz pela confiança depositada e pela contribuição na realização da patente deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, em nome da coordenadora Prof. Dra. Maria Tereza Correia e;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante o período do doutorado;

À Fundação de Amparo a ciência e tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de auxílio à mobilidade discente;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar os custos referentes ao Doutorado Sanduíche na Universidade da Califórnia-San Diego, USA, através do Projeto Formação de recursos humanos e interações interinstitucionais para validação de metodologias inovadoras aplicadas a produção e caracterização de biodiesel e co-produtos;

Ao Dr. Gregory Mitchell, Dr. Domick Mendola, Dra. Patrícia Abelin, Dra. Sitti Raehanah, Dra. Maria Vernet, Dra. Corine Gle, Elliot Weiss e Frank Shang por todos os momentos e

ensinamentos compartilhados ao longo da minha estadia no Departamento de Oceanografia da Universidade da Califórnia, San Diego;

A todos os colegas do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, em especial a Thiago Cahú (pelo apoio incondicional, por todos os momentos compartilhados e pela amizade), a Marina Marcuschi (pelo respeito e ótima convivência nos meses em San Diego), a Janilson Felix e Julieta Xavier (pela amizade), Werlayne Mendes (pela contribuição na leitura dos registros) e a Nathalia Albuquerque Roberto pelo valioso apoio neste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo e Laboratório de Maricultura Sustentável da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Leilane Santos, Felipe Santos, Rayzza Miranda, Clarissa Vilela e Steves Sobral por auxiliar e contribuir com a manutenção, produção e obtenção da biomassa algal.

Aos todos os colegas do doutorado pelos momentos vividos na Universidade, Juliana dos Santos, Renata França, Igor Souza;

Às amigas Ana Delia Orozco, Raquel Braz, Ingrid Zanella, Alessandra Campos e Kleybiana Dantas (amiga-irmã) pela amizade e por compartilhar todos os momentos com muito carinho.

À todos que não foram citados, mas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Microalgas: taxonomia, biologia e histórico.....	13
2.2 Compostos bioativos e atividades biológicas	17
2.3 Biotecnologia de microalgas.....	22
2.3.1 Aplicação Farmacêutica e cosméticos	23
2.3.2 Aplicação Alimentícia	23
2.3.3 Aplicação na Aquicultura.....	25
2.3.4 Biocombustíveis	26
2.3.5 Biorremediação	27
2.4 Avanços na genética molecular de microalga.....	28
2.5 Cultivo de microalgas.....	29
2.5.1 Produção Mundial e no Brasil.....	31
2.5.2 Tipos de cultivo	33
2.5.3 Obtenção de biomassa	36
2.6 Patentes de processos e produtos com microalgas	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Capítulo de Livro (Aprovado):	53
4.2 Artigo (a ser submetido): Food Chemistry	57
4.3 Artigo (a ser submetido): Alcoholism: Clinical and Experimental Research.....	78
4.4 Depósito de Patente	95
5. CONCLUSÃO	105
ANEXOS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Chlorella vulgaris</i>	15
Figura 2: <i>Scenedesmus subspicatus</i> .	15
Figura 3: Produtos da síntese dos metabólitos primários e secundários.	18
Figura 4: Aplicações biotecnológicas das microalgas.	22
Figura 5: Cultivo de microalgas em tanques abertos	35
Figura 6: Produção de microalgas em fotobioreatores.	35
Figura 7: Principais usos de produtos de microalgas nas patentes	38
Figura 8: Visualización del mapa de América del Sur y las Instituciones brasileñas que tienen colecciones del cultivo de microalgas	54
Figura 9: Production and obtaining of the extracts from the microalgae <i>C.vulgaris</i>	63
Figura 10: Kinetic behaviour of antioxidant extracts	69
Figura 11: Electrophysiological recordings during CSD Effect of the treatments (water, cachaça and functional alcoholic beverage) on CSD propagation velocities in young adult rats	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Empresas, produtos de origem algal e as atividades biológicas atribuídas	20
Tabela 2: Identificação dos processos, produtos e espécies de microalgas utilizadas nas patentes do Brasil.	39
Tabela 3: Phytochemical screening of different extracts of <i>C. vulgaris</i>	67
Tabela 4: Radical scavenging performance of extracts from <i>C. vulgaris</i> .	70
Tabela 5: Size of zone of inhibition (mm) (mean \pm standard deviation) of <i>C. vulgaris</i> extracts (20 μ L per disc) against different strains.	72
Tabela 6: Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of different extracts from <i>C. vulgaris</i> .	73
Tabela 7: Spreading depression-velocity and weight, Weight gain and Weight gain.day-1 in young adult rats (79-88 days of life) treated per gavage with microalgae extract, cachaça and water	86

LISTA DE ABREVIATURAS

PBR – Fotobiorreator

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH- 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl

TFC- Total favonoid content

TPC- Total phenolic content

CTC- Condensed tannins content

MIC- Minimal inhibitory concentration

MBC- Minimal bactericidal concentration

CSD – Cortical Spreading Depression

DAC – Depressão Alastrante Cortical

RESUMO

As microalgas apresentam uma enorme aplicação como produtoras de compostos bioativos de interesse industrial e com potenciais atividades biológicas. Neste sentido uma revisão sobre o cultivo de microalgas no Brasil foi abordada, levando em consideração o potencial e as perspectivas aplicações biotecnológicas destes microrganismos no país. Neste sentido, a espécie *Chlorella vulgaris* foi selecionada para a obtenção de preparações utilizando solventes de diferentes polaridades (água, metanol, butanol, acetona e dimetilsulfóxido), e a partir destes extratos, avaliar as suas atividades antioxidante e antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica). Adicionalmente, foi analisada a ação neuroprotetiva do extrato da *C. vulgaris* com a bebida alcóolica “cachaça” em ratos utilizando o modelo da depressão alastrante cortical. Visando otimizar a produção e obtenção de biomassa das espécies *C. vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus*, foram avaliados métodos de cultivo, coleta e além disso o desenvolvimento de uma bebida alcóolica funcional a partir dessas espécies. Os resultados obtidos para atividade antioxidante utilizando os diferentes extratos de *C. vulgaris* testados, demonstraram maior eficiência usando água e dimetilsulfóxido. Os extratos preparados com estes mesmos solventes, além da acetona, também apresentaram melhores resultados na atividade antibacteriana inibindo o crescimento das bactérias *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* e *Bacillus subtilis*. Os outros extratos (etanol, metanol, butanol) não inibiram o crescimento das bactérias avaliadas. As microalgas não apresentaram inibição ao crescimento dos fungos analisados. Com relação à ação da bebida alcóolica funcional (extrato da *C. vulgaris* e cachaça) na depressão alastrante em ratos, foi observado que a velocidade da depressão alastrante no cérebro dos ratos tratados com esta bebida foi inferior ($2,89 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$), quando comparado com o tratamento usando apenas cachaça e o controle (água destilada), $3,68 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ e $3,25 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivamente. Estes resultados sugerem que a inserção da *C. vulgaris* na bebida alcóolica conferiu uma possível proteção no cérebro contra o efeito do álcool. O abuso do álcool é um problema de saúde pública conhecido e os resultados obtidos devem ser utilizados cuidadosamente. Os resultados obtidos no presente estudo podem ser usados como precursores para o avanço na geração de produtos a partir das microalgas e suas possíveis aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Microalga. *Chlorella vulgaris*. *Scenedesmus subspicatus*. Atividade antioxidante. Depressão alastrante cortical. Bebida funcional

ABSTRACT

Microalgae shows great potential application in the production of compounds with biological activities of industrial interest. In this sense a review on the cultivation of microalgae in Brazil was discussed, taking into account the potential and prospects biotechnological applications of these microorganisms in the country. In this regard, the species *Chlorella vulgaris* was selected to obtain preparations using solvents of different polarities (water, methanol, butanol, acetone and dimethyl sulfoxide), and their antioxidant and antimicrobial (antibacterial and antifungal) were evaluated. Additionally, we analyzed the neuroprotective action from *C. vulgaris* extract to the alcoholic drink "cachaça" in rats using the model of cortical spreading depression. In order to optimize the production and acquisition of plant biomass from *C. vulgaris* and *Scenedesmus subspicatus* several aspects were evaluated: methods of cultivation, collection, as well as the development of a functional alcoholic drink from these species. The results obtained from antioxidant effects of *C. vulgaris* extracts showed high activity, particularly in water and dimethylsulfoxide solutions. These extracts, as well as the acetone one also presented high antibacterial activity, mainly inhibiting *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* and *Bacillus subtilis*. Ethanol and butanol extracts, however, did not show any antibacterial activity. There was no inhibition of tested fungi by any extract. The process of production and biomass obtention of microalgae *C. vulgaris* and *S. Subspicatus*, as well as the product develop was used to create a patent named "Functional alcoholic beverage with microalgae: culture process and production". This functional beverage has positive effect on the spreading depression in rats. The speed of spreading depression in the brain was lower (2.89 mm.min⁻¹) than the treatment using only cachaça and control (distilled water), 3.68 mm.min⁻¹ and 3.25 mm.min⁻¹ respectively. These results suggest that the extract with *C. vulgaris* showed a possible protection to the brain against the effects of alcohol, and are the basis for the elucidation of the real benefit of this proposed functional alcoholic beverage. However it should be kept in mind that alcohol abuse is a well known public health problem and these results should be evaluated carefully. The results obtained in this study can be used as precursors for the generation of breakthrough products from microalgae and their potential biotechnological applications.

Key-words: Microalgae. *Chlorella vulgaris*. *Scenedesmus subspicatus*. Biological activity. Cortical Spreading Depression. Functional beverage

1. INTRODUÇÃO

Em ficologia aplicada, o termo microalga é utilizado de uma forma geral para designar algas eucarióticas e cianobactérias procarióticas, microorganismos fotossintéticos filamentosos ou unicelulares. (MASOJÍDEK, et al 2010). Sob o ponto de vista biotecnológico, não constituem um grupo de microrganismos muito estudado. Dentre as dez mil espécies de microalgas que se acredita existirem, pouco mais de mil linhagens são mantidas em coleções ao redor do mundo, apenas algumas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico, e somente pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial (algumas toneladas por ano) (OLAIZOLA, 2003).

Estes organismos possuem importância biológica, ecológica e econômica. Em termos biológicos, o valor deste grupo de organismos reside na estruturação da atual atmosfera terrestre, possibilitando a vida sobre a superfície da Terra dos seres vivos aeróbicos. Ao passo que o fato de constituírem-se em produtores primários atribui às algas a importância ecológica na medida em que estas sustentam a vida nos mares e oceanos desempenhando, assim, um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas. Já a importância econômica é determinada pela diversidade de usos das algas em vários países no mundo, dentre elas na indústria alimentícia, medicamentos, imunostimulantes, cosmética e biocombustíveis, por exemplo (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

A evolução da dieta humana ao longo dos últimos anos afetou negativamente a saúde, acarretando no aumento da incidência de doenças crônicas, incluindo a obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares (DCV), hipertensão e acidente vascular cerebral, e alguns tipos de câncer (GOMEZ-GUTIERREZ et al, 2011).

Os benefícios à saúde atribuídos aos alimentos ricos em compostos fenólicos e outros antioxidantes (como ácido ascórbico e carotenóides) na sua composição química têm elevado a procura por novas espécies botânicas que possuam, além dessa propriedade, uma atividade biológica complementar relevante (CÉSPEDE et al., 2008). Neste sentido, as microalgas podem desempenhar um papel importante como fonte de produtos naturais e compostos bioativos, podendo ser utilizados em substituição aos sintéticos (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007). A *Chlorella vulgaris*, espécie utilizada no presente estudo é fonte rica em ácido ascórbico, tocoferol, vitaminas, minerais e proteína (VIJAYAVEL et al., 2007). Entre os pigmentos possui principalmente carotenóides e clorofilas, particularmente luteína, clorofila a e b, e feofitina a, sendo os compostos mais importantes na resposta da capacidade antioxidante desta espécie (CHA et al, 2010).

Tanto a utilização da biomassa *in natura* ou dos extratos algais das mais diversas classes, têm demonstrado resultados promissores nos diferentes interesses econômicos, principalmente nas indústrias nutraêutica e farmacêutica.

Considerando a importância das microalgas como fonte de moléculas bioativas foram avaliados as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos da microalga *Chlorella vulgaris* utilizando diferentes solventes e a influência do extrato hidroalcolico desta microalga na atividade elétrica cerebral. Por fim, tendo em vista a busca por alimentos e bebidas provenientes de compostos naturais e a crescente utilização de preparações na indústria alimentícia e farmacêutica a partir de microalgas, foi proposto o escalonamento do cultivo das Clorofíceas *C. vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus*, a obtenção da biomassa, assim como a produção de uma bebida alcoólica funcional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas: taxonomia, biologia e histórico

As microalgas foram os primeiros organismos capazes de realizar fotossíntese e um dos principais agentes responsáveis pela criação da atual atmosfera terrestre. São fundamentais para o equilíbrio planetário, uma vez que a dinâmica do dióxido de carbono na Terra é em grande parte determinada por estes organismos que são responsáveis por mais da metade da atividade fotossintética de todo planeta. Muitas das substâncias sintetizadas e acumuladas pelas microalgas são também encontradas nas plantas, as quais evoluíram das algas verdes ou clorófitas (RAVEN et al., 2001). Adicionalmente, desempenham um papel importante na transferência de energia ao longo da cadeia trófica, por serem produtoras primárias e, portanto responsáveis pela base na alimentação de outros organismos aquáticos. Portanto, as algas são consideradas uma rica fonte natural de metabólitos secundários, incluindo nutrientes funcionais e peptídeos bioativos. Estes fatores, associados às suas atividades biológicas e seus efeitos na saúde, têm despertado o interesse de muitos cientistas (KIM & WIJESEKARA, 2010).

As microalgas combinam típicas propriedades de plantas superiores (fotossíntese aeróbica eficiente e simplicidade de requisitos nutricionais) com atributos biotecnológicos característicos de células microbianas (crescimento rápido em cultura líquida e capacidade para acumular ou secretar alguns metabólitos). Esta particular combinação apoia a utilização desses microrganismos para processos aplicados e representa a base da biotecnologia de microalgas (CAMPOS et al., 2007)

Segundo Olaizola (2003) para ser designado microalga, o organismo necessita ser normalmente microscópico, unicelular (mas pode ser colonial, com pequena ou não diferenciação celular), apresentar coloração (devido aos pigmentos acessórios e fotossintéticos), ocorrer principalmente em água (mas não necessariamente), e provavelmente ser fotoautotrófico (mas não necessariamente o tempo todo).

A classificação taxonômica das algas é bastante extensa, pois exibem uma enorme diversidade de espécies, com representantes de formas unicelulares que possuem desde micro a milímetros de diâmetro, células em colônia, filamentos até folhas e talos com diferenciações complexas. As algas são divididas em algumas classes principais onde a separação clássica inicialmente foi baseada no tipo de pigmento: Cyanophyceae (azul-esverdeada),

Rhodophyceae (vermelho), Phaeophyceae (marrom), Chromophyceae (marrom dourado), Bacillariophyceae (diatomáceas), Chlorophyceae (verde), e Xanthophyceae (verde-amarelo). A sistemática moderna mantém estes grandes grupos, mas conta com a classificação atualizada com base na análise de pigmento por cromatografia líquida, assim como outras características, tais como produtos de armazenamento metabólico, flagelação, estrutura e componentes da parede celular. Nos últimos anos, as técnicas modernas de biologia molecular têm sido utilizadas para confirmar ou alterar a classificação anterior de algas e tornaram-se uma ferramenta promissora para explorar seus produtos (BEN-AMOTZ, 2009).

As Clorófitas, ou algas verdes, envolvem um grupo amplo de organismos com uma enorme variabilidade morfológica variando de formas microscópicas a macroscópicas, compreendendo quatro classes: Micromonadophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae e Chlorophyceae. Possuem clorofila *a* e *b* e vários carotenoides, que podem ser sintetizados e acumulados fora do cloroplasto sob condições de deficiência de nitrogênio e/ou outro tipo estresse, conferindo a alga uma cor laranja ou vermelho. O produto de armazenamento é o amido, composto de amilose e amilopectina, que ao contrário das outras algas, é formado no interior do cloroplasto. A parede celular geralmente contém celulose. O grupo inclui organismos cocóides, flagelados unicelulares ou coloniais, filamentos multicelulares ou multinucleados. As algas verdes são cosmopolitas, sendo principalmente dulciaquícolas, mas um grande número de espécies também se desenvolvem em habitats marinho, terrestre e subaéreo. Algumas espécies ocorrem em associações simbióticas, geralmente com líquens. A exploração comercial de algas verdes microscópicas compreende relativamente poucos gêneros da classe Chlorophyceae entre os quais: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Botryococcus braunii* (TOMASELLI, 2008).

A espécie *Chlorella vulgaris* é uma alga unicelular dulciaquícola pertencente à classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales e família Oocystaceae (Figura 1). Apresenta forma de vida celular ou colonial, e pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*, β -caroteno e xantofilas e sua principal fonte de reserva energética é o amido (WILSON & HUNER, 2000). O gênero *Chlorella* (Chlorophyta) é um gênero cosmopolita com pequenas células globulares (3–8 μm em diâmetro), que inclui espécies com tolerância a altas temperaturas, já que algumas podem crescer entre 15°C e 40°C. Frequentemente é utilizada como suplemento alimentar e alimento saudável, assim como na indústria de cosmético e farmacêutica. Contém em sua composição proteínas, carotenóides, alguns imunostimuladores, polissacarídeos, vitaminas e minerais (MASOJÍDEK et al 2010). Possui altas produtividades, o que a

caracteriza um dos organismos mais comumente utilizado na produção de biomassa de algas (GÖRS et al., 2009).

Scenedesmus subspicatus pertence à classe Chlorophyceae, Ordem Chlorococcales e família Scenedesmaceae (ALGAEBASE, 2008) (Figura 2). Esta espécie é cosmopolita, apresenta altas taxas de crescimento e é bastante utilizada como um organismo modelo para estudos toxicológicos (BEHRA et al, 1999, MA et al., 2003, WIND & BELARGER, 2006, DAUS et al 2010, GÜÇLÜ e ERTAN, 2012). Similar ao gênero *Chlorella* cepas de *Scenedesmus* podem produzir, no cultivo em larga escala, uma biomassa com um conteúdo de 50-56% de proteína (SOEDER & HEGEWALD, 1988) . Apesar do potencial desta espécie, sua utilização comercial para outras finalidades é recente, havendo apenas alguns registros de estudos fisiológicos visando sua aplicação na alimentação de organismos aquáticos (LÜRLING, 1997), assim como na produção de biocombustíveis (SIGEE et al, 2007 e DEAN et al., 2010).

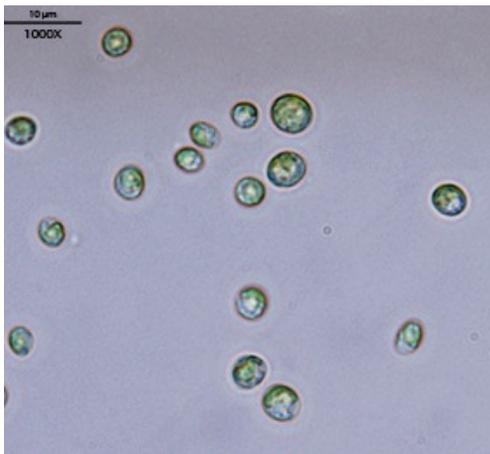


Figura 1: *Chlorella vulgaris* (UTEX, 2012)

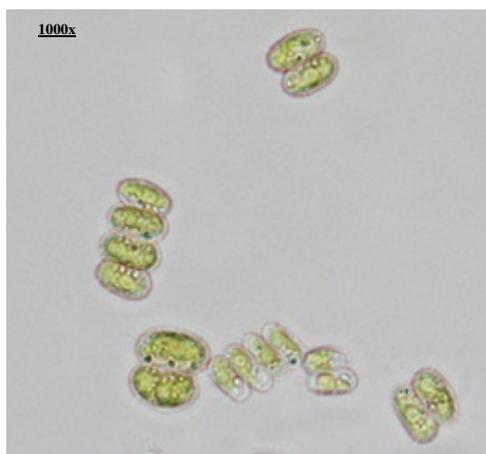


Figura 2: *Scenedesmus subspicatus* (UTEX, 2012)

Ao longo da história, os microorganismos vêm sendo empregados para diversas finalidades, sendo a mais antiga, sua utilização para alimentação de humanos e animais. A *Spirulina* (*Arthrospira*), um organismo procariótico microscópico (cianobactéria), tem sido utilizada na alimentação humana há no mínimo 700 anos. Sua origem remontam aos americanos nativos (lago Texcoco, México) e africanos (lago Chade), onde eram usadas como um fonte alternativa de proteínas (teor de proteína > 50%) (BATISTA et al., 2011).

No entanto, o cultivo comercial de microalgas teve início há apenas algumas décadas (OLAIZOLA, 2003). A produção em escala industrial se iniciou na Alemanha durante a Segunda Guerra Mundial, como fonte acessível de proteínas (já que a carne animal era um bem escasso) (SOEDER, 1986) e com o início do cultivo massivo das diatomáceas, que mostravam a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos em certas condições de cultivo. O consumo destes organismos destacou-se nos países asiáticos, onde desde os anos 60 a microalga *Chlorella* ainda é comercializada com êxito e consumida como um produto nutricional e medicinal (RICHMOND, 2004). Após a Segunda Guerra Mundial, as microalgas passaram então a ser visualizadas como promissoras na substituição das proteínas animais na alimentação humana por vários grupos de pesquisa durante os anos 70 e 80, mais especificamente nos EUA, Alemanha, Israel, Checoslováquia, Japão, Tailândia e França. Com o início da crise energética, estes organismos também foram sugeridos como uma fonte de biomassa para produção do metano (CHAUMONT, 1993).

Os primeiros produtos comerciais provenientes de algas foram polissacarídeos extraídos de macroalgas e utilizados como fonte de ficocolóides. Na sequência da introdução de algas para uso humano nos princípios do século 17, o mercado mundial expandiu oferecendo diversos produtos de algas em uma ampla variedade de aplicações. Contudo, a utilização de microalgas entrou no mercado só depois no final do século passado, quando a tecnologia de cultivo e coleta deste organismo unicelular foi desenvolvida. Quatro espécies de microalgas (*Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Nannochloropsis*) atingiram o nível de produção em cultivo industrial utilizando estrutura de tanques a céu aberto, enquanto algumas espécies unicelulares foram ampliados com sucesso em sistema de cultivo utilizando bioreatores fechados (BEN-AMOTZ, 2009).

Vantagens potenciais da utilização de algas como matéria-prima para diversos fins na biotecnologia incluem a sua capacidade de: sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídeo neutro / óleo (20-50% do peso seco), elevadas taxas de crescimento (por exemplo, duplica de 1-3 vezes por dia), tolerância à regiões que não são adequadas para a agricultura convencional (por exemplo, solos do deserto, árido e semi-árido), utilização dos nutrientes para o crescimento, tais como nitrogênio e fósforo, a partir de uma variedade de fontes de águas residuais, proporcionando assim o benefício adicional de biorremediação em águas residuais; remoção do dióxido de carbono de gases emitidos de combustíveis fósseis de usinas termoeletricas e outras fontes, contribuindo para a redução das emissões de gás no efeito estufa; produção de co-produtos e/ou subprodutos de alto valor agregado (biopolímeros,

proteínas, polissacarídeos, pigmentos, ração animal, fertilizante e H₂), crescimento durante todo o ano com uma produtividade cerca de dez vezes maior que vegetais superiores (HU et al., 2008).

A principal vantagem do cultivo comercial das microalgas é a obtenção de seus produtos metabólitos, que são utilizados na alimentação de organismos aquáticos e terrestres, como suplementos alimentares para os seres humanos, ou para seu uso em processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização dos solos, biocombustíveis e fitorremediação de resíduos tóxicos (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

2.2 Compostos bioativos e atividades biológicas

A busca por compostos bioativos a partir de microalgas vêm se tornando cada vez mais promissora, acompanhado da introdução crescente de espécies cultivadas a nível comercial, facilitando e viabilizando a obtenção destas moléculas de interesse. A manutenção controlada e a produção de microalgas é um fator essencial para explorá-las como uma fonte economicamente viável de importantes produtos.

Os organismos fotossintetizantes possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários respondem ao conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal. Os metabólitos secundários estão intimamente associados à estratégias de defesa das plantas, sendo principalmente distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O estudo do metabolismo secundário em microalgas foi desenvolvido a partir do isolamento e do reconhecimento de produtos químicos bioativos, através da pesquisa sobre a sua biossíntese e o estudo dos mecanismos de controlo fisiológicos envolvidos. Tanto os processos metabólicos primários como os secundários envolvem nucleótido de piridina /flavoproteína/ processos de transferência de elétrons da cadeia de citocromos e a reatividade anidrido dos tioésteres e anidridos fosfóricos, respectivamente. Os compostos formados na fase de produção do metabolismo secundário são geralmente constituídos de diferentes componentes intermediários que são acumulados nas células das microalgas ou no meio de cultura, durante seu período de crescimento e são precursores do metabolismo primário (SKULBERG, 2004) (figura 3).

Os compostos bioativos são geralmente metabólitos secundários, que incluem vários tipos de substâncias que variam a partir de ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos e péptidos, vitaminas, substâncias de crescimento, antibióticos e enzimas. Os metabólitos apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo atividade anticancerígena, antioxidante, antiviral e efeitos imunomoduladores. Há um potencial de descoberta de novos medicamentos a partir destes metabólitos (CHU, 2012).

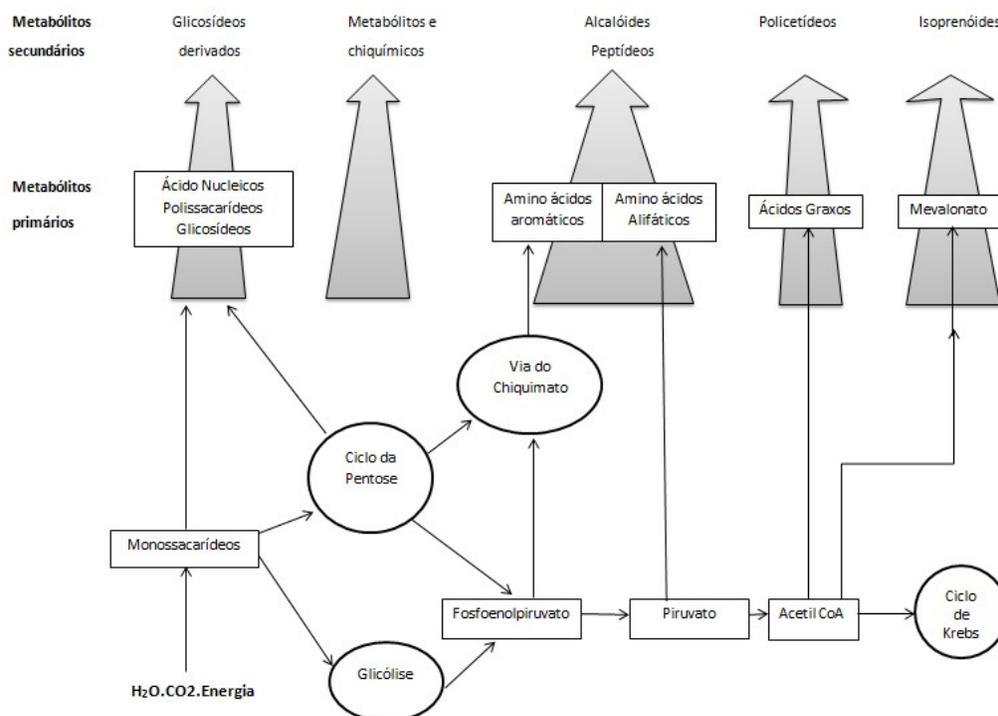


Figura 3: Produtos da síntese dos metabólitos primários e secundários (fonte: a autora)

Estudos sobre os compostos bioativos de microalgas (KIM & WIJESEKARA, 2010, SCHOLZ & LIEBEZEIT, 2012) também têm demonstrado efeito antitumoral, propriedades quimiopreventivas (WANG, et al 2010), atividade anti-inflamatória (GUZMÁN; GATO; CALEJJA, 2001) e atividade antimicrobiana (KATHARIOS et al., 2005, PARISI et al., 2009). Pesquisas com culturas de *Chlorella vulgaris* demonstraram a produção de metabólitos secundários, que se comportam como antibióticos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e antifúngicas (CHA et al., 2010, PLAZA, et al 2012).

Além das atividades demonstradas acima, as microalgas apresentam potencial atividade antioxidante (PLAZA; CIFUENTES; IBANES, 2008; GAO & TAM, 2011), Os antioxidantes são comumente usados para inibir, prevenir ou retardar a deterioração pela

oxidação, podendo atuar na redução dos radicais livres (antioxidante primário) ou por um mecanismo que não envolve a redução direta dos radicais livres (antioxidante secundário). Os antioxidantes primários, como os compostos fenólicos, serão consumidos durante a fase de iniciação. Os antioxidantes secundários, como o ácido ascórbico e o ácido cítrico, irão atuar por uma variedade de mecanismos incluindo a ligação com íons metálicos, a redução de oxigênio, a conversão de hidroperóxidos a espécies não-radicais, a absorção de radiação ultravioleta ou a desativação do oxigênio (POKORNY, 2001).

Os compostos fenólicos são encontrados em extratos de microalgas de diferentes grupos taxonômicos (SCHOLZ e LIEBEZEIT, 2012). São importantes no metabolismo das plantas e tem se tornado importante para a saúde dos humanos devido as suas características, particularmente relacionadas às suas propriedades antioxidantes (VENDRAMINI, 2004, CHA et al., 2010) e farmacológicas, como atividades antivirais e antimicrobianos (ABD EL-BAKY et al., 2008).

O crescente número de publicações representam a diversidade de substâncias presentes nas microalgas e suas respectivas atividades biológicas, gerando resultados científicos que permitem o avanço na geração de novos produtos a partir dos compostos bioativos identificados e suas possíveis aplicações (Tabela 1). Muitas empresas estão conscientes das descobertas científicas e da tendência de consumo destes compostos naturais, e buscam novos ingredientes para incorporar aos produtos já existentes e aos que poderão ser desenvolvidos no futuro. Uma tendência que está se destacando é o aumento na procura por parte da população, de produtos funcionais baseados em compostos bioativos ou fitoterápicos (ROCHA FILHO, 1995).

Tabela 1 – Empresas, produtos de origem algal e as atividades biológicas atribuídas (adaptada de PULZ & GROSS, 2004).

Empresa	País	Microalgas	Produto	Atividade biológica
Korea Chlorella Co.	Korea	<i>Chlorella</i>	Extrato de <i>Chlorella</i>	Nutracêutico
Lifestream	Nova Zelândia	<i>Chlorella</i>	Extrato de <i>Chlorella</i>	Nutracêutico
Solazyme	USA	<i>Botryococcus braunii</i>	Ácido glucurônico	Creme facial com protetor solar
Sun Chlorella	USA	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extrato de <i>Chlorella</i>	Nutracêutico, Creme facial, Suplemento para animais
Martek Omegatech	USA	<i>Cryptocodinium</i>	DHA	Desenvolvimento cerebral
Cyanotech	USA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantatina	Tratamento da Síndrome do Túnel Carpo Antiinflamatório, tratamento de lesões musculares
Mera	USA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantatina Extrato de carboidratos	Melhora da resposta imunológica, antigripal
Ocean Nutrition	Canada	<i>Chlorella</i>	EPA	Antiinflamatório
InnovalG	Francia	<i>Odoniella</i>	Vitamina B12	Melhora da resposta imunológica
Panmol/Madaus	Autria	<i>Spirulina</i>	DHA	Tratamento de doenças cerebrais e cardíacas
Nutrinova Celanese	Alemanha	<i>Ukenia</i>		

As microalgas podem ser adicionados aos alimentos ou utilizadas a partir de compostos isolados dos extratos. Quando usados na forma de extratos, os compostos presentes dependem, principalmente, do método de extração e do solvente utilizado (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007). Diversos solventes vêm sendo utilizados e comparados para extração de pigmentos e compostos em microalgas (WRIGHT et al., 1997, SILVEIRA et al., 2006, MORAES et al., 2010).

Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1998).

O composto presente no extrato da microalga *Chlorella* de maior importância é β -1,3-glucana, um imunostimulador que sequestra radicais livres, além de reduzir o teor de lípidos no sangue. No entanto, vários outros efeitos promovendo melhorias na saúde já foram observados (eficácia no tratamento de úlceras gástricas, feridas, e prisão de ventre; ação preventiva contra a aterosclerose e hipercolesterolemia e ação antitumoral (YAMAGUCHI, 1997). Para o gênero *Scenedesmus* os principais pigmentos porfirínicos são clorofila a e b. Os carotenóides encontrados na espécie *Scenedesmus obliquus* são neoxantina, lodoxantina, violaxantina e luteína, porém também há presença de β -caroteno. A maioria dos carotenóides

são conhecidos pelo potencial de atividade antioxidante e terapêutico. Os compostos antioxidantes podem neutralizar radicais livres em células e tecidos, os protegendo assim de danos oxidativos (CHU et al., 2011)

Os compostos ou extratos algais, dependendo das condições de cultivo e processamento, podem exibir diferentes concentrações de moléculas bioativas e com diferentes atividades biológicas. Por serem um grupo extremamente diverso, esta diversidade se reflete também na sua composição bioquímica. Os fatores biológicos e os químicos influenciam no crescimento das microalgas, sendo assim, a composição pode ser alterada significativamente pelas condições de cultivo que podem interferir no metabolismo das células e conseqüentemente na síntese dos compostos de interesse. Nesse sentido, manipulação dos cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (LOURENÇO, 2006).

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

Além de sintetizarem uma gama de compostos no interior das células, as algas produzem uma grande variedade de metabólitos quimicamente ativos no meio onde vivem, potencialmente como uma forma de proteção contra a sedimentação por outros organismos. Estes metabólitos ativos são conhecidos como compostos biogênicos, representado pelos compostos halogenados, álcoois, aldeídos, terpenos que são produzidos por várias espécies de macro e microalgas e possuem propriedades como antibacterianas e antifúngicas que são eficazes na prevenção da incrustação biológica e além disso possuem aplicações terapêuticas. Utilização de algas, como as Clorofíceas têm recebido um crescente interesse pois seus compostos podem ser extraídos e utilizados como para uma gama de produtos farmacêuticos. Compostos biogênicos que também possuem antibacteriana interessante, propriedades anti-incrustação e anti-algal foram isolados dos membros das microalgas Chlorophyceae (BHADURY & WRIGHT, 2004).

Outro exemplo de obtenção de composto extracelular a partir de concentrações de microalgas diatomáceas (crisófitas) ocorre através do depósito de sua carapaça rica em

carbonato de cálcio no solo. A formação deste sedimento é denominado “terra de diatomáceas” e o acúmulo deste composto pode ser aproveitado na fabricação de filtros, produtos abrasivos, cremes dentais, lixas para polimentos finos ou na indústria de cosméticos. (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

2.3 Biotecnologia de microalgas

Biotecnologia de microorganismos tem sido desenvolvida para diferentes aplicações comerciais. Algumas espécies de microalgas destacam-se por apresentar características de interesse para a indústria, por exemplo na indústria farmacêutica, pois algumas espécies de microalgas produzem compostos bioativos como antioxidantes e antibióticos. Também são usados como suplementos nutricionais para o consumo humano, devido aos elevados teores de proteínas, polissacarídeos e os conteúdos de vitaminas. Além disso, estes organismos possuem altos níveis de lipídios que podem ser extraídos e convertidos em biocombustíveis. (HARUN et al., 2010) (Figura 4).

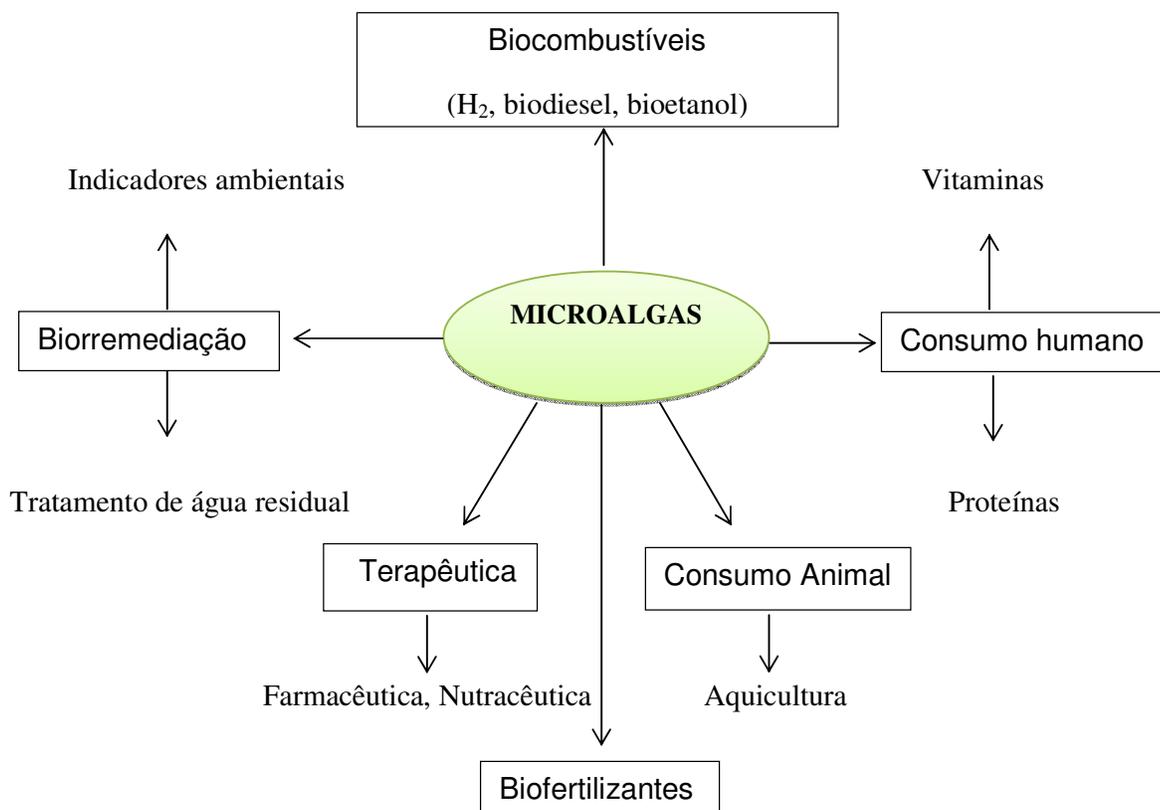


Figura 4: Aplicações biotecnológicas das microalgas

2.3.1 Aplicação Farmacêutica e cosméticos

O advento da biologia molecular tem levado a uma melhor compreensão da biossíntese e fisiológicas funções das moléculas bioativas em microalgas. Esforços também têm sido investidos para o desenvolvimento de microalgas transgênicas como 'fábricas celulares verdes' para produzir novos fármacos utilizando técnicas de transformação genética (CHU, 2012).

Apenas na década de 70 ocorreram grandes progressos, com a utilização de culturas para a produção de pigmentos, suplementos alimentares e vitaminas para a indústria farmacêutica (SOEDER, 1986). Microalgas são uma fonte potencial de suplementos alimentares diversos e biomateriais utilizados na indústria farmacêutica. Algumas destas omega-3 são ácidos graxos, ácido eicosapentanóico (EPA), decosaheptaenoico ácido (DHA) e clorofila. A clorofila é um outro produto farmacêuticamente importante obtida a partir da microalga. Acredita-se que quase todas as algas cultivadas sob condição ideal contém em torno de 4% do peso seco das células contém clorofila. Foi relatado que a *Chlorella* possui uma quantidade elevada de clorofila quando comparada com várias espécies de microalgas. A atividade quelante da clorofila tem mostrado benefícios farmacêuticos especialmente no tratamento de úlceras no fígado. Clorofila foi também investigado como fonte de pigmentos em cosméticos. (SINGH & GU, 2010).

Na aplicação na indústria de cosméticos, extratos de microalgas podem ser principalmente encontrados em produtos de cuidados para a pele e rosto (cremes antienvelhecimento, produto regenerador ou refrescante). Outras aplicações cosméticas a partir de microalgas estão representados em produtos para cabelo e proteção solar. Um exemplo de produto comercialmente disponível é um extrato de *Chlorella vulgaris* que estimula a síntese de colágeno na pele, a regeneração de tecidos, contribuindo para a redução do envelhecimento. (Dermochlorella, Codif, St. Malo, França) (SPOLOARE et al., 2006).

2.3.2 Aplicação Alimentícia

Por apresentar valores nutritivos, a biomassa pode constituir um alimento ou suplemento alimentar para animais. Também pode ser comercializada como complementos para a alimentação humana, geralmente sob a forma de cápsulas (MATA *et al.*, 2010).

Além do uso como alimento para animais aquáticos e terrestres, o valor nutricional reconhecido da biomassa de algas tem promovido a sua utilização como um elevado suplemento de proteína na nutrição humana e como nutracêuticos (CAMPOS et al, 2007).

Desde o início da produção comercial de biomassa de microalgas, no início da década de 1950, o objetivo principal do desenvolvimento deste produto tem sido focado no mercado nutracêutico e de alimentos funcionais. Há uma tendência crescente deste mercado, considerando a prosperidade econômica em todo o mundo, bem como o interesse cada vez maior no mundo ocidental por alimentos naturais. A variedade de comprimidos e pó produzidos a partir das microalgas *Chlorella*, *Spirulina* (ou *Arthrospira*) e *Dunaliella* está sendo diversificada com a inserção de outras espécies em potencial. Originalmente utilizada para produzir astaxantina para pigmentação de peixes e camarão, foi descoberto que este pigmento poderia ser excelente para prevenir o envelhecimento por possuir potencial atividade antioxidante, então a principal produção desta espécie está focada na fabricação de nutracêuticos (RICHMOND et al., 2004).

Atividades de imunopotenciação foram encontradas em células inteiras, como bactérias, fungos, algas, líquens e plantas superiores. Microalgas com suas vantagens adicionais com uma longa história de utilização alimentar, o cultivo fácil, e alto teor nutritivo tornou-se uma fonte valiosa para estudos imunomoduladores. Os cientistas estão cada vez mais voltando sua atenção para as algas como fábricas de ingredientes, particularmente os componentes nutricionais (RAJA & HEMAISWARYA, 2010).

Segundo Richmond (2004), microalgas como *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, assim como *Scenedesmus*, quando corretamente processada têm um sabor atraente e podem ser assim incorporadas em muitos tipos de alimentos humanos, expandindo a demanda destas microalgas no mercado. Atualmente, *Spirulina* e *Chlorella* são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos (DERNER et al., 2006).

Chlorella contém em sua composição proteínas, carotenoides, alguns imunostimuladores, polissacarídeos, vitaminas e minerais, sendo uma das microalgas mais utilizadas na indústria de alimentos funcionais (MASOJÍDEK et al., 2010). Segundo Wikfors e Ohno (2001) o lucro da venda desta biomassa para o mercado nutracêutico no Japão é de 500.000 dólares por ano. Ainda hoje, os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, dependem quase que exclusivamente da coleta desta microalga para sua alimentação (JOURDAN, 1996).

2.3.3 Aplicação na Aquicultura

A utilização das algas na aquicultura está diretamente relacionada à sua fundamental importância como fonte de alimento natural para os animais aquáticos. As principais aplicações de microalgas na aquicultura estão associadas com a nutrição, controle da qualidade da água (podendo junto com as bactérias, controlar o balanço entre o oxigênio e o dióxido de carbono nos cultivos), como aditivo alimentar (ex.: coloração característica no salmão e truta) e outras atividades biológicas (SPOLOARE et al., 2006).

Atualmente, mais de 40 espécies de microalgas já foram testadas como fonte de alimento para aquicultura, mas nem todas têm condições de suprir as exigências nutricionais para o desenvolvimento de animais cultivado para o consumo humano. Alguns critérios nutricionais para a seleção da microalga e sua utilização na aquicultura são: ausência de toxicidade, tamanho apropriado para ingestão, apresentar fácil digestibilidade da parede celular e possuírem os componentes bioquímicos essenciais (BROWN et al., 1997).

Dependendo do animal e do seu estágio de vida, as microalgas são consumidas diretamente, por várias espécies de herbívoros, que dependem da dieta algal durante todas as fases da vida, ou através do consumo indireto, que ocorre via cadeia alimentar. Na aquicultura são bastante utilizadas para enriquecimento de espécies de zooplâncton na nutrição de peixes. Apesar dos melhores resultados serem apresentados com a utilização das algas vivas na alimentação de organismos aquáticos, também podem ser ofertadas secas, congeladas ou inseridas nas dietas (SEIXAS et al., 2009).

Segundo Coutteau e Sorgeloos (1992), a maioria dos cultivos comerciais de moluscos bivalves utilizam sistema intensivo de produção de microalga em ambientes fechados e controlados, o que permite um maior controle das condições de cultivos e de crescimento. No entanto, estas técnicas requerem espaço, energia, mão de obra especializada, o que as tornam mais dispendiosas que o cultivo em ambientes externos. O custo estimado da produção de alga em laboratórios de bivalves varia de 50 a 400 dólares por kg de biomassa seca.

Os altos custos de produção são um dos maiores obstáculos para a viabilidade de muitos laboratórios de cultivo algal. Apesar de esforços desenvolvidos ao longo das últimas décadas, com relação ao custo-benefício na utilização de dietas artificiais para substituir microalgas, a produção de microalgas ainda continua a ser um elemento essencial no desempenho dos organismos alimentados pelas algas. A busca por dietas alternativas certamente continuará, mas pesquisas direcionadas com a redução nos custos de produção de microalgas também provavelmente diminuirá, por isso estima-se que as microalgas não serão

substituídas na sua totalidade, pelo menos a médio prazo. Uma ampla seleção de espécies de microalgas encontra-se disponível para dar suporte às espécies que dependem destas na aquicultura. No entanto, aplicações específicas em subsectores industriais demandam novas espécies com a qualidade nutricional ou características de crescimento melhorada, o que também contribuem para um aumento da eficiência e produtividade nos resultados dos cultivos de animais aquáticos.

2.3.4 Biocombustíveis

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas é uma das aplicações que ainda não se encontra muito desenvolvida devido a diversos factores económicos e técnicos. Apresenta, contudo, elevadas potencialidades, tanto a nível ambiental quanto a nível económico. As vantagens ambientais estão relacionadas à substituição de fontes não renováveis por renováveis de produção de combustíveis ou electricidade, enquanto que as vantagens económicas estão relacionadas ao crescimento de uma nova indústria de produção de energia baseada na biorrefinação de substâncias extraídas da biomassa produzida. Há uma grande diversidade de possíveis aplicações bioenergéticas gerados a partir de biomassa de microalgas. Estes incluem diversos biocombustíveis, como etanol, hidrogénio, bióleo, a geração de energia eléctrica, e a produção de gás de síntese (mistura de hidrogénio e dióxido de carbono) e o carvão (ROSA, 2011).

Outras frações de algas contêm produtos químicos valiosos ou compostos moleculares que podem ser utilizados na produção de plásticos verdes, detergentes, produtos de limpeza verdes, e polímeros que são biodegradáveis, não-tóxico, e podem ser vendidos a um preço compatível aos produtos derivados do petróleo. A utilização dos co-produtos de biomassa algal é fundamental para o sucesso dos biocombustíveis de algas. Alguns analistas de mercado consideram que, apesar de todos os factores positivos, como o potencial de crescimento elevado, a não competição com culturas alimentícias e sua utilização para o sequestro de CO₂, o sucesso comercial da aplicação de biocombustíveis algal depende do desenvolvimento de co-produtos de alto valor (ex.: polímeros renováveis ou pigmentos). Neste sentido, vários avanços e inovações tecnológicas vêm sendo desenvolvidas na biologia sintética, engenharia metabólica e genómica, desenvolvimento de sistemas de circuito fechado de reatores biológicos e tanques abertos de cultivo; sistemas de extração e coleta de microalgas (SINGH & GU, 2011)

Atualmente, a maioria dos sistemas de produção de algas podem gerar de 9.450 a 18.900 litros de óleo por hectare em tanques de cultivo abertos e microalgas com um teor de 30% de óleo (SINGH & GU, 2011). No entanto, segundo JIANG et al. (2012), o equilíbrio entre taxas máximas de crescimento e de produção de óleo e a mínima utilização de nutrientes será a meta final da produção de biocombustível a partir de algas no futuro. Este saldo será necessário para garantir que esta nova indústria seja tanto rentável como ambientalmente responsável.

2.3.5 Biorremediação

Por serem produtoras primárias dos ecossistemas aquáticos, as microalgas dependem das condições físicas e dos nutrientes presentes no sistema, demonstrando sensibilidade a possíveis mudanças nestes ambientes. Desta forma, estes microorganismos fotossintéticos vêm sendo utilizadas como excelentes bioindicadores biológicos da qualidade de água (TREVINO, 2008), além de sua eficiência na remoção de nutrientes em sistemas de tratamento de água. Sua utilização no tratamento de águas residuais e na biorremediação teve início aproximadamente nos anos 80 (SPÍNOLA, 2010).

O uso das algas na recuperação de efluentes contendo espécies metálicas apresenta vantagens, como o baixo custo da operação e a elevada eficiência na remoção dos contaminantes de efluentes muito diluídos (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). A remoção biológica de nutrientes consiste, como o nome indica, na remoção de nutrientes dos efluentes por via biológica. Estes microrganismos acumulam o nitrogênio e fósforo e os transformam em substâncias de reservas que podem ser convertidas em produtos com valor comercial. A grande vantagem está no fato das microalgas possuírem a capacidade de assimilar os nutrientes solúveis em quantidades maiores do que as necessárias para o seu crescimento imediato. Juntamente com a sua capacidade de absorverem contaminantes, como os metais pesados, as microalgas são microrganismos com um potencial elevado para a depuração de águas residuais (DINIS et al., 2004).

Segundo Shi (2009) as microalgas possuem a capacidade de assimilar uma quantidade significativa de nutrientes porque requerem altas concentrações de nitrogênio e fósforo para realizar a síntese de fosfolípidos, ácidos nucleicos e proteínas, que podem representar cerca de 45-60% do seu peso seco. Com o intuito de avaliar a eficiência da remoção de nitrogênio e fósforo de águas residuais, este autor encontrou resultados que

indicam uma remoção superior a 90% de nitratos e fósforo, das águas residuais tratadas, pelas microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus*.

2.4 Avanços na genética molecular de microalga

Microalgas têm sido amplamente cultivadas e comercializadas, sendo seu potencial como fonte de compostos de alto valor agregado bem conhecida. Mas, em contraste com o grande número de bactérias, levedura e plantas superiores geneticamente modificadas, apenas algumas espécies de microalgas foram geneticamente modificadas com eficiência. Dificuldades iniciais na expressão de genes foram progressivamente superadas, e poderosas ferramentas moleculares para sua engenharia genética já estão disponíveis atualmente. Porém, ainda há um longo caminho para transformar novas espécies de microalgas, especialmente aquelas que possuem um valor comercial, principalmente visando o aumento da produtividade e da síntese de novos ou compostos tradicionais (LEÓN, et al., 2007).

Na última década têm sido alcançados progressos significativos na genômica das microalgas, principalmente com a criação de base de dados de marcadores sequenciais e a sequência do genoma de algumas espécies. Historicamente a Clorófitica *Chlamydomonas reinhardtii* tem sido o foco da investigação genética e molecular sendo a maioria das ferramentas para expressão de genes específicas para esta espécie, porém outras ferramentas estão sendo desenvolvidas para espécies de importância econômica. Vários projetos do sequenciamento genômico já foram concluídos e algumas espécies estão em andamento, entre elas a *C. vulgaris* (GREENWELL et al, 2010)

As limitações para a transformação genética de microalgas que impedem sua manipulação são aspectos importantes. Ferramentas moleculares e recursos genéticos são cada vez mais desenvolvidos, o que vem permitindo o estudo dos processos metabólicos das microalgas e sua regulação, possibilitando uma maior aproveitamento biotecnológico. A sequência completa ou quase completa do genoma de algumas espécies vem permitindo o estudo simultâneo da expressão de milhares de genes em respostas a mudanças ambientais e nutricionais (SPINOLA, 2010)

A biotecnologia microalgal ganhou importância considerável nas últimas décadas e as suas aplicações variam da simples produção de biomassa para alimentação, como já mencionado, a valiosos produtos para aplicações farmacêuticas. Para a maioria destas aplicações, o mercado ainda está em desenvolvimento e seu uso se estendendo a novas áreas.

Considerando a enorme biodiversidade das microalgas e recentes desenvolvimentos em engenharia genética, este grupo de organismos representa uma das fontes mais promissoras para novos produtos. Com o desenvolvimento de técnicas sofisticadas de culturas, a biotecnologia microalgal já responde as altas demandas de alimento e indústrias farmacêuticas (PULZ; GROSS, 2004). Avanços na genética molecular de microalgas também terão um profundo impacto sobre o desenvolvimento de processos e tecnologias. (DEL CAMPO, et al 2007)

Além dos esforços direcionados à seleção de espécies que acumulam grandes quantidades de compostos de interesse industrial e suas respectivas atividades biológicas, o melhoramento genético de cepas de algas também é um desafio atual. O uso de microalgas transgênicas em aplicações comerciais é uma promessa significativa. Espécies modificadas podem potencializar a produção de compostos já conhecidos de algas ou recém-descobertos e também para expressar genes específicos que não possam ser expressos em levedura. No entanto, por apresentar um alto potencial, a descoberta de fármacos é a maior promessa da biotecnologia de microalgas, embora a quantidade de espécies analisadas seja ainda reduzida (TRAMPER et al., 2003).

2.5 Cultivo de microalgas

Na pesquisa básica, por sua simplicidade estrutural e complexidade funcional, as microalgas tornaram-se veículos para importantes descobertas e experimentos. Como resultado, o cultivo de algas tem sido utilizado como uma ferramenta importante em diversas áreas de pesquisas como taxonomia, morfologia, fisiologia, bioquímica, engenharia genética, cultura de tecidos, a produção de alimentos, agricultura, tratamentos de resíduos e medicina (BECKER, 1993).

Para desenvolver o cultivo de uma espécie de microalgas em particular, há a possibilidade de isolá-la do ambiente natural ou adquirir através de uma coleção de algas. Milhares de microalgas têm sido isoladas de habitats naturais e são mantidas em várias coleções de cultura em todo o mundo. Milhares de espécies e variedades de táxons de algas são atualmente mantidas isoladas em culturas de todo o mundo, como as coleções de microalga no Reino Unido, Portugal, Coréia, Maine-USA, Texas-EUA, com (CCAP, FCTUC, KMMCC, NCMA e UTEX, 2012), mantendo cerca de 3000, 4000, 1000, 2718 e 2800 cepas, respectivamente. No entanto, até a atualidade apenas alguns cepas de microalgas, a maioria de

origem aquática, têm sido cultivadas em sistemas de produção em larga escala de centenas a milhares de litros.

Segundo um levantamento realizado por Lourenço (2006), há cerca de 43 instituições brasileiras que mantêm coleções de cultivo de microalgas. A maioria das coleções estão localizadas em Universidades e Institutos de pesquisa e destina-se à utilização em investigações e também nas empresas de aquicultura distribuídas em vários estados do país, como na alimentação no cultivo de organismos aquáticos (camarão, ostra, peixe).

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

As populações naturais de fitoplâncton podem ser limitadas pelo fornecimento de nutrientes, luz e carbono, provocando baixa densidade celular e portanto uma biomassa com déficit nutritivo. Os cultivos de microalgas representam sistemas artificiais e são dispostos de estrutura e condições (aporte macro e micronutrientes, iluminação e troca de gás) adequados para a espécie selecionada, podendo ser manipulados afim de potencializar a síntese de compostos de interesse. Além disso, como as microalgas crescem em suspensão no meio, é necessário misturar a cultura, permitindo a exposição das células à luz, troca de gases e nutrientes de forma homogênea.

A seleção dos nutrientes, formando o meio de cultura é crucial na produção em massa de microalgas. Os nutrientes utilizados devem estar associados ao custo de produção, quando se trata de um cultivo em escala comercial, e a necessidade da espécie. Embora critérios objetivos sejam utilizados para determinar a importância relativa de cada elemento para nutrição algácea, não há um número universal e exato de elementos químicos essenciais para cada espécie. Existem os elementos essenciais (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, enxofre, potássio, cálcio, cobre, zinco e molibdênio) e dependendo da quantidade de cada nutriente exigida para os processos metabólicos os elementos podem ser

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

As microalgas possuem uma grande variedade de estratégias fisiológicas, bioquímicas e moleculares para lidar com o stress, sendo capazes de sintetizar uma variedade de produtos químicos bioativos (CHU, 2012). Sobre condições ambientais extremas ou estresse induzido durante o cultivo, as microalgas podem potencializar a síntese destes compostos. A manipulação de nitrogênio no meio de cultura, por exemplo, exerce uma forte influência no metabolismo de lipídeos e ácidos graxos em espécies de microalgas (TAKAGI et al., 2006). O aumento da formação de carotenóides em algas têm sido relatado como uma resposta ao estresse oxidativo e, portanto, pode ser uma condição utilizada para a regulação da síntese deste composto em diferentes condições de cultivo (CHU et al., 2011). Segundo Wilson e Huner (2000), a espécie *Chlorella vulgaris* acumula pigmentos como clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas porém sob condições de estresse podem armazenar outras substâncias de interesse. Algas do gênero *Haematococcus* se diferenciam rapidamente e acumulam astaxantina em glóbulos de gordura (geralmente ácido oleico) fora do cloroplasto, quando se deparam com condições de estresse (ex.: deficiência de nitrogênio, alta intensidade de luz, adição de sal). Este processo de carotenogênese induz grandes mudanças na composição celular das microalgas, geralmente diminuindo os teores de proteína e aumentando os de lípidos (Batista et al., 2010)

2.5.1 Produção Mundial e no Brasil

A produção comercial de microalgas mundial teve início na década de 60 com espécies de *Chlorella* e *Spirulina*, como suplementos dietéticos, *Dunaliella* salina para

obtenção de β -caroteno, *Haematococcus pluvialis* para produção de astaxantina e diversas outras espécies para aplicação na aquicultura. (BENEMAN, 1990).

Em 1980, havia cerca de 46 grandes fábricas na Ásia produzindo mais de 1000 Kg por mês de microalgas (principalmente *Chlorella*). Atualmente, a maior parte da biomassa de microalga comercializada no mercado é representada pela *Chlorella* e *Arthrospira* com uma produção anual de 3.000 t e 4.000 t, respectivamente. (MASOJÍDEK et al., 2010). *Chlorella* é produzido por mais de 70 empresas. Taiwan *Chlorella* Manufacturing (Taipei, Taiwan) é a empresa de maior produção, com 400 t de biomassa seca produzida por ano. Uma produção significativa também é alcançada em Klötze, Alemanha (130-150 t de biomassa seca por ano), utilizando um sistema de fotobiorreator tubular. As vendas anuais mundiais de *Chlorella* excedem os 38 bilhões de dólares (SPOLOARE, 2006).

No Brasil, foi o sucesso no cultivo de microalgas para alimentação de animais aquáticos que inseriu o país no cenário internacional envolvendo esta temática (LOURENÇO, 2006). Atualmente a produção em escala comercial no país está relacionada com a alimentação (direta na larvicultura de camarões e moluscos marinhos ou indireta no enriquecimento nutricional de rotíferos e copépodos utilizados como alimento nos cultivos de peixes) de organismos aquáticos de importância econômica na Aquicultura Brasileira. Os centros de cultivo de microalgas são vinculados às empresas que estão localizadas principalmente na Região Nordeste, Sudeste e Sul, onde se concentram os maiores centros de cultivo.

Microalgas produzidas industrialmente têm sido comercializadas há vários anos, principalmente nos países industrializados, onde os consumidores estão mais acessíveis ao conhecimento da qualidade das propriedades destas, o que os permite maior acessibilidade e confiança ao produto algal. Contudo, a introdução de microalgas e seus produtos nos países em desenvolvimento apresenta alguns entraves, dentre eles, fatores conservadores étnicos, incluindo aspectos religiosos e sócio-econômicos. A resistência em usar algas ou produtos de algas entre os consumidores é também causada por dificuldades relativa à ineficiência na segurança de tais produtos na saúde pública, ausência de regulamentos legislativos oficiais, diretrizes e normas sobre a produção e composição de produtos à base de algas (RICHMOND, 2004).

Diante das questões citadas acima, atualmente não há empresas brasileiras comercializando biomassa de microalga ou algum produto proveniente desta. A burocracia dos órgãos deliberadores e a lentidão dos processos legais, assim como a falta de conhecimento sobre as microalgas (espécie, produção e produtos) impedem a permissão para comercialização no país (comunicação pessoal). Apesar destes entraves, algumas empresas vêm desenvolvendo alguns processos.

A empresa Claeff Engenharia e Produtos Químicos Ltda., localizada em Pernambuco, possui uma unidade de produção instalada especialmente para o cultivo e extração de microalgas (*Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* e *Haematococcus*) adaptadas às condições da região Nordeste visando a produção de insumos úteis às indústrias de alimentos e cosméticos. Cápsulas de *Chlorella* e *Spirulina* e *Haematococcus* (Astaxantina), assim como extratos glicólicos destas espécies, são produtos já desenvolvidos por esta empresa (produtos com patente depositada) (CLAEFF, 2012). A Algae Biotecnologia tem foco especial na produção de biodiesel e potencial de sequestro de carbono pelas microalgas, incluindo os projetos dentro do âmbito do Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL). Além disto, há especial preocupação com a minimização de uso de água e valorização de resíduos agrícolas (ALGAE, 2012). A empresa americana Solazyme, que desenvolve produtos biotecnológicos a partir de microalgas (biocombustíveis, químicos, alimentos funcionais e cosméticos) recentemente vem investindo no Brasil na produção de biodiesel de alga em parceria com empresas nacionais (SOLAZYME, 2012).

2.5.2 Tipos de cultivo

Qualquer que seja a aplicação da biomassa produzida é muito importante que o processo de produção apresente todas as condições para que as microalgas cresçam e se multipliquem a uma maior velocidade de crescimento possível. Vários os parâmetros devem ser considerados na determinação da eficiência de crescimento, especialmente a produção de biomassa por unidade de volume, a produção por unidade de volume e tempo (produtividade), e talvez o mais importante, a produção de biomassa por unidade de área e tempo (produtividade em termos de área). A produtividade pode variar significativamente de acordo com a espécie de microalga utilizada e o tipo de cultivo envolvido no processo. Tal como acontece com qualquer indústria, o cultivo de microalgas deve apresentar custos o mais

baixos possível, tanto de capital quanto de operação, para viabilizar o processo do ponto de vista econômico (ROSA, 2011)

Existem basicamente quatro tipos de técnicas de cultivo que estão relacionadas ao metabolismo das microalgas: fotoautotrófico (organismos que possuem algum tipo de pigmento, como a clorofila a, b, c e d ou outros pigmentos fotossintetizantes, e utilizam a luz solar como a principal fonte de energia e o CO₂ como fonte de carbono e transformando em energia química), heterotrófico (não possuem os sistemas de produção de moléculas orgânicas dos organismos fotoautotróficos e, portanto, necessitam de algum substrato orgânico para o seu crescimento e sobrevivência), mixotrófico (possuem características os dois tipos de atividades descritas acima) e fotoheterotrófico (que são organismos que dependem de compostos orgânicos como fonte de carbono e luminosidade para o seu desenvolvimento; não se desenvolvem em ambientes afóticos), sendo o primeiro o mais comumente utilizado (LEE, 2008).

Com relação aos sistemas de cultivo, muitos modelos têm sido projetados e construído para o cultivo de microalgas usando luz natural ou artificial. Pesquisadores e empresários produtores de microalgas desenvolveram várias tecnologias de cultivo que são atualmente aplicadas à produção de biomassa algal: tanques abertos (BOROWITZKA 1999, SCHENK et al, 2008, BRENNAN & OWENDE, 2010, ZENG et al., 2011, HUO et al., 2012), fotobiorreatores fechados (PBRs) (HU et al., 1996, AMARO et al., 2011, JIANG, et al., 2013) e reatores de fermentação (RAWAT et al., 2013)

Para se estabelecer o cultivo de microalgas, as populações devem ser mantidas vivas em condições ambientais favoráveis a fim de se obter um aproveitamento econômico da biomassa final. Inicialmente as microalgas são mantidas em pequenos tubos de vidro ou placas e em ambiente livres de contaminação por outros microorganismos, o que influencia na qualidade do cultivo posteriormente. A medida que ocorre a multiplicação das células, estas são transferidas gradativamente para volumes maiores, dispostos geralmente em estruturas de bolsas plásticas, tanques de terra, alvenaria ou fibra de vidro, quando o cultivo é realizada em sistema aberto (Figura 5), ou em fotobiorreatores, quando o cultivo é realizado sistema fechado (Figura 6). Este último atinge altas produtividades e possibilita um maior controle dos parâmetros sobre o cultivo (principalmente com relação à contaminação), porém possui um custo mais elevado, o que muitas vezes inviabiliza a produção.

Segundo Spoloare et al (2006) sistemas de produção de algas precisam ser aperfeiçoados para torna-los mais competitivos e economicamente mais viáveis. O

desenvolvimento da biotecnologia microalgal tem sido atenuado pelo limitado desempenho do crescimento de algal em fotobiorreactores industriais.



Figura 5: Cultivo de microalgas em tanques abertos (a) Fonte: NATURE, 2013. (b) Fonte: LIVESCIENCE, 2013.



Figura 6: Produção de microalgas em fotobiorreactores.(a) Fonte: DANTAS, 2012. (b) Fonte: KLEINEGRIS et al, 2011

Dentre os sistemas abertos, a utilização de tanques rasos abertos vem sendo demonstrado ser a melhor escolha. Cada unidade de cultivo pode ter centenas a milhares de metros quadrados. Alguns inconvenientes deste tipo de cultivo está na possibilidade de contaminação por outros organismos e/ou por outras espécies de microalgas. Desenvolvidos mais recentemente e tecnologicamente mais avançados, os sistemas fechados oferecem as melhores condições para a produção de praticamente todas as espécies de microalgas, protegendo o cultura da invasão de organismos contaminantes e permitindo o controle das condições do cultivo. Estes fotobiorreactores são planos ou tubulares e podem adotar uma

variedade de modelos e modos de operação. Eles oferecem maior produtividade e melhor qualidade da biomassa gerada (ou produto), embora apresentem um maior custo de construção e operação do que os sistemas abertos (DEL CAMPO et al, 2007).

Segundo Singh e Gu (2011), com base nos vários relatórios disponíveis, para a produção de óleos e biodiesel de algas atualmente os custos estimados variam entre US\$ 9 e US\$ 25 por galão (3,78 Litros) em algas cultivadas em tanques , e US\$ 15 - US\$ 40 em fotobiorreatores (PBRs).

A microalga *Chlorella* se desenvolve autotroficamente em meio orgânico, assim como em condições mixotróficas e heterotróficas (por exemplo, com o acréscimo de ácido acético e glicose respectivamente). Atualmente, a produção autotrófica de *Chlorella* é realizada em tanques abertos, fotobiorreatores tubulares semi fechados, ou cascatas inclinadas. *Chlorella* é a alga eucariótica mais cultivada sendo frequentemente utilizada como suplemento alimentar e alimento saudável, assim como na indústria de cosmético e farmacêutica. Microalgas pertencem aos organismos fotossintéticos de mais rápido crescimento, visto que o tempo de duplicação de suas células pode ser de poucas a várias horas (MASOJÍDEK et al., 2010).

A seleção do tipo de cultivo utilizado para a produção das microalgas é um das peças fundamentais na viabilidade da obtenção de bioprodutos a partir destas. Muitos esforços vêm sendo realizados no intuito de atingir o cultivo em larga escala com alta produtividade e baixo custo benefício. Diferentes estruturas foram desenvolvidas para o crescimento e manipulação de microalgas em grande escala (BOROWITZKA 1999; GUDIN & CHAUMONT, 1980; WEISSMAN et al., 1988; MOLINA-GRIMA et al., 1999; PULZ 2001; RICHMOND 2004; TREDICI, 2004). A combinação dos fotobiorreatores e tanques abertos vem sendo indicado como uma eficiente alternativa para maiores produtividades e custos relativamente acessíveis na produção das microalgas (DANTAS, 2012)

2.5.3 Obtenção de biomassa

Após a seleção do sistema de cultivo a ser utilizado, um grande entrave na viabilidade da utilização das microalgas na biotecnologia ainda está na separação das células algais do meio de cultura. Este fato está relacionado ao tamanho bastante reduzido das microalgas, que apresentam cerca de 3 a 30µm (MOLINA-GRIMA, 2004) Estes organismos possuem um tamanho bastante reduzido podendo ter apenas alguns micrômetros. Quando comparadas aos musgos (menor vegetal do mundo), por exemplo, alguns representantes podem chegar a ser

até 10.000 vezes menores. Assim, a separação destas pequenas células do meio onde estão presentes é um processo complexo e dispendioso, havendo a necessidade de sua otimização. Este processo pode envolver uma ou mais etapas, como a utilização de compostos químicos para floculação, centrifugação e filtração, por exemplo. Portanto, este fato torna a obtenção destas um dos processos mais difíceis, tornando objeto de diversas investigações (HEASMAN et al., 2000, MOLINA-GRIMA et al., 2004, HARITH et al., 2009, VANDAMME et al., 2011, SIRIN et al., 2012).

Segundo Campo et al. (2007), estudos relacionados a esta área de pesquisa têm demonstrado a necessidade de um método de coleta específico para cada espécie de microalga, visando a partir disto obter um produto de alta qualidade aliado ao baixo custo. Apesar do processamento da biomassa ser específico, os métodos mais comuns são a secagem por pulverização, secagem por tambor, liofilização e secagem ao sol. Entre eles, a secagem por pulverização é o método selecionado para os produtos de alto valor, como carotenóides. Quando é necessário a ruptura celular, pode ser utilizado métodos químicos (lise alcalina, solventes) ou mecânicos (Homogeneizadores, ultrassom). Desta forma, a seleção do método de obtenção das microalgas dependerá da microalga e do produto a ser obtido.

Segundo Singh & Gu (2010) os componentes principais da matéria-prima obtida das microalgas são proteínas, hidratos de carbono, lípidos, e outros componentes valiosos, como por exemplo pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos, vitaminas, etc. Além dos parâmetros físico-químicos e da estrutura selecionada durante o cultivo, a idade da cultura (fase de crescimento) também é um fator que interfere na composição dos componentes citados acima.

O principal investimento para um projeto de obtenção de biomassa de microalgas está relacionada aos custos associados com o crescimento, coleta e isolamento da biomassa a partir do cultivo, concentração e desidratação das microalgas para posterior processamento (SINGH & GU, 2010).

2.6 Patentes de processos e produtos com microalgas

Toda pesquisa que gere um produto de caráter inovador e com aplicação industrial, desde que não conste nas proibições expressa na lei, é plenamente patenteável (WOLF, 2005). As patentes em biotecnologia são aquelas que contemplam processos de produção e produtos baseados em materiais biológicos (ex.: métodos para produção de plantas transgênicas), produtos resultantes de processos biológicos (ex.: composição contendo microorganismo), e

podendo incluir os próprios organismos resultantes dos processos biotecnológicos (FIGUEIREDO et al., 2006).

A busca pelo incremento da qualidade dos alimentos ingeridos pela população humana, aliada ao crescente conhecimento do amplo potencial de uso das microalgas nos mais diferentes setores da indústria tem levado a um expressivo número de patentes correlatas ao tema microalgas (Figura 7).

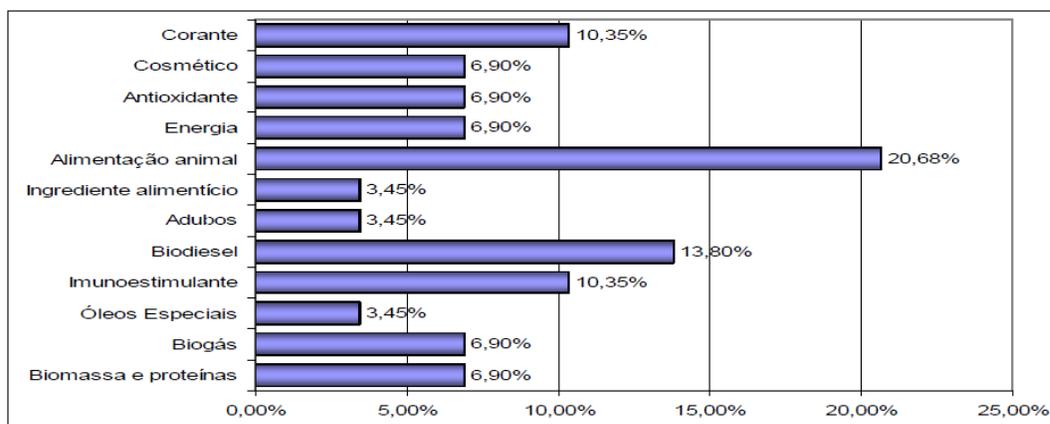


Figura 7: Principais usos de produtos de microalgas nas patentes. Fonte: Barcellos et al., 2012.

Apesar do alto número de estudos concluídos e/ou em andamento sobre esta temática, há um reduzido número de depósitos no Brasil. Apesar da posição de destaque crescente na produção científica mundial, o Brasil está no 27º colocação mundial em geração de patentes (LOURENÇO, 2006). Segundo Lourenço, apenas por ações induzidas poderá ser alcançada maior participação brasileira em inovação tecnológica, como o incentivo através de agências de pesquisa no Brasil e a interação com as empresas.

Em países desenvolvidos ou em desenvolvimento há um elevado número de depósitos de patentes sobre processos e produtos de microalgas (BARCELLOS et al., 2012). Na Universidade da Califórnia, por exemplo, 30 a 40% da receita da Universidade é originado das licenças das patentes produzidas pelos alunos e pesquisadores (WOLF, 2005).

Apesar da ausência de uma cultura de proteção à propriedade intelectual no Brasil (BARCELLOS et al., 2012), segundo Figueiredo et al (2006), o Brasil vem aumentando o número de patentes em biotecnologia seguindo as tendências mundiais.

As patentes relacionadas aos processos e produtos obtidos a partir de microalgas no Brasil estão representados na tabela 2 (INPI, 2012; PATENTESONLINE, 2012)

Tabela 2: Identificação dos processos, produtos e espécies de microalgas utilizadas nas patentes do Brasil.

Nº Patente	Nome	Espécie
PI0710226-7A2	Extrato de microalga	Microalgas
PI0112424-2	Imunoestimulantes de microalgas	Microalgas
PI0805091-0A2	Produção de biomassa, proteínas e lipídios	<i>Chlorella minutissima</i>
PI0703245-5	Produção e purificação de biogás de biomassa	Microalgas e/ou cianobactérias
PI0903470-6A2	Estrutura de produção	Microalgas
PI0701072-9	Processo tecnológico de produção	Microalgas e/ou cianobactérias
PI0903984-8A2	Método de tratamento de resíduos e produção de biombustíveis	Microalgas
PI0900631-1A2	Sequestro de dióxido de carbono e obtenção de proteína	Microalgas
PI0801132-0A2	Formulação de creme antioxidante e cicatrizante de caroteno	<i>Dunaliella</i>
PI0605365-3	Processos de conservação da microalga <i>Spirulina</i> spp	<i>Spirulina</i>
PI0702736-2	Fotobiorreatores tubulares para a remoção de CO ₂	Microalgas e/ou cianobactérias
PI0701842-8	Fotobiorreatores a remoção ou fixação CO ₂	Microalgas e/ou cianobactérias
PI0904515-5A2	Suporte para células-tronco oriundas de biopolímeros de microalga	Microalgas e/ou cianobactérias
PI0704911-0	Produção de óleos especiais, ingredientes alimentícios, cosméticos e biocombustíveis	Microalgas
PI0804513-5A2	Método para o crescimento de organismos fotossintéticos	Microalgas
PI0805123-2A2	Método de aproveitamento de CO ₂ e seu uso no cultivo de microalgas	Microalgas
PI0800141-3A2	Método para remoção de poluentes da água de produção de petróleo.	Microalgas
PI0516802-3	Mistura de óleos baseada em ingredientes bioativo	<i>Dunaliella salina</i>
PI0207907-0	Óleo da biomassa, preparação, composição farmacêutica, cosmética e nutricional	Microalgas
PI0703633-7A2	Sistema de agitação de baixo consumo de energia aplicado em fotobiorreatores	Microalgas
PI0903826-4A2	Obtenção de óleo a partir de resíduos industriais para combustíveis	Microalgas
PI0314034-2	Processo para preparar um óleo de biomassa algal	Microalgas

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar as atividades biológicas das preparações obtidas da Clorofícea *Chlorella vulgaris*, além de produzir e obter a biomassa da *C. vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat visando suas potenciais aplicações biotecnológicas

3.2 Objetivos específicos

- 1- Gerar um levantamento bibliográfico sobre a situação atual do cultivo de microalgas no Brasil;
- 2- Caracterizar as atividades antioxidantes e antimicrobianas dos compostos obtidos a partir da extração da biomassa da *Chlorella vulgaris* utilizando solventes de diferentes polaridades;
- 3- Analisar o efeito crônico da administração do extrato alcóolico da microalga *Chlorella vulgaris* sobre a depressão alastrante cortical (DAC), em ratos adultos jovens;
- 4- Obter uma invenção inovadora de um processo de produção e obtenção de microalga, somado a obtenção de um produto alcoólico bioativos funcional.

REFERÊNCIAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E. et al. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v.136, p. 109-120, 1998.

ABD EL-BAKY, H. H.; EL BAZ F. K.; EL-BAROTY, G. S. Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. American-Eurasian. Journal of **Agricultural & Environmental Science**, v.3, n.3, p.434–444, 2008.

ALGAE BIOTECNOLOGIA LTDA. **ALGAE**. Disponível em <http://www.algae.com.br/>. Acesso em: 7 dez. 2012.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402–3410, 2011.

BARCELLOS, A. D.; BARRETO A. G. S. S.; MACHADO, B. A. S. et al. Microalgas e seu potencial de uso. Congresso Brasileiro de Prospecção Tecnológica. **Cadernos de Prospecção** - ISSN 1983-1358 (print) 2317-0026 (online), 5, 4, 178-18, 2012.

BATISTA, A.P.; NUNES, M. C.; RAYMUNDO, A. et al. Microalgae biomass interaction in biopolymer gelled systems. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 817-825, 2011.

BECKER, E.W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1993. 291 p.

BEHRA, R.; GENONI, G. P.; JOSEPH, A. L. Effect of Atrazine on Growth, Photosynthesis, and Between-Strain Variability in *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 37, p. 36–41, 1999.

BEN-AMORTZ, A. Bioactive compounds: Glycerol Production, Fatty Acids Production. In: BEN-AMORTZ, A., POLLE, J. E. W., RAO, D. V. S. **The Alga Dunaliella: Biodiversity,**

physiology, genomics and biotechnology. 1st ed. Science Publishers. 2009. cap. 8, p. 189-190.

BHADURY, P.; WRIGHT, P. C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**, v. 219, p. 561- 578, 2004.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p. 313–321, 1999.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sustain Energy**, v. 14, p. 557–77, 2010.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, p. 315 – 331, 1997.

CÉSPEDE, C. L.; EL-HAFIDI, M.; PAVON, N. et al. Antioxidant and cardioprotective activities aff phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. **Food Chemistry**, v. 107, p. 820-829, 2008.

CHA, K. H.; KANG, S. W.; KIM, C. Y. et al. Effect of Pressurized Liquids on Extraction of Antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chemistry*, v. 58, p. 4756–4761, 2010.

CHAUMONT, D. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 593-604, 1993.

CHU W-L. Biotechnological applications of microalgae. **JeJSME**. v. 6 (Suppl 1). p. S24-S37, 2012

CHU, F. L.; PIRASTRU, L.; POPOVIC, R. et al Carotenogenesis Up-regulation in *Scenedesmus* sp. Using a Targeted Metabolomics Approach by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 3004–3013, 2011.

CLAEFF Engenharia e produtos químicos LTDA. **CLAEFF**. Disponível em: <http://www.claeff.com.br/tecnologias/ativos-vegetais.html>. Acesso em: 15 dez. 2012

COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. The requirement for live algae and the use of algal substitutes in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusc: an international survey. **Journal Shellfish Resource**, v. 11, p. 467-476, 1992.

CULTURE COLLECTION OF ALGAE AND PROTOZOA, **CCAP**. Disponível em: <http://www.ccap.ac.uk>. Acesso em: 6 dez. 2012.

DANTAS, D. M. M. As microalgas para produção de biodiesel. In: ZANELLA, I. **Um olhar para o futuro: Temas ambientais**. Ed. Nossa Livraria: Recife, Brasil, 2012, 181-198.

DAUS, B.; WEISS, H.; ALTENBURGER, R. Uptake and toxicity of hexafluoroarsenate in aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 78, p. 307–312, 2010.

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

DEL CAMPO, J. A.; GARCIA-GONZALEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 1163–1174, 2007.

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

FCTUC, **Algoteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra**. Disponível em: <http://www.uc.pt/fctuc/noticias/2009/n20091020n03>. Acesso em: 23 nov. 2012

FIGUEIREDO, L. H. M.; PENTEADO, M. I. O.; MEDEIROS, P .T. Patentes em biotecnologia, patenteamento em biotecnologia agropecuária: cenário brasileiro. **Biologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 36, p. 32-39, 2006,

GOMEZ-GUTIERREZ, C.. GUERRA-RIVAS, M. G.; SORIA-MERCADO, I. E. et al. Marine Edible Algae as Disease Preventers. In: KIM, S-K. **Advances in Food and Nutrition Research**, Academic Press of Elsevier, 2011, Cap. 3, p. 30-37.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R.J. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the Royal society interface**, v. 7, p. 703-7206, 2010

GRIMA, E. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R. Downstream Processing of Cell-mass and Products. In: RICHMOND, A. (ed) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, Oxford, 2004, p. 215-252.

GÜÇLÜ, Z.; ERTAN, Ö. O. Toxicity and Removal of Zinc in the Three Species (*Acutodesmus obliquus*, *Desmodesmus subspicatus* and *Desmodesmus armatus*) Belonging to the Family, Scenedesmaceae (Chlorophyta) .**Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 12, p. 309-314, 2012.

GUZMAN, S, J. M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 224–230, 2001.

HARITH, Z. T.; YUSOFF, F. M.; MOHAMED, M. S. et al. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5971-5978, 2009.

HARUN, R; SINGH, M.; FORDE, G. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.

HEASMAN, M.; DIEMAR, J. O.; CONNOR, W. et al. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation by bivalve molluscs – a summary. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 637-659, 2000.

HU, Q.; GUTERMAN, H.; RICHMOND, A. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. **Biotechnol. Bioeng.** v. 51, p. 51–60, 1996.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E. et al Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.

HUO, S.; WANG, Z.; ZHU, S. et al. Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 76–82, 2012.

INPI. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual**. Disponível em: <http://inpi.gov.br/portal/>. Acesso em: 25 nov. 2012.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70 -77, 2012.

JIANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, J. et al. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 359–364, 2013.

KATHARIOS, P.; PAPADAKIS, I.E.; PRAPAS, A. et al. Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy in 0+ grouper *Epinephelus marginatus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.** v. 25, p. 28–31, 2005.

KIM, S. K.; WIJESSEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional foods**, v. 2, p. 1–9, 2010.

KLEINEGRIS, D. M. M.; JANSSEN, M.; BRANDENBURG W. A. et al. Two-phase systems: Potential for *in situ* extraction of microalgal products. **Biotechnology Advances**. v.29, n. 5, p. 502-507, 2011.

Korea Marine Microalgae Culture Center . **KMMCC**. Disponível em: <http://www.kmmcc.re.kr/> Acesso em: 25 nov. 2012.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge University Press. Cambridge: New York, 4ed 2008, 432 p.

LEÓN, R.; GALVÁN, A.; FERNANDÉZ, E. **Transgenic Microalgae as Green Cell Factories: Advances in experimental medicine and biology**. Springer Science, 2007 vol. 616. 142 p.

LIVESCIENCE. **Algae: Biofuel of the future**. Disponível em: <http://www.livescience.com/13718-oil-algae-biofuels-water-renewable-energy.html>. Acesso em: 7 jan. 2013

LOURENÇO S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Rima, São Carlos: Brasil. 2006. 606 p.

LÜRLING, M.; LANGE, H .J.; DONK, E. V. Changes in food quality of the green alga *Scenedesmus* induced by *Daphnia* infochemicals: biochemical composition and morphology. **Freshwater Biology**. v. 38, p. 619-628, 1997.

MA, M.; ZHU, W.; WANG, Z. et al. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 221-228, 2003.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 217–32, 2010.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E. et al. Comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal Applied Phycology.**, v. 9, p. 29-35, 1997.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios, **Brazilian Journal Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MOLINA-GRIMA, E.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R. Downstream Processing of Cell-mass and products. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, Oxford, 2004, p. 215-250.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133–148, 2010.

NATIONAL CENTER FOR MARINE ALGAE AND MICROBIOTA. NCMA. Disponível em: <http://ccmp.bigelow.org> . Acesso em 7 jan. 2013.

NATURE. **Algae: the scum solution.** Disponível em: http://www.nature.com/nature/journal/v474/n7352_supp/full/474S015a.html. Acesso em 7 jan. 2013

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PARISI, A. S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O. et al. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.30, n. 3, p. 297-301, 2009.

PATENTESONLINE. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/patente.pesquisar.do?pesquisa=microalgas>. Acesso em: 21 dez. 2012

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M.; DE BASHAN, L. E. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolismo and potencial products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

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

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S. Microalgae and Immune Potential. In: WATSON R. R., ZIBADI S., PREEDY V. R. **Dietary Components and Immune Function**. Humana Press: London, 2010, p. 515-527.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 6a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. 2001, 906 p.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

ROSA, J. M. C. **Modelação e Optimização de uma Unidade de Produção de Microalgas**. 2011, 95 f. .Dissertação (Mestrado na área científica de Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. John Wiley & Sons. 2004, 584 p.

ROCHA FILHO, P. A. Fitocosméticos. **Cosmetic & Toiletries**, v.7, n. 2, p. 18-20, 1995.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y.-J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae- A review. **Food Research International**, v. 48, p. 948–960, 2012.

SCHENK, P. M; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**. v. 1, p. 20–43, 2008.

SCHOLZ, B.; LIEBEZEIT, G. Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. **Harmful Algae**, v. 20 , p. 58–70, 2012.

SEIXAS, P.; COUTINHO, P.; FERREIRA, M. et al. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 381, p. 1–9, 2009.

SHI, J. **Removal of nitrogen and phosphorus from municipal wastewater using microalgae immobilized on twin-layer system**. 2009. 174 f. Tese (Doutorado Mathematisch-Naturwissenschaftlichen) Fakultät der Universität zu Köln. 2009.

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

SILVEIRA, S.T.; BURKERT, J.F.M.; COSTA, J.A.V. et al. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2006.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596–2610, 2010.

SIRIN, S.; TROBAJO, R.; IBANEZ, C. et al. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1067-1080, 2012.

SKULBERG, O.M. Bioactive chemicals in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science: Oxford. 2004. p.485-512.

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

SOEDER, C. **A historical outline of applied phycology. Handbook of Microalgal Mass Culture**, CRC Press: Florida, 1986, pp. 25-41.

SOLAZYME. Disponível em: <http://solazyme.com/pt-br>. Acesso em: 15 nov. 2012

SPINOLA, M. V. **Inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y acumulación de fitoeno en microalgas : el irna como mecanismo de silenciamiento génico**. 2010, 216 f. Tese (doutorado de Química y Ciencia de los Materiales) Universidad de Huelva. Facultad de ciencias experimentales. Huelva, 2010.

SRIRAM, S.; SEENIVASAN, R. Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 2, p. 9- 13, 2012.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

TAKAGI, M.; KARSENIO, Y. T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **J. Bioscience Bioengineer**, v. 101, p. 223–226, 2006.

TOMASELLI, L. The microalgal Cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell, Oxford, , 2004, p.3-19.

TRAMPER, J.; BATTERSHILL, C.; BRANDENBURG, W. et al. What to do in marine biotechnology? **Biomol. Eng.**, v. 20, p. 467–471, 2003

TREVIÑO, I. F. **Estudios taxonomicos em algas verdes cocales em Sur de España**. 2008, 336 f. Tese (Doutorado) Universidad de Granada, Facultad de Ciencias: Granada, 2008.

UTEX, **The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin**. Disponível em: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/Search.aspx>. Acesso em: 25 nov. 2012.

VANDAMME, D.; PONTES, C. S. V.; GOIRIS, K. et al. Evaluation of Electro-Coagulation–Flocculation for Harvesting Marine and Freshwater Microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 10, p. 2320-2329, 2011.

VENDRAMINI, A. L. A.; TRUGO, L. C. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 15, n. 5, p. 664-668, 2004.

VIJAYAVEL, K.; ANBUSELVAM, C.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 303, p. 39–44, 2007.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quím. Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

WANG, H.-M.; PAN, J.-L.; CHEN, C.-Y. et al. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1865–1872, 2010.

WIKFORS, G.H.; OHNO, M. Impact of algal research in aquaculture. **Journal of Physiology**, v. 37, p. 968-974, 2001.

WILSON, K. E; HUNER, N. P A. The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid Delta pH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. **Planta**, v. 212, p. 93–102, 2000.

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

WIND, T.; BELANGER, S. E. Acute and Chronic Toxicity of Alcohol Ethoxylates to the Green Alga, *Desmodesmus* (= *Scenedesmus*) *subspicatus*, and the Subsequent Development of Structure Activity Relationships. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v. 76, p. 218–225, 2006.

WOLF, M. T. A pesquisa científica e as patentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, p. 16-17. 2005

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **J. Appl. Phycol.**, v. 8, p. 487–502, 1997.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHEN, X. D. et al. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 15, p. 3252–60, 2011.

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo de Livro (Aprovado):

Cultivo de microalgas en Brasil. In: Acuicultura en América Latina: Estado Actual y Perspectivas.

Cultivo de microalgas en Brasil

Danielli Matias de M. Dantas, Alfredo O. Gálvez, Ranilson de S. Bezerra

Las microalgas están presentes en distintos ecosistemas de la Tierra, no solamente en ambientes acuáticos, sino también en terrestres, representando una variedad de especies que viven en una gama de condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50.000 especies en el mundo, cerca de 30.000, ya fueron estudiadas y analizadas (Richmond, 2004). En Brasil, se calcula que hay un total de 10.000 especies continentales (Rocha, 2005) y 975 especies marinas (Oliveira *et al.* 1999).

Entre los microorganismos, las microalgas representan al grupo mejor estudiado en el Brasil, contando con un número mayor de investigadores (Rocha, 2005). Existen varios ficólogos dedicados al estudio taxonómico de las algas, lo que contribuye al avance del conocimiento de este tema en el país. Los ficólogos destacan como acciones prioritarias para aumentar los conocimientos del grupo: la mejora de las colecciones, la literatura y recursos humanos capacitados.

Con respecto a las colecciones de algas, existen pequeños y medianos centros de colección en el Brasil. De acuerdo con un estudio realizado por Sérgio Lourenço (2006), hay cerca de 43 instituciones brasileñas que mantienen colecciones de cultivo de microalgas. La mayoría están ubicadas en Universidades e Institutos destinados para la investigación y también por empresas de acuicultura distribuidas en varios estados del país (Figura 1).



Figura 1: Visualización del mapa de América del Sur y las Instituciones brasileñas que tienen colecciones del cultivo de microalgas (Google earth-mapas – [Http://mapas.google.com](http://mapas.google.com)).

Brasil no participó del desarrollo de los principales cultivos de microalgas en el período que concluyó a finales de la primera mitad del siglo XX. Las experiencias de los cultivos de microalgas solamente empezaron a ser desarrolladas en el País cuando a nivel internacional se produjo una diversificación de los estudios y aplicaciones de la biotecnología del cultivo. A pesar que las microalgas ya se cultivaban en empresas de acuicultura, sólo desde el año 1980 estos cultivos comenzaron a ser difundidos en el Brasil (Lourenço, 2006).

El suceso del cultivo de microalgas surgió desde que empezaron las necesidades para alimentar a los cultivos de animales acuáticos en Brasil, colocando el tema en un escenario internacional. Varios estudios comenzaron a desarrollarse en especialidades como fisiología, bioquímica y genética. En la actualidad, la investigación aplicada en el cultivo de microalgas continúa, especialmente en los aspectos de producción con el objetivo de obtener sistemas más eficientes (Jorquera et al, 2010), destacando los estudios sobre el uso de algas como fuentes de metabolitos bioactivos (Marinho-Soriano, et al 2011) y su utilización como biocombustibles (Roberto et al, 2010; Mussato et al, 2010; Carioca et al, 2009;

Araujo, et al, 2011, Borges et al, 2011). Además de los contratos de cooperación tecnológica entre empresas y universidades, el gobierno brasileño ha invertido cada vez más en el desarrollo de la investigación relacionada con el uso de las microalgas y las cuestiones antes mencionadas, teniendo como una de las acciones de alta prioridad la bioenergía con generación de biocombustibles y derivados (subproductos). Los proyectos que vienen desarrollándose tienen como objetivo la inclusión de la producción de microalgas en las industrias asociándolos a la utilización de los desechos agrícolas en los sistemas de cultivo, a la absorción de CO₂ por las microalgas y a la producción de biomasa con fines biotecnológicos.

Actualmente toda la producción en escala comercial de microalgas desarrollada en el país, está relacionada con la alimentación en acuicultura principalmente en la larvicultura de camarones y moluscos marinos, también se utiliza en forma indirecta como alimento en cultivos de peces por medio de rotíferos y copépodos. Los cultivos de microalgas están a cargo de empresas que están localizadas en las Regiones del Noreste, Sudeste y Sur, donde se concentran los mayores centros de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* y moluscos marinos representado por los cultivos del mejillón *Perna perna*, de ostras *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gazar* y de vieira *Nodipecten nodosus* respectivamente. En la región del Noreste, el estado del Rio Grande do Norte se destaca por ser el mayor productor de la acuicultura marina del Brasil (28.649,7 t) y en La Región Sur, se destaca el estado de Santa Catarina (15.636,2 t) que está en tercer lugar en el ranking de la acuicultura marina nacional (MPA, 2012).

Los principales géneros de microalgas cultivadas en los laboratorios de producción comercial de Brasil pertenecen a diferentes grupos taxonómicos: las Bacillarioficeas (diatomeas) *Thalassiosira* sp. y *Chaetoceros* sp.; las Cloroficeas *Desmodesmus* sp. (antes conocida como *Scenedesmus*) *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp.; la Haptoficea (Primnesophicea) *Isochrysis* sp y la Eustigmatoficea *Nannochloropsis* sp. Hay registros de producción de la Cianobacteria *Spirulina platensis* en escala piloto en los Estados del Rio Grande do Sul (Costa, et al 2002 & Morais, et al 2009) y Paraíba, recomendando la utilización de la biomasa como suplemento alimenticio.

El tipo de cultivo comunmente utilizado en el Brasil es el semicontínuo, donde los estanques son de baja profundidad, construidos con concreto o fibra de vidrio o

policarbonato o revestido con material de plástico y los cultivos son constantemente aerados. Muchas empresas desenvuelven los cultivos sobre condiciones naturales de iluminación y temperatura, principalmente las empresas que están ubicadas al Noreste Brasileño, por presentar días largos, altos índices de luz natural (porque está cerca de la línea del Ecuador) y por consiguiente temperaturas más elevadas (media anual de 20° a 28°C). Estas condiciones proporcionan mayor productividad de microalgas. En algunas empresas, los cultivos utilizan fotobiorreactores con el objetivo de alcanzar mayor productividad, por lo menos para la fase inicial del cultivo.

A pesar del potencial del país, empresas consolidadas para la obtención de microalgas son poco representativas y los productos consumidos en el país a partir de biomasa algal, como cápsulas para complemento alimenticio y fármacos, son importados de otros países (las microalga más importadas son *Spirulina* sp. y *Chlorella* sp.). A pesar de esto, es cada vez más creciente en Brasil la producción científica, los números de investigadores y empresas que vienen invirtiendo en la producción de microalgas no apenas como alimento vivo, mas si para su utilización con fines biotecnológicos.

Referencias.

Araújo SG, LJBL Matos, LRB Gonçalves, FAN Fernandes & WRL Farias (2011) Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*: 102 5248–5250.

Borges L, JA Morón-Villarreyes, MGM D'Oca & PC Abreu (2011) Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and Bioenergy*: 35 4449-4454.

Carioca JOB, JJ Hiluy Filho, MRLV Leal & FS Macambira (2009) The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil. *Biotechnology Advances*: 27 1043–1050.

Costa JAV, LM Colla, P Duarte Filho, K Kabke & A Weber (2002) Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal Microbiology Biotechnology* 18: 603–607.

Google earth-mapas. URL: <http://www.google.com/maps> Acessado em 13 de Março de 2012.

- Jorquera O, A Kiperstok, EA Sales, M Embiruçu & ML Ghirardi (2010) Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*: 101 1406–1413
- Marinho-Soriano E, E Pinto, NS Yokoya, P Colepicolo, VL Teixeira & Y Yoneshigue-Valentin (2011) Frontiers on algae bioactive compounds *Brazilian Journal of Pharmacognosy (Brazil)*: 21 41-42
- Morais MG, EM Radmann, MR Andrade, GG Teixeira, LRF Bruschi & JAV Costa (2009) Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. *Aquaculture* 294: 60–64.
- MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura (2012) Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil em 2010. In: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf (acessado em 07 de Março de 2011).
- Mussatto SI, G Dragone, PMR Guimarães, JPA Silva, LM Carneiro et al. (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*: 28 817–830.
- Lourenço SO (2006) *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. RiMa, São Carlos, Brasil. 606 pp.
- Oliveira EC, PA Horta, CE Amancio & CL Sant’Anna (1999) Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. MMA/FNMA/GEF. Fundação André Tosello, Campinas Brasil URL: <http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/algas> (acessado em 28 de Dezembro de 2011).
- Richmond A (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd, London. 545 pp.
- Rocha, O (2005) Organismos de Água Doce *In*: Thomas Lewinsohn (Org.) *Avaliação do estado do conhecimento biodiversidade brasileira*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Vol.2, pp.15-52. ISBN: 85-87166-82-4

4.2 Artigo (a ser submetido): Food Chemistry

Extraction of antimicrobial and antioxidant compounds from *Chlorella vulgaris* using
solvents of different polarities

Danielli M.M. Dantas^a, Romero M.P.B. Costa^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^a, Alfredo O.

Gálvez^b, Ana Rita F. Drummond^c, Ranilson S. Bezerra^{a*}

^aDepartment of Biochemistry, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP 50.670-420, Recife-PE, Brazil.

^bDepartment of Fisheries and Aquaculture, Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brazil.

^cLaboratory of Fluids, Technological Institute of Pernambuco (ITEP), Av. Prof Luiz Freire, 700. Cidade Universitária, CEP: 50.740-540, Recife - PE, Brazil.

*Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratory of Enzymology – LABENZ

Department of Biochemistry, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP 50.670-420 Recife, PE, Brazil

Tel: +55.81.2126.8540

Fax: +55.81.2126.8576

E-mail address: ransoube@uol.com.br

Abstract

Different solvents (ethanol, methanol, butanol, acetone, dimethyl sulfoxide and water) were used to extract compounds from the green microalgae *Chlorella vulgaris* and then they were examined for antioxidant activity, phytochemical screening and antimicrobial properties. In vitro free radical quenching and total antioxidant activity of extracts were investigated with 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), and compared with catequin and gallic acid as positive controls. In most cases, the results showed a significant association between the antioxidant properties and the total phenolics content. The aqueous extract showed both the highest antioxidant activity for inhibition scavenging (68.5%) and highest phenolic content (3.45 mg/mL). Antimicrobial activities were carried out using disc diffusion assays and the both dilution method and compared with Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results demonstrated activity between the aqueous extract and most specimens (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*). These results suggest that the aqueous crude extract of *C. vulgaris* could be considered as a biological antioxidant and antimicrobial agent, and a valuable tool for the biotechnology field.

Key words: microalgae, *Chlorella vulgaris*, antibacterial, extracts, phytochemical

1.Introduction

Microalgae are a source of natural products and have been recently studied for biotechnological applications. The diversity of microalgae makes a potentially rich source for various chemical products with applications in nutritional, cosmetic, pharmaceutical, and medicinal industries. Extracts from microalgae are a rich source of proteins, vitamins, and minerals. *Chlorella*, a unicellular green algae, contains various valuable proteins (40~60%) and has been widely used in aquaculture, food and biotechnology industries. Additionally, the extract from *Chlorella* contains various biologically active compounds including growth factors, anti inflammatory and wound healing substances, antioxidants, and emollient compounds (Kim, Ravichandran, Dominic, Bahadar, & Young, 2008).

The production of free radicals in organisms is regulated by different antioxidants molecules which may be endogenous, such as superoxide dismutase, or may come from the diet, such as ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoids and polyphenols. When there is a limitation in the availability of antioxidants, there may be oxidative damage to the cumulative nature. Among the various classes of naturally occurring antioxidants, phenolic compounds such as simple phenols, phenolic acids (derivatives of benzoic acid and cinnamic acid), coumarins, flavonoids and others, have received much attention. According to Wang et al. (2010), the isolated indigenous *C. vulgaris* strain extract obtained from Supercritical carbon dioxide extraction exhibits significant antioxidant activities and presents dual inhibitions to lung cancer cell growth and migration ability, which is the index of cancer metastasis. Therefore, microalgal species, such as *C. vulgaris*, could have the potential for the development of antioxidant and anticancer products. A revision involving research for innovative functional food ingredients from microalgae showed the particular species of microalgae, the activity of the compounds obtained, and the type of extraction mechanisms used, showing that the unicellular algae *Chlorella vulgaris* contains many bioactive

substances with medical properties. Experimental studies carried out using *Chlorella* have demonstrated antitumor effect, cancer chemoprevention properties (Wang et al., 2010), antiinflammatory activity (Guzmán, Gato & Calejja, 2001), antioxidant activity (Vijayavel, Anbuselvam, & Balasubramanian, 2007), and antimicrobial activity (Makiridis, Costa, & Dinis, 2006).

The chemical composition of the different microalgae species may be presented in three stages: the first step since it will help to target the valuable compounds, antioxidants, sulphated polysaccharides, PUFAs, etc., in the studied microalgae. As a second step, the growing conditions (salinity, luminosity and nutrient availability) could be optimized to maximize the production of the compound of interest. The next step, once the biomass in the target compound (or compounds) is enriched, is to optimize the conditions to extract the valuable components with high yield and activities. Therefore, it is necessary to know not only the selectivity of the process but also its impact in the global definition of a sustainable production. Important extraction parameters such as yield, quality, and bioactivity should be monitored, but also other factors such as sustainability, environmental pollution, residues, cost effectiveness and should also contribute to the final selection of the most appropriate extraction process (supercritical fluids like CO₂, ethanol, water, and mixture of fluids or solvents). The development of processes to improve yield productions and the selectivity of the compounds is becoming everyday more and more urgent in our society (Plaza, Herrero, Cifuentes, & Ibanez, 2009). Hence, the present research focuses extraction of antimicrobial and antioxidant compounds from *Chlorella vulgaris* using solvents of different polarities.

2. Material and methods

2.1. Microalgae production

The green microalgae *Chlorella vulgaris* used in this study was obtained from the Culture Centre of Algae of Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. The microalgae inoculum were cultivated in semicontinuous culture, indoors and outdoors. The indoor cultures of microalgae were grown with autoclaved freshwater and Provasoli medium in 2 L bottles bubbled with air, incubated in a controlled temperature room (24°C). The bottles were irradiated with daylight fluorescent tubes (light intensity, 4000Lux) for 72 hours. The outdoor cultivation was composed of 10, 100 and 500L fiberglass containers with freshwater and fertilizer NPK (20:10:20), constant aeration, and a natural photoperiod (12:12) under a light intensity of approximately 100.000 Lux. Algal biomass was estimated with use of a Neubauer chamber. The separation of microalgae biomass was obtained by flocculation with NaOH (1M), dried, and sent to the Biotechnology Laboratory of the Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) for processing.

2.2. Preparation of the extracts

The extracts were obtained from different solvents: ethanol, methanol, butanol, acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO) and water. Samples of dried microalgae biomass (1g) were suspended in 10 mL for each solvent. The sample were extracted under 30 minutes of sonication (40 kHz) in an ultrasonic batch (model Ultra Cleaner 1400, Ultrasonic Unique, Brasil) followed by camera shake for 2 hours and centrifugation (2486xg, Herolab UniCen MR Centrifuge, Germany) for 10 minutes to obtain the supernatant liquid (Figure 1). These extracts were analyzed for activity antioxidant, antibacterial, antifungal and phytochemical compounds.

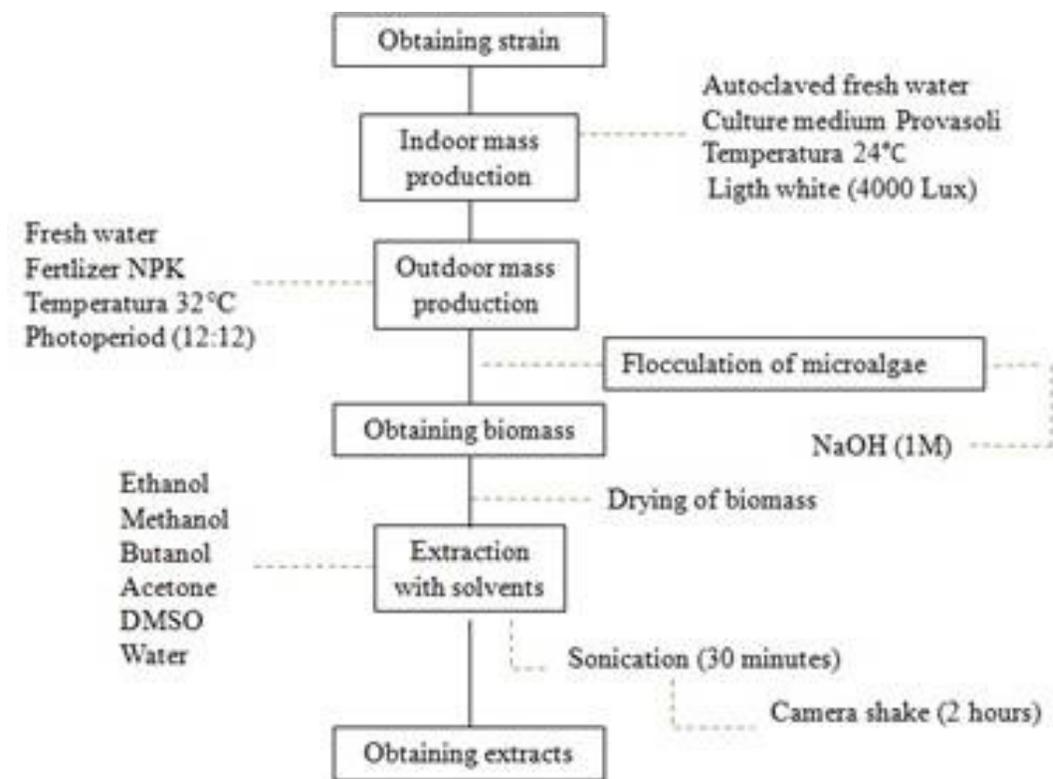


Figure 1. Production and obtaining of the extracts from the microalgae *C.vulgaris*.

2.3. Phytochemical screening

The total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and condensed tannins content (CTC) in the extracts were determined.

The total phenolic content (TPC) in the extracts was determined according to the method described by Julkunen-Titto (1985) with some modifications. An aliquot (50 μ L) of each extract or standard solution was mixed with 1 mL of H₂O and 500 μ L of Folin–Ciocalteu’s phenol reagent, then 2.5 mL of 20% Na₂CO₃ solution were added to the mixture, followed by incubating at room temperature (22°C) in the dark for 45 min. The absorbance against a blank was measured at 735 nm (Bio-RAD xMark™ Microplate spectrophotometer, United States). Gallic acid was used to prepare a standard curve (0.025–0.6 mg/mL). The results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g extract (dry weight). The total

flavonoid content (TFC) was determined according to the method of Zhishen, Mengcheng, and Jianming (1999). An aliquot (250 μ L) of each extract or standard solution was mixed with 1.25 mL of H₂O and 75 μ L of 5% NaNO₂ solution for 6 min, then 150 μ L of 10% AlCl₃ H₂O solution were added. After 5 min, 0.5 mL of 1 M NaOH solution was added and then the total volume was made up to 2.5 mL with H₂O. Following the thorough mixing of the solution, the absorbance against a blank was determined at 510 nm. (+)-Catechin was utilized for constructing the standard curve (0.05–0.5 mg/mL). The results were expressed as mg catechin equivalents (CE)/g extracted (dry weight). The condensed tannin content (CTC) was determined according to the method of Julkunen-Titto (1985). An aliquot (50 μ L) of each extract or standard solution was mixed with 1.5 mL of 4% vanillin (prepared with MeOH) and then 750 μ L of HCl were added. The well-mixed solution was incubated at room temperature (22°C) in the dark for 20 min. The absorbance against the blank was read at 500 nm. The (+) - Catechin was used to make the standard curve (0 – 1 mg/mL). The results were expressed as mg catechin equivalents (CE)/g extracted (dw).

2.5. Antioxidant activity

2.5.1 DPPH scavening

The antioxidant activity of the extracts from *C. vulgaris* was evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free-radical scavenging activity according to the method of Soler-Rivas, Espin and Wichers (2000) & Moure, Franco, Sineiro, Dominguez, Núñez and Lema (2001). The experiments were performed using the SmartSpec 3000 spectrophotometer (Bio-RAD). An aliquot (20 μ L) of butanol, ether, ethyl acetate and aqueous extracts were mixed separately with 90 μ M methanolic DPPH radical solution to a final volume of 1 mL. Pure methanol was used as negative control. Solution of (+)-catechin, ascorbate and pirocatechin in methanol were used as a positive control. The DPPH radical concentration in

the reaction mixture was calculated by the calibration curve according to the following nonlinear regression equation ($R= 0.9983$): $A_{515\text{ nm}} = 0.0362 [\text{DPPH}] - 0.055$, where $[\text{DPPH}]$ is expressed in mg mL^{-1} . The percentage of remaining DPPH ($\% \text{DPPH}_{\text{REM}}$) was calculated according to Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995), as follows:

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T}} / [\text{DPPH}]_{\text{T}_i} \times 100$$

where T is the time when absorbance was determined (1–30 min) and T_i is the initial time. For determination of IP, an aliquot (50 μL) of each extract was added to 2 mL of 90 μM methanolic solution of the DPPH radical and the absorbance was determined at 515 nm at the steady state (20 min).

2.5.2 Determination of reducing power

The reducing power of all samples was determined as described by a literature report (Dorman, Kosar, Kahlos, Holm, & Hiltunen, 2003). One milliliter of each sample was mixed with 1.0 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 ml of a 1% aqueous potassium hexacyanoferrate $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution. After 30-min incubation at 50 °C, 1.5 ml of 10% trichloroacetic acid were added, and the mixture was centrifuged for 10 min. Finally, 2.0 ml of the upper layer were mixed with 2.0 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% aqueous FeCl_3 , and the absorbance was recorded at 700 nm. The data were presented as ascorbic acid equivalent (AscAE) in milligrammes of ascorbic acid per gramme of microalgae material. A greater value of the AscAE related to greater reducing power of the sample.

2.6. Antibacterial activity

The Bacteria strains were obtained from the Department of Antibiotics (DA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil and stored in Difco™ Nutrient Agar (NA) at 4 °C. Gram-positive strains were *Streptococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*; Gram-

negative strains were *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. Extract preparations for antibacterial activity were investigated by the disc diffusion method. A mixture of one-hundred millilitres of warm NA (43 °C) and 0.5 mL of bacteria suspensions (10^5 – 10^6 CFU mL⁻¹) were prepared, and then 10 mL volumes were distributed in sterile Petri plates (90x15 mm) and allowed to solidify. Sterile blank paper discs (6 mm diameter) impregnated with 20 µL of sterile extracts carried out using dried algae (10%, w/v) obtained in different solvents (ethanol, methanol, butanol, acetone, DMSO and water) were added on the center agar plates. The negative controls were discs with different solvents (20 µL). Plates were incubated at 37 °C for 24 h. A transparent ring around the paper disc revealed antibacterial activity.

2.7 Antifungal activity

The antimicrobial activity of the different extracts of *C. vulgaris* was determined according to the method already established by Costa, Vaz, Oliva, Coelho, Correia, and Carneiro-da-Cunha (2010). *Aspergillus niger* (URM2813), *A. flavus* (URM2814), *A. fumigatus* (URM2815), *Rhizopus arrhizus* (URM2816), *Paecilomyces variotti* (URM2818), *Fusarium moniliforme* (URM2463), *F. lateritium* (URM2665), *Candida albicans* (UFPE-DA1007) and *C. burnenses* (UFPE-DA4674) were obtained from the Cultures Collection —Micoteca (URM) of the Department of Mycology and from the Department of Antibiotic (DA), University Federal of Pernambuco (UFPE), Brazil.

2.8 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of four determinations. Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance. Differences were considered significant at P values < 0.05.

3. Results and discussion

3.1 Phytochemical screening and Antioxidant properties

Dried samples of *C. vulgaris* algae were submitted to analysis by their constituents. The results for the phytochemical analysis of the extracts obtained from different solvents is presented in Table 1. It may be seen that water extract showed the highest levels of total phenols (3.45 mg/mL), followed by the extraction using DMSO solvent (2.23 mg/mL).

Table 1. Phytochemical screening of different extracts of *C. vulgaris*.

	*TPC (mg/mL)	*TFC (mg/mL)	*CTC (mg/mL)
Ethanol	0.380 ± 0.020	ND	ND
Methanol	0.650 ± 0.010	ND	ND
Buthanol	0.110 ± 0.010	0.06 ± 0.02	ND
Acetone	0.120 ± 0.004	0.04 ± 0.02	ND
DMSO	2.230 ± 0.200	1.12 ± 0.02	ND
Water	3.450 ± 0.260	1.48 ± 0.02	0.230 ± 0.020

* TPC: Total phenols contents; * TFC: Total flavonoids contents; * CTC: Condensed tannins contents

* ND: Not detected. Means ± standard deviation of three measurements.

Butanol and acetone extracts contained significantly less phenols and flavonoids when compared with extraction of others solvents. The results achieved by Wang, Zhang, Duan and Li (2009) for *Rhodomela confervoides* algae showed that ethyl acetate solvent (minor polarity) had better extraction for condensed tannins contents than the others solvents, about 74 mg/mL. According to López, Rico, Rivero, and Tangil (2011) the amount of total phenolics extracted from *Stypocaulon scoparium* varied from 1.23 to 3.28 mg equivalent GA/g of dry algae powder, while in the present investigation TPC varied from 0.110 to 3.450 mg equivalent GA/g of dry algae powder. It also may be seen in Table 1 that low contents of tannins were extracted when water was used as the solvent or not detectable for all the others

extracts. It is well known that the yield of chemical extraction depends on the type of solvents and its polarities, pH, extraction time and temperature as well as on the chemical compositions of the sample. Solvents such as methanol, ethanol, butanol, acetone, chloroform and water have been commonly used for the extraction of phenolics from brown and red seaweeds (Ganesan, Kumar, & Bhaskar, 2008; López, Rico, Rivero, & Tangil 2011). Further tests were conducted for the extracts of *C. vulgaris* in methanol and water to assess the presence of coumarin, phenylpropanoglycoside compounds, terpene, alkaloids and carbohydrates. Low quantities of carbohydrates were extracted by methanol, on the other hand water appears not to extract carbohydrates. The other biomolecules were not detectable. Ananthi, Raghavendran, Sunil, Gayathri, Ramakrishnan and Vasanthi (2010) showed that in *Turbinaria ornata*, a major contribution of carbohydrates in quantitative estimation of compounds were present in the same extract.

Due to the presence of different antioxidant components in the crude extracts of biological tissue samples, it is relatively difficult to measure each antioxidant component separately. Therefore, several assay methods have been developed and applied in recent years to screen and evaluate the total antioxidant activity of the samples (Prabhakar et al., 2007). Assays for free radical scavenging with DPPH are known by the action of antioxidants to inhibit the oxidation of products. Thus, the DPPH assay is often used as an indicator of antioxidant activity (Wang et al., 2010). Figure 2 shows the kinetic behaviour of antioxidant extracts against DPPH. According to results, DMSO and water extracts demonstrate the highest antioxidant properties. This may occur because molecules which have antioxidant properties in these extracts present a hydrophilic behaviour. Antioxidant compounds are able to stabilize or deactivate free radicals before they attack targets in the biological cells. The radicals formed from antioxidants that are not reactive enough to propagate the chain reaction are neutralized by reactions with another radical to form stable products, or may be picked up

by another antioxidant (Andrade, Costa, Bora, Miguel, Miguel, & Kerber, 2007). In figure 2, may be observed that the extractions obtained with acetone and buthanol present the lowest antioxidant activities. This agree with the the results reported earlier about the hydrophilic behaviour of the compounds extracted. DPPH free radical scavenge testing system is an acknowledged mechanism by which antioxidants act to inhibit oxidation products. Hence, this DPPH assay has been widely applied as one of the indicators for antioxidant activity.

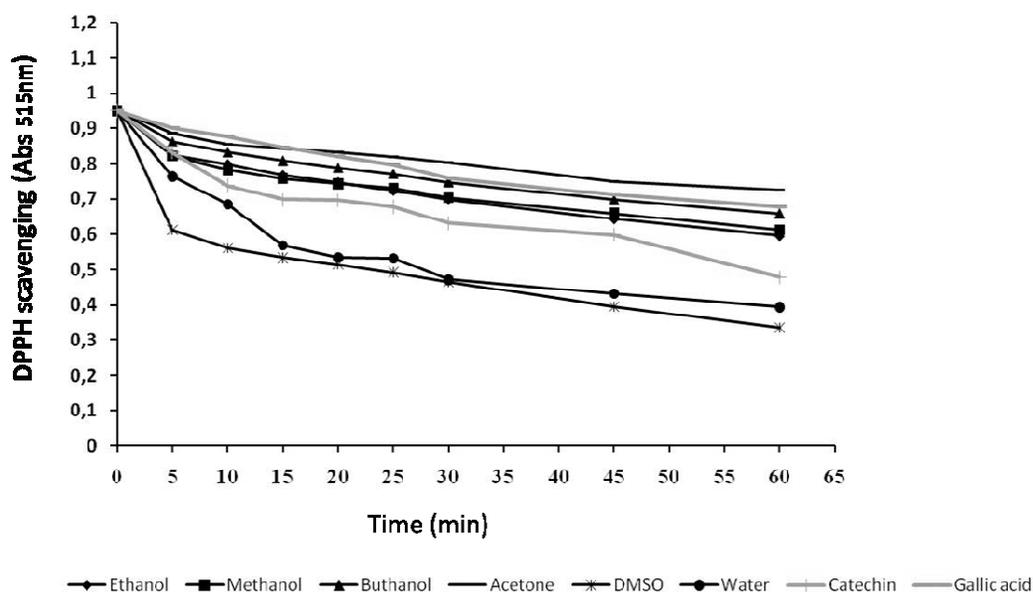


Figure 2. Kinetic behaviour of antioxidant extracts. The error in the determination of absorbance 515 nm to relative values of different doses is approximately ± 0.010 , smaller than the size of the symbols. Preparations of extracts are described in the figure.

In this study the solvents with higher efficiency of extraction of compounds with antioxidant activity for the species *Chlorella vulgaris* are shown in Table 2. The solvents DMSO and water showed the DPPH percentage of inhibition of 64.6 % and 68.5 %, respectively.

respectively, higher than the standards used catechin (49.6 %) and gallic acid (28.7 %), showing that they are potential inhibitors of cellular oxidation by free radicals. Wang et al. (2010) studied *C. vulgaris* and observed that in the DPPH assay when using ultrasonic extraction, ethanol presents the lowest percentage of inhibition (0.74 %), however in the present study a high yield was found than found in this study (37.2 %).

Table 2. Radical scavenging performance of *C. vulgaris* extracts.

<i>C. vulgaris</i> extracts	DPPH scavenging		Reducing power
	IP (%)	REMDPPH (%)	AscAE \pm SD
Ethanol extract	37.2	62.8	396 \pm 1.34a
Methanol extract	35.4	64.6	384 \pm 1.45a
Buthanol extract	30.6	69.4	185 \pm 2.46b
Acetone extract	23.5	76.5	198 \pm 3.12b
DMSO extract	64.6	35.4	595 \pm 3.12c
Water extract	68.5	31.5	612 \pm 2.24c
Catechin standard	49.6	50.4	412 \pm 2.11a
Gallic acid standard	28.7	71.3	187 \pm 3.45b

*Catechin and Gallic acid are the standards; IP: percentage inhibition; REMDPPH: percentage of remaining DPPH. IP (%) and REMDPPH were calculated at the steady state (60 min).

Reducing power is expressed as ascorbic acid equivalents (AscAE; mg/g seaweed dry weight of AscAE). Each value is presented as mean \pm SD (n = 3). Means within each column with different letters (a–c) differ significantly (p < 0.05).

The reducing power of *C. vulgaris* extracts is described in table 2. All extracts possessed the ability to reduce iron (III). In the six fractions extracted by different solvent partitions, the water soluble extract was significantly (p < 0.05) better iron (III) reducer than the other fractions. Among the six extracts, aqueous extract appeared to possess the highest reducing activity, followed by DMSO, the same order as the antioxidant activities in both assay systems. Statistical analyses indicated that there was a strong correlation between the reducing activity and DPPH radical-scavenging activities in both of the fractions. This may be due to a common under pinning mechanism, i.e. electron/hydrogen donation.

This fact also might be related to the variation in strains of microalgae and with the appropriate constituents, as well as the environmental conditions. *Chlorella* multiplies rapidly, requiring only carbon dioxide, water, sunlight, and a small amount of minerals. Therefore tropical regions, mainly like the Northeast of Brazil, where the temperature always is above 20 °C, represents a favorite habitat for this algae, which could have continues crop.

The result found using aqueous extract proves satisfactory because in addition to reducing processing costs, resulting in a product without the potentially toxic residues compared with other solvents.

3.4 Antimicrobial activity of *C. vulgaris*

The effects of different extracts on the antibacterial and antifungal activities were evaluated in this research. Table 3 showed the size of zone of inhibition (mm) of *C. vulgaris* extracts against different strains. The aqueous extract showed antibacterial activity against most bacteria tested, except *S. faecalis*. The growth inhibition of *S. faecalis* was observed

only when the extracts with acetone and DMSO were used, with size of zone of inhibition of 12 mm and 15 mm, respectively. The other extracts showed no inhibition against the tested bacteria.

Table 3. Size of zone of inhibition (mm) (mean \pm standard deviation) of *C. vulgaris* extracts (20 μ L per disc) against different strains.

Extracts preparations	<i>S. fecalis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Ethanol	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Methanol	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Buthanol	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Acetone	12 \pm 1	NI	NI	15 \pm 1	NI	NI
DMSO	15 \pm 1	NI	NI	NI	11 \pm 1	NI
Water	NI	11 \pm 1	11 \pm 1	12 \pm 1	15 \pm 1	10 \pm 1

NI: no inhibition; numbers represent the average diameter (in mm) \pm SD of the inhibition zone (three replicates).

Table 4 showed Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of different extracts from *C. vulgaris*. According to Aligiannis, Kalpoutzakis, Mitaku, and Chinou (2001), plant materials showing MIC values up to 0.5 mg/mL are considered strong inhibitors, values of 0.6-1.5 mg/mL are moderate inhibitors, and vales above 1.6 mg/mL are weak inhibitors. The results of this work showed that the MIC values of extracts of *C. vulgaris* were more satisfactory with the following solvents: water for *B. Subtilis* (0.7 mg/mL), DMSO for *S. faecalis* (0.55 mg/mL) and acetone for *S. enteritidis* (0.8 mg/mL). Guzmán, Gato, and Calleja (2001), when evaluating the anti-inflammatory activity of the methanolic extract of *Chlorella stigmatophora*, did not find significant results even at high concentrations of the extract, only in aqueous extracts. This result was similar to

that found in the present work for antibacterial activity of *C. vulgaris* against all bacteria tested.

Table 4. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of different extracts from *C. vulgaris*.

Strains	Acetone		DMSO		Water	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. fecalis</i>	1.05	>2.00	0.55	0.75	NT	NT
<i>P.mirabilis</i>	NT	NT	NT	NT	1.50	>2.00
<i>K.pneumoniae</i>	NT	NT	NT	NT	1.50	>2.00
<i>S.enteritidis</i>	0.80	0.95	NT	NT	1.00	1.50
<i>B. subtilis</i>	1.00	>2.00	1.00	>1.50	0.70	1.00
<i>E. coli</i>	NT	NT	NT	NT	1.00	>1.50

NT: Not Tested; Values of MIC and MBC in mg.mL⁻¹.

According to Ki-Bong et al. (2008) compounds from *Odonthalia corymbifera* showed potent antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, and *Salmonella typhimurium*. Besides, the antifungal activity found to be the most active against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Despite strong antibacterial activity, antifungal activity tests showed no effect for all extracts evaluated in this research.

Conclusions

The data presented in this study demonstrated antioxidant and antibacterial activities for *C. vulgaris*, demonstrating the presence of bioactive compounds in the biomass obtained from this microalgae in industrial scale cultivation.

A series of extracts from *C. vulgaris* has been prepared. The results for antioxidant activity obtained from different solvents demonstrated greater efficiency when using aqueous and DMSO, and a more effective extraction of compounds with antioxidant activity when compared with ethanol, methanol, butanol and acetone. The hydrophilic behaviour of the solvent is related to these results. The antibacterial activity was also higher for the aqueous and DMSO extracts, including the acetone extract which has also demonstrated growth inhibition of some bacteria (*E. faecalis*, *S. enteritidis* and *B. subtilis*). The other extracts (ethanol, methanol, butanol) showed no inhibition against the tested bacteria. Microalgae did not demonstrate any inhibition of fungal growth.

This study demonstrates a process resulting in an efficient isolation of an aqueous extract from microalgae using a more cost efficient protocol and avoiding the use of toxic residues. Furthermore, we found that the large scale production did not interfere in the biological activities of *C. vulgaris* resulting in a promising process for this species and their biotechnological applications.

Acknowledgments

The authors are deeply grateful to the Department of Antibiotics, Rural Federal University of Pernambuco for valuable assistance. This research was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

AliGiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4168-4170.

Ananthi, S., Raghavendran, H. R. B., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., & Vasanthi, H. R. (2010). In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 187–192.

Andrade, C.A., Costa, C.K., Bora, K., Miguel, M.D., Miguel, O.G., & Kerber, V.A. (2007). Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 231-235.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28, 25–30.

Costa, R. M. P. B., Vaz, A. F. M., Oliva, M. L. V., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2010). A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry*, 45, 526-533.

Dorman, H. J. D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563–4569.

Ganesan, P., Kumar, C. S., & Bhaskar. N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99, 2717-2723.

Guzmán, S, J. M. (2001) Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytotherapy Research*, 15, 224–230.

Julkunen-Titto RJ. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for analysis of certain phenolics. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 33, 213-217.

Ki-Bong O., Ji H. L., Soon-Chun C., Jongheon S., Hee J. S., Hye-Kyeong K. & Hyi-Seung L. (2008). Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *18*, 104–108.

Kim, S., Ravichandran, Y., Dominic, K., Bahadar, S. & Young, T. K. (2008). Prospective of the Cosmeceuticals Derived from Marine Organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.*, *13*, 511-523.

López, A., Rico, M., Rivero, A., Tangil, M. S. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, *125*, 1104–1109.

Makridis, P., Costa, R. A., & Dinis, M.T. (2006). Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima* and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture*, *255*, 76–81.

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International*, *34*, 103-109.

Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibanez. E. (2009) Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agric. Food Chem*, *57*, 7159–7170.

Prabhakar, K. R., Veerapur, V. P., Bansal, P., Parihar, V. K., Kandadi, M. R., Kumar, P. B., Priyadarsini, K. I., & Unnikrishnan, M.K. (2007). Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract. *Chemico-Biological Interactions*, *165*, 22-32.

Soler-Rivas, C. J., Espin, C., & Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, *11*, 1-9.

Vijayavel, K., Anbuselvam, C. & Balasubramanian, M. P. (2007). Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular Cell Biochemistry*, 303, 39–44.

Wang, B.-G., Zhang, W.-W., Duan, X.-J., Li, X.-M. (2009). In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry*, 113, 1101–1105

Wang, H.-M., Pan, J.-L., Chen, C.-Y., Chiu, C.-C., Yang, M.-H., Chang, H.-W., Chang, J.-S (2010). Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry*, 45, 1865–1872.

Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

4.3 Artigo (a ser submetido): Alcoholism: Clinical and Experimental Research

Effect of functional alcoholic beverage with microalgae *Chlorella vulgaris* on the cortical spreading depression propagation in young-adult rat treated chronically.

Danielli M.M. Dantas^a, Suzan D. Santos^a, Thiago B. Cahú^a, Ricardo Abadie-Guedes^b,
Nathalia A. Roberto^a, Werlayne Mendes^a, Rubem C. A. Guedes^b, Ranilson S. Bezerra^{a*}

^aDepartment of Biochemistry, Laboratory of Enzymology (LABENZ), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP 50.670-420, Recife-PE, Brazil.

^bDepartment of Nutrition, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP 50.670-420, Recife-PE, Brazil.

*Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratory of Enzymology – LABENZ

Department of Biochemistry, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP 50.670-420 Recife, PE, Brazil

Tel: +55.81.2126.8540

Fax: +55.81.2126.8576

E-mail address: ransoube@uol.com.br

Abstract

Recent advances on microalgae biotechnology show that these organisms possess many bioactive compounds such as antioxidants. *Chlorella vulgaris*, a green microalgae, aiming study its capacity in producing interesting biomolecules e.g oil for biofuel production and antioxidants, which can play protective role against oxidants in many human tissues. In this study we analyzed the effect of a *C. vulgaris* hydroalcoholic extract (a functional alcoholic beverage) on brain by a cortical spreading depression (CSD) model in rats, which has been demonstrated previously that is affected by the presence of antioxidants. The *C. vulgaris* hydroalcoholic extract showed percentage of inhibition of 77,2 % on DPPH scavenging radical assay. This functional alcoholic beverage at concentration of 12,5mg microalgae per mL significantly inhibited the CSD velocity in brain (2,89 mm.min⁻¹), when compared with cachaça treated and even below control (distilled water), 3,68 mm.min⁻¹ and 3,25 mm.min⁻¹ respectively. Animals treated with microalgae extract gained less weight than alcohol and water groups. These data suggests that this functional alcoholic beverage play a physiologic role particularly on brain as a protective for effects of ethanol. More studies are being carried out to evaluate the mechanisms of *C. vulgaris* biomolecules physiologically in animal models.

Key words: Antioxidant; *Chlorella*; Brain protective; *Cachaça*; Cortical spreading depression

1.Introduction

The consumption of alcohol is well known by its effects on the brain and not only is related to many chronic diseases, but represents the third most common causes for incapacity and lower life expectancy in Brazil (WHO, 2009). Excessive alcohol consumption is associated to an increased risk of dementia [6], presumed to be due to the neurotoxic effect of alcohol [7,8]. Conversely, the regular consumption of alcohol in moderate amounts has been recognized as a protective factor for atherosclerosis and its clinical sequelae: ischemic stroke, coronary heart disease and peripheral vascular disease (Deng et al., 2006) Light to moderate alcohol consumption has been associated in several studies with decreased risk of both coronary heart disease and stroke (Zuccalà et al., 2001). Moderate consumption means a daily intake of one drink for women and two drinks for men. A drink was defined as one 5-ounce glass of wine, one 12- ounce can of beer, or 1.5 ounces of 80-proof distilled beverage, each of which contains about 14 g of alcohol.

Diets rich in fruits, vegetables and beverages are, along with natural extracts, an important source of polyphenols. Interestingly, epidemiological studies pointed to the possible capacity of moderate consumption of red wine.(Bastianeto and Quirion, 2002). The concept of functional foods and beverages has recently gained most attention for its protective effects against oxidants and toxic compounds consumed particularly in alcoholic drinks. The studies investigating the beneficial health effects of beverages rich in polyphenols on brain function are limited. Phytochemicals are also found in beverages such as wine and tea. People who are moderate wine drinkers (three to four glasses a day) have a significantly lower incidence of dementia compared to nondrinkers (Zuccalà et al., 2001, Letenneur, 2007, Orgogozo et al., 1997). The possible mechanisms for these protective effects include antioxidant and antiinflammatory properties as well as elevation of plasma apolipoprotein E levels (Orgogozo et al., 1997). Therefore, moderate wine drinking is seen as a possible

preventive measure against senile dementia, even though a direct demonstration of the protective effects of wine or a delineation of its mechanisms has not been shown (Letenneur, 2007).

Although polyphenols are present in virtually all plant antioxidant and antibacterial activities foods, their levels vary enormously among diets depending on the type and quantity of plant foods in the diet. For example, some plant foods and beverages that are particularly rich in polyphenols are red wine, apple and orange juices, and legumes.(Kris-Etherton et al., 2002) Although biological actions of phenolic compounds have been commonly related to its free radical scavenging activity (Goya, Mateos, & Bravo, 2007).

Plaza et al (2012) suggest ethanol as the most appropriate solvent to extract compounds with biological activities from *Chlorella vulgaris* (contains a large spectra of chemical compounds and increased yield), but the antioxidant activity of the water extract obtained was, by far, higher than ethanol, acetone and hexane extracts from *C. Vulgaris*. *Chlorella*, a green single-celled microalgae that contains the highest concentrations of chlorophyll, and the nutrient profile is subject to much variation between habitats and harvest procedures which influences the content of vitamins and antioxidants delivered in the final product (Field et al., 1998). Carotenoid contents (Violaxanthin, Neoxanthin, Lutein, β -Carotene, Chlorophyll-a and Chlorophyll-b) and vitamin E composition found in *C. vulgaris* are generally designated as primary carotenoids (Young, 1993).

The CSD phenomenon is an interesting electrophysiological model that is valuable for understanding the relationship between oxidative stress, nutrition, and neural development and function (Guedes, et al., 2012). Calling for a better understanding the action of compounds from microalgae alcoholic extract and their application to human health, particularly on the nervous system, we investigated its effects on changes on the cortical

spreading depression (CSD) propagation in the cerebral cortex of young-adult rat treated chronically.

2. Material and methods

2.1. Microalgae production

The green microalgae *Chlorella vulgaris* used in this study was obtained from the Culture Centre of Algae of Rural Federal University of Pernambuco, Brazil. The microalgae inoculum were cultivated in semicontinuous culture, indoors and outdoors. The indoor cultures of microalgae were grown with autoclaved freshwater and Provasoli medium in 2 L bottles bubbled with air, incubated in a temperature controlled room (24°C). The bottles were irradiated with daylight fluorescent tubes (light intensity, 4000Lux) for 72 hours. The outdoor cultivation was composed of 10, 100 and 500L fiberglass containers with freshwater and fertilizer NPK (20:10:20), constant aeration, and a natural photoperiod (12:12) under a light intensity of approximately 100.000 Lux. The separation of microalgae biomass was obtained by flocculation with NaOH (1M), dried, and sent to the Biotechnology Laboratory of the Federal University of Pernambuco for processing.

2.2. Preparation of the functional alcoholic beverage

Sample of dried microalgae biomass was dissolved in an Brazilian commercial (Pitu Ltda.) alcoholic beverage (40% ethanol) from sugar cane (cachaça), resulting in a hydroalcoholic microalgae extract in a final concentration of 12,5 mg/mL. The sample was extracted under 30 minutes of sonication (40 kHz) in an ultrasonic batch (model Ultra Cleaner 1400, Ultrasonic Unique, Brasil) followed by camera shake for 2 hours and centrifugation (2486xg, Herolab UniCen MR Centrifuge, Germany) for 10 minutes to obtain the supernatant liquid. Every three days was made a new microalgae hydroalcoholic extract. The extract was

maintained on the freezer and analyzed every day to evaluate the quality of the samples for antioxidant activity during the experiment.

2.3 Antioxidant activity

The antioxidant activity of the extracts from *C. vulgaris* was evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free-radical scavenging activity according to the method of Soler-Rivas, Espin and Wichers (2000) & Moure, Franco, Sineiro, Dominguez, Núñez and Lema (2001). The extracts were analyzed during the experiment to evaluate the DPPH percentage of inhibition and a possible change over days.

2.4 Experimental design

The animals (male Wistar rats) were handled in accordance with the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil (where the experiments had been conducted), which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, MD). They were reared in polypropylene cages (51 x 35.5 x 18.5 cm) in a room maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12 hour light/ 12 hour dark cycle (lights on at 7:00 AM).

A total of 27 rats divided in three groups (55-73 days of life) received during 18 days, per gavage (a method consisting of administering substances directly into the stomach through a cannula inserted in the mouth) doses of 4,5 mL / kg / d: microalgae (*C. vulgaris*) extract with cachaça (group 1); just cachaça (group 2) and finally only distilled water (group 3). All groups had free access to water and a commercial laboratory chow diet (containing 23 g protein per 100 g diet; Purina do Brazil Ltd, Paulínia, SP, Brazil).

2.5 Electrophysiological recordings

Immediately after gavage period, the CSD recording session was carried out, as previously described (Bezerra et al., 2005). Briefly, under anesthesia with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (Sigma; injected intraperitoneally), a tracheal cannula was inserted and 3 trephine holes were made on the right side of the skull, aligned along the anteroposterior direction and parallel to the midline.

One hole was positioned on the frontal bone (2 mm in diameter) and was used to apply the stimulus to elicit CSD. The other 2 holes were drilled on the parietal bone (3 to 4 mm in diameter) and were used to record the propagating CSD wave. The distance between the centers of contiguous holes was about 3 to 5 mm. Rectal temperature was continuously monitored and maintained at $37 \pm 1^\circ \text{C}$ by means of a heating blanket. At 20-minute intervals, CSD was elicited by application, for 1 minute, of a cotton ball (1 to 2 mm in diameter) soaked with 2% KCl solution (approximately 270 mM) placed on the frontal cortical surface through the hole drilled on that region. On the 2 parietal holes, both the slow DC-potential change and the reduction in the spontaneous cortical electrical activity accompanying CSD were continuously recorded for 4 hours using a pair of Ag–AgCl agar-Ringer electrodes (1 in each hole), as previously described (Abadie-Guedes et al., 2008). A common reference electrode, of the same type, was placed on the nasal bones. The DC-potential changes were recorded by connecting the electrodes to GRASS DC-amplifiers (Astro-Med Industrial Park, West Warwick, RI), and the ECoG was recorded with AC-amplification (band pass filters set at 1 to 35 Hz range). Both DC-recording and ECoG were performed in a model 7-D GRASS chart recorder (Astro-Med Industrial Park). In some experiments, DC-recording was also computer-digitalized and recorded. The CSD velocity of propagation was calculated from the time required for a CSD wave to cover the distance between the 2 cortical electrodes. In the measurement of CSD velocities, the initial point of each DC negative rising phase was used. A repeated measure analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc (Tukey– Kramer)

test was used to compare body weights and CSD propagation rates between groups. Differences between groups were accepted as significant when $p \leq 0.05$. All values are presented as means \pm standard deviations.

2.6 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error (SE). Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance followed by Tukey comparisons test. Differences were considered significant at P values < 0.05 .

3. Results and discussion

The present study tested antioxidant activity (*in vitro*) and the cortical spreading depression (CSD) model in rat brains treated with “cachaça” (a Brazilian alcoholic beverage), microalgae extract (cachaça with *Chlorella vulgaris* biomass) and control (water). Data is presented as DPPH percentage of inhibition and reduction of CSD velocity.

All animals survived and were in good health throughout the experiment. There were no significant differences in body weight between the rats from microalgae extract and cachaça treatments, but both were significantly different of control treatment (table1).

Table 1. Spreading depression-velocity and weight, Weight gain and Weight gain.day⁻¹ in young adult rats (79-88 days of life) treated per gavage with microalgae extract, cachaça and water

Treatment	Vel. (mm.min ⁻¹)	Weight (g)	Weight gain (g)	Weight gain.day ⁻¹ (g)	Age (days)
Microalgae extract	2.89 ^c \pm 0.07	292.2 ^a \pm 9.66	32.63 ^b \pm 9.84	1.81 ^b \pm 0.55	79
Cachaça	3.68 ^a \pm 0.04	297.8 ^a \pm 5.29	46.5 ^{ab} \pm 14.02	2.58 ^{ab} \pm 0.78	79
Control (water)	3.25 ^b \pm 0.02	361.8 ^b \pm 5.34	62.15 ^a \pm 18.74	3.41 ^a \pm 1.03	88

Each value is presented as mean \pm SD. Means within each column with different letters (a–c) differ significantly ($p < 0.05$).

The rats treated with microalgae extract had a lower weight gain (32,63g) and Weight gain.day⁻¹ (1,81g) than cachaça and control treatments. Nuño et al. (2013) observed similar results evaluating the effect of the microalgae *Isocrhysis galbana* and *Nannochloropsis*

oculata in diabetic rats. Both healthy and diabetic, had a lower ($p < 0.05$) final weight than the control group (no microalgae). The authors suggest that consumption of the microalga *I. galbana* could be beneficial in the diabetes mellitus rat model, it promoted body weight loss in healthy animals and helped to maintain weight in diabetic animals while lowering glucose and cholesterol values and raising lactic acid bacteria counts.

In previous studies we observed the presence of bioactive compounds (phenols, flavonoids and tannins) in *C. vulgaris* extract. Furthermore, the extracts with solvents ethanol and water showed DPPH percentage of inhibition of 37.2 % and 68.5 %, respectively, higher than the standard used Gallic acid (28.7 %), showing that they are potential inhibitors of cellular oxidation by free radicals (unpublished data). The *C. vulgaris* extract (cachaça with microalgae) and cachaça (40% ethanol + 60% water) showed percentage of inhibition of 77,2% and 36,7%, respectively. The value to DPPH percentage of inhibition of the extracts prepared not changed during the experiment, showing that the extract was preserved without change during the period gavage. The minor carotenoids neoxanthin, violaxanthin, α -carotene and β -carotene have functional properties, for example, β -carotene may play important roles in preventing degenerative diseases due to its associated antioxidant activity. (Plaza et al., 2012)

Abadie- Guedes et al., 2008 have demonstrated that the antioxidant molecules known exert an antagonistic action against the effect of chronic EtOH on CSD in rats. The authors found that astaxanthin (molecule antioxidant) dose alone was able to counteract EtOH action on CSD, suggested that such effect is related to the antioxidant activities this molecule and its brain protective effect. CSD is a wave of neuronal and glial depolarization, slowly propagating in the cortex (3–5 mm/min), and followed by a long-lasting suppression of neuronal activity and excitability, also described by Bogdanov et al., (2013)

We observed the reduction of cortical spreading depression velocity in young adult rats (79-88 days of life) treated per gavage with microalgae extract followed by the control treatment (water). The cortical spreading depression-velocity in young adult rats were significantly different in all treatments. The electrophysiological recordings (electrocorticogram and slow cortical depression-potential changes) during CSD are documented in Figure 1

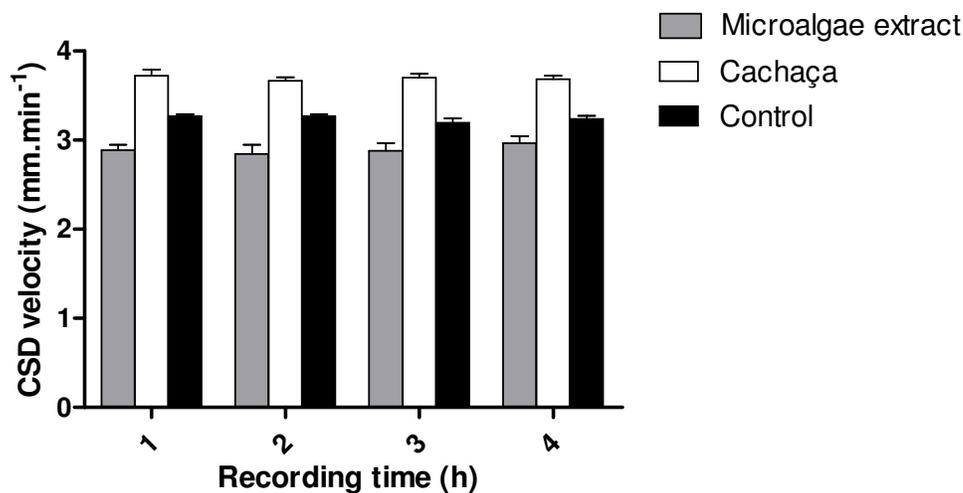


Figure 1: Electrophysiological recordings during CSD Effect of the treatments (water, cachaça and functional alcoholic beverage) on CSD propagation velocities in young adult rats. Treatments were administered daily per gavage during 18 days. One hour after the last gavage, a 4-hour-CSD recording session was initiated. Data are expressed as mean \pm standard deviation.

In the last two decades, a considerable scientific effort has been produced to clarify whether antioxidant supplementation can help in preventing of various neurological dysfunctions. The implication is that understanding the specific molecular effects of ROS on brain functioning is of great importance in determining the role of antioxidants on these diseases and may certainly help in shedding light on the epidemiological findings, which sometimes point to opposite neuropsychological effects of antioxidants (Guedes et al., 2012).

Migraine is a neurological disorder, characterized by recurrent attacks of severe headache, nausea, photo- and/or phonophobia. In 20% of subjects the migraine headache is preceded by a transient neurological disturbance known as the aura. Cortical spreading depression (CSD) has been suggested to be a trigger for aura, and, possibly, headache. CSD is a wave of neuronal and glial depolarization, slowly propagating in the cortex (3–5 mm/min), and followed by a long-lasting suppression of neuronal activity and excitability. In a previous study we noted that chronic administration of anti-migraine drugs differentially influenced susceptibility to KCl-induced CSD in rats (Bogdanov et al, 2010). As part of this study we assessed anxiety-like behavior in the open field test (OFT) in order to search for a possible relationship between level of anxiety and CSD frequency and to verify if previously observed migraine prophylaxis drug effects on CSD susceptibility were accompanied by a change in anxiety levels.(Bogdanov et al., 2013).

The data obtained showed that the rats treated with microalgae extract demonstrating a decrease CSD propagation velocity. This result can be associated with the protective action from *Chlorella* antioxidants compounds. Reactive oxygen species can be formed in ethanol metabolism and the presence of antioxidants may help in protecting tissues from the deleterious effects of ethanol. Carotenoids and chlorophylls, particularly lutein, chlorophylls a and b, and pheophytin a, were the most abundant antioxidants in the *Chlorella vulgaris* extracts. These four compounds contributed to almost 50% of the total antioxidant potential in most extracts, their isomers and derivatives comprising the rest. This result indicates that hydrophilic compounds, lutein, chlorophylls a and b, and pheophytin a were major contributors to the antioxidant capacity in *Chlorella*. (Cha et al., 2010). The opposite results were observed in this work in the rats that received *cachaça* caused less resistance to CDS, presented an increase in CSD propagation velocity. Abadie-Guedes et al. (2008) also found a facilitation of CSD propagation after treating rats with EtOH for 18 days. Experimental

increasing or decreasing the brain ability to counteract CSD may help in understanding the phenomenon and the diseases related to it (Abadie-Guedes et al., 2008).

Nevertheless, the regular consumption of alcohol in moderate amounts has been recognised as a protective factor for atherosclerosis and its clinical sequelae: ischemic stroke, coronary heart disease and peripheral vascular disease (Deng et al. 2006) This authors found that light-to-moderate drinking was associated with a significantly lower risk of dementia compared with non-drinking. Excessive drinking was related to a higher risk of dementia. Light-to-moderate intake of beer was associated with a significantly higher risk of dementia than non-drinking of beer. For wine, a significantly lower risk of dementia existed for light-to-moderate drinking. According Ellias et al (1999) adult drinkers aged 55–88 years who consume moderately (two to eight drinks per day) alcoholic beverages (in particular wine) performed better in various cognitive tests compared to abstainers.

According Zuccalà et al (2001) studies on the potential benefits of alcohol use should not be banned from current research. In fact, the results of this study, together with those focusing on the favorable cardiovascular effects of alcohol consumption, indicate that moderate drinking might confer health benefits that should not be disregarded, from both the patients and societal perspectives. The data obtained for these authors indicate that moderate alcohol consumption (i.e., 40 g daily for women and 80 g for men) is associated with reduced probability of cognitive impairment as compared with abstaining, after adjusting for potential confounders. Conversely, higher amounts of alcohol intake are associated with an increased probability of cognitive dysfunction.

Among dietary factors, alcohol consumption was found to be associated with a lower risk for dementia in some studies. Light to moderate wine drinkers may prove to be moderate with regard to other risk factors of dementia, and alcohol intake would only be an indicator of such behavior. Until such factors have been identified, we must be careful in how we interpret

results relating to alcohol consumption. People should not be encouraged to drink more in the belief that this will protect them against dementia. (Letenneur, 2007).

With respect to the brain it is suggested that, although the studies are few and more work needs to be done, the polyphenols present in antioxidant-rich foods and beverages can reduce the deleterious effects of oxidative stress and inflammation in the central nervous system. These reduction may, in turn, contribute to forestalling or reversing the course of neuronal and behavioral aging. Furthermore, the present information suggests that factors involving mechanisms and bioavailability remain to be determined and, in addition, the polyphenol families involved in producing the positive effects in aging and behavior should be investigated further, with a view to increasing the protection in both neurodegenerative disease and aging (Shukitt-Hale et al., 2005).

Several research groups to investigate the neural protective effects of antioxidant molecules, mainly those from nutraceutical- and dietary sources, both in laboratory animals and in humans, using *in vivo* and *in vitro* models (Guedes et al., 2012). So, it is suggested that *Chlorella vulgaris* components extracted by “cachaça” can be used as a functional alcoholic beverage conferring protection against the deleterious effects of ethanol in brain, when moderately consumed.

Conclusions

The data presented in this study provide evidence of compounds with antioxidant activity for alcoholic beverage with *C. vulgaris*. This result was demonstrated by resistance to CDS in the cerebral cortex of young-adult rat showing a neuroprotective action of the functional beverage. This result suggesting that the action this functional alcoholic beverage, in this context, is greater than what might have been expected from its mere *cachaça* content. Certainly, the antioxidant compounds may play a role in preventing oxidative damage to the

brain by free radicals. However, there is a possibility of the presence of other unknown constituents in algae with protective effects that might enhance their antioxidant activity and others biological activities. People should not be encouraged to drink more in the belief that this will protect them against diseases that affect the nervous system.

Acknowledgments

The authors are deeply grateful to the Department of Antibiotics, Rural Federal University of Pernambuco for valuable assistance. This research was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Abadie-Guedes R., Santos S.D., Cahu T.B., Guedes R.C.A., Bezerra R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 32:1417– 1421, 2008

Abadie-Guedes R., Guedes R. C. A., Bezerra R. S. The Impairing Effect of Acute Ethanol on Spreading Depression is Antagonized by Astaxanthin in Rats of 2 Young-Adult Ages. *Alcoholism: clinical and experimental research*. Vol. 36, No. 9, 2012

Barbara Shukitt-Hale, Amanda Carey, and James A. Joseph. Phytochemicals in Foods and Beverages: Effects on the Central Nervous System. In: Harris R. Lieberman, Robin B. Kanarek, Chandan Prasad. *Nutritional Neuroscience Volume 3 de Nutrition, Brain and Behavior Series*. CRC Press 393-403, 2005

Bastianetto S., Quirion R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiology of Aging* 23 891–897, 2002

Bezerra R.S., Abadie-Guedes R., Melo F.R.M., Paiva A.M.A., Santos A.A., Guedes R.C.A. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects on cortical spreading depression. *Neurosci Lett* 391:51–55, 2005.

Bogdanov VB, Multon S, Chauvel V, Bogdanova OV, Prodanov D, Makarchuk MY, et al. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiology of Disease*;41:430–5, 2010.

Bogdanov V. B., Bogdanova O.V., Koulchitsky S. V., Chauvel V., Multon S., Makarchuk M.Y., Brennan K. C., Renshaw P. F., Schoenen J. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats. *Behavioural Brain Research*, 236, 90–93, 2013.

Cha K. H., Kang S. W., Kim C. Y., Um B. H., Na Y. R., PAN C.-H. Effect of Pressurized Liquids on Extraction of Antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem*, 58, 4756–4761, 2010.

Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P. Functional properties of carotenoids originating from algae. *J Sci Food Agric.*, 93, 5–11, 2013.

Elias P.K., Elias M.F., D'Agostino R.B., Silbershatz H., Wolf P.A. Alcohol consumption and cognitive performance in the Framingham Heart Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:580–1999.

Deng J., Zhou D. H.D., Li J., Wang Y. J., Gao C., Chen M. 2-year follow-up study of alcohol consumption and risk of dementia. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 108 378–383. 2006

Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237–240. 1998

Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *European Journal of Nutrition*, 46(2), 70–78, 2007.

Guedes R. C. A., Abadie-Guedes R., Bezerra R. S. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. *Nutritional Neuroscience* , 15, 3, 111-119, 2012

Letenneur L. Moderate alcohol consumption and risk of developing dementia in the elderly: The contribution of prospective studies Author manuscript, published in "Annals of Epidemiology 2007;17(5 Suppl):S43-5" INSERM U593; Universite Victor Segalen; Bordeaux, France DOI : 10.1016/j.annepidem. 2007

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International*, 34, 103-109.

Nuño K., Villarruel-López A., Puebla-Pérez A.M., Romero-Velarde E., Puebla-Mora A.G., Ascencio F. Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, Vol 5, Iss. 1, Pages 106–115, 2013.

Plaza M., Santoyo S., Jaime L., Avalo B., Cifuentes A., Reglero G., Reina G. G.-B., Señoráns F. J., Ibáñez E. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Science and Technology* 46, 245-253, 2012.

Soler-Rivas, C. J., Espin, C., & Wichers, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11, 1-9, 2000

Vijayavel, K., Anbuselvam, C., Balasubramanian, M.P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol. Cell. Biochem.* 303, 39–44, 2007.

Zuccalà G., Onder G., Pedone C., Cesari M., Landi F., Bernabei R., Cocchi A. Dose-Related Impact of Alcohol Consumption on Cognitive Function in Advanced Age: Results of a Multicenter Survey. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 25, 12, 2001

4.4 Depósito de Patente

Bebida alcoólica funcional de microalga: Processo de cultivo e produção.

Nº do Processo depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI): BR 10 2012 032930 1

RELATÓRIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO

BEBIDA ALCOÓLICA FUNCIONAL DE MICROALGA: PROCESSO DE CULTIVO E PRODUÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção envolve processos de cultivo e obtenção de biomassa seca de microalgas (*Chlorophyceae*), bem como, produção de bebida alcoólica funcional de microalga.

RESUMO

A presente invenção refere-se a um processo de produção de microalgas (*Chlorophyceae*), somado a obtenção de um produto alcoólico bioativo a partir de microalgas, com aplicação na indústria de bebidas. Mais particularmente, a presente invenção compreende: um processo de cultivo de duas etapas com propriedades físico-químicas (primeira fase) e condições estruturais controlados para reduzir o período de cultivo da fase de sistema fechado para o aberto com um aumento do rendimento final e, um processo para produção de uma bebida alcoólica funcional a base de microalgas. Esse processo não apenas maximiza em um curto período a produtividade do cultivo por meio de duas etapas, mas também permite obter de forma econômico e simples uma biomassa de microalga seca. Além de envolver um processo para produção de uma bebida alcoólica funcional a partir de uma microalga *Chlorophyceae* utilizando cachaça - uma bebida popular brasileira feita a partir de cana de açúcar fermentada.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

Microalgas são os membros mais simples e primitivos na evolução do reino vegetal. Estes organismos realizam fotossíntese como as plantas terrestres, e na sua maioria apresentam-se como pequenas células de cerca de 3-20 μm (IBAÑEZ et al., 2012, RAZIF HARUN et al., 2010). Estas algas são onipresentes na natureza, podendo ser encontradas em zonas aquáticas variando entre fontes termais a geleiras glaciais, assim como distribuídas nos corpos de água continentais e oceânicos como fitobentos e fitoplânctons (IBAÑEZ et al., 2012).

Um número crescente de estudos têm sido conduzidos para explorar as técnicas, procedimentos e processos de produção de grandes quantidades de biomassa de microalgas, devido à sua alta taxa de crescimento e tolerância a diferentes condições ambientais (RAZIF HARUN et al., 2010, EUA B2 6524486, 2003). Existem duas técnicas que são mais utilizadas para o cultivo de microalgas: uma composta por sistema aberta em tanques e outra de sistema fechado com a utilização de fotobiorreatores (RAZIF HARUN et al., 2010). Muitos fotobiorreatores têm sido desenvolvidos para a produção de biomassa de microalgas, devido à eficiência de produção apesar de não apresentar baixo custo quando desenvolvido para produção em larga escala. Sistemas abertos, como tanques, raceway e sistemas de superfícies de canais inclinados, são comumente usados para produção em larga escala (HSIEH C. & WU, W, 2009).

Mais de 100 mil espécies de microalgas são conhecidos e a descoberta de novos usos para estas é componente importante no desenvolvimento das indústrias de bases biotecnológicas. As microalgas são eficazes: no controle biológico de pragas agrícolas, como condicionadores de solo e biofertilizantes na agricultura; como produtores de oxigênio; como removedores de nitrogênio, fósforo e substâncias tóxicas no tratamento de esgoto; na biodegradação de plantas e; na produção de biocompostos e biodiesel (B2 EUA 6.524.486, 2003). A venda de microalga (*Chlorella*) utilizado na alimentação humana, alimentação animal e como aditivo alimentar ultrapassou 38 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos América (EUA). Enquanto o mercado anual estimado para o ácido docosahexaenóico, um suplemento nutricional utilizado pela aquicultura produzido por microalgas (*Cryptocodinium* ou *Schizochytrium*) foi de cerca de U\$ 10 bilhões (SPOLAORE et al., 2006).

Nos últimos anos as microalgas têm recebido atenção crescente devido aos seus componentes fitometabólicos com estruturas químicas e diferentes atividades biológicas (SKULBERG, 2004). O uso de microalgas, como fonte de alimento para saúde, alimento funcional e para produção de biomoléculas, tais como vitaminas, carotenoides, fitocianina e ácidos graxos poliinsaturados, tem efeitos positivos sobre a saúde humana e animal, devido às atividades antioxidantes elevadas de algumas destas substâncias (PULZ & GROSS, 2004, MANIVANNAN, 2012). Estudos sobre os compostos bioativos de microalgas (MARINHO-SORIANO et al, 2011) têm demonstrado efeito antitumoral, propriedades quimiopreventivas (WANG, 2010), atividade anti-inflamatória (GUZMÁN, Gato & CALEJJA, 2001), atividade antioxidante (VIJAYAVEL, et al, 2007), e atividade antimicrobiana (MAKIRIDIS, et al 2006).

O uso de alimentos para reduzir o risco de doenças tem sido um tema constante em reuniões nas áreas de alimentação e nutrição, aumentando a demanda por informações sobre alimentos funcionais e nutracêuticos. Neste sentido, esta temática tem despertando como consequência uma atenção específica para os componentes essenciais e não essenciais bioativos de alimentos, conhecidos por modificar uma série de processos celulares associados com a prevenção de doenças, incluindo o metabolismo carcinogênico, equilíbrio humoral, sinalização celular, controle do ciclo celular, apoptose e angiogênese (TRUJILLO et al, 2006).

As bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, licor) apresentam algum valor alimentar, mesmo que apenas em termos de calorias. A Food and Drug Administration (FDA) define alimentos como "... artigos usados para comida e bebida, ou componentes de tais artigos (substância) que proporcione sabor, aroma, ou valor nutritivo". Porém, os alimentos têm outras funções do que nutrição, sabor e aroma (BRANNO, 2008) e hoje em dia, os consumidores começaram a olhar para além dos benefícios nutricionais básicas dos alimentos, estando cada vez mais interessados em compostos contidos que possam prevenir e gerar benefícios à saúde. Portanto, existe por parte da população uma ampla demanda por alimentos funcionais e produtos naturais para prevenir o desenvolvimento de doenças e o envelhecimento precoce (AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA, 2012).

Bebidas fermentadas têm feito parte da dieta do homem, desde dez mil anos antes de Cristo. Existe relatos antigos de suas propriedades medicinais, bem como os seus efeitos viciantes e destrutivos (CLAUDIAN, 1970; FORBES, 1970; WILSON, 1973; VALLE, 1994). Como consequências ao longo da história surgiram debates fervorosos sobre prós e contras do álcool (BRANNO, 2008). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo moderado de vinho e bebidas alcoólicas estão estatisticamente associados na diminuição de doenças relacionados a eventos cardiovasculares, tais como insuficiência cardíaca (TRUJILLO et al, 2006).

As pessoas, na sua maioria, reconhece o lugar do álcool na sociedade como uma droga lícita associada ao lazer. Poucos associam seu uso como medicamento, porém o desenvolvimento de álcoois concentrados e de alta qualidade apresenta vantagens paralelas nos avanços de fármacos ao longo dos tempos (VALLE, 1994). O álcool é o segundo solvente depois da água de grande importância utilizado particularmente na extração de componentes ativos das partes inertes de drogas brutas. Permite concentrar os compostos medicinalmente ativos e faz com que a solução se torne de mais fácil administração e consumo, também melhorado a sua absorção. Os compostos que normalmente se dissolvem em álcool incluem alcalóides, glicosídeos, resinas e óleos voláteis. Combinada com água gera um solvente hidroalcoólico, que age como um conservante, impedindo hidrólise e fermentação que normalmente ocorreria quando é utilizado apenas água (LINDBERG & AMSTERDAM, 2008).

A cachaça é uma bebida alcoólica produzida principalmente no Brasil, onde, 1,5 bilhões de litros (390 milhões de galões) são consumidos anualmente, em comparação com 15 milhões de litros (4,0 milhões de galões) fora do país. Possui geralmente, graduação alcóolica entre 38% e 48% de álcool em volume. Quando caseiro pode ser tão forte quanto o destilador desejar. "A principal diferença entre cachaça e rum é que o rum geralmente é feito a partir de melaço, um subproduto das refinarias que ferve o caldo de cana para extrair o máximo de açúcar cristal possível, enquanto que a cachaça é feita a partir de caldo de cana fresco que é

fermentado e destilado. Como alguns rums também são feitos por este processo, a cachaça é também conhecida como rum brasileiro (WIKIPEDIA, 2012).

A correlação conhecida entre dieta e saúde demonstra as grandes possibilidades de alimentos e / ou bebidas para manter ou até melhorar a nossa saúde. Este fato tem provocado um grande interesse para a busca de novos produtos que podem contribuir para melhoria da saúde e bem-estar. Estes tipos de alimentos e / ou bebidas, capazes de promover a saúde tem sido genericamente definidos como alimento funcional.

Uma das formas mais frequentemente utilizadas pelos fabricantes de alimentos para a produção de novos alimentos funcionais é a adição de um ou mais compostos bioativos de interesse em um alimento tradicional. Os compostos bioativos adicionados são geralmente referidos como ingredientes funcionais e são responsáveis pelas funções bioativas que o novo produto possa apresentar. Usando essa estratégia, vários alimentos funcionais já foram desenvolvidos e comercializados. Por exemplo, os produtos que possuem atividade anti-hipertensiva, efeito hipo-colesterolêmico, propriedades antioxidantes, efeitos probióticos ou prebióticos, efeitos reguladores sobre o apetite, entre outros, estão disponíveis no mercado (Ibanez, et al, 2012).

Existem patentes nacionais e internacionais relacionadas com processos e produtos a partir de microalgas como, processos de produção com o objetivo de obter biomassa, formas de conservação, produção de extratos, os produtos alimentares (US2010/0297325, 2010), farmacêuticos (US0028376, 2010), os biocombustíveis, entre outros.(PI0701072-9; PI0801270-9; PI0804611-5, WO 2008/000431, PI0703245-5, EUA 2005/0214897, EUA 2010/7785823, EP 1 138 757 e EUA 7.306.669). No entanto, não está contemplado nas patentes, métodos de processo de cultivo, secagem e produção de uma bebida alcoólica funcional a partir de microalga Chlorophyceae usando cachaça.

APRESENTAÇÃO DOS PROBLEMAS EXISTENTES

O desenho e operação dos sistemas de produção de biomassa de microalgas têm sido amplamente discutidos em vários países., As microalgas podem ser cultivadas em tanques de cultivo abertos que necessita de áreas de terra relativamente grandes para obter luz solar suficiente para realização da fotossíntese pelas microalgas. Atualmente a utilização de fotobioreatores e sistema de cultivo contínuo vem sendo desenvolvidos, mas geralmente só apresentam-se viáveis para a produção de quantidades relativamente pequenas de microalgas (US006673592, 2006).

Há vários fatores que influenciam o crescimento de algas: fatores abióticos, como luz (qualidade e quantidade), temperatura, concentração de nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidade, produtos químicos tóxicos, fatores bióticos como patógenos (bactérias, fungos, vírus) e concorrência por outras algas. Entre estes fatores o fornecimento de energia para obtenção de luz artificial nos sistemas de cultivo é um dos mais caros. Desta forma, produção de microalga em laboratório utilizando apenas luz artificial é menos viável, devido alto custo de energia. Muitos sistemas diferentes de cultura foram desenvolvidos ao longo dos anos tentando atender a esses requisitos, no entanto, torna-se difícil para cultivos em larga escala. Um dos pré-requisitos importantes para o cultivo de algas comercialmente é a necessidade de

sistemas de grande escala economicamente viáveis. Alguns sistemas de culturas, como sistemas de fotobioreatores fechados, apresentam custos substancialmente mais elevados do que outros sistemas de cultura.

Uma vez coletada no sistema de cultivo, as células de microalgas contêm de 85% a 95% de água. O elevado teor de água é devido à umidade interna das células que torna difícil a sua remoção por meios mecânicos. Como resultado, a secagem da microalga de acordo com técnicas convencionais necessita de uma quantidade intensiva energia tornando o processo dispendioso, e responsável por até 30% dos custos de produção (US005276977). Além disso, muitos componentes de microalgas como clorofila, carotenoides e enzimas são rapidamente oxidados se exposta ao oxigênio e luz durante longos períodos de secagem.

Obtenção de pigmentos naturais com efeito antioxidante geralmente envolve técnicas complexas e de elevado custo, e o uso de alguns solventes são recomendados pela FDA (EUA) para alimentos, fármacos, cosméticos, apenas em baixas concentrações. Além disso, em muitos casos, tais pigmentos formam complexos com outras substâncias, presentes intracelularmente, o que torna o processo de extração laborioso e reflete no custo do produto final.

Existe um déficit de inovação na produção de bebidas alcoólicas utilizando-se compostos bioativos para a elaboração de bebidas alcoólicas funcionais. Neste sentido observa-se na indústria alcoólica a ausência de produtos alcoólicos diferenciais.

APRESENTAÇÃO DA SOLUÇÃO EM LINHAS GERAIS

A presente invenção vem solucionar alguns problemas mencionados, quando propõe não só um processo de cultivo, que diminui seu tempo reduzindo as etapas de cultivo, mas também, uma técnica de secagem de biomassa e obtenção de uma bebida alcoólica funcional de microalgas. Além disso, todas as etapas envolvidas na produção, secagem e obtenção da bebida é caracterizada pela simplicidade e baixo custo.

A técnica, objeto do presente pedido de patente, utiliza tanques transparente, permitindo uma melhor iluminação do sistema de cultivo, particularmente em regiões que possuem grande incidência de luz natural durante todo ano. Estes fatores permitem alta produtividade tal como redução nos custos de produção. Várias formas para realização do sistema de cultivo de microalga combinam vantagens normalmente associado a sistemas de cultivo fechados como alta produtividade por volume com vantagens normalmente associado a sistemas abertos, tais como, baixo custo operacional e de construção.

Outra vantagem da técnica ora exposta é que a biomassa celular pode ser separada, seca e mecanicamente rompida para extração dos componentes intracelulares por meio de simples técnicas de processo, o que Torna o processo conseqüentemente menos custoso.

O solvente utilizado na presente invenção tem 40% de etanol em água, os quais são aceitos pela FDA (EUA) para uso alimentar. Sobretudo, a extração dos compostos bioativos da microalga com cachaça permiti a obtenção de uma apreciável bebida alcoólica funcional inovadora.

A presente invenção também irá adicionar valor ao processo de cultivo de microalgas da classe Chlorophyceae, devido ao uso do resíduo obtido após o processo de extração.

Portanto, este co-produto pode ser aproveitado para a indústria biotecnologia de nutracêuticos, alimentos e farmacêutica por possuir ainda compostos bioativos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Sistemas e métodos para aumentar a e reduzir os custos da produção de biomassa de microalgas em um sistema de cultivo vêm sendo discutidos. Neste sentido, o objetivo do presente invento foi desenvolver um método de cultivo de curto período desenvolvido em duas fases, utilizando um sistema estrutural visando elevada produtividade e redução do custo da produção.

A primeira fase do processo de cultivo da presente invenção proporciona condições ambientais e estruturais controladas maximizando o crescimento e qualidade celular. Esta primeira fase é caracterizada pelo crescimento celular contínuo e divisão celular máxima em recipientes de vidro esterilizados. Esta fase inclui o controle e manipulação dos parâmetros físico-químicos potencializando a velocidade de crescimento no cultivo.

A segunda etapa permite o cultivo em tanques fechados produzidos de material transparente e resistente à deterioração. Nesta etapa a estrutura utilizada na presente invenção permite o aproveitamento de luz natural possibilitando uma maior viabilidade econômica do sistema. Esta segunda fase é ainda caracterizada por características que permitem aumentar a velocidade de crescimento e assim maximizar o crescimento celular das microalgas condicionadas nos tanques. Um aspecto é que a homogeneização das células algais é proporcionada por um sistema de aeração originado de ar natural que é dissipado a através de pequenas perfurações que permitem a homogeneização de forma proporcional a toda a área do tanque. Este sistema também minimiza o estresse algal provocado muitas vezes por sistemas de aeração contínua e evita propagação de organismos contaminantes no cultivo. Ainda outro aspecto é que esta estrutura possui mesmo diâmetro do fundo circular do tanque onde é posicionado, permitindo que o fluxo do ar seja uniformemente direcionado. Além disso, nesta segunda etapa, foi encontrada uma um período de cultivo aproximadamente de 4 a 6 dias.

A presente invenção compreende um processo econômico e simples de secagem de biomassa de microalgas. Um aspecto da invenção é que este presente processo proporciona um método para separar a biomassa úmida do tanque de cultivo a partir do meio de cultivo (separação sólido-líquido). Dois ou mais métodos podem ser combinados nesta etapa de separação da biomassa úmida. Outro aspecto é que um flocculante é usado para obter a biomassa. Ainda outro aspecto, após a flocculação e conseguinte decantação das microalgas, uma bomba de sucção é mergulhado no interior do tanque para eliminar o meio aquoso. Desta forma, a biomassa úmida é recolhida e transferida para recipientes protegidos da incidência direta da luz e com circulação de ar para obter biomassa seca. Por conseguinte, este processo de secagem é um processo econômico e eficiente.

Outro aspecto da presente invenção inclui a produção de uma bebida alcoólica funcional de microalgas Chlorophyceae utilizando a cachaça - uma bebida popular brasileira feita a partir de cana fermentado. Ainda outro aspecto da presente invenção é que a metodologia utilizada proporciona extração e separação de compostos bioativos da partir das

microalgas. O método compreende a mistura da biomassa seca com um solvente alcoólico (cachaça) e a ruptura das células por atrito mecânico; misturando a cachaça por um tempo e temperatura determinado, que após ser centrifugada, é obtido na fase sobrenadante um extrato alcoólico contendo compostos bioativos.

Outro aspecto ainda é que nesta última etapa descrita, a fase precipitada do processo de extração, a biomassa residual do processo, é ainda um produto que poderá ser usado na indústria biotecnológica, de alimentos, nutracêutica e farmacêutica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Esta descrição detalhada da invenção é dividida em três partes. A Parte I descreve métodos do cultivo das microalgas (descrito em primeira e segunda etapa). A Parte II, em duas sub-partes, descreve métodos para a coleta de biomassa de microalgas, assim como a metodologia para a secagem desta biomassa. Parte III descreve a metodologia para a criação da bebida funcional da presente invenção e os métodos utilizados para combinar a biomassa seca das microalgas e o todo o processo para obtenção da bebida. Biomassa de microalgas, biomassa de algas, e biomassa significa um material produzido pelo crescimento e ou propagação de células de microalgas. A biomassa pode conter células e ou incluir material intracelular, mas não está limitado a, compostos secretados por uma célula (EUA 2010/0297325).

Parte I - A presente invenção refere-se a um sistema de cultivo caracterizado por possuir custos de operação e construção relativamente baixo, composto por poucas etapas de produção e de elevada qualidade. Os aspectos da realização da metodologia são descritas em duas etapas a seguir em maior detalhe. A primeira etapa do método inclui o cultivo em ambiente controlado. Nesta etapa são utilizados apenas dois momentos de inoculação: em ambos as microalgas são anteriormente manipuladas com relação aos parâmetros de crescimento e inoculadas na fase exponencial a fim de maximizar a produtividade celular, assim como obter uma maior qualidade das culturas. As microalgas são condicionadas em recipientes de vidro de 30-80 mL no primeiro momento, e então transferidos para o segundo e último volume desta etapa; recipientes de vidro de 1-5L, estes acoplados a um sistema de aeração (ar filtrado). O meio utilizado para o crescimento algal é composto por água enriquecida com macro e micronutrientes seguindo a composição do Meio Provasoli (modificações no meio poderão ser realizadas de acordo com a composição química da água). Os recipientes de vidro assim como o meio de cultura são previamente esterilizados. As culturas são mantidas uma temperatura (entre 18 - 22°C) e pH (entre 6-9) controlados. As culturas são submetidas a uma iluminação através da lâmpadas tubulares fluorescentes (branca e fria) com intensidade luminosa entre 1000 - 8000 Lux com fotoperíodo integral. A duração desta primeira etapa é de aproximadamente 6 a 8 dias. As microalgas utilizadas na presente invenção incluem Chlorophyceae e / ou uma variedade de microalgas.

Após a primeira etapa do cultivo, as algas são transferidas para a segunda etapa, realizada em ambiente externo. Nesta segunda etapa o cultivo é realizado em dois modelos de tanques com volumes distintos, aeração contínua e os parâmetros físicos não são controlados, sendo utilizada a iluminação e fotoperíodo natural. Para desenvolver o crescimento das

microalgas, a água utilizada nos tanques é enriquecida, mas não limitada, a adição de: uréia, NaNO₃, EDTA, KOH, FeSO₄, MgSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, H₃BO₃, CuSO₄, MoO₃, MnCl₂, ZnSO₄. Um aspecto da presente invenção é que as duas estruturas dos tanques circulares fechados utilizados nesta etapa são produzidos com material transparente. Este fato, aliado ao sistema de aeração, permite a incidência da luz solar em todas as direções da estrutura do tanque permitindo o aproveitamento pelas microalgas durante o cultivo. Outro aspecto, é que a estrutura dos tanques possibilita mantê-los fechados, inibindo a contaminação da cultura por insectos, bem como outros contaminantes possíveis. O tanque de cultivo pode ter dimensões diferentes, dependendo da capacidade desejada para o sistema de cultivo de algas. Em algumas situações a profundidade do tanque de cultivo poderá ser maior que cerca de cinquenta centímetros. Em outras situações esta profundidade pode ser superior a cinquenta centímetros. Outro aspecto da presente invenção é a homogeneização das células algais durante esta segunda etapa de cultivo. A estrutura de aeração é inserida na parte inferior interna, possuindo o mesmo diâmetro do fundo dos tanques permitindo que o fluxo do ar seja uniformemente direcionado. Ainda outro aspecto é que esta estrutura possui pequenos orifícios que a liberação do ar no sentido inferior – superior, possibilitando uma homogeneização uniforme além de minimizam o impacto sobre as microalgas no sistema. Adicionalmente, o desenho dos tanques circular evita a formação de pontos mortos (região não alcançada pelo sistema de aeração) contribuindo para evitar a propagação de organismos contaminantes no cultivo. Além disso, nesta segunda etapa, foi encontrada uma taxa de produção de biomassa de 0.2 a 0.4 gramas por litro no tanque da fase final e em um período de cultivo aproximadamente de 4 a 6 dias.

Nesta etapa não apenas os tanques, mas toda a estrutura de aeração pode ser desmontada para desinfecção de forma simples e prática sempre que se julgar necessário.

Part II- Outro aspecto da presente invenção proporciona um método extremamente viável para a recuperação e obtenção de biomassa do meio de cultivo. As microalgas presentes no tanque de cultivo foram coletadas a partir de um processo inicial de separação das microalgas da solução da cultura (separação sólido-líquido). Dois ou mais métodos podem ser combinados nesta etapa. Nesta etapa a utilização de flocculantes para separar as células do meio líquido e obter a biomassa algal podem ser usados, incluindo o uso do reagente Hidróxido de Sódio. A utilização e concentração de flocculante depende dos parâmetros químicos do cultivo. Nesta etapa de flocculação foi possível retirar entre 85 - 98% de água da cultura, obtendo assim a biomassa úmida. A concentração das microalgas em volume mínimo de água possibilita reduzir a necessidade da centrifugação, normalmente aplicado para a separação da biomassa do meio de cultura no cultivo convencional. Outro aspecto nesta etapa é que após a decantação das células, provocada pela ação do flocculante, uma bomba de sucção é inserida na parte inferior do tanque a uma altura de aproximadamente 30 a 50 cm do fundo com o objetivo de eliminar a fase líquida sobrenadante obtida após o processo de flocculação descrito acima. A biomassa úmida é coletada através de uma válvula localizada na parte inferior do tanque de cultivo e transferida para recipientes plásticos com largura de aproximadamente 30x40cm e profundidade de 5 a 10 cm. Ainda outro aspecto é que estes recipientes são protegidos da incidência direta da luz e mantidos a uma temperatura de cerca de 22-30 ° C e circulação de ar para secagem da biomassa seca. Em algumas situações este processo de secagem pode levar um dia. Em algumas situações este processo de secagem pode levar dois dias. Em algumas formas de realização do processo de secagem pode levar dois dias. A metodologia

utilizada nesta etapa buscou obter uma metodologia eficiente e com custos reduzidos de separação e obtenção de biomassa seca.

Part III- Ainda outro aspecto da presente invenção contempla a extração de compostos bioativos das microalgas utilizadas obtidos através da utilização da cachaça. A invenção trata-se de uma bebida alcoólica apreciada, uma bebida funcional. As características da presente invenção é obtida por um método inovador para extrair as substâncias produzidas pelas microalgas utilizadas no processo citado nas etapas acima, utilizando uma bebida alcoólica tradicional brasileira.

Nesta etapa a cachaça foi inserida em recipiente contendo biomassa seca da microalga utilizando uma proporção de aproximadamente 1% do seu peso seco. Foi utilizado um processo de maceração mecânica com o objetivo de romper a parede das células algais. A utilização desta metodologia vem possibilitar a aplicação desta invenção na escala piloto e industrial. Neste aspecto a extração dos compostos intracelulares ocorre com a inserção gradativa de cachaça, iniciando a uma concentração média de 200% deste solvente no recipiente contendo a microalga. Ainda outro aspecto é que todo o processo é realizado protegido da incidência direta da luz. A extração dos compostos intracelulares da microalga inicia-se através do processo de ruptura celular com a utilização de um aparato de vidro com um pistão. Os movimentos e deslocamento repetitivo do pistão permitem a colisão sobre a superfície rígida do recipiente e das células algais. Neste processo ocorre a ruptura das células ou parte delas ocorrendo a liberação gradativa dos compostos bioativos de interesse. Após a fase de ruptura celular a extração dos compostos na solução (mistura cachaça e microalga) é realizada utilizando uma câmara agitadora por um período aproximado de 2 horas, seguido de centrifugação (4000 rpm) durante 10 minutos. O sobrenadante obtido é separado e condicionado em outro recipiente, sendo caracterizado como o produto final da presente invenção: uma bebida alcoólica funcional. Ainda outro aspecto é que a biomassa precipitada foi mantida refrigerada, podendo ser utilizado e aplicada nas indústrias de biotecnologia alimentícia, nutracêutica e farmacêutica. Resultados prévios obtidos demonstram atividade anti-oxidante para esta amostra. A qualidade do produto advinda pela atividade antioxidante do produto obtido pela presente patente podem ser atribuídas a componentes bioativos presentes na biomassa das microalgas utilizadas na presente invenção.

Neste sentido, a presente invenção estabelece um método de produção de uma bebida que compreende a combinação de biomassa de microalgas, sob a forma de pó ou flocos de células com um líquido comestível, obtendo assim uma bebida alcoólica nutricional.

Em alguns casos, a biomassa algal utilizada para fazer a composição alimentar deste processo citado acima compreende uma espécie ou uma mistura de pelo menos duas ou mais distintas microalgas. Em alguns casos, pelo menos, duas das espécies distintas de microalgas foram cultivadas separadamente. Outro aspecto ainda é que pelo menos, duas das espécies distintas de microalgas possuem diferentes perfis de compostos bioativos.

Outra consideração é que a utilização da microalga pode ser contribuir para reduzir o sabor forte da cachaça convencional. A presente invenção, opcionalmente, inclui ainda um sabor suave originado das microalgas. A invenção tem um sabor leve, não forte, suave, não áspera. O sabor suaviza o paladar na degustação. Outro aspecto é o cheiro leve, não possuindo um forte odor, geralmente observado em tradicionais bebidas etílicas. O odor é caracterizado como um odor característico de microalgas. Ervas diversas, plantas aromáticas ou extratos dos mesmos, podem também ser incluídos nas composições de produtos por várias razões diversas, tais como o sabor ou para os seus próprios benefícios potenciais para a saúde (No. Pub: 2010/0119667 A1 data Pub: May 13, 2010).

O presente invento demonstra um processo que resulta em um eficiente cultivo obtenção de biomassa e isolamento de um extracto alcoólico de microalgas usando um protocolo de um custo benefício eficiente. Outro aspecto, e de fundamental importância para esta invenção é a característica não tóxica do solvente utilizado, evitando a presença de resíduos tóxicos encontrados no processo final.

REIVINDICAÇÃO

1. Processos de cultivo e obtenção de biomassa seca de microalgas (*Chlorophyceae*), bem como, produção de bebida alcoólica funcional de microalga.
2. O processo da reivindicação 1, apresentam reivindicações caracterizado por:
 - 2.1. Um processo de cultura de duas etapas com condições físico-químicas controladas (primeira etapa do cultivo) e estruturais para reduzir o período de produção do sistema de cultivo;
 - 2.2. Um processo econômico e simples de separação e secagem de biomassa de microalgas e
 - 2.3. Um processo de produção de um produto alcoólico bioativo com propriedades funcionais a partir de microalgas *Chlorophyceae*.
3. O processo da reivindicação 1, em que envolva a produção de microalgas caracterizado também por *Chlorella sp.* e/ou *Scenedesmus sp.*
4. O processo da reivindicação 2,1, caracterizado por compreender ainda, em algumas formas de realização da profundidade do tanque de cultivo podendo ser maior que cinquenta centímetros, ou cerca de cinquenta centímetros.
5. O processo da reivindicação 4, além capacidade de volume da estruturaé caracterizado por uma estrutura de produção de microalgas com material transparentes.
6. O processo da reivindicação 5, também está caracterizado por aproveitamento da luz natural pelas microalgas durante o processo de cultivo.
7. O processo da reivindicação 2,2, mais o método caracterizado pela separação das células do meio de cultura.
8. O método da reivindicação 7, adicionado ao processo caracterizado por converter a biomassa úmida em seca.
9. O processo da reivindicação 2,3, em que a composição do produto está caracterizado por uma extração com cachaça.
10. O processo da reivindicação 9, também está caracterizado pelo baixo custo da ruptura das células de microalgas por abrasão mecânica das células.
11. O processo da reivindicação 9, somado a produção caracterizado por a obtenção de uma bebida alcoólica funcional de microalga diferente e apreciável.
12. O processo da reivindicação 9, acrescentado a um processo de aproveitamento caracterizado pela biomassa residual (coproduto) e seu aproveitamento pelas indústrias nutraceuticas, alimentares, farmacêuticas e biotecnológicas.

5. CONCLUSÃO

A revisão sobre o cultivo de microalgas no Brasil demonstrou que apesar do potencial do país, empresas consolidadas para a obtenção de microalgas para fins biotecnológicos são pouco representativas e os produtos consumidos no país a partir da biomassa algal, como cápsulas para complemento alimentar e fármacos, são importados de outros países. Apesar disto, a produção científica e o número de patentes depositados sobre cultivo e utilização de microalgas são cada vez mais crescentes no Brasil. O investimento na investigação e nas empresas interessadas nesta temática vem sendo direcionado não apenas na utilização das microalgas como alimento vivo na aquicultura, mas para sua utilização nas indústrias nutracêutica, cosméticos e de biocombustíveis.

As preparações obtidas a partir dos extratos da microalga *C. vulgaris* com solventes de diferentes polaridades demonstraram atividades antioxidante e antibacteriana, mas não exibiram atividade antifúngica. O extrato aquoso apresentou resultado interessante por trata-se de uma preparação livre de resíduos tóxicos e de baixo custo. Estas atividades devem estar vinculadas à presença de compostos bioativos na biomassa algal proveniente de cultivo em larga escala. Contudo, análises no intuito de identificar os compostos associados às atividades analisadas são sugeridas.

Ao analisar o efeito do consumo da preparação obtida a partir do extrato da bebida alcoólica brasileira “cachaça” com *C. vulgaris* na depressão alastrante cortical em ratos brancos, foi observado que este extrato apresentou uma ação neuroprotetiva no animais, sendo evidenciado através da resistência adquirida à depressão alastrante cortical no córtex cerebral. A atividade antioxidante analisada nesta preparação foi superior a todo os extratos analisados ao longo deste trabalho, o que está relacionado com a proteção oxidativa no cérebro pelos radicais livres. Apesar dos resultados positivos para o extrato de microalga usando a chaçaca, o consumo excessivo não deve ser encorajada visando benefícios em doenças que afetam o sistema nervoso ou outras enfermidades.

O processo de cultivo e obtenção da biomassa das microalgas *C. vulgaris* e *S. subspicatus* foi desenvolvido de forma econômica, somado a obtenção de um produto alcoólico funcional, com aplicação na indústria de bebidas. Estes inventos geraram um depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.

ANEXOS

Comprovante de Depósito de Patente

 <p>INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL</p> <p>21/12/2012 01912000392 15:32 REPE</p>  <p>BR 10 2012 032930 1</p> <p>Espaço reservado ao protocolo</p>	<p>< Uso exclusivo do INPI ></p> <p>Espaço para etiqueta</p>												
DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO													
<p>Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial: O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas</p>													
<p>1. Depositante (71):</p> <p>1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO</p> <p>1.2 Qualificação AUTARQUIA DE ENSINO FEDERAL</p> <p>1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08</p> <p>1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235 - CIDADE UNIVERSITÁRIA - RECIFE - PE</p> <p>1.5 CEP: 50670-901 1.6 Telefone: 81-2126-8959 1.7 Fax: 81-2126-8600</p> <p>1.8 E-mail: patentes dine.propesq@ufpe.br</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> continua em folha anexa</p>													
<p>2. Natureza: <input checked="" type="radio"/> Invenção <input type="radio"/> Modelo de Utilidade <input type="radio"/> Certificado de Adição</p> <p>Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção</p>													
<p>3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54): BEBIDA ALCOÓLICA FUNCIONAL DE MICROALGAS: PROCESSO DE CULTIVO E PRODUÇÃO</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> continua em folha anexa</p>													
<p>4. Pedido de Divisão: do pedido Nº XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX Data de Depósito: XXXXXXXXXXXX</p>													
<p>5. Prioridade: <input type="checkbox"/> interna <input type="checkbox"/> unionista</p> <p>O depositante reivindica a(s) seguinte(s):</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">País ou organização de origem</th> <th style="width: 33%;">Número de depósito</th> <th style="width: 33%;">Data do depósito</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>XXXXXXXXXXXXXXXXXX</td> <td>XXXXXXXXXXXXXXXXXX</td> <td>XXXXXXXXXX</td> </tr> <tr> <td>XXXXXXXXXXXXXXXXXX</td> <td>XXXXXXXXXXXXXXXXXX</td> <td>XXXXXXXXXX</td> </tr> <tr> <td>XXXXXXXXXXXXXXXXXX</td> <td>XXXXXXXXXXXXXXXXXX</td> <td>XXXXXXXXXX</td> </tr> </tbody> </table>		País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito											
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX											
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX											
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX											
<p>6. Inventor (72):</p> <p><input type="checkbox"/> Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)</p> <p>6.1 Nome: DANIELLI MATIAS DE MACEDO DANTAS</p> <p>6.2 Qualificação DOUTORANDA 6.3 CPF: 034.746.644-33</p> <p>6.4 Endereço completo RUA SÃO MATEUS, 510-APTO. 108 - IPATINGA - RECIFE - PE</p> <p>6.5 CEP: 50810-350 6.6 Telefone: 81-9222-5301 6.7 Fax: 81-2126-8600</p> <p>6.8 E-Mail: PATENTES_DINE.PROPESQ@UFPE.BR</p> <p style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> continua em folha anexa</p>													
<p>INPI Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)</p>													

Convite e Normas do Capítulo do Livro: Cultivo de Microalgas em Brasil



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
 FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
 DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
 CASILLA 160-C - CONCEPCION - CHILE - FONOS: 204502 - FAX: 225400



CONCEPCIÓN, 04 marzo de 2013

Sra.
 Danielli Matías de M. Dantas
 Universidad federal de Pernambuco
 Pernambuco - Brasil

Estimada Sra Matías de M. Dantas :

Como parte del Programa de Capacitación en Acuicultura, que el Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción ha venido desarrollando desde el año 2003 bajo la dirección del suscrito y gracias a la colaboración del la Agencia de Cooperación Internacional de Corea (KOICA) y la correspondiente agencia de Cooperación Internacional de Chile (AGCI), es que actualmente nos encontramos involucrados en un proyecto para la confección y desarrollo de un libro sobre el estado actual y perspectivas de la Acuicultura en América Latina.

El mencionado proyecto pretende ser llevado adelante con la participación de algunos de los ex-becarios de este curso, razón por la cual y habiendo Ud. participado en una de las versiones de este curso, es que nos dirigimos a su persona con la finalidad de invitarlo a colaborar en la confección del capítulo correspondiente a Brasil, en conjunto con algunos otros ex -becarios que ya han comprometido su participación.

De aceptar nuestra propuesta, rogaría a Ud. hacernos llegar lo antes posible su consentimiento al respecto, para así entregarle las directrices de este proyecto y también ponerlo en contacto lo antes posibles con las demás personas que colaboraran en el correspondiente capítulo.

En espera de su pronta respuesta, le saluda cordialmente

Dr. Camilo Wehinger
 Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
 Departamento de Oceanografía
 Universidad de Concepción
 Barrio Universitario S/N
 Concepción, CHILE

Estimadas y estimados colaboradores:

Les adjunto una relación temática de los diferentes tópicos a ser incluidos en cada capítulo correspondiente a cada país en nuestro libro que inicialmente llevará el título de “Acuicultura en América Latina: Estado Actual y Perspectivas”.

- Cada uno de los diferentes tópicos debe ser elaborado de una manera sintética, pero incluyendo la mayor información posible que se obtenga a partir de una investigación exhaustiva de cada uno de los temas.
- Cada uno de los capítulos deberá ser escrito en español.
- El texto escrito deberá estar complementado con figuras y gráficos en color, considerando sin embargo, que estos deberían ser claramente entendibles y legibles en una versión en blanco y negro.
- Se incorporan también capítulos correspondientes a países mediterráneos de Sudamérica, que si bien nunca han participado del curso, igualmente tienen una acuicultura de aguas continentales en desarrollo o incipiente. Para ello se contactará a algunos especialistas en el tema para solicitarles su colaboración.
- No se ha incluido en el título a la zona del caribe en consideración a la amplia presencia de pequeñas países y estados, la mayoría de los cuales nunca han participado de este curso por razones del tipo de convenio en el cual se encuentra definida la cooperación entre Chile y Corea, al igual que las definiciones para el curso. Sin embargo, igualmente se contactará a participantes de los países del caribe que sin han participado de esta actividad para invitarlos a colaborar en este libro.
- El escrito no debe exceder las 45 páginas escrito a espacio y medio, letra arial 12 puntos e incluyendo texto, figuras y tablas., y deberá estar finalizado a mas tardar el 31 de Noviembre de 2012.

NOTA.- En una etapa inmediatamente posterior consideraremos una versión en Inglés, en donde esta deberá ser, dentro de los márgenes posibles, una traducción del texto en español.

Normas Generales citar las referencia bibliográficas que se incluyan en el capítulo.

(Según las normas de la Revista Chilena de Historia Natural).

En la sección Bibliografía debe listar la referencia completa de todos los trabajos citados en el texto. No incluya trabajos no publicados, ni resúmenes de reuniones científicas (estos últimos deben citarse en el texto usando notas a pié de página; véase más abajo). No use viñetas, cursiva o negrita, y no inserte líneas en blanco entre las referencias.

Las referencias deben ir justificadas a la izquierda, y listadas en orden alfabético de acuerdo al apellido del primer autor. En forma secundaria, las referencias deben ordenarse por año, número de coautores, y apellidos de los coautores. En el caso de trabajos con nueve o más autores, liste sólo el nombre de los primeros cinco seguidos por “et al.”. Los nombres y las iniciales de los autores deben ir en mayúsculas (llevando tilde cuando corresponda), y el último autor debe ir separado por el signo “&”. Ejemplo de una secuencia de referencias:

Smith R (2009)

Smith R & M Jones (2002)

Smith R & M Jones (2003)

Smith R, M Jones & M Contreras (1994)

Smith R, M Jones & H Pérez (1994)

Smith R, P Gómez, J White & F Black (1975)

White J (1999)

White J, P Wu, M Lee, M Díaz, F Black et al. (1999)

Por favor siga los ejemplos indicados más abajo para diferentes formatos de citas, incluyendo URLs. Note la ausencia de puntos entre iniciales, año de publicación y título de la referencia. Los nombres de revistas deben indicarse siempre completos, con cada palabra del nombre comenzando con una letra mayúscula (excepto para conjunciones y artículos), y proveyendo el volumen (no incluya el número) y rango de páginas para cada referencia. Para revistas no indexadas agregue el país de publicación en paréntesis antes del volumen. Los libros, capítulos de libro y tesis deben incluir la ciudad de publicación (el país debiera agregarse al final de la referencia sólo si es necesario para su identificación apropiada). Ejemplos:

(a) Cita de artículos en revistas (note el uso de dos puntos después del volumen, seguidos de un espacio en blanco, y punto final después del rango de páginas):

Minami N & Mt Kimura (1980) Geographical variation of photoperiodic adult diapause in *Drosophila auraria*. *Japanimation (Japan)* 55: 319–324.

Packard MJ, GC Packard & TJ Boardman (1980) Water balance of the eggs of a desert lizard (*Callisaurus draconoides*). *Canadian Journal of Zoology* 58: 2051-2058.

Pérez JC (1982) Distribución de los roedores andinos. *Revista Chilena de Historia Natural* 256: 45-56.

Zamudio B (1999a)

Zamudio B (1999b)

(b) Cita de libros:

Dixon WJ (ed) (1991) *BMDP biomedical computer programs*. Third edition. University of California Press, Berkeley, California. 214 pp.

Soto D & RH Pérez (1986) *El océano*. Academia Editores, Santiago, Chile. 356 pp.

Long HI & J Long (eds) (1990) *Novel approaches to ...*

(c) Cita de capítulos de libros*:

Pérez J (1982) Lizards as laboratory animals. In: Veronese BG (ed) *Laboratory animals*: 70-89. Second edition, Moulin Editors, Paris.

Álvarez JS (1993) Ecología de aves. En: López GH, DR Lee & RH Dixon (eds) *Fauna tropical*: 89-114. SS Impresores, Santiago, Chile.

* Al referirse al libro que contiene el capítulo citado, el uso de “En” o “In” depende del idioma del manuscrito (español o inglés, respectivamente).

(d) Cita de tesis:

Williams CA (1991) *Ecology of Antarctic bats*. Ph.D. Thesis, Faculty of Sciences, Northern University, Buenos Aires. 207 pp.

(e) Cita de artículos en prensa:

Alertado JJ & LJ Rocher (in press) A revolutionary technique for restoration. *Journal of Controversy*.

No indique el año o volumen esperado de publicaciones por aparecer, a menos que tenga una confirmación oficial (RChHN requerirá estos datos antes de la publicación de un manuscrito). (f) Cita de revistas electrónicas:

Al final de la referencia, incluya “(en línea)” o “(online)” (para manuscritos en español e inglés, respectivamente), el URL completo, y la fecha de acceso entre paréntesis; cuando las páginas del número de la revista no estén numeradas en forma correlativa, cite el número total de páginas (e.g., 20 pp.). Ejemplos:

Cortéz R (2004) La dinámica de fluidos y su rol en el estudio de fenómenos biológicos. *Ciencia al Día Internacional* 5: 14 pp. (en línea) URL: <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen5/numero2/articulos/articulo2.html> (accedido Febrero 2, 2009).

Tosto D & E Hopp (2008) Characterization of the nuclear ribosomal DNA unit in *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae) and related species. *Electronic Journal of Biotechnology* (online) 11: 11-22. URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582008000300002&lng=es&nrm=iso (accessed December 23, 2008).

(g) Cita de URLs para documentos o información electrónica (aceptable únicamente para sitios oficiales mantenidos por organizaciones reconocidas, y conteniendo datos relevantes de naturaleza científica/académica): indique la referencia completa y fecha de acceso. Ejemplos:

JPL (2009) El Niño/La Niña watch. Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, NASA. USA. URL: <http://sealevel.jpl.nasa.gov/elnino/index.html> (accessed March 12, 2009).

IUCN (2008) The IUCN red list of threatened speciesTM. 2008. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. URL: <http://www.iucnredlist.org/> (accessed June 8, 2006).

6. Notas a pié de página

En esta sección proporcione la referencia completa de resúmenes o resúmenes expandidos referidos por notas a pié de página en el texto. Lístelas en orden correlativo, precedidas por sus números superíndices, e incluya: autor, año, título, nombre y número del congreso o reunión (preserve la notación original), fecha y lugar. Si están publicados en revistas o libros de resúmenes, agregue la referencia correspondiente.

Normas da Revista Food Chemistry

Introduction

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).
2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).
3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.
4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.
5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.
6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.
7. Book reviews

Page charges

This journal has no page charges

Ethics in publishing . For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> ; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights: As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source : You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies : Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access : This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted

for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language (usage and editing services) : Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Review Policy : A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.

Preparation:

Use of wordprocessing software General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original

manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections : Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information:

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Database linking : Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Artwork: *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats* If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not: • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors; • Supply files that are too low in resolution; • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork : Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color

reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions : Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables: Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text : Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references: As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf . Accessed 14.02.11.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. *List*: references should be arranged first alphabetically and then further sorted

chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. *Examples:* Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. Reference to a book: Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4). Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Supplementary data Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist : The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: E-mail address, Full postal address, Phone numbers All necessary files have been uploaded, and contain: Keywords, All figure captions, All tables (including title, description, footnotes) Further considerations, Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked', References are in the correct format for this journal, All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa, Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web), Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print, If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information : Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Normas da Revista *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*

Author Guidelines

Alcoholism: Clinical and Experimental Research is the official publication of the Research Society on Alcoholism and the International Society for Biomedical Research on Alcoholism. It is a peer-reviewed, multidisciplinary journal that publishes papers based on original research that make substantial contributions to the understanding of the etiology, treatment, and prevention of alcohol-related disorders. Two kinds of papers may be submitted, full-length papers and critical reviews. Papers that the editors consider to have cross-disciplinary interest and significance may be highlighted as Feature Articles. The journal will also publish invited mini reviews and editorial commentaries.

Ethical/Legal Considerations

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or a preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Wiley-Blackwell. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the Journal, its editors, or the publisher. All manuscripts must be submitted on-line through the journal's Web site at <http://mc.manuscriptcentral.com/acer>. See submission instructions under 'On-line manuscript submission.'

Patient anonymity and informed consent: It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from figures unless they obtain written consent from the patients and submit written consent with the manuscript.

Research ethics. You will be asked during online submission to confirm that your study has been approved by relevant bodies (e.g. institutional review boards, research ethics committees) and that appropriate consent was obtained for studies involving human or animal participants.

Permissions: Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Wiley-Blackwell.

Manuscript Submission

On-line manuscript submission: All manuscripts must be submitted on-line through the journal's Web site at <http://mc.manuscriptcentral.com/acer>. First-time users: Please click the Register button from the menu and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an e-mail indicating your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Note: If you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, do not register again; just log in.

Once you have an assigned ID and password, you do not need to re-register, even if your status changes (that is, author, reviewer, or editor). Authors: Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log into the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If you experience any problems, please contact Mary Newcomb, Acerjournal@earthlink.net, or by calling (317) 375-0819. You may also contact Lisa Daitch, Associate Managing Editor, LDaitchACER@gmail.com, or by calling (925) 915-0271. Requests for help and other questions will be addressed in the order received.

Authors who submit a manuscript do so with the understanding that if it is accepted for publication, copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to the Research Society on Alcoholism.

Articles, editorials, letters to the editor, and other text material in the journal *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* represent the opinions of the authors and do not reflect the opinions of the Research Society on Alcoholism, the International Society for Biomedical Research on Alcoholism, the publisher, or the institution with which the author is affiliated, unless the contrary is clearly specified. All papers are subject to peer review by a Review Editor (member of the Board of Review Editors, the Editor, and the Associate Editors) and one or two referees. Authors may suggest up to four, and disqualify two, potential referees.

A cover letter signed by all authors must accompany the manuscript. The letter should state that: a) the submitted manuscript has been read and approved by all signatories, b) all authors acknowledge that they have exercised due care in ensuring the integrity of the work, and c) none of the original material contained in the manuscript has been submitted for consideration nor will any of it be published elsewhere except in abstract form in connection with scientific meetings.

Requirements for authorship are: (1) substantial contribution to conception, design, gathering, analysis and/or interpretation of data and (2) contribution to the writing and intellectual content of the article.

Page Charges

Manuscripts accepted for publication in *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* will be assessed a page charge of \$60.00 (U.S.) per printed page to cover, in part, the cost of publication. Color pages will be assessed a page charge of \$650. Editorial consideration of a manuscript is in no way related to the author's ability to assume the page charge, but it is expected that this charge will be paid by the author's research funds that supported the research. Requests for waiver of page charges will be considered at the time of acceptance, if rationale can be provided.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see: http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website [here](#). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit. If your paper is

accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA): Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA, Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Types of Papers

The following types of articles may be submitted for publication in the journal.

Manuscripts exceeding the word and reference limitations will be returned without review.

- Critical Review articles are not to exceed 4500 words (excluding title page, abstract, references, figure legends, tables, and figures.) References are not to exceed 50.

- Original Research are not to exceed 4500 words (excluding title page, abstract, references, figure legends, tables, and figures.) References are not to exceed 50. It should be noted that Alcoholism: Clinical & Experimental Research does not impose a minimum length on original research articles.

- Commentaries are not to exceed 2500 words (excluding title page, abstract, references, figure legends, tables and figures) and 20 references.

Preparation of Manuscript

Please ensure that all text (including abstract, body of manuscript, figure legends, and references) is submitted as double-spaced type. We also require all text be line-numbered. Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Title page:

The title page should include:

- The complete manuscript title
- The full names of all authors, their highest academic degrees, and affiliations
- Name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address
- All sources of support, including pharmaceutical and industry support, that require acknowledgement

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Structured abstract and key words: The article should be briefly summarized or abstracted in a short paragraph (approximately 300 words) at the beginning of the text on a separate page. It should contain 4 elements labeled: Background, Methods, Results, and Conclusions. At the end of the paragraph, provide no more than 5 key words or phrases.

Text: Organize the manuscript into four main headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country).

Abbreviations: For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

References: The authors are responsible for the accuracy and completeness of information contained in the references. The journal uses Harvard Style for Referencing.

-Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Several publications by the same author or group should be listed in chronological order; those that appeared in the same year should be distinguished by a,b,c, etc. Where there are two authors, both should be named, but with three or more only the first author's name plus "et al." should be given.

-Reference List

The list of references should only include works that are cited in the text and have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. References should be compiled (double-spaced) at the end of the article in alphabetical order. Identify multiple authors published in the same year with an a,b,c, etc. after the year. In-text citations should be listed by author name(s) and year of publication in parentheses.

Journal article, list all authors

Aragon CMG, Spivak K, Amit Z (1991a) Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39:55-59. Aragon CMG, Stotland LM, Amit Z (1991b) Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol Clin Exp Res* 15:165-169.

Book chapter

2. Holtzman SG (1990) Discriminative stimulus effects of drugs: relationship to potential for abuse, in *Modern Methods in Pharmacology*, Vol. 6, Testing and

Evaluation of Drugs of Abuse (Adler M, Cowan A eds), pp 193-210. Wiley-Liss, New York.

Entire book

3. Julien RM (1985) A Primer of Drug Action. 4th ed. WH Freeman, New York.

Software

4. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

Online journals

5. Friedman SA. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* [serial online]. January 1988;71:22-37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990.

Database

6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. Updated March 29, 1996.

World Wide Web

7. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [JAMA HIV/AIDS Web site]. June 1, 1996. Available at: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Accessed June 26, 1997.

Figures: There are three preferred formats for digital artwork submission: Encapsulated PostScript (EPS), Portable Document Format (PDF), and Tagged Image Format (TIFF). We suggest that line art be saved as EPS files. Alternately, these may be saved as PDF files at 600 dots per inch (dpi) or better at final size. Tone art, or photographic images, should be saved as TIFF files with a resolution of 300 dpi at final size. For combination figures, or artwork that contains both photographs and labeling, we recommend saving figures as EPS files, or as PDF files with a resolution of 600 dpi or better at final size. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Each figure should be submitted individually - one file per figure.

Figure legends: Include legends for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

Color figures: The journal accepts for publication color figures that will enhance an article. Authors who submit color figures will be assessed a charge of \$650 per color page to cover the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

Tables: Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (eg, Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Each table should include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Tables should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Tables may be submitted at the end of the manuscript text file. Table legends should appear on a separate page, labeled 'Table Legends'.

Supplementary material: If you have supplementary information that you would like to link to your submission, please read the following instructions:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (10th edition), *Stedman's Medical Dictionary* (28th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (11th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express units of measure and degrees Celsius to express temperatures. Please submit all text (including abstract, figures, legends, and references) as double-spaced.

Manuscript Revisions

All manuscript revisions should be submitted online within three months following the editor's decision. If this is not enough time in which to make your revisions, please contact the Editorial Office for an extension. If you do not request an extension and your revisions are not submitted within six months, your manuscript will be withdrawn by the editorial office. At that point, any further work by you will be considered as a new submission.