



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

REBECA GONÇALVES DE MELO

APLICAÇÃO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* NA REDUÇÃO DA
TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E UTILIZAÇÃO DO
EXTRATO DA BIOMASSA PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO*

REBECA GONÇALVES DE MELO

APLICAÇÃO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* NA REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DA BIOMASSA PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Dept^o. de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raquel Pedrosa Bezerra
Dept^o. de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela de Araújo Viana Marques
Universidade de Pernambuco, Campus Serra Talhada

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Melo, Rebeca Gonçalves de

Aplicação da microalga *Chlorella vulgaris* na redução da toxicidade de subprodutos agroindustriais e utilização do extrato da biomassa para atividade cicatrizante in vivo / Rebeca Gonçalves de Melo- 2019.

100 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadoras: Raquel Pedrosa Bezerra e Daniela de Araújo Viana Marques

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências

1. *Chlorella vulgaris* 2. Cicatrização 3. Toxicidade I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orient.) II. Bezerra, Raquel Pedrosa Bezerra (coorient.) III. Marques, Daniela de Araújo Viana (coorient.) IV. Título

579.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-116

REBECA GONÇALVES DE MELO

**APLICAÇÃO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* NA REDUÇÃO DA
TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E UTILIZAÇÃO DA
BIOMASSA PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 18/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Presidente

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva, Universidade Federal de Pernambuco.
1º Examinador

Dr. Páblo Eugênio da Costa e Silva, Instituto Mato-grossense do Algodão.
2º Examinador

Dra. Silvany de Sousa Araújo, Universidade Federal de Pernambuco.
3º Examinador

Prof. Dr. Lorenzo Miguel Pastrana, International Iberian Nanotechnology Laboratory,
Portugal.
4º Examinador

Dedico este trabalho à minha mãe,
Lauriete Gonçalves de Melo, que nunca
mediu esforços para me fazer feliz.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço muito a Deus. Ele, que me manteve firme todos os dias de minha vida, e acreditou mais em mim do que eu mesma. Se hoje estou aqui, é porque Ele sempre esteve ao meu lado, juntamente com a minha mãezinha do céu, Nossa Senhora Aparecida, que sempre intercedeu por mim junto ao Pai;

Aos meus pais, Lauriete e Edson, a quem devo tudo o que sou, e que se sacrificaram de muitas coisas para me dar sempre o melhor. Nada que eu faça nessa vida será suficiente para agradecer e retribuir tanto amor e cuidado;

Aos meus irmãos, Luciana e Rodrigo, que sempre me apoiaram e me incentivaram, me ensinando a ser uma pessoa melhor e servindo muitas vezes de inspiração para mim. Amo vocês.;

Às minhas sobrinhas, Maria Clara e Maria Emília, e às minhas afilhadas Gabriela e Giulie, que mesmo sem se darem conta são luz na minha vida e me fazem querer ir sempre mais adiante;

Aos meus tios, tias, primos (as), cunhados e demais familiares, que sempre vibraram com minhas conquistas e me ajudaram no que foi possível;

Ao meu companheiro, amigo e namorado Anthony, que compartilhou comigo muitos momentos felizes, e outros tantos difíceis, ao longo de toda essa jornada acadêmica, e que com seu amor e carinho conseguiu tornar a caminhada mais leve;

À minha orientadora, prof^a. Ana Porto, que abriu as portas de seu grupo de pesquisa para mim, sem me conhecer, e que com sua alma rica em simplicidade é exemplo para todos que trabalham ao seu lado;

Às minhas co-orientadoras, prof^a. Raquel Pedrosa e prof^a. Daniela Viana, duas mulheres maravilhosas e inspiradoras, que me acolheram com todo carinho e enxergaram potencial em mim, dando vida ao meu trabalho, concordando com algumas maluquices e me ensinando muito nesses últimos anos;

À banca que se faz aqui presente, disponibilizando seu tempo e contribuindo para enriquecer essa tese;

Aos amigos que o Cenapesq me deu: Páblo, Priscilla Calaça, Ariadne, Emanuelle, Karoline, Aldeni, Diego, Meire e Milena, que ao longo desses anos trocaram comigo muito conhecimento, tornaram os dias mais felizes, o trabalho menos cansativo e toda a rotina cheia de risadas! Tudo foi mais fácil com vocês por perto!;

À minha companheira de experimentos, e acima de tudo minha amiga, Alexandra Frazão, que se dedicou junto a mim nesse doutorado e levou adiante comigo esse projeto. Vivemos muitas emoções ao longo desses anos, e esse trabalho só foi possível graças à sua colaboração. Obrigada por tudo!;

À Hortência Farias, que compartilhou comigo disciplinas, viagens, aflições, alegrias e todas as sensações que o doutorado nos traz, tudo isso envolvido com muito carinho e amizade;

À Rebecka Dulce, Nilda Dulce e Marcone Jr., que me acolheram tantas vezes como família em sua casa nesses últimos anos e torceram pelo meu sucesso;

Às minhas grandes amigas Ianne Macêdo e Rafaela Pinheiro, que já viveram muitos momentos ao meu lado, mostrando que verdadeiras amizades persistem independente de tempo e espaço;

Ao prof. Bruno Severo Gomes, que sempre foi exemplo de um ser humano incrível e excelente mestre, partilhando alegrias e incentivando os meus passos profissionais;

À prof^a. Ana Christina, Dominick e Vanessa, do Dpto. de Genética da UFPE, que me ajudaram e me ensinaram o pouco que sei sobre as análises de toxicidade;

Aos demais amigos: Natassia, Amanda, Leandro, Joana, Rafaela Leite, Daniele, Igor, Leone, Lisiane, Rhaíssa, e tantos outros, que em todos esses anos celebraram comigo as minhas vitórias e compartilharam momentos importantes;

A todos os colegas e funcionários que fazem o Cenapesq e o Labtecbio, pelas experiências divididas e apoio nos experimentos, desde o início do meu projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dessa pesquisa.

Minha sincera gratidão!

Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam bem alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam!

Isaías 40:31

RESUMO

O reaproveitamento de subprodutos utilizando microrganismos fotossintetizantes é considerado uma alternativa promissora para a fitorremediação, pois além de reduzir o impacto ambiental causado por esses efluentes extremamente poluentes, aumenta a produção de biomassa com alto valor agregado. A biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* é conhecida por possuir uma variedade de bioativos com diferentes atividades biológicas como antimicrobianos, antineoplásicos, anti-hiperlipidêmico e anti-hipertensivos, e pode ser obtida através de cultivo autotrófico ou mixotrófico, utilizando fontes orgânicas menos onerosas. O objetivo do presente estudo foi cultivar a microalga *C. vulgaris* em condições autotrófica e mixotrófica utilizando subprodutos agroindustriais, avaliar a redução de nutrientes e toxicidade desses subprodutos, bem como utilizar o extrato da biomassa proveniente do melhor cultivo para investigar uma possível atividade cicatrizante *in vivo*. O cultivo autotrófico utilizou o meio padrão Bold's Basal Medium (BBM) e os cultivos mixotróficos foram realizados suplementando o BBM com três subprodutos: 1% de milhocina, 10g/L de soro de queijo e 2% de vinhaça. Após atingirem a faixa estacionária de crescimento, os cultivos foram centrifugados e o sobrenadante foi submetido à análises de toxicidade e remoção de nutrientes; as biomassas das melhores condições de crescimento foram utilizadas para elaboração de um gel e avaliação da atividade cicatrizante. As formulações em gel foram constituídas de 10% ou 25% do extrato celular, adicionados ao veículo hidrogel de Carbopol®, e aplicadas diariamente durante 12 dias em feridas em camundongos. Análises macroscópicas e histomorfométricas dos animais foram realizadas após eutanásia. Os extratos foram caracterizados quanto à concentração proteica, o perfil fitoquímico, atividade hemaglutinante, atividade antioxidante e atividade antibacteriana. O cultivo mixotrófico utilizando 1% de milhocina apresentou maior crescimento celular. Em todos os cultivos, *C. vulgaris* removeu 100% de nitrato e fósforos totais, e no cultivo utilizando soro de queijo removeu 73% da Demanda Química de Oxigênio. Os cultivos de *C. vulgaris* também reduziram a toxicidade da milhocina e vinhaça. Uma maior oclusão das feridas, a partir do 7º dia do ensaio, foi observada utilizando o gel contendo 25% do extrato celular obtido do cultivo mixotrófico com milhocina. Além disso, as avaliações histológicas e histomorfométricas confirmaram uma maior deposição de colágeno, redução de fibroblastos e células inflamatórias e uma significativa presença de anexos da pele no mesmo grupo. O extrato celular obtido da biomassa cultivada com milhocina obteve maior concentração proteica (1,174 mg/mL) e atividade antioxidante (54,64%), e

atividade hemaglutinante $\geq 2^{48}$ para sangue de coelho. As melhores atividades antimicrobianas foram frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Além disso, o perfil fitoquímico do extrato demonstrou a presença de esteroides, triterpenos, saponinas e açúcares. Assim, a microalga *C. vulgaris* pode ser utilizada para reduzir a toxicidade e poluentes de subprodutos agroindustriais, bem como seu extrato pode ser empregado na formulação de um gel com alta capacidade de reepitelização tissular.

Palavras-chave: Cicatrização. Cultivo mixotrófico. Microrganismo fotossintetizante. Subprodutos agroindustriais. Toxicidade.

ABSTRACT

The treatment of by-products using photosynthetic microorganisms is considered a promising alternative for phytoremediation, as well as reducing the environmental impact caused by these extremely polluting effluents, increases the production of biomass with high added value. *Chlorella vulgaris* microalgae biomass is known to have a variety of bioactives compounds with different biological activities such as antimicrobial, antineoplastic, antihyperlipidemic and antihypertensive. It can be obtained through autotrophic or mixotrophic cultivation using less expensive organic sources. The aim of this study was to cultivate *C. vulgaris* under autotrophic and mixotrophic conditions, using agroindustrial by-products, to evaluate nutrient and toxicity reduction, as well as to use biomass from the best cultivation to investigate wound healing activity *in vivo*. The autotrophic culture used the standard Bold's Basal Medium (BBM) and the mixotrophic cultures were performed supplementing BBM with three by-products: 1% corn steep liquor, 10 g L⁻¹ cheese whey and 2% vinasse. After reaching stationary growth phase, the cultures were centrifuged and the supernatant were used for toxicity and nutrient removal analyzes; the biomasses of the best growth conditions were used to elaborate a gel and evaluate the wound healing activity. Gel formulations were composed of 10% or 25% of cell extract, added to Carbopol® hydrogel vehicle, and applied daily for 12 days in wounds in mice. Macroscopic and histomorphometric analyzes of the animals were evaluated after euthanasia. The extracts were characterized in terms of protein concentration, phytochemical profile, hemagglutinating activity, antioxidant activity and antibacterial activity. Mixotrophic cultivation using 1% corn steep liquor showed higher cell growth. In all cultures, *C. vulgaris* removed 100% of nitrate and total phosphors, and in the culture using cheese whey it removed 73% of the chemical oxygen demand. *C. vulgaris* cultures also reduced the toxicity of corn steep liquor and vinasse. Higher wounds occlusion, from the 7th day of the test, was observed using the gel containing 25% of the cellular extract obtained from mixotrophic culture with corn steep liquor. In addition, histological and histomorphometric evaluations have confirmed increased collagen deposition, reduction of fibroblasts and inflammatory cells, and a significant presence of skin appendages in the same group. Cellular extract obtained from the biomass grown with corn steep liquor showed higher protein concentration (1.174 mg mL⁻¹) and antioxidant activity (54.64%), and haemagglutinating activity $\geq 2^{48}$ for rabbit blood. The best antimicrobial activities were against *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*

and *Escherichia coli*. In addition, the phytochemical profile of the extract demonstrated the presence of steroids, triterpenes, saponins and sugars. Thus, the microalgae *C. vulgaris* can be used to reduce the toxicity and pollutants from agroindustrial byproducts, as well as its biomass can be used for the formulation of a gel with high tissue reepithelization capacity.

Keywords: Agroindustrial by-products. Healing. Mixotrophic culture. Photosynthetic microorganism. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação Teórica

Figura 1 - <i>Chlorella vulgaris</i>	21
Figura 2 - As fases de cura de feridas cutâneas: inflamação, proliferação e maturação.....	29

Artigo 1

Figura 1 - Cellular growth of <i>Chlorella vulgaris</i> in autotrophic and mixotrophic conditions. (□) CA: Autotrophic culture; (▲) CW: 10 g L ⁻¹ of lactose; (◆) CC: 1% corn steep liquor; (●) CV: 2% vinasse. Data are expressed as mean ± SD.....	40
---	----

Figura 2 - Nutrients Removal Efficiency in <i>Chlorella vulgaris</i> mixotrophic cultivation with corn steep liquor (CC), cheese whey (CW) and vinasse (CV). TN = total nitrogen; NH ₃ -N = ammoniacal nitrogen, N = organic nitrogen; N-NO ₂ ⁻ = nitrite; N-NO ₃ ⁻ = nitrate; COD = Chemical Oxygen Demand; TP = total phosphorus. Data are expressed as mean ± SD.....	42
---	----

Artigo 2

Figura 1 - Fotografias representativas da contração das feridas em diferentes dias pós-operatório (3 ^o , 7 ^o e 12 ^o , respectivamente). CC: controle Carbopol®; CP: controle positivo (Neocetheo®); EA-25: Carbopol + 25% de extrato autotrófico; EM-25: Carbopol® + 25% de extracto mixotrófico.....	74
--	----

Figura 2 - Análise histopatológica das feridas tratadas com CC (Controle Carbopol®), CP (Controle Positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de Extrato Autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de Extrato Mixotrófico) no 3 ^o , 7 ^o e 7 ^o 12 dias de pós-operatório. As fotografias mostram o processo de cicatrização de feridas, com clara evidência de epitelização, queratinização e formação de área cicatricial em grupos tratados com extrato de microalgas, principalmente no grupo EM-25, com presença de folículo piloso (HF) no D12. Coloração com hematoxilina-eosina, ampliação de 100x e as barras de escala representam 100 µm. B: sangramento; C: crosta; E: epiderme; D: derme.....	76
--	----

Figura 3 - Análise histopatológica das feridas tratadas com CC (controle Carbopol®), CP (controle positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de extracto autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de extracto mixotrófico) no 3º, 7º e 12º dias de pós-operatório. As fotografias mostram clara evidência de epitelização, redução de células inflamatórias e fibroblastos e deposição de colágeno em grupos tratados com extrato de microalgas, principalmente no grupo EM-25, com presença de anexos cutâneos como folículo piloso (HF) e glândulas sebáceas (G) no D12. Coloração Tricromo de Masson, ampliação de 400x e as barras de escala representam 20 µm. B: sangramento; BV: vaso sanguíneo; C: colagénio; F: células de fibroblastos; IC: células inflamatórias.....77

Figura 4 – Análise histopatológica das feridas tratadas com CC (Controle Carbopol®), CP (Controle Positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de extrato autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de extrato mixotrófico) no 12º dia pós-operatório. As fotografias mostram evidência de epitelização e presença de lâmina basal (seta) no grupo tratado com EM-25. Coloração de ácido periódico de Schiff, ampliação de 400x e as barras de escala representam 20 µm. E: epiderme; D: derme.....78

Figura 5 – Análises morfométricas das feridas tratadas com CC (Controle Carbopol®), CP (Controle Positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de extrato autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de extrato mixotrófico) no 12º dia pós-operatório. Uma menor quantidade de fibroblastos (A) e células inflamatórias (C) é observada no grupo EM-25. Uma maior densidade de colágeno (B) e anexos cutâneos são apresentados no mesmo grupo. Os dados são descritos como média ± DP, $p < 0,05$79

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Growth parameters of *Chlorella vulgaris* cultivated under autotrophic and mixotrophic conditions.....41

Tabela 2 - Nutrients Elimination Capacities of *Chlorella vulgaris* mixotrophic cultivation with corn steep liquor (CC), cheese whey (CW) and vinasse (CV).....42

Tabela 3 - Toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of by-products before and after treatment by *C. vulgaris* mixotrophic cultivation.....43

Patente de Invenção

Tabela 1 - Evolução da atividade cicatrizante dos grupos controle negativo (CC), controle positivo (CP), Extrato autotrófico (EA25%) e Extrato mixotrófico (EM25%).....62

Artigo 2

Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos autotrófico e mixotrófico de *Chlorella vulgaris* através de cromatografia de camada delgada.....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ_{\max} – Taxa específica de crescimento

Abifisa – Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico

ABIQ – Associação Brasileira de Indústrias de Queijo

B – Bleeding

BBM – Bold's Basal Medium

BV – Blood vessel

C – Collagen

D – Dermis

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

E – Epidermis

F – Fibroblast cells

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

FGF-7 – Fator de crescimento de queratinócitos

G – Sebaceous glands

HF – Hair follicle

IC – Inflammatory cells

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

MEC – Matriz extracelular

N – Nitrogênio orgânico

NH₃ – Nitrogênio amoniacal

NO₂⁻ – Nitrito

NO₃⁻ – Nitrato

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMN – Leucócitos polimorfonucleares

P_{\max} – Máxima produtividade celular

TGF- β – Fator transformador de crescimento- β

TN – Nitrogênio total

TNF – Fator de necrose tumoral

TP – Fósforo total

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

X_m – Concentração celular máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos Específicos.....	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 <i>CHLORELLA VULGARIS</i> : CULTIVO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	20
2.1.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>.....	21
2.1.1.1 Subprodutos agroindustriais como fonte de cultivo para microrganismos fotossintetizantes.....	22
2.1.2 <i>Chlorella vulgaris</i> como fonte de produtos bioativos.....	27
2.2 REPARO POR CICATRIZAÇÃO.....	28
2.2.1 Fases do processo de cicatrização.....	29
2.3 PRODUTOS CICATRIZANTES OBTIDOS DE FONTES NATURAIS.....	32
2.4 ALGAS E MICROALGAS COM POTENCIAL USO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS CICATRIZANTES.....	35
3 RESULTADOS.....	37
3.1 ARTIGO 1 - CULTIVO MIXOTRÓFICO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> AUMENTOU A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E REDUZIU A TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS.....	37
3.2 PATENTE DE INVENÇÃO - FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA.....	45
3.3 ARTIGO 2 - HIDROGEL À BASE DE EXTRATOS DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> : UMA NOVA FORMULAÇÃO TÓPICA PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS.....	64
4 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A microalga verde *Chlorella vulgaris* é um microrganismo fotossintetizante que possui uma biomassa rica em diversos nutrientes como proteínas, vitaminas, minerais, fibras, carboidratos, ácidos nucleicos e substâncias antioxidantes (SEO-HYEON et al., 2012). A condição de cultivo destes microrganismos influencia diretamente na composição de sua biomassa, e podem ser caracterizados como autotróficos, heterotróficos e mixotróficos (SAFI et al., 2014). Os cultivos mixotróficos, caracterizados pela adição de fonte orgânica de carbono ao cultivo autotrófico, em geral são realizados com a finalidade de aumentar a produção de biomassa, bem como maximizar o valor agregado a esta (ZHAN et al., 2017).

O uso de subprodutos agroindustriais para o cultivo mixotrófico de microalgas reduz os custos de produção, simultaneamente diminuindo o volume destes efluentes potencialmente poluentes ao meio ambiente. Além disso, a biomassa pode ser cultivada com a finalidade de obter produtos de interesse biotecnológico (RIÑO et al., 2016; SILVA et al., 2018). Na literatura estão descritas diversas aplicações com a biomassa deste gênero de microalga, sendo utilizada na pesquisa médica para atividade antimicrobiana (SYED et al., 2015), antitumoral (KUBATKA et al., 2015), imunomoduladora (QI; KIM, 2017), anti-hipertensiva (LIN et al., 2018) e hepatoprotetora (PANAHI et al., 2012).

O conceito de tratamento de feridas sempre objetivou a redução do risco causado pela própria ferida, minimizando potenciais complicações ambientais e aumentando a regeneração e o restabelecimento do tecido cutâneo lesionado (CHANDIKA et al., 2015). O uso de materiais biologicamente ativos naturais e sintéticos também evoluiu na cicatrização de feridas ao longo dos anos, no entanto, ainda há um grande interesse na identificação de produtos cicatrizantes com efeitos colaterais mínimos, provenientes de compostos extraídos de fontes naturais como plantas (ÖZ et al., 2017; SU et al., 2017), animais (GORCZYCA et al., 2014; PAL et al., 2016) e microrganismos (AYED et al., 2015; TRABELSI et al., 2017).

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que depende da condição da ferida, da saúde do paciente e do suporte físico-químico dado através de materiais externos. A identificação de moléculas ideais para o tratamento de feridas ainda está em crescente ascensão e, conseqüentemente, o uso de materiais naturais biologicamente ativos com finalidade de regeneração tecidual também evoluiu. Nos

últimos anos a identificação contínua de novos bioprodutos levou à exploração do ambiente aquático em busca de compostos ativos. Como resultado disso, em um curto espaço de tempo, o ecossistema marinho e de água doce foram identificados como fontes ideais de biomateriais, pois contém uma diversidade ilimitada (CHANDIKA et al., 2015).

Ainda há muito que se pesquisar na área de desenvolvimento de medicamentos e produtos cicatrizantes, não só para aperfeiçoar os recursos já existentes, mas também para torná-los acessíveis ao maior número de pessoas, produzindo tecnologias mais simples e baratas, igualmente eficientes e provenientes de diversos tipos de matérias-primas. Diante dos benefícios associados à microalga *C. vulgaris* com atividade biológica, e da incessante busca por compostos naturais que possuam capacidade de regeneração tecidual, se faz necessário investigar a atividade cicatrizante *in vivo* desta microalga, a partir da biomassa cultivada em condições mixotróficas, área ainda pouco estudada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a redução da toxicidade de subprodutos agroindustriais a partir do cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* e utilizar sua biomassa para avaliação de atividade cicatrizante *in vivo*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o crescimento de *C. vulgaris* em meio de cultivo padrão suplementado com os subprodutos agroindustriais: milhocina, soro de queijo e vinhaça;
- b) Estimar a composição centesimal da biomassa cultivada nos diferentes subprodutos;
- c) Determinar a taxa de remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO), nitrogênio e fósforo totais dos subprodutos antes e após o crescimento da microalga;
- d) Avaliar a remoção da toxicidade desses subprodutos após o crescimento da microalga;
- e) Obter extratos com tampão Tris-salina-HCl das biomassas com melhor condição de crescimento;

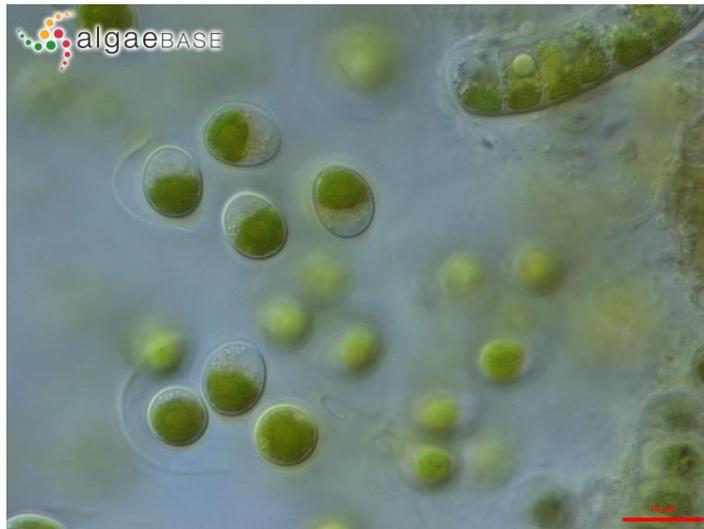
- f) Elaborar formulações tópicas em gel contendo diferentes concentrações dos extratos;
- g) Avaliar a atividade cicatrizante *in vivo* das formulações tópicas em modelo experimental com camundongos;
- h) Caracterizar os extratos quanto à concentração de proteínas e perfil fitoquímico;
- i) Determinar as atividades antimicrobiana, antioxidante e hemaglutinante dos extratos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *CHLORELLA VULGARIS*: CULTIVO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

A microalga verde *Chlorella vulgaris* (Figura 1) foi descoberta pelo pesquisador holandês Martinus Willem Beijerinck em 1890 como a primeira microalga com núcleo bem definido. É um microrganismo fotossintetizante, pertence ao filo Chlorophyta, Classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales e família Chlorellaceae (BEIJERINCK, 1890). Essa espécie habita a água doce e apresenta forma de vida unicelular, podendo acumular pigmentos de clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas. Possui forma esférica, com cerca de 2-10 μm de diâmetro e sem flagelos (SONG et al., 2008). Sua célula reprodutiva é imóvel (autósporo), e sua reprodução é exclusivamente assexuada (YAMAMOTO et al., 2004).

A biomassa de *C. vulgaris* é produzida comercialmente em larga escala para alimentação e fabricação de ração desde 1960. Nos dias atuais, estima-se que a produção global de *Chlorella* seja de 6.600 toneladas de matéria seca por ano. O preço global do mercado desta microalga foi estimado em 2014 no valor de 28,7 €/kg, com uma taxa composta anual de crescimento de 28,4% (FROST; SULLIVAN, 2015). O Japão é um dos principais consumidores mundiais de *Chlorella*, devido à sua biomassa rica em proteínas e de suas propriedades terapêuticas associadas (OTSUKI et al., 2015; QI; KIM, 2017). Além de diversas aplicações biotecnológicas o cultivo de *C. vulgaris* também é amplamente realizado objetivando a produção de biodiesel (PARICHEHREH et al., 2019; SAKARIKA; KORNAROS, 2019).

Figura 1 - *Chlorella vulgaris*

Fonte: Algae Base (2008)

2.1.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

A partir do uso da fonte de carbono, podem-se distinguir três tipos de metabolismo: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Em cultivos autotróficos todos os elementos necessários para o crescimento são através de compostos inorgânicos, envolvendo a utilização da luz como única fonte de energia, a qual é convertida em energia química pelo processo de fotossíntese. Os cultivos heterotróficos são realizados sem necessidade de fonte luminosa, no entanto, são adicionados substratos orgânicos no meio de cultura, que são utilizados como fonte de energia através de oxidação (BORGHETTI, 2009; HATA et al., 2000). Já o cultivo mixotrófico equivale à junção do autotrófico com o heterotrófico, onde tanto os compostos orgânicos, a presença de luz e o CO₂ são necessários para o crescimento, operando simultaneamente o metabolismo respiratório e o fotossintético (GROBBELAAR, 2004).

Em alguns casos, o cultivo autotrófico apresenta uma produtividade celular limitada, uma vez que utiliza apenas fonte de carbono inorgânico para o crescimento celular, sendo necessário que haja uma conversão da energia luminosa em biomassa, e para que isso ocorra de forma eficaz, a fonte de luz e a eficiência fotossintética devem estar em equilíbrio. Essa produtividade celular reduzida é uma das principais desvantagens observadas neste tipo de cultura, tanto em sistemas abertos quanto em

sistemas fechados (fotobiorreatores), conseqüente há uma maior dificuldade na obtenção de novas biomoléculas. O cultivo mixotrófico surge então como uma alternativa para otimizar a produção de biomassa, bem como potencializar o valor agregado a esta (ZHAN et al., 2017).

A cultura mixotrófica combina as vantagens da autotrófica e heterotrófica. A literatura relata diversos tipos de cultivos mixotróficos com *C. vulgaris* apresentando produtividade celular superior aos cultivos autotrófico e heterotrófico e utilizando diferentes fontes orgânicas: esgoto doméstico esterilizado, lodo digerido, águas residuais, despejos industriais, resíduos da suinocultura, resíduos de laticínios e resíduos agroindustriais (PIPES; GOTAAS, 1960; WONG; LAY, 1980; RUSSO, 2011; TRAVIESO et al., 2006; ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014; SILVA et al., 2018).

Em condições de cultivo mixotrófico, as microalgas podem não só crescer heterotroficamente com carbono orgânico, aumentando a taxa de crescimento e melhorando a biomassa e a acumulação de lipídios, mas também consumindo carbono inorgânico (CO₂) e produzindo oxigênio através da fotossíntese, tornando a emissão de CO₂ mais baixa (ABE et al., 2002). Além disso, os pigmentos valiosos e os carotenoides fotossintéticos podem ser preservados em condições luminosas em cultivo mixotrófico (ALKHAMIS; QIM, 2015). Essas e outras vantagens demonstram que o cultivo mixotrófico é o tipo de cultivo ideal para microalgas, com a finalidade de produzir biomassa e biocompostos (ZHAN et al., 2017).

2.1.1.1 Subprodutos agroindustriais como fonte de cultivo para microrganismos fotossintetizantes

Nas últimas décadas o mundo tem enfrentado um aumento no consumo de matérias-primas e na geração de subprodutos na agricultura e nas atividades agroindustriais, devido aos avanços significativos do agronegócio. Assim, uma atenção especial tem sido focada na minimização desses efluentes e na sua reutilização. Os subprodutos agroindustriais são uma das maiores fontes de resíduos produzidos no mundo, e dependem do tipo de matéria-prima utilizada e do processamento da tecnologia. Quando descartados no meio ambiente liberam uma grande quantidade de nutrientes considerados poluentes inorgânicos (MIRZAIE et al., 2015).

Alguns estudos também relatam uma elevada toxicidade e genotoxicidade associada a esses subprodutos, promovendo danos nos cromossomos ou no DNA de uma célula. Diversos organismos bioindicadores já foram utilizados para comprovar esses efeitos, como peixes, diplópodes, plantas e microalgas (CORREIA et al. 2017; CHRISTOFOLETTI et al., 2016; PEDRO-ESCHER et al., 2014; NASIR et al., 2015). O bioensaio que utiliza raízes de *Allium cepa* também é amplamente utilizado, uma vez que é reconhecido como um excelente modelo para detecção de agentes genotóxicos ambientais, além de ser validado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) desde 1999 (MA, 1999).

A capacidade poluidora dos subprodutos agroindustriais está frequentemente associada às suas altas taxas de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e/ou sua Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), indicadores da presença de matéria orgânica na água. Esses parâmetros determinam o consumo ou a demanda de oxigênio necessário para estabilizar a matéria orgânica contida em uma amostra de água (BRASIL, 2014). Além de elevadas DQO e DBO, esses resíduos também liberam nutrientes como compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) e fósforo - responsáveis pelo processo de eutrofização -, compostos orgânicos e metais pesados (MELO et al., 2018).

A fitorremediação é uma tecnologia emergente que oferece uma técnica ambientalmente segura e econômica, que objetiva reduzir contaminantes de efluentes, através de organismos fotossintetizantes (NASIR et al., 2015). Inicialmente as plantas terrestres foram extremamente utilizadas no processo de fitorremediação, no entanto, com o passar dos anos, foram substituídas por microrganismos fotossintetizantes, como as microalgas. Alguns estudos já comprovam que as microalgas são alternativas promissoras para a fitorremediação de efluentes e subprodutos agroindustriais (LANANAN et al., 2014; MELO et al., 2018).

As microalgas consomem os nutrientes utilizando fontes orgânicas e inorgânicas, provenientes dos subprodutos. Na ausência de requisitos de substratos químicos adicionais, a fitorremediação também auxilia na redução dos custos operacionais do tratamento desses efluentes. Esses aspectos sugerem que o cultivo de microalgas em meios preparados a partir de diferentes tipos de resíduos e subprodutos podem minimizar os custos de produção de biomassa de algas, com a perspectiva de múltiplos benefícios ecológicos e biotecnológicos (CALIXTO et al.,

2016). No Brasil, três subprodutos agroindustriais merecem destaque e podem ser utilizados no crescimento de microalgas: a milhocina, o soro de queijo e a vinhaça.

- Milhocina

A milhocina é um subproduto proveniente do beneficiamento do milho. O milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; as bactérias presentes na fração solúvel realizam uma fermentação láctica suave, e é então submetida posteriormente a um processo de evaporação, onde a milhocina é concentrada (FILIPOVIC et al., 2002). Este subproduto é utilizado principalmente como alimento complementar na fabricação de ração para aves e ruminantes, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (AMARTEY ; LEUNG, 2000).

A composição da milhocina é variável e complexa e depende da origem da matéria-prima e de seu processamento, mas de uma maneira geral ela apresenta uma grande quantidade de aminoácidos, vitaminas e polipeptídios, que são excelentes fontes de nitrogênio (LIU et al., 2015). Chiani et al. (2010) relatou que a milhocina possui tipicamente 525g/kg de matéria seca, das quais 205/kg são equivalentes à proteína, 10g/kg de fibras, 88g/kg de cinzas, 130-220g/kg de carboidratos e uma pequena quantidade de ácido sulfuroso (<0,01g/kg).

Este subproduto já foi descrito na literatura para a produção microbiológica de enzimas celulolíticas, produção de ácido succínico, ácido láctico e etanol (NASCIMENTO et al., 2009; LIU et al., 2010; SAXENA; TANNER, 2012). Nos últimos anos, a milhocina tem sido incluída como fonte de matéria orgânica para cultivo de microrganismos como fungos, bactérias e microalgas, visando as mais diversas aplicabilidades (VALDUGA et al., 2013; LIMA ; SAXENA; TANNER, 2012; SILVA et al., 2018).

- Soro de queijo

O soro de queijo é o líquido resultante da precipitação e remoção da caseína do leite no processo de fabricação do queijo (RIÑÑO et al., 2016). Este subproduto constitui um sério problema ambiental devido à sua alta carga orgânica, com uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) = 60 - 80 g/L e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) = 30 - 50 g/L (ABREU et al., 2012), enquanto os valores limites para lançamento de efluentes são de 120 - 150 mg/L para DQO em determinados países (IBAMA, 2008) e 10mg/L para DBO (CONAMA, 2005). Seus principais constituintes são a lactose (4,5-5% p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v), lipídios (0,4-0,5% p/v), sais minerais (8-10% do extrato seco), ácido lático e ácido cítrico (0,05% p/v), compostos não-proteicos nitrogenados (ureia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (SISO, 1996).

Aproximadamente 9L de soro de queijo são gerados a cada kilograma de queijo produzido (KOUSHKI et al., 2012). Segundo a Associação Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ), em 2015, o Brasil produziu 1,105 milhão de toneladas de queijo, o que corresponde a uma produção de 9,945 milhões de toneladas de soro de queijo. Para minimizar a quantidade de soro a ser descartado anualmente, diferentes estratégias foram desenvolvidas e adotadas visando à produção de energia ou bens com altos benefícios. Essas ações transformam o soro de queijo em um subproduto de interesse e ao mesmo tempo geram efluentes de baixa carga de carbono para reduzir o impacto ambiental (PRAZERES et al., 2012).

A digestão anaeróbica do soro é um tipo de solução para este subproduto em fábricas de laticínios de pequeno e médio porte, no entanto os efluentes anaeróbicos ainda apresentam altas concentrações de nitrogênio e fósforo, que requerem um tratamento adicional (PRAZERES et al., 2012; WANG et al., 2010b). O cultivo de microrganismos com soro de queijo apresenta-se como uma alternativa para a redução das taxas de nutrientes, além da presença do dissacarídeo lactose, que faz deste resíduo uma interessante fonte de carbono para estes seres. Na literatura o soro já é utilizado para o cultivo de microalgas (RIÑÑO et al., 2016; SALATI et al., 2017), bactérias (AMADO et al., 2016; COLOMBO et al., 2016) e leveduras (DAS et al., 2016; CAROTA et al., 2017), visando a produção de compostos de interesse.

- Vinhaça

A vinhaça é um subproduto proveniente da calda na destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar. Ela é produzida em muitos países como o principal subproduto da produção de álcool, e sua composição depende do tipo de matéria-prima utilizada, como a cana-de-açúcar na América do Sul, ou a beterraba na Europa (SILVA et al., 2007). O Brasil é o maior produtor de álcool proveniente de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção aproximada de 30 bilhões de litros em 2015/2016 (EPE, 2016), e para cada litro de álcool gerado são produzidos 10-13 litros de vinhaça (EMBRAPA, 2016).

A vinhaça é tipicamente ácida (pH = 3,5 – 5), de cor marrom escura, com uma alta carga orgânica (DQO = 50 – 150 g/L) e alta carga de potássio (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; SILVA et al., 2014). A carga orgânica da vinhaça provoca a proliferação de microrganismos que esgotam o oxigênio dissolvido na água, matam animais e plantas aquáticas e tornam os corpos de água contaminados mais difíceis de serem usados como fontes de água potável. Além disso, a descarga de vinhaça em ambientes aquáticos contribui para a disseminação de doenças endêmicas como a malária, amebíase e esquistossomose (LAIME et al., 2011), pela ausência de predadores e/ou vetores naturais (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Normalmente a vinhaça é utilizada para irrigação e fertilização de solos, devido à grande quantidade de nutrientes e matéria orgânica. No entanto, a presença de compostos fitotóxicos, antibacterianos e recalcitrantes como fenóis, polifenóis e metais pesados, causa efeitos indesejáveis sobre microrganismos e plantas em áreas de descarte (PANT; ADHOLEYA, 2007). Conseqüentemente, a vinhaça representa um potencial poluente para os corpos de água e solo quando descarregada inadequadamente em rios e lagos sem tratamento prévio.

Uma variedade de tecnologias, muitas delas baseadas no possível uso da vinhaça como um subproduto com aplicações potenciais, estão sendo avaliadas a fim de mitigar o seu impacto ambiental. Colin et al. (2016) utilizou vinhaça para produzir bioemulsificante através da actinobactéria *Streptomyces* sp. A cianobactéria *Spirulina maxima* foi cultivada com vinhaça para obtenção de grande quantidade de biomassa e produção de proteínas (SANTOS et al., 2016). Nair e Taherzadeh (2016) cultivaram duas espécies de fungos filamentosos em vinhaça para avaliação da produção de etanol e biomassa rica em proteínas. A utilização de vinhaça como matéria-prima para obtenção de produtos microbiológicos de interesse biotecnológico é uma prática

promissora que reduz os custos de produção e simultaneamente diminui o volume deste subproduto (APARICIO et al., 2017).

2.1.2 *Chlorella vulgaris* como fonte de produtos bioativos

A composição química de *C. vulgaris* indica que esta microalga possui uma variedade de nutrientes essenciais como vitaminas, minerais, proteínas, carboidratos, fibras dietéticas e ácidos nucleicos (SEO-HYEON et al., 2011). Esta microalga possui cerca de 42-58% de proteínas em seu peso seco, e este valor varia de acordo com as condições de crescimento (SAFI et al., 2014). Análises fitoquímicas revelam a presença de compostos como flavonóides, taninos, compostos fenólicos, terpenos e saponinas (SYED et al., 2015).

Os compostos bioativos de *C. vulgaris* já foram utilizados para as mais diversas aplicações na área médica: atividade antimicrobiana contra *Klebsiella* sp., atividade antiulcerogênica contra úlceras pépticas, atividade antineoplásica em modelos de câncer de mama, redução de glicose e lipídios em ratos obesos e atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (SYED et al., 2015; VINAGRE, 2005; KUBATKA et al., 2015; NOGUCHI et al., 2013; LIN et al., 2018).

Esta microalga é uma rica fonte de antioxidantes, como luteína e caroteno, ácido ascórbico e tocoferol (RODRIGUEZ-GARCIA; GUIL-GUERRERO, 2008). Estudos utilizando *C. vulgaris* demonstram excelentes resultados para atividade antimicrobiana, atividade antineoplásica em modelos de câncer de mama, redução de glicose e lipídios em ratos obesos, atividade anti-hipertensiva, atividades de proteção contra tumores, dentre outros (SYED et al., 2015; KUBATKA et al., 2015; NOGUCHI et al., 2013; SHEIH et al., 2009; RAMOS et al., 2010).

Panahi et al. (2012) relataram que a suplementação da dieta de pacientes com doença hepática não-alcoólica com *C. vulgaris*, reduziu o nível de transaminases e triglicérides e aumentou a sensibilidade à insulina, mostrando-se ser um suplemento hepatoprotetor. Outros estudos também associam os extratos de *C. vulgaris* à melhorias dos sintomas físicos e cognitivos da depressão, redução de impacto dos fatores de stress no eixo hipotalâmico e inibição de mediadores pró-inflamatórios (PANAHI et al., 2015; QUEIROZ et al., 2016; SIBI ; RABINA, 2016). Além disso, pesquisas apontam esta microalga como fonte de compostos que podem ser

utilizados no tratamento quimioterápico de leucemia (EBRAHIMINEZHAD, et al., 2014).

2.2 REPARO POR CICATRIZAÇÃO

As feridas se caracterizam por lesões de um tecido através de um trauma químico, físico, mecânico ou por afecções clínicas. Elas podem ser classificadas como agudas ou crônicas, considerando-se o tempo necessário para que haja reparação tecidual, sendo as agudas de tempo estabelecido e sem complicações, e as crônicas de tempo de reparo indefinido (BLANES, 2004). A cicatrização de feridas pode ocorrer por primeira intenção, quando se trata da morte de um número limitado de células do tecido epitelial e conjuntivo através de uma incisão cirúrgica; ou por segunda intenção, quando há perda excessiva de células e tecido (KUMAR et al., 2010).

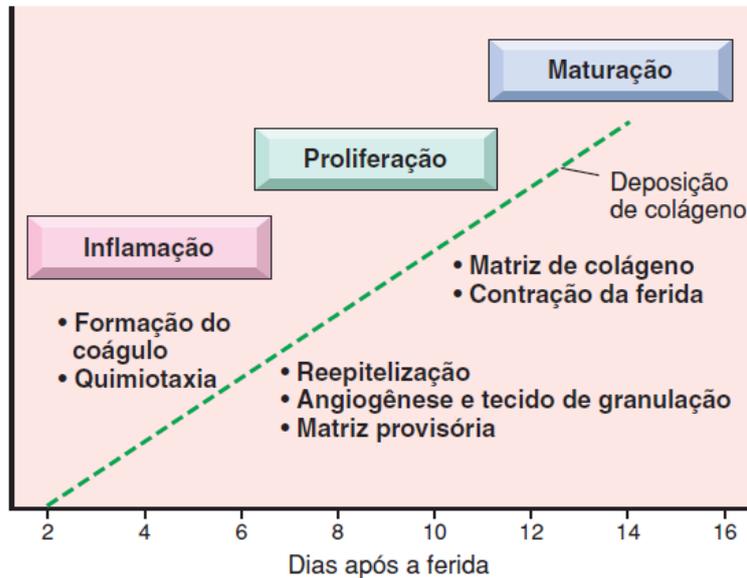
Entende-se por cicatrização o processo pelo qual um tecido lesionado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, sendo a lesão de origem necrótica ou traumática. Este fenômeno complexo e ordenado envolve diferentes processos, tais como: indução de um processo inflamatório em resposta à lesão inicial, com remoção de tecido danificado ou morto; proliferação e migração de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas; formação de novos vasos sanguíneos e tecido de granulação; síntese de proteínas da matriz extracelular (MEC) e deposição de colágeno; remodelação tecidual; contração da ferida e aquisição de resistência da ferida (PANOBIANCO et al., 2012; KUMAR et al., 2010).

Existem diversos fatores que influenciam no processo de reparação tecidual: o ambiente e a extensão do dano tecidual, a intensidade e duração do estímulo, as condições de inibição (p. ex. presença de corpos estranhos), ou se o paciente é acometido com alguma doença como diabetes e/ou tratamento com esteroides. A reparação consiste em uma perfeita cascata de eventos celulares e moleculares interligados que objetivam reconstruir o tecido lesionado. Este evento envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos de forma harmoniosa e organizada (KUMAR et al., 2010, MANDELBAUM et al., 2003).

Normalmente o processo de reparo por cicatrização é dividido em três fases: (1) fase inflamatória, (2) fase proliferativa e (3) fase de maturação (ou fase de

remodelação) (Figura 2). Na realidade estas fases se sobrepõem, porém esta divisão ajuda a compreender a sequência de eventos do processo (KUMAR et al., 2010).

Figura 2: As fases de cura de feridas cutâneas: inflamação, proliferação e maturação.



Fonte: Kumar et al. (2010).

2.2.1 Fases do processo de cicatrização

- Fase inflamatória

Inicialmente a lesão provoca agregação das plaquetas, formando um coágulo na superfície da ferida, levando à inflamação. Este coágulo é formado por hemácias, fibrina, fibronectina, e componentes do sistema complemento, e funciona como um arcabouço para as células em migração, as quais são atraídas por fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas liberadas na área. Dentro de 24 horas após a lesão, os neutrófilos aparecem nas bordas da ferida e migram para o coágulo, usando o arcabouço produzido pela fibrina. Através de enzimas proteolíticas, esses neutrófilos removem restos necróticos e bactérias (KUMAR et al., 2010; WERNER; GROSE, 2003).

Simultaneamente, a vasodilatação faz com que as vênulas liberem um líquido contendo substâncias vasoativas, fatores de crescimento, enzimas e proteínas adesivas, resultando em uma tumefação das células do endotélio celular. A presença

de eritema, edema, calor e dor são características da fase inflamatória. Ao mesmo tempo inicia-se a resposta celular representada pela ação dos neutrófilos e macrófagos (MARTIN; LEIBOVICH, 2005; PELED et al., 2000).

Além dos neutrófilos outras células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos estão presentes nessa fase. Os PMN realizam a fagocitose de bactérias no local da lesão, durante um período de aproximadamente 3-5 dias. Os macrófagos permanecem no local da infecção por um período mais extenso, do 3º ao 10º dia, fagocitando bactérias, removendo corpos estranhos e direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (PETROVA, 1992; BROUGHTON, 2006).

- Fase proliferativa

Uma das principais características da fase proliferativa é a formação de um tecido granular, róseo, edemaciado e macio na superfície das feridas, o tecido de granulação, que indica o início do reparo tecidual. Este tecido apresenta novos e pequenos vasos sanguíneos e a proliferação dos fibroblastos. A epitelização, angiogênese e deposição de colágeno também são etapas decorrentes desta fase (KUMAR et al., 2010; LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

Após a lesão, as células mesenquimatosas indiferenciadas transformam-se em fibroblastos migratórios, substituindo a matriz extracelular por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico; a este processo dá-se o nome de fibroplasia, e para sua eficiência é indispensável a formação de novos vasos na região. A angiogênese é um processo fundamental que afeta reações fisiológicas, como a cura de feridas, sendo essencial porque permite a troca gasosa e a nutrição das células metabolicamente ativas. Embora exista uma diversidade de fatores que influenciam a angiogênese, o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) é o mais importante nos tecidos adultos que sofrem neovascularização em uma lesão tecidual (JOHNSTON, 1981; SILVER, 1982).

Por volta do 2º-4º dia após a lesão os neutrófilos são substituídos pelos macrófagos, que removem resíduos extracelulares, fibrina e outros materiais estranhos do local de reparo e promovem angiogênese e deposição de MEC (matriz extracelular). A proliferação dessas células é influenciada por diversos fatores de

crescimento como TGF- β (fator transformador de crescimento- β), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), as citocinas IL-1 (interleucina 1) e TNF (fator de necrose tumoral), dentre outros. Os macrófagos também influenciam na epitelização, estimulando a produção pelos fibroblastos de FGF-7 (fator de crescimento de queratinócito) e IL-6, que aumentam a migração e a proliferação de queratinócitos (KUMAR et al., 2010).

Em 24 a 48 horas grupos de células epiteliais deslocam-se da borda da ferida ao longo das margens depositando componentes da membrana basal. Elas se unem abaixo da crosta, na linha média, produzindo uma fina camada epitelial que inicia o fechamento da ferida. Alguns fatores de crescimento promovem o aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio (CHRISTOPHER, 1972; GRINNELL, 1992; WERNER; GROSE, 2003). A epitelização ocorre de maneira mais eficaz em meio úmido, onde o movimento dos queratinócitos migrantes é determinado pelo conteúdo de água no leito da ferida. Feridas abertas e ressecadas levam mais tempo para serem ocluídas (BRUIN et al., 1990; WINTER, 1962).

Durante a segunda semana há uma redução do infiltrado leucocitário e do edema, além de uma redução da neovascularização. O aumento do acúmulo de colágeno na área da ferida e a regressão dos canais vasculares transformam o tecido de granulação em uma cicatriz avascular e pálida, constituída por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tecido elástico e outros componentes da MEC (KUMAR et al., 2010).

- Fase de maturação (Remodelação)

No começo desta etapa, o TGF- β estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e se transformarem em miofibroblastos, promovendo a contração da ferida. O colágeno mais abundante produzido inicialmente é o de tipo III, mais fino que o colágeno presente normalmente na pele, e de orientação paralela a esta. O colágeno tipo III vai sendo degradado com o decorrer do tempo, enquanto o tipo I é produzido em maior quantidade pelos fibroblastos. Concomitantemente ocorre uma reorganização das fibras colágenas, as quais se tornam entrelaçadas e organizadas (BROUGHTON et al., 2006; SINGER; CLARK, 1999).

Esta reorganização da nova matriz é um processo importante para o sucesso da cicatrização. Células fibroblásticas e leucocitárias secretam colagenase, uma metaloproteinase de matriz, promovendo a lise da matriz antiga; as colagenases e seus inibidores são fundamentais no desbridamento de locais lesados e no remodelamento do tecido conjuntivo necessário para reparar a ferida. Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparece, observando-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando o tecido cicatricial (BROUGHTON et al., 2006; BALBINO et al., 2005).

A última fase do processo de cicatrização é responsável pelo aumento da resistência do local danificado. As fibras colágenas tipo I são fundamentais para a formação do tecido conjuntivo nos locais de reparo e são essenciais para o desenvolvimento da força tênsil nas feridas em cicatrização. A resistência da ferida aumenta gradativamente durante as quatro semanas seguintes, e a recuperação da força tênsil é resultante de uma crescente síntese de colágeno, mais abundante que sua degradação, durante os primeiros dois meses e posteriormente de modificações estruturais das fibras colágenas, como ligação cruzada e aumento do tamanho destas, quando a síntese é finalmente cessada (KUMAR et al., 2010).

2.3 PRODUTOS CICATRIZANTES OBTIDOS DE FONTES NATURAIS

O mercado global de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 20 bilhões, do total de US\$ 320 bilhões em vendas anuais de produtos farmacêuticos, e está em constante ascensão, devida à incessante busca por melhor qualidade de vida. De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa), em 2015 o Brasil teve um aumento de 8% no mercado de fitoterápicos, comparado com 6,1% em 2014, o que comprova o crescente consumo destes tipos de fármacos, incluindo os que possuem ação cicatrizante (GUIA DA FARMÁCIA, 2016).

Produtos oriundos de animais e plantas medicinais são utilizados mundialmente desde a antiguidade para o tratamento de diversas enfermidades humanas, como a cicatrização de feridas. Os registros mais antigos citam manuscritos egípcios, datados de 3000-2500 a.C., que descrevem o uso de curativos utilizando mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos (ZIMMERMAN; VEITH, 1961). Durante a

Segunda Guerra Mundial (1939-1945), iniciou-se o uso de substâncias antissépticas e os agentes com ação antimicrobiana, utilizando-se procedimentos com a proteção das feridas com coberturas secas, através de curativos que consistiam basicamente de gaze seca, fixada com espessa camada de fitas adesivas (SINCLAIR; RYAN, 1993).

Apenas na década de 1960, Winter realizou um estudo demonstrando que um ambiente úmido era capaz de promover uma taxa de epitelização 50% mais rápida do que o seco, além de minimizar a formação de crostas, promovendo assim um maior interesse no desenvolvimento de pesquisas, produção e comercialização desse tipo de recurso (WINTER, 1962). Posteriormente, diversas agências e órgãos começaram a coordenar os estudos que estabelecessem critérios para a avaliação adequada do tratamento de feridas, buscando reunir as melhores evidências sobre as tecnologias, os materiais e procedimentos (MANDELBAUM et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, feridas e doenças de saúde de pele são comuns entre a população de muitos países em desenvolvimento (OMS, 2005; 2010). A administração e o tratamento de feridas crônicas, incluindo úlceras venosas de perna e úlceras de pressão, têm sido relatados a um custo de 2-3% dos orçamentos de saúde nos países desenvolvidos e afetam milhões de pessoas anualmente (FRYKBER ; BANKS, 2015; GUEST et al., 2015). Estes números estão crescendo rapidamente em todo o mundo devido ao aumento do envelhecimento da população e uma acentuada e crescente incidência de patologias associadas (BUDOVSKY et al., 2015).

As feridas representam um fator de risco significativo para hospitalização, amputação, sepse e até mesmo a morte, e do ponto de vista do paciente a maioria dos tratamentos utilizados é frequentemente desconfortável ou doloroso (GREGOR et al., 2008). Dor permanente, sofrimento, incapacidade, perda de autoestima, isolamento social, gastos, afastamento do trabalho, alterações psicossociais de seus portadores e grupo familiar, além de baixa qualidade de vida, especialmente na população de adultos mais velhos - uma vez que a cicatrização é um processo relacionado à idade - são alguns dos problemas enfrentados por pacientes que sofrem com feridas, principalmente as do tipo crônicas (ABREU et al., 2013; GOULD et al., 2015).

Muitos fatores podem influenciar a cicatrização de feridas como diabetes mellitus, traumatismos, insuficiência renal e hepática, tabagismo, dentre outros, assim a maioria das tentativas de tratamento são insatisfatórias (TAZIMA et al., 2008). Os agentes terapêuticos atuais, na sua maioria drogas sintéticas, possuem geralmente uma eficácia inadequada, e os efeitos colaterais são frequentemente associados; sendo assim, a busca por agentes naturais surge como uma estratégia de alternativa para o tratamento de feridas (BUDOVSKY et al., 2015).

Em particular, compostos naturais como alcaloides, óleos essenciais, flavonoides, taninos, terpenóides, saponinas, ácidos graxos e outros fenóis utilizados em vários estudos têm demonstrado o efeito de produtos naturais na cicatrização de feridas e os mecanismos moleculares envolvidos na ação farmacológica da cicatrização (BAHRAMSOLTANI et al., 2014). Para enfrentar diversos desafios que envolvem o processo de cicatrização, os compostos naturais interferem em diferentes vias de sinalização celular, a fim de reduzir ou induzir mecanismos celulares diferentes através da modulação de diversos fatores de crescimento. Esses compostos são capazes de regular expressões gênicas para alterar atividades celulares como migração celular, deposição de MEC e o sucesso final da regeneração tecidual (ZHANG et al., 2012).

Devido ao elevado potencial da utilização de produtos naturais para a promoção da cicatrização, há uma série de estudos em andamento com a finalidade de identificar e isolar materiais para a cura de feridas. Polímeros naturais ativos como polissacarídeos e diferentes tipos de proteínas já são utilizados em aplicações na engenharia de tecidos (KIM et al., 2011). Diante disso, e das necessidades do mercado farmacêutico, os agentes cicatrizantes de feridas originados de produtos naturais, usados na medicina tradicional, avançaram abundantemente nas pesquisas acadêmicas e são um interesse principal da indústria de medicamentos (BUDOVSKY et al., 2015; MAVER et al., 2015).

2.4 ALGAS E MICROALGAS COM POTENCIAL USO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS CICATRIZANTES

Os organismos fotossintetizantes são seres autotróficos que convertem energia solar em energia química; dentro deste grande grupo estão incluídas as algas e microalgas. As algas apresentam um alto valor agregado: possuem carotenóides, proteínas, ácidos graxos essenciais, fibras dietéticas, vitaminas (C, D, E, K e do complexo B) e minerais (ROCHA et al., 2011). Além de potencial nutritivo, também são fonte de compostos bioativos, muitos deles candidatos a serem utilizados como fármacos (WIJESEKARA et al., 2010; NAMVAR et al., 2014).

As microalgas apresentam em sua composição esteróis, carotenóides, ácidos graxos poliinsaturados, compostos fenólicos e alcalóides (CARDOZO et al., 2007; PLAZA et al., 2009; GÜVEN et al., 2010). Existem inúmeras vantagens em se trabalhar com microalgas: são capazes de utilizar tanto carbono inorgânico como orgânico, podem ser produzidas de forma contínua, ocupam áreas pequenas de cultivo, podem ser manipuladas geneticamente visando à obtenção da composição nutricional desejada, não estão sujeitas às variações ambientais e apresentam tempo de geração curto quando comparados às células vegetais (BENEMANN, 1990).

Os estudos que utilizam compostos provenientes de algas e microalgas para cicatrização ainda são escassos na literatura, porém se apresentam como promissores candidatos a medicamentos cicatrizantes e/ou matéria-prima para confecção de curativos. Nascimento-Neto et al. (2012) avaliaram o potencial cicatrizante de uma lectina extraída da alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* e observaram propriedades pró-cicatrizantes em feridas agudas em camundongos. Polissacarídeos sulfatados extraídos das algas *Padina tetrastromatica* e *Padina boergesenii* demonstraram-se eficazes na formação de colágeno e regeneração da pele quando aplicados em feridas de ratos (KORDJAZI et al., 2013).

O alginato proveniente de diferentes espécies de algas marrons como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria japonica* é utilizado há várias décadas na forma de fibras para fabricação de curativos ou na forma de hidrogéis auxiliando o processo de cicatrização de feridas exsudativas (SMIDSRØD et al., 1990). Pietramaggiore et al. (2008) relatou o uso de um polímero (poli-N-acetilglicosamina) extraído de uma microalga utilizado como curativo para feridas e queimaduras. Um curativo composto de quitosana e fucoidan, um polissacarídeo sulfatado, extraídos da macroalga *Fucus vesiculosus* apresentou uma excelente regeneração dérmica, reepitelização e rápido fechamento da ferida em queimaduras

superficiais de coelhos (SEZER et al., 2007). O extrato bruto da alga marinha *Eucheuma cottonii* apresentou uma rápida contração da ferida, epitelização e crescimento do pelo em ratos machos (FARD et al., 2011).

A microalga *C. vulgaris* já foi relatada na literatura sendo utilizada por tribos como agente anti-inflamatório para o tratamento de queimaduras (NAMSA et al., 2009). Salman et al. (2007) observaram que a adição do extrato metanólico de *C. vulgaris* na alimentação de ratos desnutridos submetidos à anastomose colônica promoveu uma cicatrização pós-operatória mais rápida. Cães da raça beagle com dermatite crônica foram alimentados com o pó de *C. pyrenoidosa* e apresentaram melhoras na cicatrização das áreas afetadas (CHUBACHI et al., 2009). *Chlorella* sp. foi administrada por via oral e aplicação cutânea para o tratamento de uma inflamação crônica na pele e para a cicatrização de feridas em camundongos, respectivamente; e apresentou melhoras significativas em ambas as análises (HIDALGO-LUCAS et al., 2014).

Devido às promissoras propriedades bioativas dos compostos presentes em algas e microalgas, outros estudos ainda devem ser realizados para obter compostos que possam auxiliar no processo de cicatrização de feridas. A alta competição existente no ambiente aquático proporciona às algas e às microalgas mecanismos de defesa que resultam em uma variedade de compostos produzidos através de diversas vias metabólicas. Isto faz desses seres, organismos promissores como fonte de novos compostos biologicamente ativos, que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (MARINHO-SORIANO et al., 2011).

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1 - CULTIVO MIXOTRÓFICO DE *CHLORELLA VULGARIS* AUMENTOU A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E REDUZIU A TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS



Artigo publicado no periódico Chemosphere
Fator de Impacto: 4,427 e classificação Qualis A2



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Chlorella vulgaris mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products



Rebeca Gonçalves de Melo ^a, Alexandra Frazão de Andrade ^b, Raquel Pedrosa Bezerra ^b, Dominick Spindola Correia ^c, Vanessa Cristina de Souza ^c, Ana Christina Brasileiro-Vidal ^c, Daniela de Araújo Viana Marques ^d, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^{a, b, *}

^a Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Avenue Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

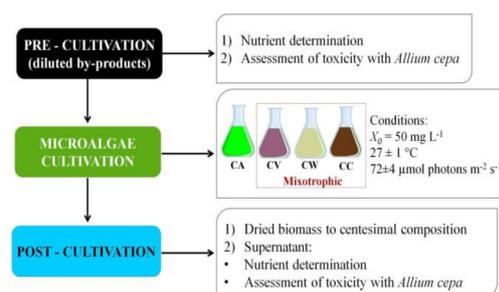
^c Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Avenue Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^d University of Pernambuco, Serra Talhada Campus, Avenue Afonso Magalhães, AABB, 56912-380 Serra Talhada, PE, Brazil

HIGHLIGHTS

- Toxicity of corn steep liquor and cheese whey was reported for the first time.
- Corn steep liquor toxic power was totally eliminated after microalgae treatment.
- Total phosphorus was completely removed in all treated groups.
- *C. vulgaris* is a great alternative for agroindustrial by-products biotreatment.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 January 2017
Received in revised form
5 March 2018
Accepted 7 April 2018

Handling Editor: A Adalberto Noyola

Keywords:
Chlorella vulgaris
Cheese whey
Corn steep liquor
Vinasse
Toxicity

ABSTRACT

Algal wastewater remediation has become attractive for a couple of years now, however the effectiveness of genetic toxicity reducing of some by-products through microalgae are still not well reported. This study aimed to evaluate the growth, nutrients and toxicity removal of *Chlorella vulgaris* cultivated under autotrophic and mixotrophic conditions in three agro-industrial by-products. Mixotrophic culture using corn steep liquor showed higher cell concentration, specific growth rate, maximum cell productivity and biomass protein content when compared to cheese whey and vinasse. Nutrient removal results showed that *C. vulgaris* was able to completely remove corn steep liquor nutrients, while in cheese whey and vinasse culture this removal was not as efficient, observing remaining COD. This work evaluated for the first time the corn steep liquor and cheese whey genetic toxicity through *Allium cepa* seeds assay. These results demonstrate that corn steep liquor toxicity was totally eliminated by *C. vulgaris* cultivation, and cheese whey and vinasse toxicity were minimized. This study proves that the mixotrophic cultivation of *C. vulgaris* can increase cellular productivity, as well as it is a suitable and economic alternative to remove the toxicity from agroindustrial by-products.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil.
E-mail address: ana.porto@pq.cnpq.br (A.L.F. Porto).

1. Introduction

Agro-industry by-products are one of the largest sources of wastes produced in the world, which depend of raw material type used and technology processing. When discarded in the environment, these by-products release a large amount of nutrients such as nitrogen and phosphorus, which are considered inorganic pollutants. On the other hand, these nutrients could be an alternative culture medium for microalgae production (Mirzaie et al., 2015; Calixto et al., 2016). Some agricultural industry with pollution potential can be highlighted as cheese whey, corn steep liquor and vinasse.

Cheese whey is the main pollutant from cheese production. For each 10 L of milk used by cheese making, about 9 L of cheese whey are produced. In 2016, 19,391 million tons of cheese were produced in the world with about 174,519 million tons of cheese whey released (USDA, 2017a). Cheese production tends to increase, consequently the high amount of cheese whey released becomes a problem since it cannot be discarded in the rivers due to its high levels of Chemical Oxygen Demand ($COD = 60\text{--}80\text{ g L}^{-1}$) and Biochemical Oxygen Demand ($BOD = 30\text{--}50\text{ g L}^{-1}$) (Abreu et al., 2012).

Corn steep liquor is a typically viscous liquid mixture from the corn wet milling industry, from global corn production of 963.3 million tons estimated for 2016/17 (USDA, 2017b). This has high amounts of amino acids, vitamins, polypeptides, reducing sugars, organic acids and minerals, being source of organic nitrogen (Chiani et al., 2010) and has been used as an inexpensive nutrient for the microbial production of enzymes (Zheng et al., 2012), solvents and organic acids, including succinic acid (Xi et al., 2013).

For each 1 L of sugarcane alcohol produced, about 13 L of vinasse are discarded. In Brazil, the largest producer of sugarcane alcohol worldwide, approximately 28 billion liters of alcohol were produced in 2016 (EPE, 2016) and 364 billion liters of vinasse were generated. Vinasse has a high pollution potential, approximately one hundred times more than household sewage, due to its high organic matter content. It causes depletion of oxygen, low pH and high corrosivity (Kannan and Upreti, 2008). Therefore, it is necessary to find adequate uses and treatments for this by-product.

These three by-products are produced in large quantities and require a correct destination before being released in the environment. Therefore, microalgae cultivation offers a solution to reduce nutrients, such as nitrogen and phosphorus, which can otherwise lead to risks of ecosystem damage and downstream eutrophication. In addition, microalgal-based wastewater treatment requires low costs, low energy, no use hazardous chemicals and simultaneously produces high-added value algal biomass (Batista et al., 2015). Microalgae of genus *Chlorella* sp. is widely used to remove nutrients and reduce toxicity from different by-products types and wastewaters (Franchino et al., 2016; Dahmani et al., 2016). The aim of this study was to evaluate the cell growth, nutrients and toxicity removal of the microalgae *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 in three types of agro-industrial by-products.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

The freshwater microalgae *C. vulgaris* (UTEX, 1803) used in this study was obtained from the culture collection of Texas University (Austin, TX).

2.2. Agro-industrial by-products

2.2.1. Cheese whey

Cheese whey was supplied by a cheese factory from Nazaré da

Mata, Pernambuco, Brazil. It was deproteinised by heat treatment through sterilization at 121 °C, for 20 min and cooled to room temperature at ± 27 °C. Lactose concentration was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC), according Erich et al. (2012).

2.2.2. Corn steep liquor

Corn steep liquor was obtained from CornProducts Brazil, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil. The pH 8.0 was adjusted with KOH and autoclaved 121 °C, for 20 min. It was centrifuged at 430 × g, 5min (Hermle Labortechnik 326 HK, Wehingen, Germany) and the supernatant was collected for use (Liggett and Koffler, 1998).

2.2.3. Vinasse

Vinasse was supplied by Usina Bom Jesus S/A, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil. The treatment was performed through according Bonini (2012).

2.3. Media and culture conditions

Microalgae were pre-inoculated in 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of Bold's Basal Medium (BBM) (Bischoff and Bold, 1963). The cultures were divided in autotrophic using BBM as standard medium, and mixotrophic were supplemented with different by-products: 1% corn steep liquor (Silva et al., 2017); cheese whey with initial lactose concentration about 10 g L^{-1} (Abreu et al., 2012); or 2% vinasse (preliminary tests described in item 3.1). The microalgae were inoculated in 400 mL in 1 L Erlenmeyer flasks with an initial biomass concentration of 50 mg L^{-1} , temperature of 27 ± 1 °C, light intensity of $72 \pm 4\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, under constant aeration. The initial cultures pH were adjusted to 6.8 and this parameter was monitored every two days (Hanna Instruments, Woonsocket, USA).

After reach the stationary growth phase, about 14 days, the cultures were centrifuged at 430 × g for 10 min (Hermle Labortechnik 326 HK, Wehingen, Germany). Biomass were lyophilized (SP Scientific BenchTop Pro, Warminster, USA) for analysis of centesimal composition and the supernatant were utilized to nutrient determination and toxicity assay.

2.4. Determination of microalgae cell concentration

Cell concentration was determined by optical density (OD) at 685 nm (Xu et al., 2008) (FEMTO 700 Plus, São Paulo, Brazil) and expressed in g L^{-1} through a calibration curve relating OD to dry biomass weight.

2.5. Kinetic parameters of *C. vulgaris* growth

2.5.1. Biomass productivity

Maximum biomass productivity (P_{max} , $\text{g L}^{-1}\text{ day}^{-1}$) was calculated from the Eq. (1), where X_0 = initial biomass (mg L^{-1}); X_i = biomass at time i (mg L^{-1}) and t_i = time interval (day) between X_0 and X_i .

$$P_{\text{max}} = (X_i - X_0) / t_i \quad (1)$$

2.5.2. Specific growth rate

Specific growth rate (μ , day^{-1}) was calculated by Eq. (2), where X_0 and X_i were the concentration of cells at the beginning (t_1) and at the end (t_2) of the exponential growth phase, respectively

$$\mu = (\ln X_i - \ln X_0) / (t_2 - t_1) \quad (2)$$

2.6. Biomass composition

Proteins, carbohydrate, lipids and ash in dried biomass were determined by standard AOAC (1995) methods. Protein content was determined by micro-Kjeldahl method ($6.25 \times N$). The lipids were extracted by Soxhlet extractor (TECNAL-TE-044, São Paulo, Brazil) using chloroform:methanol (Piorreck et al., 1984). The ash content was obtained by calcinations in a muffle furnace at 550 °C for 4 h. Carbohydrate content was determined as the weight difference using protein, lipid and ash content data.

2.7. Nutrient determination

Nutrient contents were determined on the initial and final day of the experiment. Supernatant was analyzed for TN (total nitrogen), NH_3 (ammoniacal nitrogen), organic-N, NO_2 (nitrite), NO_3 (nitrate), TP (total phosphorus) and COD concentration (APHA, AWWA, WEF, 2012). Removal efficiency (RE) and Elimination Capacity (EC) were estimated by Eq. (3) and Eq. (4) (Franchino et al., 2016):

$$\text{RE} = (C_i - C_n) / C_i \times 100 \quad (3)$$

$$\text{EC} = (C_i - C_n) / t_{n-i} \quad (4)$$

Where, C_i is the initial nutrient concentration, C_n is the final nutrient concentration, and t_{n-i} is the time elapsed between them.

2.8. Assessment of effluent toxicity – *Allium cepa* test system

Allium cepa cv. Vale Ouro - IPA 11 seeds were kindly provided by Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA, Recife, Brazil) and germinated in Petri dishes (50 seeds/dish; four dishes/treatment), containing filter paper moistened with 10 mL of the analyzed samples, at $\pm 27^\circ\text{C}$. Six treatments were tested: untreated cheese whey (UW), treated cheese whey (TW), untreated corn steep liquor (UC), treated corn steep liquor (TC), untreated vinasse (UV) and treated vinasse (TV). Distilled water was used as the negative control (NC). For genotoxicity assay, two positive controls were also included: the herbicide Trifluralin (TRI, 0.84 ppm, aneugenic activity) and Methyl Methanesulfonate (MMS, 4.10^{-4}M , clastogenic activity).

The toxicity, cytotoxicity and genotoxicity assays followed a completely randomized experimental design. For toxicity, the experimental unit consisted of one Petri dish with 50 seeds, with four repetitions per treatment, while for cytotoxicity and genotoxicity, it consisted of one slide (500 cells/slide), with six repetitions. After 72 h exposure period, *A. cepa* developed roots were fixed in ethanol:acetic acid solution (3:1) and stored at -20°C , and used to cytotoxicity and genotoxicity assays. Root tips were washed and hydrolyzed in 1 N HCl at 60°C for 10 min. The slides were prepared and stained according to Fernandes et al. (2009).

Toxicity was analyzed based on Germination Index (GI) of developed roots after 18 days of exposure period for each treatment analyzed using the follow equation:

$$\%GI = (\text{total number of germinated seeds} \times 100) / \text{total exposed seeds to treatment} \quad (5)$$

To assess the cytotoxicity and genotoxicity, Mitotic Index (MI)

and Genotoxic Index (Gel) were calculated, respectively, scoring 3000 meristematic cells (500 cells/slide; six slides per treatment) under a light microscope, using the followed equations (6) and (7):

$$\%MI = (\text{total number of mitotic cells} \times 100) / \text{total number of observed cells} \quad (6)$$

$$\%Gel = (\text{total number of chromosomal alterations} \times 100) / \text{total number of observed cells} \quad (7)$$

2.9. Statistical analysis

Data which showed homogeneity of variance were analyzed using ANOVA followed Tukey test ($p < 0.05$). For the non-parametric data (individual chromosomal or nuclear alterations) the Kruskal Wallis test was performed ($p < 0.05$). All the tests were carried out by Statistic 8.0.

3. Results and discussion

3.1. Growth of *C. vulgaris* in autotrophic and mixotrophic conditions

Preliminary tests using different concentrations of vinasse in *C. vulgaris* mixotrophic culture were carried out to determine the best concentration to be used in this work. Assays were performed using 0.5%, 1%, 2%, 4% and 6% of this by-product. Vinasse at 2% showed the highest cell concentration ($X_m = 0.77\text{ g L}^{-1}$) and biomass productivity ($P_{max} = 0.09\text{ g L}^{-1}\text{ day}^{-1}$) when compared with other concentrations. Therefore, it was chosen to carry out the other experiments.

The cell growth profile of the microalgae *C. vulgaris* in autotrophic (CA) and mixotrophic conditions using cheese whey (CW, 10 g L^{-1} of lactose), corn steep liquor (CC, 1%) and vinasse (CV, 2%) are shown in Fig. 1. Initially, the CW group did not present adaptation phase and showed a faster growth when compared to the others, remaining until the 6th day of growth. Probably lactose present in this type of medium may have proved to be an acceptable carbon source in initial phase of growth. In CC and CV groups it is possible to observe a higher adaptation phase until the 6th day in both cases, however in CA group this same phase remained until the 2nd day. Modifications in carbon supply, present in mixotrophic cultures, are influencing factors that can alter the microalgae

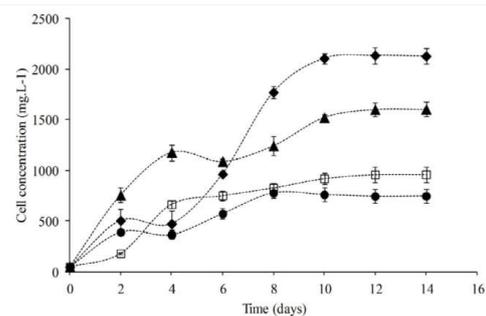


Fig. 1. Cellular growth of *Chlorella vulgaris* in autotrophic and mixotrophic conditions. (□) CA: Autotrophic culture; (▲) CW: 10 g L^{-1} of lactose; (◆) CC: 1% corn steep liquor; (●) CV: 2% vinasse. Data are expressed as mean \pm SD.

growth during their adaptation phase (Liao et al., 2018).

The presence of different types of by-products provided different values of cell concentration, maximum cell productivity and specific growth rate (Table 1). The maximum biomass concentration at the end of cultivation (X_m) in autotrophic cultivation was 0.91 g L^{-1} at 10th day, and under mixotrophic conditions were 2.10 g L^{-1} (CC) at 10th day, 1.60 g L^{-1} (CW) at 12th day and 0.77 g L^{-1} (CV) at 8th day with $p < 0.05$ for all results. The type of cultivation also influenced the results of P_{max} , obtaining different values for each by-product used: $0.08 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (CA), $0.12 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (CW), $0.20 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (CC) and $0.09 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (CV). The highest value of μ (0.38 day^{-1}) was achieved in the mixotrophic culture using corn steep liquor (CC). CV group had also high μ value (0.34 day^{-1}), while CW and CA obtained the same μ (0.29 day^{-1}). CC group showed the highest X_m , P_{max} and μ , with X_m values 2.3 times higher than that observed in autotrophic culture (CA) at the same time (10th day).

Culture medium supplemented with 1% corn steep liquor showed the highest values of X_m and P_{max} , being the best by-product as source of carbon and energy for *C. vulgaris*. Corn steep liquor has high amount of nitrogen, amino acids, vitamins, polypeptides, and biotin, providing a significant contribution to the nutritional requirement of microorganisms (Xi et al., 2013). These results agree with a previous study which reported that mixotrophic *C. vulgaris* growth in corn steep liquor yielded higher biomass content and productivity (Mirzaie et al., 2015).

Carbon source is very important for microalgae cultivation. In the present work, cheese whey with lactose in their composition had a good performance, but was not enough to promote high cellular concentration when compared to CC group which has high concentrations of protein and sugars (Chiani et al., 2010). Probably vinasse contains other types of residual sugars, such as sucrose and raffinose (Lappa et al., 2015), which were not sufficient to promote high cellular growth in this study.

3.1.1. Effect of pH

The pH of the culture medium is one of the most important factors in microalgae cultivation. Variations of pH can affect the distribution of carbon dioxide species and carbon availability, change the speciation and the availability of macro and micro-nutrients, induce direct physiological effects in the culture medium, and affect the cell metabolism and growth of the microalgae biomass (Mostafa et al., 2012).

A gradual increase in the pH was observed with cell growth (range of 6.8–9.7). The CA group pH rose more quickly than the other groups, because in this culture there is only inorganic carbon, consumed rapidly by the cells in form of HCO_3^- . Microalgae cells

preferentially uptake HCO_3^- over CO_2 , although it is a poor carbon source than CO_2 (Carvalho et al., 2006).

In mixotrophic cultures, organic carbon is assimilated through aerobic respiration and this phenomenon is influenced by the amount of available organic carbon in the culture medium (Hu et al., 2012). CC, CW and CV groups showed maximum pH values of 9.3, 8.3 and 8.1, respectively, results lower than those obtained by CA group (pH = 9.7) and were achieved in a longer period, proving that mixotrophic cultivation use simultaneously both inorganic and organic carbons producing OH^- and CO_2 as metabolites, inducing variations of pH values (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

3.2. Biomass centesimal composition of *C. vulgaris*

Changes in physiological conditions and culture medium composition are some alternatives used to modify microalgae biomass composition. In this study, analysis of different *C. vulgaris* biomass showed that each type of residue stimulated a different centesimal composition. The autotrophic culture showed values of 21.93% protein, 32% lipids, 39.34% carbohydrates and 6.73% ashes.

Cultivation using 1% corn steep liquor achieved the highest biomass protein content (43.33%), about twice higher than the other by-product values (CW: 23.20%; CV: 22.23%). This result is attributed to a large presence of proteins in this by-product (Chiani et al., 2010). Xie et al. (2017) reported that *C. vulgaris* synthesizes more protein when grown in environments rich in nitrogen and when the nitrogen is limited in culture medium, microalgae reduce their protein synthesis.

On the other hand, cheese whey culture obtained a result of carbohydrates (44.85%) higher than CA (39.34%) and CV (36.50%) groups, and twice higher than observed in CC group (25.41%). It can be explained due the presence of disaccharide lactose, the major component of this substrate (Abreu et al., 2012). These results differ from those reported by Salati et al. (2017) which cultivated *C. vulgaris* with cheese whey and did not obtain difference of carbohydrate contents between autotrophic and mixotrophic biomass. Cheese whey is a substrate with nitrogen limitation, promoting an accumulation of carbohydrates and other non-nitrogenous bio-compounds to microalgae biomass.

Chlorella vulgaris growth using 2% of vinasse obtained carbohydrates value of 36.50%, 22.23% of proteins, 32.82% of lipids and 8.45% of ashes. As CW group, vinasse promoted a larger concentration of carbohydrates. However, the sugars contained in this by-product were not sufficient to achieve a higher rate of carbohydrates than CW. Similar results to carbohydrate concentration were reported by Calixto et al. (2016), using the same by-product with *Chlamydomonas* sp. In relation of lipids content the microalgae *Neochloris oleoabundans* also presented lipids rates in the range of 21–38% when cultivated on anaerobic effluents of vinasse (Olguín et al., 2015).

3.3. Nutrient removal by microalgae mixotrophic cultivation

The steps of treatment and removal of nutrients from industrial waste are essential to reduce environmental impacts such as eutrophication as well as promoting a possible reuse of treated water. Removal Efficiency (RE) in *C. vulgaris* mixotrophic cultivation with cheese whey with 10 g L^{-1} of lactose, 1% corn steep liquor and 2% vinasse were shown Fig. 2.

Most of nitrogen present in by-products was in the form of NO_3^- (nitrate) and TN (Table 2). If ammonium, nitrate or nitrite are present in the culture medium, microalgae will primarily use ammonium until depletion, and then the remaining forms, nitrite followed by nitrate (Abdelaziz et al., 2013). In this study, NO_3^- was completely removed in all growth conditions (RE = 100%) by the

Table 1
Growth parameters of *Chlorella vulgaris* cultivated under autotrophic and mixotrophic conditions.

Growth condition	Growth parameter		
	X_{max}^a (g L ⁻¹)	μ_{max}^b (day ⁻¹)	P_{max}^c (g L ⁻¹ day ⁻¹)
CA	0.91 ± 0.02^c	0.29 ± 0.00^c	0.08 ± 0.02^c
CW	1.60 ± 0.01^b	0.29 ± 0.02^c	0.12 ± 0.01^{ab}
CC	2.10 ± 0.01^a	0.38 ± 0.01^a	0.20 ± 0.02^a
CV	0.77 ± 0.03^d	0.34 ± 0.01^b	0.09 ± 0.02^{bc}

CA: *C. vulgaris* autotrophic; CW: *C. vulgaris* + cheese whey; CC: *C. vulgaris* + corn steep liquor; CV: *C. vulgaris* + vinasse.

Data are expressed as mean \pm SD. Tukey test was performed.

Means in the same column followed by different letters represent significant differences ($p < 0.05$).

^a X_{max} = Maximum biomass concentration.

^b μ_{max} = Specific growth rate during exponential growth phase.

^c P_{max} = Biomass productivity.

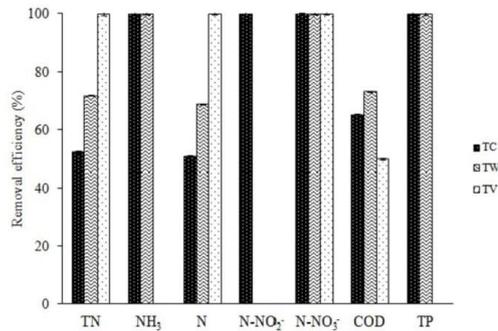


Fig. 2. Nutrients Removal Efficiency in *Chlorella vulgaris* mixotrophic cultivation with corn steep liquor (CC), cheese whey (CW) and vinasse (CV). TN = total nitrogen; NH₃ = ammoniacal nitrogen; N = organic nitrogen; N-NO₂ = nitrite; N-NO₃ = nitrate; COD = Chemical Oxygen Demand; TP = total phosphorus. Data are expressed as mean \pm SD.

fact that substrates used had a low ammonia and nitrite load, consequently *C. vulgaris* consumed the entire NO₃⁻ available to the microalgae. The organic nitrogen also presented excellent reduction values, with RE rates between 50 and 100%. *Chlorella vulgaris* is able to uptake ammonia, nitrate and some organic nitrogen for the regulation of the metabolic pathways (Mujtaba and Lee, 2017). It is used to produce the amino acids, and other organic N-containing macromolecules (Dahmani et al., 2016). Li et al. (2013) obtained a TN removal of 90.1% using a citric acid effluent to *C. vulgaris* growth.

COD expresses the overall organic load (dissolved and suspended matter) of wastewaters. In this study RE of COD obtained in mixotrophic cultures were: 73.16% (TW), 65.16% (TC) and 49.93% (TV) (Fig. 2). These results are higher than COD removal (78%) by *C. pyrenoidosa* in domestic wastewater (Dahmani et al., 2016) and by *C. vulgaris* using swine wastewater (76%) (Wang et al., 2015). COD removal efficiency in mixotrophic growth depends on the initial COD concentration: the efficiency is higher when the initial COD concentration was also higher (Wang et al., 2015). *Chlorella vulgaris* also can reduce COD levels through mixotrophic metabolism as both light and organic carbon were present (Mujtaba and Lee, 2017), but the moderate results showed in this study may be due to a low biodegradability of the carbon present in these by-products.

Chlorella sp. cells assimilate P as inorganic orthophosphate to produce phospholipids, ATP and nucleic acids (Dahmani et al., 2016). Phosphorus was present only in the cultures with cheese whey or corn steep liquor, 5.2 mg L⁻¹ and 10.5 mg L⁻¹ respectively. In both groups TP was completely removed, higher values when compared to 96.7% phosphate reduction, using *Chlorella* to treatment of citric acid effluent (Li et al., 2013). It is interesting to note that phosphorous removal by microalgae, compared to nitrogen, is

usually much slower and less efficient (Bashan and Bashan, 2010). On the other hand, in the present study phosphorus concentrations were completely reduced, showing a high efficiency of *C. vulgaris* to removing this nutrient from by-products. Phosphorous can also be removed through precipitation at high pH of 9–11 (Mujtaba and Lee, 2017), however mixotrophic culture pH was not high enough in this study to trigger precipitation, then the uptake of TP by *C. vulgaris* was the only mechanism for phosphorous removal.

The results achieved in this study were compared to the Brazilian legislation of effluent release standards (CONAMA 357, CONAMA 430 and CPRH 2001). Data obtained in TW and TV groups were in accordance with the limit values imposed for discharges for all the parameters analyzed with the exception of COD concentration (TW = 2107 mg L⁻¹ and TV = 186 mg L⁻¹). In TC group, all the parameters of pollutants were eliminated after treatment with *C. vulgaris*, since the amount of TN remaining is related to organic nitrogen (N), and in Brazil there is no standard threshold limit value for this parameter.

In addition, nutrients Elimination Capacities (EC) were higher in CC and CW groups (Table 2), suggesting a lower toxicity of these substrates that allows a higher microalgae growth and a more rapid nutrient removal. Franchino et al. (2013) have grown *C. vulgaris* in cattle digestate and obtained similar values of TN elimination capacity, but our results to TP elimination capacity were better than theirs. The results obtained in this work to COD reduction were also stand out when compared to others previously reported (Franchino et al., 2016). The higher EC of NO₃⁻ in all groups related probably is due to the availability of this nutrient in the by-products. Results show that *C. vulgaris* can be an effective method to treat by-products such as corn steep liquor, while in cheese whey and vinasse the COD removal achieved good results, however it was not enough to meet the Brazilian legislation parameters.

3.4. Toxicity of treated by-products

Samples of untreated and treated by-products by *C. vulgaris* cultivation for 14 days were used to evaluate possible toxicity potential using *Allium cepa* test-system. The results of toxicity, cytotoxicity and genotoxicity are shown in Table 3.

The results showed that the UC group was the only by-product that presented higher toxicity when compared to the negative control (NC), because it inhibited the roots development process, and consequently obtained lower Germination Index (GI). Before treatment, UC group showed high rates of nutrients and organic matter. Nitrate (NO₃⁻) is a low toxicity substance, but as the final product of nitrification, it can accumulate in large quantities, especially in closed culture systems. Moreover, the presence of nitrate and phosphorus in water bodies such as rivers or lakes may lead to eutrophication (Lado et al., 2017; Ngatia et al., 2017). Ammonia (NH₃), present in TN, is more toxic even than nitrate to living organisms, and therefore it is an unwanted nutrient. In this study, the results obtained were compared to the Brazilian legislation threshold limit values for effluents (CONAMA 357, CONAMA 430 and CPRH 2001: TN: 2.18 mg L⁻¹; NH₃: 20 mg L⁻¹; N-NO₂:

Table 2
Nutrients Elimination Capacities of *Chlorella vulgaris* mixotrophic cultivation with corn steep liquor (CC), cheese whey (CW) and vinasse (CV).

Culture Condition	Nutrients (mg L ⁻¹ d ⁻¹)						
	TN	NH ₃	N	NO ₂	NO ₃	COD	TP
CC	6.86 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	6.47 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01	13.42 \pm 0.03	193.87 \pm 0.01	0.75 \pm 0.02
CW	7.22 \pm 0.03	0.95 \pm 0.02	6.27 \pm 0.01	–	12.06 \pm 0.02	410.4 \pm 0.01	0.37 \pm 0.03
CV	0.41 \pm 0.02	–	0.41 \pm 0.02	–	12.62 \pm 0.03	13.26 \pm 0.01	–

TN = total nitrogen; NH₃ = ammoniacal nitrogen; N = organic nitrogen; NO₂ = nitrite; NO₃ = nitrate; TP = total phosphorus. Data are expressed as mean \pm SD. – = No concentration was detected.

Table 3
Toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of by-products before and after treatment by *C. vulgaris* mixotrophic cultivation.

Treatment	GI (%)	MI (%)	Gel (%)
UW	80.50 ± 2.51	63.31 ± 5.41	0.76 ± 0.06*
TW	93.00 ± 2.00	52.59 ± 4.07	0.95 ± 0.01*
UC	62.00 ± 5.88*	48.86 ± 4.83*	1.08 ± 0.07*
TC	87.50 ± 3.00	67.34 ± 3.26	0.56 ± 0.03
UV	88.50 ± 7.54	47.51 ± 6.47*	0.98 ± 0.05*
TV	87.50 ± 1.91	45.21 ± 2.74*	0.24 ± 0.03
TRI	–	–	1.26 ± 0.02*
MMS	–	–	1.68 ± 0.07*
NC	85.50 ± 4.73	66.52 ± 3.35	0.41 ± 0.08

GI = Germination Index; MI = Mitotic Index; Gel = Genotoxic Index; UW = untreated cheese whey; TW = treated cheese whey; UC = untreated corn steep liquor; TC = treated corn steep liquor; UV = untreated vinasse; TV = treated vinasse; TRI = Trifluralin (positive control for genotoxicity); MMS = Methyl-methanesulphonate (positive control for genotoxicity); NC = negative control (distilled water). Data are expressed as mean ± SD. Tukey test was performed.

* $p < 0.05$, level of significance when compared with the negative control.

– = Not used for this parameter.

1 mg L⁻¹; N–NO₃: 10 mg L⁻¹; PO₄³⁻: 0.1 mg L⁻¹; COD: 60–80% of reduction, according to the industrial typology), and after *C. vulgaris* culture treated corn steep liquor (TC) has completely reduced NO₂, NO₃ and P, and removed 65.16% of COD, reaching the values required by the legislation. Furthermore, this group obtained an increase of 25.5% on GI, proving the efficacy of treatment by reducing toxicity. The other groups showed no toxicity when compared to NC.

Reduction of the rates of cell division in the UC could be confirmed by the statically low Mitotic Index (MI), which reflects its cytotoxicity potential. However, after microalgae cultivation, this group demonstrated a reduction of nutrients and organic load, in addition to the reduction of cytotoxicity, with an increase of MI from 48.86% to 67.34% of MI (Table 3). Mitotic Index values lower than negative control were also observed for UV and TV groups, being considered as cytotoxic agents.

These results are not in agreement with Christofolletti et al. (2013a) which achieved a reduction in vinasse cytotoxicity after treatment with diplopods as test organism. After 14 days of treatment with *C. vulgaris*, nutrient data obtained in TV were in accordance with the limit values imposed for Brazilian legislation to effluents discharges for all the parameters analyzed, except for COD concentration, even though TV had showed the lowest COD concentration when compared to other by-products. Sugarcane vinasse can be toxic, not only because of its COD load, but also because of the presence of some heavy metals (Garcia et al., 2017). Some studies performed with higher plants showed that the toxic potential of metals can induce disturbances during the mitotic process (Minissi and Lombi, 1997), justifying UV and TV cytotoxicity observed. Additionally, it is interesting to note that the TV group was characterized as cytotoxic, but did not present genotoxic characteristics.

Chlorella vulgaris treatment could reduce genotoxicity from corn steep liquor (TC) and vinasse (TV), reflecting the efficiency of both treatments for this parameter. However, non-treated groups UW, UC, UV and TW presented values of Gel significantly higher when compared to negative control but significantly lower when compared to positive controls (TRI and MMS) (Table 3). These data are in accordance with Christofolletti et al. (2013b) and Garcia et al. (2017), which also reported the genotoxic activity of sugarcane vinasse.

A genotoxic agent can promote repairable damage to the chromosomes or DNA of a cell. The presence of these types of changes indicates that a substance has some effect on the genetic material analyzed. In the present work the main chromosomal alteration

observed in UC group was binucleate cells, which may be having occurred due to inhibition of cytokinesis or cell plate formation. In the other groups with genotoxic potential, the presence of micronucleus (MN) was the main chromosomal alteration. MN is considered the most effective and simple indicators of cytological damage, being an excellent parameter to assess environmental impacts (Ventura-Camargo et al., 2016).

In TW treatment, MN formation was also statistically higher than positive controls (TRI and MMS) in *A. cepa* root cells ($p < 0.05$), indicating a high genotoxic level for this alteration. This behavior was not observed for the other treated groups. The evaluation of the toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of corn steep liquor and cheese whey in a test organism has never been reported, and the lack of studies does not give enough support to understand the whole mechanism of metabolic oxidation of these by-products. Since nutrient concentrations were highly removed from the residues after cultivation with *C. vulgaris*, the presence of MN must be connected to other not analyzed component remaining in the UW, TW and UV groups.

Studies that use microalgae to treat wastewaters and by-products are well reported in the literature, but those that evaluate the toxicity of these effluents before and after microalgae cultivation are still scarce. This type of evaluation is important to investigate the effectiveness of the treatments used, not only considering the levels required by the effluent disposal legislation, but also assessing the ecological risk related to the discharge of these effluents in the aquatic environment. Furthermore, these studies evaluate the effectiveness of an innovative and environmentally sustainable by-product treatment using microalgae, which is an additional biological-based treatment.

4. Conclusion

This study showed that *Chlorella vulgaris* mixotrophic culture using 1% corn steep liquor promoted higher growth parameters ($X_{max} = 2.10 \text{ g L}^{-1}$, $\mu_{max} = 0.38 \text{ day}^{-1}$), besides higher productivity ($P_{max} = 0.20 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$). Furthermore, the microalgae was effective in removing nutrients such as N and P, and reduction of COD levels from by-products used. The *Allium cepa* seeds assay showed that *C. vulgaris* biotreatment was able to remove completely corn steep liquor toxic power and minimized the vinasse genotoxic potential by reducing nuclear abnormalities. Using economic substrates to microalgae cultivation minimize the impact caused by the inappropriate disposal of wastes in environment, in addition to producing algal biomass higher added value which can be used for several types of industrial fields.

Conflicts of interest

The authors have declared that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) – Brazil.

References

- Abdelaziz, A.E.M., Leite, G.B., Hallenbeck, P.C., 2013. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. *Environ. Technol.* 34, 1783–1805.
- Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour. Technol.* 118, 61–66.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, sixteenth ed. AOAC

- International, Washington, EUA.
- APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Bashan, L.E., Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101, 1611–1627.
- Batista, A.P., Ambrosano, L., Graça, S., Sousa, C., Marques, P.A.S.S., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro Neto, P., Gouveia, L., 2015. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – an integrated microalgae-based approach. *Bioresour. Technol.* 184, 230–235.
- Bischoff, H.W., Bold, H.C., 1963. *Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species*, vol. 6318. University of Texas Publications number, pp. 1–95.
- Bonini, M.A., 2012. Cultivo heterotrófico de *Aphanotece microscópica* Nágelli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono em vinhaça. MSc Dissertation. Agricultural Science Center, Federal University of São Carlos, Araras, Brazil.
- Calixto, C.D., Santana, J.K.S., Lira, E.B., Sassi, P.G.P., Rosenham, R., Sassi, C.F.C., Conceição, M.M., Sassi, R., 2016. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresour. Technol.* 221, 438–446.
- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X., 2006. Microalgal Reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490–1506.
- Chiani, M., Akbarzadeh, A., Farhangi, A., Mehrabi, M.R., 2010. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. *Pak. J. Biol. Sci.* 13, 1151–1155.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J., 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 3, 21–34.
- Christofolletti, C.A., Pedro-Escher, J., Fontanetti, C.S., 2013a. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diploids using the *Allium cepa* assay. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1523.
- Christofolletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013b. Sugarcanevinasse: environmental implications of its use. *Waste Manag.* 33, 2752–2761.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente, vol. 357. Resolução n, Brazil. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.
- CONAMA, 2011. Conselho Nacional de Meio Ambiente, vol. 430. Resolução n, Brazil. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/res43011.pdf>.
- CPRH, 2001. Agência Estadual de Meio Ambiente, vol. 2. Norma Técnica n, Brazil, 001. <http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/normas-cprh-2001.pdf>.
- Dahmani, S., Zerrouki, D., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F., 2016. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in outdoor open raceway pond using domestic wastewater as medium in arid desert region. *Bioresour. Technol.* 219, 749–752.
- EPE, 2016. Empresa de Pesquisa Energética. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis. Ministério de Minas e Energia. Available in. http://www.epe.gov.br/sites/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao_167/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADeis%20-%20Ano%202016.pdf. (Accessed 11 January 2018).
- Erich, S., Anzmann, T., Fischer, L., 2012. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. *Food Chem.* 135, 2393–2396.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1680–1686.
- Franchino, M., Comino, E., Bona, F., Riggio, V.A., 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere* 92, 738–744.
- Franchino, M., Tigrini, V., Varese, G.C., Sartor, R.M., Bona, F., 2016. Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggy digestate. *Sci. Total Environ.* 569–570, 40–45.
- Garcia, C.F.H., Souza, R.B., Souza, C.P., Christofolletti, C.A., Fontanetti, C., 2017. Toxicity of two effluents from agricultural activity: comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 216–221.
- Hu, B., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Mohr, M., Cheng, Y., Ruan, R., 2012. Influence of exogenous CO₂ on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166 (7), 1661–1673.
- Kannan, A., Upreti, R.K., 2008. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vignaradiata*) seeds. *J. Hazard Mater.* 153, 609–615.
- Lado, J.J., Pérez-Roa, R.E., Wouters, J.J., Tejedor-Tejedor, M.I., Federspill, C., Ortiz, J.M., Anderson, M.A., 2017. Removal of nitrate by asymmetric capacitive deionization. *Sep. Purif. Technol.* 183, 145–152.
- Lappa, K., Kandylis, P., Bekatorou, A., Bastas, N., Klauodatos, S., Athanasopoulos, N., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., 2015. Continuous acidogenesis of sucrose, raffinose and vinasse using mineral kissiris as promoter. *Bioresour. Technol.* 188, 43–48.
- Li, C., Yan, H., Xia, X., Li, Y., Chen, L., Zhang, M., Zhang, L., Wang, W., 2013. High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. *Bioresour. Technol.* 127, 248–255.
- Liao, Q., Chang, H.-X., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Zhu, X., Zhong, N., 2018. Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. *Bioresour. Technol.* 250, 583–590.
- Liggett, W.R., Koffler, H., 1998. Corn Steep Liquor in Microbiology. a. E. Staley Manufacturing Company, Decatur, Illinois, and Purdue University, Lafayette, Indiana, pp. 297–311.
- Minissi, S., Lombi, E., 1997. Heavy metal content and mutagenic activity evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat. Res.* 393, 17–21.
- Mirzaie, M.M.A., Kalbasi, M., Mousavi, S.M., Ghobadian, B., 2015. Statistical evaluation and modeling of cheap substrate-based cultivation medium of *Chlorella vulgaris* to enhance microalgae lipid as new potential feedstock for biolubricant. *Prep. Biochem. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031398>.
- Mostafa, S.S., Shalaby, E.A., Mahmoud, G.I., 2012. Cultivating microalgae in domestic wastewater for biodiesel production. *Not. Sci. Biol.* 4, 56–65.
- Mujtaba, G., Lee, K., 2017. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water Res.* 120, 174–184.
- Ngatia, L.W., Hsieh, Y.P., Nemours, D., Fu, R., Taylor, R.W., 2017. Potential phosphorus eutrophication mitigation strategy: biochar carbon composition, thermal stability and pH influence phosphorus sorption. *Chemosphere* 180, 201–211.
- Olguin, E.J., Dorantes, E., Castillo, O.S., Hernández-Landa, V.J., 2015. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochlorisoleobundanscultures*. *J. Appl. Phycol.* 27 (5), 1813–1822.
- Piorreck, M., Klaus-Hinnerk, B., Peter, P., 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23, 207–216.
- Salati, S., Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., Mariani, P., Adani, F., 2017. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresour. Technol.* 230, 82–89.
- Silva, P.E.C., Souza, F.A.S., Barros, R.C., Viana Marques, D.A., Porto, A.L.F., Bezerra, R.P., 2017. Enhanced production of fibrinolytic protease from microalgae *Chlorella vulgaris* using glycerol and corn steep liquor as nutrient. *J. Microbiol. Res.* 1 (1), 9–19.
- U.S. Department of Agriculture, 2017a. Dairy: World Markets and Trade. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>.
- U.S. Department of Agriculture, 2017b. World Agricultural Supply and Demand Estimates. <https://www.usda.gov/oc/commodity/wasde/latest.pdf>.
- Ventura-Camargo, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A., 2016. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. *Chemosphere* 161, 325–332.
- Wang, Y., Guo, W., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Lo, Y.-C., Cheng, C.-L., Ren, N., Chang, J.-S., 2015. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresour. Technol.* 198, 619–625.
- Xi, Y., Chen, K., Dai, W., Ma, J., Zhang, M., Jiang, M., Wei, P., Ouyang, P.K., 2013. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresour. Technol.* 136, 775–779.
- Xie, T., Xia, Y., Zeng, Y., Li, X., Zhang, Y., 2017. Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalgae *Chlorella vulgaris*: over-compensation strategy. *Bioresour. Technol.* 233, 247–255.
- Xu, X.Y., Qian, H.F., Chem, W., Jiang, H., Fu, Z.W., 2008. Establishment of real-time PCR for analysing mRNA abundance in *Chlorella vulgaris* exposed to xenobiotics. *ActaHydrobiol. Sinica* 34, 139–143.
- Zheng, J., Zhao, W., Guo, N., Lin, F.L., Tian, J., Wu, L.S., Zhou, H.B., 2012. Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant b-mannanase by *Pichia pastoris*. *Bioresour. Technol.* 118, 257–264.

3.2 PATENTE DE INVENÇÃO - FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA



27/12/2018 870180168045
12:54

29409161811219763

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 077212 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2018 às 12:54, Petição 870180168045

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA

Resumo: FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA. A presente patente de invenção refere-se à forma farmacêutica gel à base do extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* para o tratamento cicatrizante de feridas cutâneas em geral, particularmente feridas incisais. A microalga foi cultivada em meio de cultivo autotrófico ou, preferencialmente, mixotrófico com a adição de um ou mais subproduto e/ou resíduo agroindustrial rico em proteínas. A biomassa microalgal obtido do cultivo foi concentrada e a parede celular rompida em solução aquosa, obtendo uma fração sólida e uma líquida. A fração líquida, denominada de extrato bruto, foi utilizada para a preparação do formulado em gel. O efeito cicatrizante do gel foi comprovado a partir do sétimo dia de tratamento em camundongos saudáveis. O produto é de fácil obtenção e aplicação e consegue produzir resultados eficazes na regeneração celular, em tempo inferior ao observado no tratamento convencional à base de outros medicamentos disponíveis no mercado. Ademais, os bioativos presentes no produto não precisam ser purificados para realizarem sua ação cicatrizante. Este produto tem aplicação na área da Biotecnologia e farmacêutica que visa, principalmente, resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição tissular.

Figura a publicar: 1

“FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO
EXTRATO DE MICROALGA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente relatório de invenção trata de uma formulação em gel contendo extrato aquoso cicatrizante obtido através do extrato da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* com ação cicatrizante de lesões cutâneas para uso tópico, com aplicação nas áreas clínicas, terapêuticas e farmacêuticas. É um método mais rápido, fácil e econômico quando comparado a outros produtos utilizados, possibilitando uma reepitelização a partir do sétimo dia de tratamento, estando no campo da biotecnologia e farmácia.

Antecedentes da invenção

[002] Os produtos disponíveis no mercado, que têm sido utilizados na gestão e no tratamento de enfermidades humanas ao longo dos anos, geralmente são à base de plantas. Apesar da importância desses produtos, sua utilização geralmente ocorre de forma empírica, onde muitas vezes não segue os padrões de qualidade (TUROLLA & NASCIMENTO. Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 289-206, 2006), pode ter uma eficácia baixa, os efeitos colaterais diversos são frequentemente associados, além de requerer maior área para plantação e depender das condições climáticas. Os efeitos colaterais podem ser alergias, maior tempo de cicatrização, hemorragia no tecido e queimaduras na pele. Mesmo assim, o uso de cicatrizantes naturais *in natura* ou como fitoterápicos supera o uso dos convencionais pelo seu fácil acesso e menor custo. Além disso, um só tipo de tratamento não preenche os requisitos para ser aplicado em todos os tipos de feridas cutâneas, uma vez que deve ser adequado à natureza, à localização e ao tamanho da ferida. Dessa maneira, a busca por outros agentes naturais surge como uma alternativa para o tratamento dessas enfermidades (BUDOVSKY et al., Wound Repair and Regeneration, v. 23, n. 2, p. 171–83, 2015).

[003] A utilização de compostos bioativos derivados de algas e microalgas, torna-se interessante para o tratamento de enfermidades devido às suas propriedades biológicas, a baixa toxicidade e elevada disponibilidade (NASCIMENTO-NETO et AL Marine Drugs, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 2012; KORDJAZI et al., Int. J. Mol. Cell Med., v. 2 n. 4, p. 156-163, 2013). Assim, biomoléculas ativas presentes em micro-organismos fotossintetizantes podem ser uma potencial terapia dessas enfermidades, principalmente os micro-organismos fotossintetizantes GRAS (*generally recognized as safe*) como a *Chlorella vulgaris*.

[004] Os micro-organismos fotossintetizantes são ricos em ácidos graxos essenciais, proteínas, carotenoides, polissacarídeos, vitaminas, enzimas e outros compostos, sendo fontes de bioativos e produtos biotecnológicos (BATISTA et al., Algal Res., v. 2, p. 164–173, 2013). Essas substâncias podem contribuir com atividades biológicas, devido aos seus compostos conterem propriedades farmacológicas, como redução de inflamações, regulação das expressões gênicas para alterar atividades celulares, como: migração celular, deposição de matriz extracelular e o sucesso final da regeneração tecidual (ZHANG et al., Phytomedicine, v. 20, p. 9–16, 2012).

[005] Extratos da microalga *Chlorella vulgaris* são ricos em aminoácidos essenciais, vitaminas, ácidos graxos essenciais, minerais polissacarídeos (SAFI et al., Energy Ver., v. 35, p. 265-278, 2014) e pigmentos antioxidantes, tais como β -catoreno, luteína e clorofila (LI et al., J. Agric. Food Chem., v. 50, n. 5, p. 1070-1072, 2002) que podem atuar como imunoestimuladores e antioxidantes (WANG et al., Process Biochem., v. 45, p. 1865-1872, 2010).

[006] Dentre outras atividades bioativas descritas na literatura, podemos citar antidiabética, antimicrobiana, antitumorais, anti-inflamatória (PIETRAMAGGIORI et al., J. of Trauma and Acute Care Surgery, v. 64, n. 3, p. 803–808, 2008; SILVA et al., Ann Microbiol. Res., v. 1, n. 1, p.9-19, 2017). Estudos anteriores realizados com microesferas obtidas a partir do extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* demonstraram atividade cicatrizante (BARI et al., Materials, v. 10, p. 983, 2017). A utilização de extrato metanólico dessa microalga demonstrou atividade antibacteriana para gram-negativas, bem como a inibição de proteínas anti-apoptóticas de células tumorais (JAYSHREE et al.,

Indian J. Pharm. Sci, v. 78 n. 5, p. 575-581, 2016). Relatos na literatura também associam comprimidos de extratos de *Chlorella vulgaris* as melhorias dos sintomas físicos e cognitivos da depressão devido a redução do estresse oxidativo na fisiologia (PANAHI et al., Complementary Therapies in Medicine, v.23, p. 598–602, 2016). Além disso, pesquisas apontam que o extrato metanólico dessa microalga, como fonte de compostos, pode ser utilizado para inibição de mediadores pró-inflamatórios (SIBI & RABINA, Pharmacognosy Res., v.8, n.2, p. 118-122, 2016).

[007] Os micro-organismos fotossintetizantes são micro-organismos com baixa exigência nutricional para seu crescimento celular, necessitando basicamente de água, CO₂, intensidade luminosa e alguns sais minerais (BERTOLDI et al., Ciência Rural, v. 38, n. 1, p. 54-58, 2008; ORTENZIO et al., Bioenergia em revista: diálogos, ano 5, n. 1, p. 58-65, 2015), sendo uma forma promissora de geração de biomassa com potencial para diversas aplicações. Os micro-organismos fotossintetizantes são de fácil cultivo, ocupam áreas pequenas, podem ser facilmente controlados, não estão sujeitos às variações ambientais e possuem curto tempo de geração quando comparados às células vegetais, visto que esses micro-organismos se reproduzem normalmente por fissão binária, permitindo assim que o ciclo celular ocorra em poucas horas (BENEMAN, J. of Indus. Microbiology, v. 31, n. 5, p. 247-256, 1990).

[008] Os micro-organismos fotossintetizantes podem ser cultivados em meios de cultura alternativos suplementados de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais, possibilitando uma redução nos constituintes do meio de cultura, um aumento da produtividade celular e/ou dos bioativos de interesse, além de ser uma alternativa de tratamento para remoção de poluentes, como fósforo e nitrogênio, principais causadores de eutrofização (GODOS et al., BioresourTechnol., v. 100, n. 19, p. 4332-4339, 2009; CHINNASAMY et al., BioresourTechnol., v. 101, n. 9, p. 3097-3105, 2010), reduzindo os impactos ambientais.

[009] Os constituintes do meio de cultura podem alterar a composição da biomassa dos micro-organismos fotossintetizantes. Estes reagem às condições adversas de seus habitats com mecanismos adaptativos, como a síntese de uma ampla rede de metabólicos secundários bioativos (MARKOU & NERANTZIS, Biotechnol. Adv. v. 31, p.

1532–1542, 2013). As diferentes vias metabólicas são ativadas como estratégias de defesa por cada espécie de microalga, explicando assim sua diversidade em termos de composição estrutural e química (MORAIS et al., BioMed Res. Int. ID835761, 2015). Melo et al., (Chemosphere, v. 204, p. 344-350, 2018) avaliaram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em diferentes tipos de subprodutos agroindustriais (vinhaça, milhocina e soro de leite) e observaram que o cultivo suplementado com milhocina apresentou maior rendimento de biomassa quando comparado ao cultivo autotrófico, e maior teor de proteínas na biomassa, enquanto que o uso do soro de leite proporcionou maior teor de carboidratos na biomassa. Xie et al., (Bioresour. Technol., v. 136, p. 775-779, 2013) relataram que a *C. vulgaris* sintetiza mais proteínas quando cultivada em ambientes ricos em nitrogênio e quando este encontra-se limitado em meio de cultura, as microalgas reduzem sua síntese proteica. Silva et al., (Ann Microbiol. Res., v. 1 n. 1, p. 9-19, 2017) relataram que a atividade fibrinolítica a partir do extrato da microalga *Chlorella vulgaris* varia com a concentração de milhocina adicionada ao meio de cultura. Sendo assim, o tipo de suplemento utilizado em um cultivo influencia no tipo e na quantidade de bioativos extraídos dos micro-organismos fotossintetizantes.

[010] Os documentos que antecedem o presente documento descrevem formulações com atividade cicatrizante utilizando extratos de vegetais, de macroalgas e/ou microalgas e aplicação de compostos isolados destes. Alguns métodos utilizando os extratos advindos desses podem ser encontrados nos documentos patentários e artigos a seguir.

[011] A patente BR 102014033126-3 A2 descreve uma formulação à base de hemicelulose e óleo essencial de uma espécie nativa do gênero *Lippia*, apresentando atividade cicatrizante e antimicrobiana. É um produto fitoterápico preparado a partir das folhas da espécie *Lippia*, as quais são submetidas à extração de óleos essenciais pela técnica de destilação com arraste de vapor d'água. Posteriormente, é utilizado um funil de vidro contendo sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para retirar a água residual. Para a preparação da formulação é utilizado o veículo galactonamana a 1.5%, óleo essencial da espécie, conservante brometo de cetiltrimetilamina 0.1% e água. Esse documento de patente difere por utilizar uma formulação à base de extrato aquoso da microalga

Chlorella vulgaris, utilizando como método de extração dos bioativos, solução tampão e sonicação. Além disso, utiliza como veículo o gel de policarboxietileno.

[012] A patente BR 102014008978-0 A2 descreve uma composição medicamentosa com ação antibiótica, anti-inflamatória e cicatrizante, mediante a associação sinérgica de extratos vegetais secos da *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. e *Plantago major* L., e opcionalmente da *Casearia sylvestris* SW, para aplicação tópica, sob a forma de biofilme bacteriano ou na forma farmacêutica sólida, sem a utilização de conservantes. A presente invenção utiliza uma formulação com apenas um gênero, *Chlorella*, onde os seus compostos demonstram sinergia e garantem cicatrização eficaz.

[013] A patente BR 102013000137-6 A2 1 descreve uma nova formulação farmacêutica à base do extrato vegetal seco de *Chenopodium ambrosioides* L., extraído a partir do processo de maceração utilizando como extratores os solventes etanol e metanol, sendo aceitável para uso oral, parenteral ou tópico com finalidade profilática e terapêutica em processos inflamatórios e de cicatrização tecidual para uso em humanos e animais. Esse documento de patente difere por utilizar uma formulação à base de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando como método de extração dos bioativos a sonicação em solução tampão.

[014] Nascimento-Neto et al., (Marine Drugs., v. 10, p. 1936-1954, 2012) avaliaram o potencial cicatrizante de uma lectina purificada extraída por cromatografia de troca iônica da alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* e observaram propriedades pró-cicatrizantes em feridas agudas em camundongos, destacando-se como um possível tratamento de feridas agudas. Polissacarídeos sulfatados extraídos das algas *Padina tetrastromatica* e *Padina boergesenii*, extraídos com água quente e precipitados com CaCl₂, demonstraram-se eficazes na formação de colágeno e regeneração da pele quando aplicados utilizando pomadas como veículo em feridas de ratos (KORDJAZI et al., International J. of Mol. Cellular Medicine. v. 2, n. 4, p. 156-163, 2013). O extrato em pó da alga marinha *Eucheuma cottonii*, preparado a partir de agitação mecânica e filtrado, e posteriormente submetido à secagem em estufa para a obtenção do pó, apresentou uma rápida contração da ferida, epitelização e crescimento do pelo em ratos machos (FARD et al., J. of Animal and Veterinary Advances, v. 5, p.

6373–6380, 2011). Um curativo composto de quitosana, o qual foi adquirido comercialmente, contendo fucoidan, um polissacarídeo sulfatado, extraídos da macroalga *Fucus vesiculosus*, apresentou uma excelente regeneração dérmica, reepitelização e rápido fechamento da ferida em queimaduras superficiais de coelhos (SEZER et al., AAPS Pharm. Sci. Tech., v.8, p.94–101, 2007). Esse documento de patente difere por utilizar uma formulação à base de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo mixotrófico, sem requerer o isolamento de bioativos para aplicação nas feridas, utilizando como método de extração dos bioativos a sonicação em solução tampão.

[015] A patente WO0075282 (A1) relata um método para obter um extrato, que é estável ao calor e tem uma atividade antioxidante e de cicatrização de feridas. Foi realizado a partir do meio de cultura de microalgas cultivadas e depois submetidas à supersaturação de oxigênio que induz um forçamento metabólico para superprodução de compostos antioxidantes. Após este período, as algas foram separadas por centrifugação, sendo depois filtradas através de membrana de celulose e assim obtendo o extrato com aplicações de interesse biotecnológico. Esse documento de patente difere por utilizar na metodologia ao utilizar o método de sonicação para obtenção dos biativos presentes na biomassa da microalga, além de utilizar o extrato aquoso proveniente apenas da microalga *Chlorella vulgaris* a partir do cultivo mixotrófico.

[016]A patente WO2012052356 (A2) teve como objetivo desenvolver extratos baseados em fontes renováveis, microalgas, com intuito de modular e estimular o metabolismo da pele humana e dos folículos capilares, a fim de obter melhorias na perda e despigmentação do cabelo. Os extratos aquosos utilizados foram constituídos pelas microalgas: *Monodus* sp., *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp. e *Chlorococcum* sp. Foram utilizados solventes consistindo em acetato de etila, etanol absoluto e água em quantidade adequada para que os compostos ativos presentes na biomassa passem para a fase solvente, sendo opcionalmente a temperaturas elevadas. A extração foi realizada de modo sequencial, em três etapas: acetato de etila> etanol absoluto> água, para obter uma melhor separação dos compostos. Esse documento de patente difere por utilizar na metodologia ao utilizar o método de sonicação para obtenção dos

bioativos presentes na biomassa da microalga, além de utilizar o extrato aquoso proveniente apenas da microalga *Chlorella vulgaris* a partir do cultivo mixotrófico, onde os seus compostos apresentam sinergia e garantem cicatrização eficaz.

[017] A patente PI0801132-0 A2 relatou uma formulação de um creme antioxidante e cicatrizante com B-caroteno a partir de microalgas. O produto na forma de creme consistiu na mistura de componentes como β -caroteno da microalga *Dunaliella salina* com a própolis na forma de gel, junto com o ácido úsnico na forma de pó. Esse documento de patente difere na metodologia por utilizar uma formulação com apenas um gênero, sem o requerer o isolamento de bioativos, uma vez que os seus compostos apresentam sinergia e garantem cicatrização eficaz, bem como não necessita da adição de outros componentes.

[018] Pietramaggioret al., (J. of Trauma and Acute Care Surgery, v. 64, n. 3, p. 803–808, 2008) relatou o uso de um polímero (poli-N-acetil-glicosamina), extraído por separação e purificação, de uma microalga produzida pela Marine Polymer Technologies, utilizado como curativo para feridas e queimaduras. Esse documento de patente difere por utilizar na metodologia uma formulação contendo extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo mixotrófico, sem requerer o isolamento de bioativos para aplicação nas feridas.

[019]O extrato aquoso de um microrganismo fotossintetizante, a cianobactéria *Spirulina platensis*, obtido por maceração em diferentes solventes (metanol, etanol e água ultrapura) e evaporadas a 40° C, estimulou a migração e diferenciação das células de fibroblastos *in vitro* em menor intervalo de tempo quando comparado ao grupo controle com alantoína, podendo ter aplicação biomédica no tratamento de várias feridas crônicas, especialmente em pacientes com diabetes mellitus (SYARINA et al., EXCLI Journal, v. 14, p. 385-393, 2015). Estudos de cultura celular *in vitro* demonstraram que o extrato bruto obtido por sonicação de *Spirulina platensis* a partir de cultivo autotrófico, na presença de tampão fosfato pH 7,4 apresentaram um efeito significativo na proliferação da linhagem celular L929 de fibroblastos, quando incorporados em creme para pele. Com base nesses resultados, sugerem que *S. platensis* pode ser incorporada em creme para pele ou biomateriais, podendo ser um forte promissor para

uso posterior em aplicações biomédicas, particularmente para feridas (GUNES et al., *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1824–1832, 2017). Esse documento de patente difere por utilizar o formulado, utilizando gel como veículo, contendo extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em condição mixotrófica.

[020] Hidalgo-Lucas et al., (*Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, v.13, p.93-102, 2014) investigaram a cicatrização de feridas utilizando amostras de ROQUETTE *Chlorella* sp., pó comercial produzido pela ROQUETE Frères, através de aplicação cutânea e administração oral, demonstrando um potencial médico para doenças de pele. Esse documento de patente difere por utilizar um formulado de gel contendo extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo mixotrófico, sem a necessidade de uma administração oral para potencializar o resultado. Ademais, o extrato celular permite melhor disponibilidade dos bioativos presentes na biomassa.

[021] A presença de agentes com atividade cicatrizante extraídas do extrato aquoso da biomassa da *C. vulgaris* possibilita a reparação tecidual de maneira rápida e eficiente quando comparado a outros produtos já vendidos no mercado. Nesse contexto, o presente invento apresenta um fácil cultivo e de forma não onerosa sendo derivado de uma fonte natural, reduzindo então a possibilidade de efeitos colaterais e toxicidade. Com isso, o desenvolvimento e aplicação do dito FORMULAÇÃO EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA proposto neste documento de patente de invenção possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui a tecnologia de obtenção, desenvolvimento e aplicação semelhantes, podendo ser utilizado preferencialmente como um método potencial cicatrizante sobre feridas cutâneas tópicas em geral (lesões cirúrgicas, escoriações, fissuras, etc.). Destaca-se ainda que a tecnologia proposta neste documento de patente de invenção apresenta também os outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

Descrição da Invenção

[022] O objetivo do presente invento foi à obtenção de um produto cicatrizante a base de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* com reparação tecidual em menor tempo, de fácil aplicação, que não proporcione desconfortos e sem a produção de efeitos secundários nocivos.

[023] A biomassa microalgal utilizada para a preparação do extrato aquoso celular é obtida a partir de cultivos autotróficos, mixotróficos ou a mistura de ambos. O cultivo mixotrófico ocorre pela adição de um ou mais subproduto e/ou resíduo agroindustrial rico em proteínas. Após o cultivo, a biomassa é concentrada.

[024] A biomassa microalgal concentrada sofre lise da parede celular por método físico para a preparação do extrato aquoso celular.

[025] O extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* poderá ter como veículo outras formas farmacêuticas, como cremes e pomadas. Adicionalmente, conservantes poderão ser acrescentados ao veículo de hidrogel constituído pelopolímero carboxivinílico (Carbopol 940), como exemplo metilparabeno, quatérnio-15 ou fenoxietanol, caso não haja a presença de álcool na formulação do gel. Além disso, 3-5% de glicerina pode ser adicionada, com a finalidade de evitar o ressecamento do gel.

[026] O objeto da invenção será descrito em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

[027] A presente invenção é descrita a seguir e melhor compreendida através da Figura 1.

[028] Figura 1 representa a produção da biomassa, preparação do extrato celular e da formulação em hidrogel.

Descrição detalhada da Invenção

[029] A preparação do formulado em hidrogel com atividade cicatrizante procedeu-se inicialmente com a produção da biomassa microalga, extração dos bioativos e, por último, a formulação.

10 / 17

[030] Para a produção da biomassa, as microalgas podem ser cultivadas em meio de cultura líquido contendo água e sais minerais de modo autotrófico ou mixotrófico com suplementação de uma fonte de orgânica rica em proteínas, preferencialmente milhocina, na concentração entre 0,5 – 2,0 %, preferencialmente 1,0 %. Os meios de cultura devem ser previamente esterilizados por método físico.

[031] Os recipientes dos cultivos devem ser transparentes ou translúcidos. Os cultivos aerados e iluminados naturalmente e/ou artificialmente com intensidade luminosa de 20 – 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, preferencialmente a 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até as células atingirem a fase exponencial de crescimento celular.

[032] As células devem ser concentradas através da separação das células do meio de cultura para a extração dos bioativos com atividade cicatrizante. Os métodos de separação podem ser por sedimentação, centrifugação, filtração, floculação. Posteriormente, as células concentradas em meio aquoso e a parede celular rompida por métodos mecânico, químico, físico ou associação de ambos, tais como congelamento/descongelamento, pérolas de vidro, choque osmótico, homogeneização, preferencialmente por sonicação, para a extração dos bioativos presentes na biomassa.

[033] Após a extração, a fração sólida foi separada da líquida para obtenção extrato aquoso celular, por método físico, preferencialmente centrifugação. A fração líquida do extrato celular foi adicionada ao veículo de hidrogel na proporção de 5 – 80%, preferencialmente 25%, e o pH ajustado para valores de 6,0 – 8,0, preferencialmente 7,0. O veículo de hidrogel é constituído preferencialmente por carboxivinílico (Carbopol 940) e etanol dissolvidos em água, preferencialmente na concentração de 2% de carboxivinílico e 15% de Etanol.

[034] A presente invenção é melhor descrita de acordo com os exemplos a seguir:

Exemplo 1. Determinação do cultivo.

[035] A microalga *Chlorella vulgaris* (UTEX 1803) foi adquirida da Coleção de Cultura de Algas da Universidade do Texas (Austin, TX). Este micro-organismo foi cultivado em meio líquido constituído por água e sais minerais (BISCHOFF & BOLD, University of Texas Publications, n. 6318, p. 1-95, 1963) de maneira autotrófica ou

mixotrófica com suplementação de 1% de milhocina (SILVA et al., Ann Microbiol. Res.,v.1, n.1, p. 9-19,2017). A milhocina foi previamente tratada pela adição de base até atingir pH 8.0 e esterilizada por autoclavação a 121 °C por 20 minutos (LIGGETT& KOFFLER, Bacteriol Rev., v. 12, n. 4, p. 297–311,1948). Os cultivos em frascos de Erlenmeyer foram aerados continuamente, à temperatura de 27±3°C e intensidade luminosa de 52±5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As células foram obtidas no final da fase exponencial de crescimento celular para a preparação dos extratos.

Exemplo 2. Determinação dos extratos.

[036] A biomassa foi concentrada e ressuspendida em tampão TRIS-HCl-NaCl 0,15 M, pH 7,5,na concentração de 5% p/v (50 mg/ml). A extração foi realizada por rompimento mecânico da membrana celular, preferencialmente utilizando sonicação, e os sobrenadantes foram utilizados como extrato bruto para as atividades biológicas.

Exemplo 3. Determinação das formulações.

[037] As formulações foram compostas por extratos aquosos autotróficos ou mixotróficos da microalga nas concentrações (10% e 25%), utilizando hidrogel como veículo. O gel hidro-alcoólico foi constituído por 2% de carboxivinílico, 15% de Etanol P.A. em água purificada (CLAVIJO & COMES, ISBN: 84-922568-0-X, 1997) e pH ajustado para 6,5-7,0 com Trietanolamina. Posteriormente, o gel foi submetido à esterilização, preferencialmente em autoclave a 121° C por 20 minutos. Os produtos foram armazenados em geladeira e protegidos da luz até sua utilização.

Exemplo 4. Determinação de proteínas.

[038]O conteúdo proteico dos extratos celulares autotrófico e mixotrófico foram determinados utilizando Kit BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC), seguindo a metodologia do fabricante. Os resultados demonstraram que o extrato autotrófico e mixotrófico apresentaram 1,011 mg/mL e 1,174 mg/mL de proteínas solúveis totais, respectivamente.

Exemplo 5. Atividade hemaglutinante.

[039] O ensaio de aglutinação de células sanguíneas foi realizado em placas de microtitulação contendo eritrócitos humanos do sistema ABO e de coelho previamente tratados com glutaraldeído a 2,5% (v/v) (CORREIA & COELHO et al., Appl. Biochem. Biotech., v.55, p. 261-273, 1995). A hemaglutinação foi observada macroscopicamente e considerada positiva no caso em que mais de 50% dos eritrócitos no poço foram aglutinados. Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH). Os resultados demonstraram que os extratos autotrófico e mixotrófico apresentaram títulos de hemaglutinação semelhantes com valores $>2^{48}$ para sangue de coelho. Em relação ao sistema sanguíneo humano ABO, apenas o extrato mixotrófico demonstrou atividade para o sangue tipo B, com valor de $>2^{24}$.

Exemplo 6. Atividade antioxidante.

[040] A atividade antioxidante dos extratos autotrófico e mixotrófico foi realizada pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O extrato autotrófico apresentou atividade antioxidante 33,63% e o extrato mixotrófico de 54,64%.

Exemplo 7. Atividade antibacteriana.

[041] O ensaio antibacteriano dos extratos foi realizado utilizando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do teste de microdiluição em caldo descrito pelo CLSI (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017). As bactérias utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* UFPEDA700, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 1019B, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA64, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC6057, todas cultivadas em caldo Mueller-Hinton. Os extratos foram previamente liofilizados e em seguida ressuspensos em água destilada esterilizada a uma concentração de 0,1% (100 mg/ml). As bactérias foram inoculadas a 1×10^7 UFC/mL. A CIM foi verificada através de diluição seriada, e as concentrações dos extratos testados foram de 0,100 a 0,195 mg/mL. A CIM foi determinada como a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. O crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 600nm, após

24h de incubação a 37°C. A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano foi calculada e os resultados demonstraram que o extrato bruto autotrófico foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados testados em sua concentração mais alta (100mg/mL). Em relação ao extrato mixotrófico, este foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* na CIM de 0,781 mg/mL, *E. faecalis* em 50mg/mL e *E. colina* concentração de 100mg/mL.

Exemplo 8. Atividade cicatrizante.

[042] Um total de 63 camundongos fêmeas (*Mus musculus*) Swiss (40-60 dias de idade); foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Durante o procedimento experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente controlado, e fotoperíodo 12h claro/escuro. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pelo CEUA-UFPE. Nº do processo: 23076.017009/2012-13. Os animais foram aleatoriamente organizados em dois ensaios experimentais. No primeiro ensaio, foram divididos em três grupos ($n = 9$), de acordo com o tratamento: Grupo I: 10% de extrato autotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EA10%); Grupo II: 10% de extrato mixotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EM10%); Grupo III: Controle negativo contendo apenas gel de polímero carboxivinílico (CC). No segundo ensaio, os animais foram divididos em quatro grupos ($n=9$) de acordo com sua formulação: 25% de Extrato Autotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EA25%); 25% de Extrato Mixotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EM25%); Controle negativo contendo gel de polímero carboxivinílico (CC); Controle positivo (CP). Os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com Xilazina (10 mg.kg^{-1}) e Quetamina (115 mg.kg^{-1}) (HALL & CLARKE, Veterinary anaesthesia. 9.ed., London: Baillière Tindall, p. 51-79, 1991), seguidos por tricotomia manual e antisepsia com álcool iodado a 0,1% na região interescapular do animal. A região foi demarcada com um molde circular esterilizado (1 cm^2). Após a cirurgia, cada ferida de cada grupo foi tratada com aplicação tópica diária em dose única

contendo ± 100 mg da respectiva substância de sua formulação, durante 12 dias de experimento. As análises macroscópicas foram realizadas através da mensuração diárias das feridas utilizando um paquímetro digital, para determinar a área da ferida e o grau de contração da oclusão, através das respectivas equações: $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde "A"= área (mm^2), "R"= raio maior e "r" = raio menor (PRATA et al., Acta Cir. Bras., v.3, n.2, p.43–48, 1988); e $\%W = [(W_0 - W_i) / W_0] \times 100$, onde %W= porcentagem do grau de contração, W_0 = área inicial e W_i = área do dia (ZHANG et al., Lipids Health Dis., v. 9, n. 24, 2010). As eutanásias foram realizadas pela administração de injeção intraperitoneal de tiopental sódico nos 3º, 7º e 12º dias de pós-operatório, e as biópsias das feridas foram coletadas para avaliar a evolução da cicatrização nos grupos, através de análises patológicas e histomorfométricas. Os materiais coletados foram fixados em formalina tamponada, submetidos à bateria de preparação histológica e posteriormente embebidos em parafina. Amostras de cortes de 4 μm foram coradas com: Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson (TM) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As laminae foram submetidas à análise descritiva comparativa dos grupos experimentais em microscópio óptico binocular (modelo Leica, DM 500) com aumento de 100 e 400x, onde foram avaliadas as características celulares e teciduais da pele após lesão e posterior cicatrização. Para o estudo histomorfométrico foram determinados cinco campos dos parâmetros em análise para cada animal/grupo (aumento total de 400x) para obter a média. As imagens foram submetidas à contagem de células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno, tecido adiposo e anexos cutâneos.

Exemplo 9. Análises macroscópicas dos animais.

[043] No primeiro ensaio, pode-se observar que a cicatrização evoluiu com o passar do tempo. No 1º dia, todos os animais estavam com as bordas das feridas edemaciadas, apresentando exsudato inflamatório e eritema, permanecendo assim até às 48h de pós-operatório. Os grupos demonstraram formação de crosta a partir do 7º dia de experimento, e a formação de cicatriz foi evidenciada em todos os grupos a partir do 12º dia de experimento. O segundo apresentou semelhança macroscópica com o ensaio anterior em relação aos 3 primeiros dias de pós-operatório, no entanto foi observado que no 7º dia do grupo EM25% o grau de contração da ferida foi

15 / 17

significativamente maior quando comparado aos demais grupos. Ao final do experimento, todos os grupos evoluíram para a cicatrização após os 12 dias. Foi possível observar também que o grupo EM25% apresentou uma cicatriz mais fina e com maior oclusão de fechamento.

Exemplo 10. Média dos valores de grau de contração.

[044] No primeiro ensaio, no 3º dia, os valores do grau de contração foram EA10%= 19,36%; EM10%=39,25%, CC=26,49%. A partir do 7º dia, os grupos apresentaram grau de contração: EA10%= 57,07%, EM10%=76,84%, CC= 44,95%. É importante salientar que no 7º dia o grupo EM10% demonstrou uma retração macroscópica significativa quando comparado aos demais. No entanto, no 12º dia de experimento todos os grupos demonstraram valores similares de contração de ferida: EA10%=84,40%, EM10%=91,65% e CC=88,05%. Para avaliar se uma maior concentração de extratos poderia promover uma cicatrização mais rápida, foi necessário investigar a adição de 25% de ambos os extratos ao veículo gel de polímero carboxivinílico. No segundo ensaio, no 3º dia de tratamento as médias dos valores de grau de contração foram EA25%= 16,58%; EM25%=9,19%, CC=15,41% e CP=0%. No 7º dia, os grupos apresentaram grau de contração de EA25%= 60,01%, EM25%=86,92%, CC = 55,17%, CP = 63,40%. A retração macroscópica evidenciada pelo grupo EM25% no dia 7º dia foi estatisticamente significativa quando compara aos demais ($p<0,05$). Ao final do experimento os grupos apresentaram graus de contração de EA25%= 84,76%, EM25%= 90,06%, CC=85,23%, CP=82,42%.

Exemplo 11. Análises Histopatológicas.

[045] O segundo ensaio realizado, utilizando 25% de cada extrato adicionado ao veículo de hidrogel, demonstrou clara evidência de melhor e mais rápida cicatrização tecidual quando comparado ao ensaio anterior, sendo assim submetidas às amostras coletadas para análises patológicas e morfométricas. A coloração de H&E apresentou o processo evolutivo da cicatrização das feridas, com clara evidencia de epitelização, queratinização e formação de área cicatricial nos grupos tratados com os extratos da microalga, principalmente no grupo EM25%, com presença de folículo piloso no 12º dia

de tratamento. A melhor cicatrização neste grupo também foi evidenciada na coloração de TM, onde foi observado, no mesmo período de pós-operatório, uma redução na quantidade de fibroblastos e um maior depósito de colágeno, além da presença de glândulas sebáceas e folículos pilosos como já anteriormente mencionado. A coloração de PAS demonstrou que o grupo EM25% no 12º dia de experimento possuía uma lâmina basal bem definida, o que não foi observado nos demais grupos.

Exemplo 12. Análise Histomorfometria.

[046] As análises histomorfométricas (células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno, tecido adiposo e anexos cutâneos) foram realizadas com as amostras do segundo ensaio, coletadas no 12º dia de experimento. Essas demonstraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de células fibroblásticas no grupo EM25% (2,91%), quando comparado aos grupos controles CC (30,56%) e CP (40,54%). A densidade de colágeno também foi avaliada e observou-se um grande aumento nos dois grupos tratados com extrato de microalgas (EA25%: 49,75 e EM25%: 57,13%) quando comparado com CC e CP (34,51%, 32,52%, respectivamente). O grupo tratado com 25% do extrato mixotrófico também apresentou uma redução significativa nas células inflamatórias (3,10%) quando comparado aos controles, mostrando uma atividade anti-inflamatória. No mesmo grupo, observou-se alta presença de anexos cutâneos (30,27%), como folículos pilosos e glândulas sebáceas, o que não foi evidenciado nos demais grupos (EA25%: 4,8; CC: 3,8%; CP: 2,7%), demonstrando capacidade de reepitelização tecidual. Um resumo dos resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.

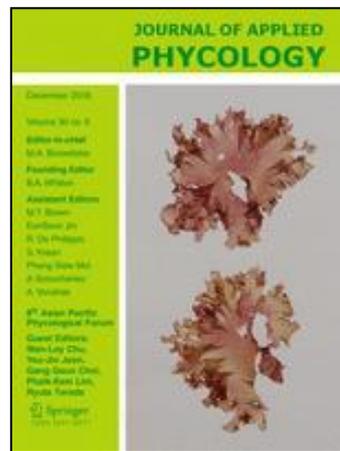
[047] Tabela 1. Evolução da atividade cicatrizante dos grupos controle negativo (CC), controle positivo (CP), Extrato autotrófico (EA25%) e Extrato mixotrófico (EM25%).

Dia	CC	CP	EA25%	EM25%
1	- Edema - Eritema - Exsudato			

17 / 17

3	- Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta	- Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta	- Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta	- Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta
7	- Intensa angiogênese - Infiltrado inflamatório	- Presença de hemorragia local - Angiogênese Moderada	- Discreta angiogênese - Fibroblastos - Deposição de colágeno	- Discreta angiogênese - Fibroblastos - Deposição de colágeno - Queratinização
12	- Presença de cicatriz; - Moderada deposição de colágeno	- Presença de cicatriz; - Discreta angiogênese - Moderada deposição de colágeno	- Presença de cicatriz; - Queratinização - Redução da epiderme - Aumento da derme - Intensa deposição de colágeno	- Presença de discreta cicatriz; - Presença de anexos cutâneos - Queratinização - Redução da epiderme - Aumento da derme - Intensa deposição de colágeno - Lâmina basal

3.3 ARTIGO 2 - HIDROGEL À BASE DE EXTRATOS DE *CHLORELLA VULGARIS*: UMA NOVA FORMULAÇÃO TÓPICA PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS



Artigo submetido ao periódico Journal of Applied Phycology

Fator de Impacto: 2,401 e classificação Qualis B1

Hidrogel à base de extratos de *Chlorella vulgaris*: uma nova formulação tópica para o tratamento de feridas

Rebeca Gonçalves de Melo^a, Alexsandra Frazão de Andrade^b, Raquel Pedrosa Bezerra^b, Daniela de Araújo Viana Marques^c, Valdemiro Amaro da Silva Jr.^d, Sylvania Tavares Paz^e, José Luiz de Lima Filho^f, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,b*}

^a*Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil*

^b*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil*

^c*Universidade de Pernambuco, Campus Serra Talhada, Avenida Afonso Magalhães, AABB, 56912-380, Serra Talhada, PE, Brasil*

^d*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil*

^e*Departamento de Patologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil*

^f*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil*

*Autor para correspondência: fone: +55-81-33206345;

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Resumo

Chlorella vulgaris é um microrganismo fotossintetizante que possui uma variedade de compostos bioativos já descritos na literatura como taninos, terpenos e saponinas, além de nutrientes como proteínas e ácidos graxos. Esta microalga vem sendo utilizada em diferentes campos ao longo dos anos, se mostrando atraente para a indústria farmacêutica e cosmética. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade cicatrizante de um hidrogel contendo extratos de *Chlorella vulgaris* cultivada sob condições autotrófica e mixotrófica em camundongos. Formulações de hidrogel contendo extratos das biomassas de *C. vulgaris* obtidas de cultivo autotrófico (EA) e mixotrófico (EM) foram preparadas nas concentrações de 10% e 25% e aplicadas por 12 dias em feridas em camundongos. Análises macroscópicas e histomorfométricas foram realizadas para avaliar a contração da ferida e investigar a regeneração tecidual. Quanto à caracterização dos extratos, foram avaliadas a concentração proteica, o perfil fitoquímico, a atividade hemaglutinante, a atividade antioxidante e a atividade antibacteriana. O ensaio *in vivo* de cicatrização sugeriu que os animais tratados com hidrogel contendo 25% de EM apresentaram maior presença de deposição de colágeno, diminuição de fibroblastos e células inflamatórias, grande quantidade de anexos cutâneos e evidência de lâmina basal quando comparados aos demais grupos. Os resultados mostraram que o EM possui 1,174 mg/mL de proteínas totais e atividade hemaglutinante \geq a 2^{48} contra eritrócitos de coelho e \geq a 2^{24} contra sangue humano tipo B. Além disso, o EM apresentou os maiores valores de atividade antioxidante (54,64%) e atividade antibacteriana contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Este primeiro relato de uma formulação de hidrogel contendo extratos de *C. vulgaris* para a cicatrização de feridas demonstrou que o extrato da microalga cultivada em condições mixotróficas acelerou a cicatrização de feridas em camundongos. As propriedades pró-cicatrizantes e antiinflamatórias deste extrato podem ser uma potencial alternativa para o tratamento de feridas agudas e crônicas.

Palavras-chave: Cicatrização; cultivo mixotrófico; feridas; microalga; regeneração tissular.

1 Introdução

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo e dinâmico que envolve células, mediadores, fatores de crescimento e citocinas, com o objetivo de restabelecer rapidamente a integridade da pele (BARRIENTOS et al., 2014). As feridas estão entre os principais problemas clínicos em todo o mundo, devido à morbidade associada a longos períodos necessários para o reparo e regeneração do tecido lesionado, sangramento, risco de sepse, quelóides e formação de cicatrizes (SIVARANJANI; PHILOMINATHAN, 2016). Geralmente, o tratamento de feridas sempre teve como objetivo reduzir o risco causado pela ferida em si, minimizando possíveis complicações ambientais e aumentando a regeneração e o restabelecimento do tecido cutâneo lesionado (CHANDIKA et al., 2015).

Do passado ao presente várias matérias-primas de origem natural têm sido utilizadas experimentalmente como medicina tradicional para tratar doenças da pele e feridas, com o objetivo de melhorar a cicatrização e reduzir os custos (BISWAS et al., 2017). Os microrganismos fotossintéticos demonstram ser produtos atrativos para a indústria farmacêutica e cosmética, e alguns autores já relataram aplicações para atividade de cicatrização de feridas (BARI et al., 2017). A *Chlorella vulgaris*, aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) como GRAS (Generally Recognized as Safe – “Geralmente Reconhecida como Seguro”), é uma das microalgas mais interessantes e abundantes, com uma produção industrial anual de 4.000 toneladas (MASOJÍDEK; PRÀŠIL, 2010). Ao longo dos anos, diferentes estudos foram realizados com esta microalga para aperfeiçoar a extração e purificação de compostos bioativos, potencialmente úteis para diferentes aplicações medicinais (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015).

A *Chlorella vulgaris* é rica em produtos naturais como proteínas, ácidos graxos, vitaminas, carboidratos, fibras alimentares e ácidos nucléicos, além de metabólitos secundários (SEO-HYEON et al., 2012). Seus compostos bioativos têm sido utilizados para as mais diversas aplicações farmacêuticas: atividade antimicrobiana (SYED et al., 2015), atividade antineoplásica em modelos de câncer de mama (KUBATKA et al., 2015), redução de glicose e lipídios em ratos obesos (NOGUCHI et al. ., 2013), atividade anti-hipertensiva (SHEIH et al., 2009), atividades antitumorais (RAMOS et al., 2010), dentre outras. No entanto, estudos que utilizem *Chlorella*. sp. para cicatrização de feridas ainda são escassos na literatura, porém essas microalgas são

candidatas promissoras para medicamentos cicatrizantes, matéria-prima para curativos e formulações tópicas (HIDALGO-LUCAS et al., 2014).

Hidrogéis são redes tridimensionais sólidas hidratadas de polímeros naturais ou sintéticos, que são altamente biocompatíveis e biodegradáveis, podendo ser adaptados para mimetizar propriedades físico-químicas de tecidos humanos e utilizados para aplicações eficazes de liberação controlada de medicamentos em cicatrização de feridas (ANNABI et al., 2017). Em particular, estudos prévios demonstraram a incorporação de compostos cicatrizantes em curativos baseados em hidrogel através da integração de diferentes tipos de agentes, incluindo extratos vegetais (KIM; LEE, 2017) e agentes antimicrobianos (ANNABI et al., 2017). Formulações em hidrogel à base de extratos de *Chlorella vulgaris* para uso em atividade cicatrizante não foram relatadas até o momento.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade cicatrizante de hidrogéis contendo extratos de *Chlorella vulgaris* cultivada sob condições autotróficas e mixotróficas em modelo de ferida cutânea em camundongos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Microalga e condições de cultivo

Chlorella vulgaris (UTEX 1803) foi obtida da Coleção de Culturas de Algas da Universidade do Texas (Austin, TX). A microalga foi cultivada em condições autotrófica - utilizando o meio de cultura padrão Bold's Basal Medium (BBM) (BISCHOFF; BOLD, 1963) -, e mixotrófica contendo BBM suplementado com 1% de milho-cina (CornProducts Brasil, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil) (SILVA et al., 2018). Quando a fase estacionária de crescimento foi atingida as células foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min (Hermle Labortechnik Centrifugue 326 HK, Wehingen, Alemanha) e liofilizadas (SP Scientific BenchTop Pro, Warminster, EUA) para posterior análise.

2.2 Preparação dos extratos

A biomassa seca foi extraída (50 mg/mL) em tampão TBS (Tris-salina-HCl, pH 7,5) a 4°C (CHU et al., 2006) por sonicação (sonicador Bandelin electronic, Berlin, Alemanha) utilizando dez pulsos de 1 minuto com um intervalo de 1 minuto entre

cada pulso. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 7.000 rpm (Hermle Labortechnik Centrifuge 326 HK, Wehingen, Alemanha), por 10 min, 4 C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para ambas as culturas, autotrófica e mixotrófica. O extrato obtido da biomassa de *C. vulgaris* cultivada sob condição autotrófica foi denominado EA, e o extrato obtido da biomassa de *C. vulgaris* cultivada sob condição mixotrófica foi denominado EM.

2.3 Formulação tópica

A formulação em hidrogel foi composta por extratos da biomassa de *C. vulgaris* cultivadas em condições autotróficas e mixotróficas nas concentrações de 10% e 25%, utilizando o hidrogel de Carbopol® como veículo. Apenas o veículo, sem nenhum extrato, foi utilizado como controle negativo, e como controle positivo foi administrada uma pomada antibacteriana comercial utilizada em feridas e profilaxia de queimaduras (Neocetheo®).

2.4 Modelo experimental

Foram utilizados 54 camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) do sexo feminino, com 6-7 semanas de idade e peso de $35,0 \pm 5,0$ g. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco. Durante os procedimentos experimentais, os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente controlado, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura constante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), com água e ração *ad libitum*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (número 23076.017009 / 2012-13).

2.5 Atividade cicatrizante

2.5.1 Modelo de ferida cutânea

Os camundongos foram inicialmente anestesiados por via intramuscular com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (115 mg/kg) (HALL; CLARKE, 1991), seguidos de tricotomia manual e antissepsia com álcool iodado a 0,1% na linha média dorsal da região cervical. Depois de marcar a pele com um molde estéril (1,00 cm²), foram criadas feridas cutâneas assépticas circulares com uma tesoura de íris reta e um fórceps Adson.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos ($n = 9$) de acordo com o tratamento administrado: Carbopol® + 10% de extrato autotrófico (EA-10), Carbopol® + 10% de extrato mixotrófico (EM-10), Carbopol® + 25% extrato autotrófico (EA-25), Carbopol® + 25% de extrato mixotrófico (EM-25), apenas Carbopol® (CC) e o controle positivo (CP). As feridas foram tratadas topicamente durante 12 dias consecutivos com uma dose única por dia contendo ± 100 mg da respectiva formulação.

2.5.2 Análises macroscópicas das feridas

As feridas foram medidas diariamente utilizando um paquímetro digital durante 12 dias para avaliar o potencial cicatrizante de cada tratamento. Para avaliar o potencial de contração das feridas tratadas com as diferentes formulações foi utilizada a equação abaixo Eq. (1) (PRATA et al., 1988):

$$A = \pi \times R \times r \quad (1)$$

Onde “A” representa a área (mm^2), “R” o raio maior e “r” o raio menor.

A porcentagem de contração da ferida em cada intervalo de tempo foi determinada pela equação Eq. (2) (ZHANG et al., 2010):

$$\%W = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\% \quad (2)$$

Onde “W” representa a porcentagem de contração da ferida, “W₀” é a área inicial da ferida e “W_t” é a área do dia da mensuração.

As avaliações foram feitas diariamente pelo mesmo examinador, com os animais sob contenção física. A presença de tecido de granulação, exsudato, fibrina, formação de crostas e reepitelização também foram observadas.

2.5.3 Análises histopatológicas e morfométricas

No 3º, 7º e 12º dia pós-operatório os animais (3 por grupo) foram anestesiados e a área da ferida coletada para a análise histopatológica. Em seguida, os animais foram eutanasiados com uma dose intraperitoneal de tiopental sódico. As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído a 10% (v/v) preparado em PBS (0,01 M, pH 7,4) seguido de processamento histológico através de inclusão em parafina, cortes em micrótomo (4 μm de espessura) e subsequente coloração em Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricromo de Masson (TM) e ácido periódico de Schiff (PAS).

A avaliação histológica foi realizada por meio de análise descritiva comparativa dos grupos experimentais em microscópio óptico binocular (modelo Leica, DM 500) com aumento de 100 e 400x, onde foram avaliadas as características celulares e teciduais da pele após lesão e posterior cicatrização. Cinco medidas/campo dos parâmetros em análise foram realizados para cada animal/grupo (aumento total 400x) para obter a média. As imagens foram submetidas à contagem de células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno, tecido adiposo e anexos cutâneos.

2.6 Caracterização e atividades biológicas dos extratos de *Chlorella vulgaris*

2.6.1 Concentração proteica

A concentração proteica das amostras foi determinada utilizando o kit de reagente de ensaio de proteínas BCA (Kit de Ensaio de Proteína BCA™, Thermo SCIENTIFIC). Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

2.6.2 Perfil fitoquímico

A prospecção fitoquímica dos extratos foi avaliada por cromatografia em camada delgada, utilizando reveladores químicos específicos para cada classe de metabólitos secundários, segundo Wagner e Bladt (1996).

2.6.3 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi calculada pela atividade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (FUKUMOTO; MAZZA, 2000). Ácido ascórbico foi usado como controle positivo. A concentração de DPPH no meio foi calculada a partir de uma curva de calibração previamente determinada, para deduzir a porcentagem de DPPH restante (% DPPH). A porcentagem de inibição do DPPH foi calculada de acordo com a Eq. (3):

$$\%AA = (Abs_i - Abs_s / Abs_i) \times 100 \quad (3)$$

Onde “Abs_i” é a absorvância inicial (solução etanólica + DPPH) e “Abs_s” é a absorvância da mistura (DPPH + cada amostra).

2.6.4 Atividade hemaglutinante

A determinação da atividade hemaglutinante (AH) dos extratos de *C. vulgaris* foi realizada em ensaio utilizando placas de microtitulação, descrito por Correia e Coelho (1995). Uma amostra de 50 µL de cada extrato preparado foi diluída duas vezes em série NaCl a 0,15 M, seguido da adição de 50 µL de eritrócitos de coelho ou eritrócitos humanos (sangue tipo A, tipo B e tipo O) tratados com 2,5% (v/v) de glutaraldeído. Após repouso por 45 min, a AH foi expressa como a maior diluição que exibiu hemaglutinação. A hemaglutinação foi observada macroscopicamente e considerada positiva no caso em que mais de 50% dos eritrócitos no poço foram aglutinados. A atividade de hemaglutinação foi expressa como um título, o recíproco da maior diluição de duas vezes exibindo hemaglutinação positiva. O ensaio foi realizado em triplicata para cada extrato testado.

2.6.5 Atividade antibacteriana

Para avaliar uma redução de possíveis infecções bacterianas a atividade antibacteriana foi realizada utilizando-se cinco cepas freqüentemente encontradas na pele. Os ensaios antibacterianos dos extratos de microalgas foram realizados através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo teste de microdiluição em caldo descrito pelo CLSI (2017). As cepas bacterianas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* UFPEDA700, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA1019B, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA64, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC6057, todas cultivadas em caldo Müeller-Hinton. Os extratos foram previamente liofilizados e ressuspensos em água destilada esterilizada na concentração de 100 mg/mL. Cada bactéria foi inoculada a 1×10^7 UFC/mL. A CIM foi determinada por diluições seriadas e as concentrações dos extratos testados foram de 100 a 0,195 mg/mL. Após 24h de incubação a 37°C, as placas foram lidas a 595 nm para calcular a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram descritos como média \pm DP (desvio padrão). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey, utilizando ANOVA One-way e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

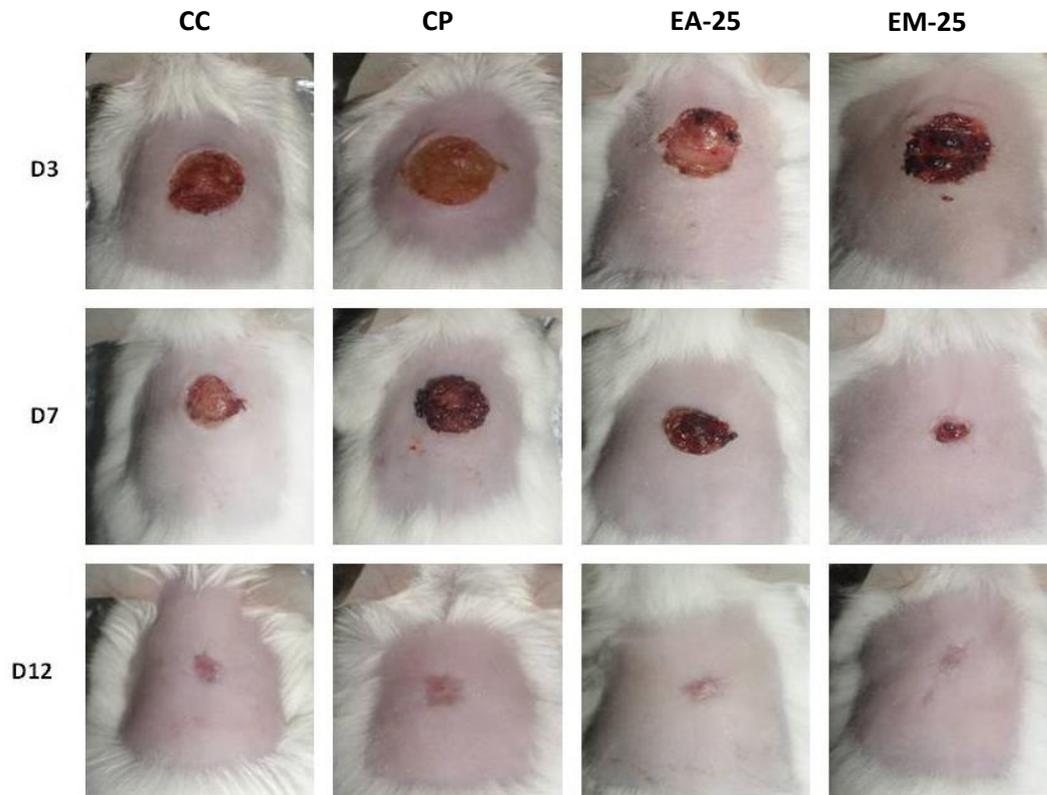
3.1 Análise das feridas cutâneas

Para avaliar a influência dos tratamentos no fechamento das feridas foram realizadas medições diárias de todos os animais. Os resultados das análises macroscópicas ao longo do experimento mostraram que os grupos EA-25 e/ou EM-25 obtiveram resultados superiores quando comparados aos grupos tratados com 10% dos respectivos extratos (EA-10 ou EM-10). Portanto, as etapas subsequentes foram realizadas apenas com os grupos usando 25% dos extratos.

No terceiro dia de pós-operatório os valores de contração das feridas obtidos foram: EA-25 = $16,58 \pm 2,43\%$, EM-25 = $9,19 \pm 2,50\%$, CP = $0,00 \pm 0,00\%$ e CC = $15,41 \pm 2,30\%$. No 7º dia houve um aumento significativo no percentual de contração da ferida no grupo EM-25 ($86,92 \pm 2,10\%$) com $p < 0,05$, quando comparado com os demais grupos (EA-25 = $60,01 \pm 1,89\%$; CP = $63,40 \pm 2,78$; CC = $55,17 \pm 2,38\%$). Ao final do estudo, no 12º dia de pós-operatório, os resultados alcançados foram: EA = $84,76 \pm 2,78\%$, EM = $90,06 \pm 2,14\%$, CP = $82,42 \pm 1,42\%$ e CC = $85,23 \pm 1,28\%$ e nenhuma diferença estatística foi observada.

A partir do sétimo dia de tratamento observou-se uma diminuição significativa de fibrina nos grupos tratados com EA ou EM, utilizando 10% ou 25% de extrato bruto, em relação aos grupos controle. Uma redução na presença de exsudato foi observada no sétimo dia nos grupos tratados com AE e ME em comparação com o grupo Carbopol® ou o controle positivo, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Fotografias representativas da contração das feridas em diferentes dias pós-operatório (3º, 7º e 12º, respectivamente). CC: controle Carbopol®; CP: controle positivo (Neocetheo®); EA-25: Carbopol + 25% de extrato autotrófico; EM-25: Carbopol® + 25% de extracto mixotrófico.



Fonte: O autor (2018).

Os hidrogéis evitam a perda de fluidos, mantêm a relação umidade/secagem ideal da região afetada, absorvem os exsudatos, promovem a proliferação dos fibroblastos, a migração dos queratinócitos e a reepitelização da ferida (XIAO et al., 2016). Estas propriedades são excelentes para a cicatrização de feridas e facilitam a viabilidade celular, proliferação e diferenciação. Eles têm sido amplamente utilizados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois são fáceis de espalhar e não são gordurosos (CORRÊA et al., 2005). Extratos de bioprodutos incorporados em hidrogéis já são amplamente relatados na literatura e comprovam a eficácia desse tipo de formulação na melhoria do reparo tecidual (KIM et al., 2017; FOX et al., 2017).

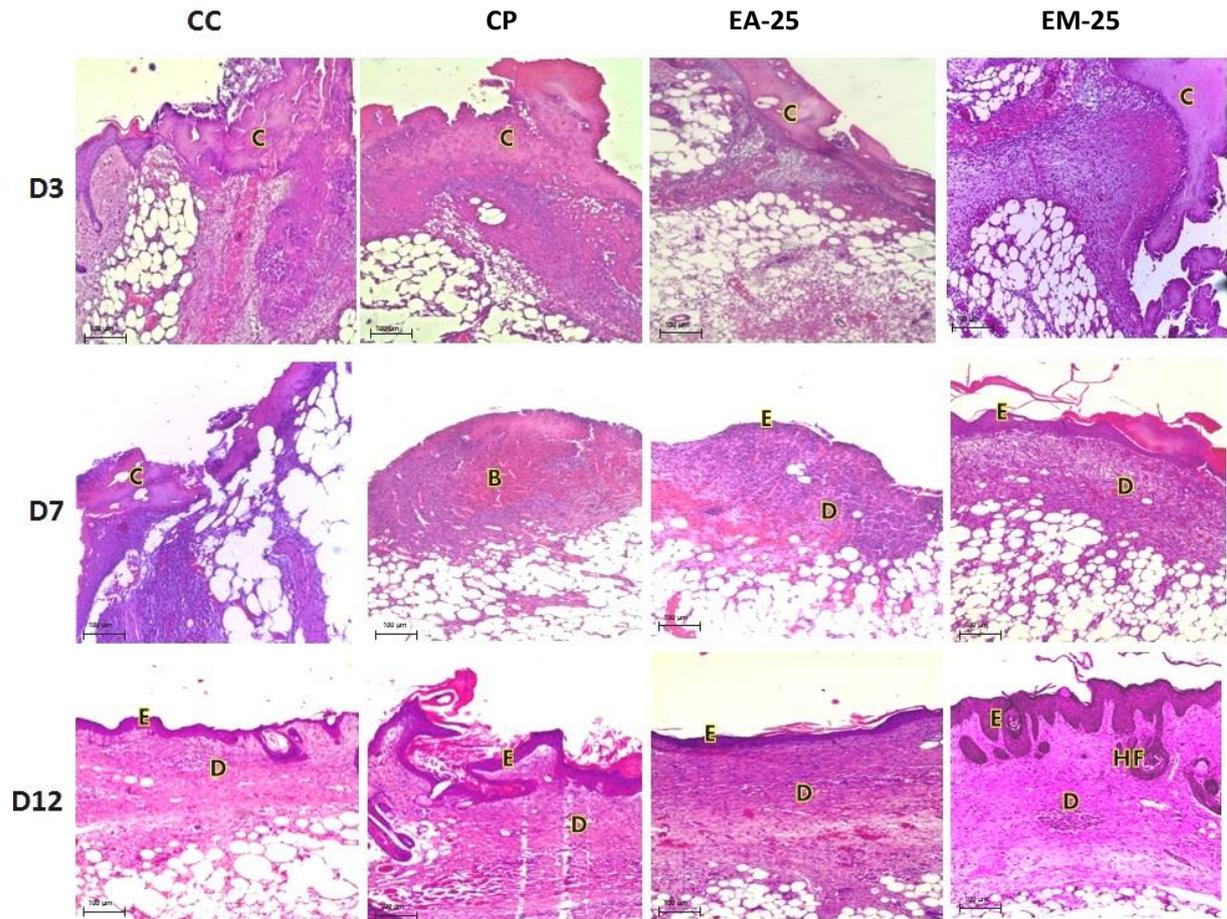
A cicatrização de feridas é uma resposta natural do tecido lesionado, que resulta em contração e oclusão da área, bem como a restauração do epitélio como um revestimento funcional (LODHI; AK, 2011). O processo fisiológico da cicatrização de feridas envolve eventos como vasoconstrição, secreção de fatores de crescimento

e citocinas, que atraem fibroblastos, células endoteliais, células responsáveis pela resposta imune e queratinócitos para reparar os vasos sanguíneos danificados. Células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases que impedem a contaminação bacteriana e limpam a ferida de detritos celulares (FRYKBERG; BANKS, 2015). Assim, um produto com finalidade cicatrizante deve conter compostos que favoreçam ou acelerem o processo natural, uma vez que todos esses fatores contribuem para uma regeneração tecidual mais rápida e eficiente.

3.2 Análises histomorfométricas

Para avaliar o efeito dos tratamentos dos grupos CC, CP, EA-25 e EM-25 na reparação tecidual das feridas, as análises histopatológicas foram realizadas no 3º, 7º e 12º dia de pós-operatório. A análise morfométrica (células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno, tecido adiposo e anexos cutâneos) da região da derme foi realizada no 12º dia, e uma reepitelização significativa no grupo EM-25 foi observada quando comparada aos controles CC e CP ($p < 0,05$) (Fig. 2).

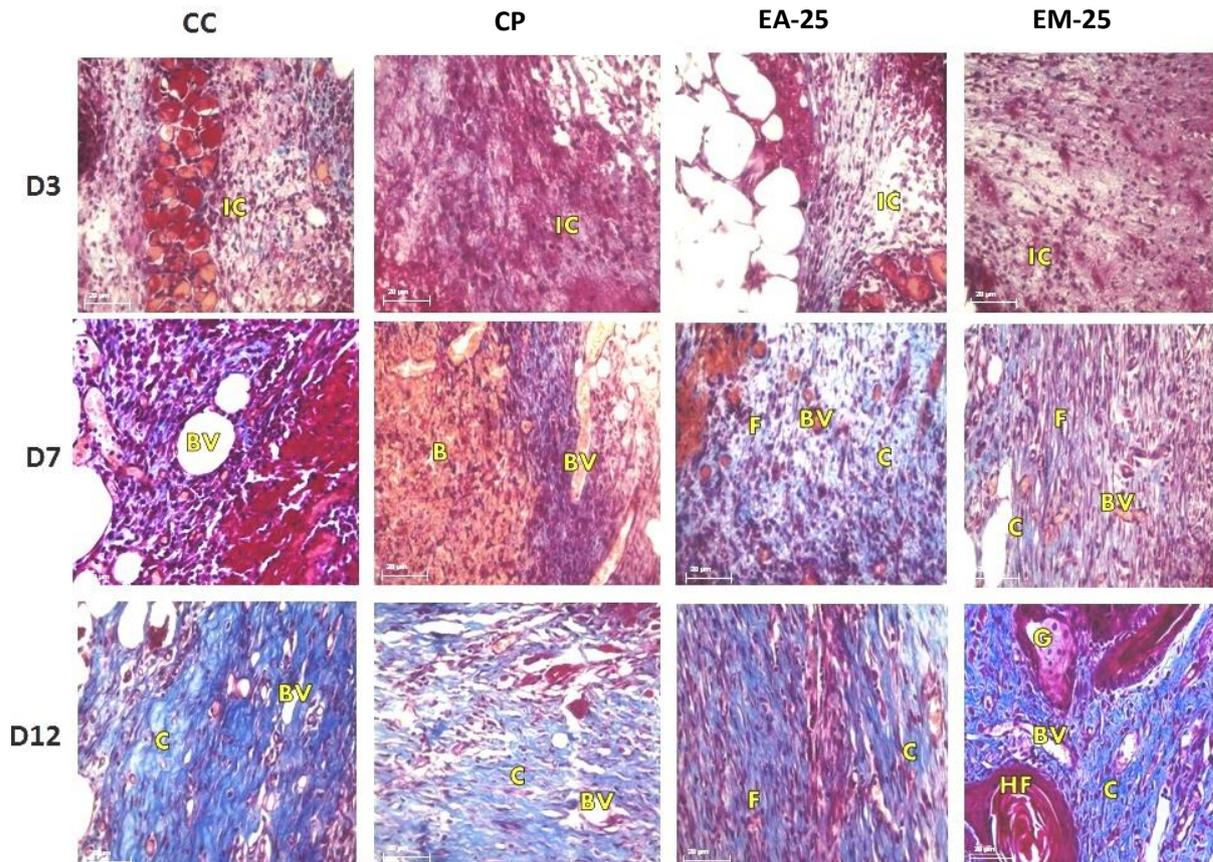
Figura 2 - Análise histopatológica das feridas tratadas com CC (Controle Carbopol®), CP (Controle Positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de Extrato Autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de Extrato Mixotrófico) no 3º, 7º e 7º 12 dias de pós-operatório. As fotografias mostram o processo de cicatrização de feridas, com clara evidência de epitelização, queratinização e formação de área cicatricial em grupos tratados com extrato de microalgas, principalmente no grupo EM-25, com presença de folículo piloso (HF) no D12. Coloração com hematoxilina-eosina, ampliação de 100x e as barras de escala representam 100 µm. B: sangramento; C: crosta; E: epiderme; D: derme.



Fonte: O autor (2018).

As análises histopatológicas e histomorfométricas demonstraram uma diminuição significativa no número de células fibroblásticas (Fig. 3 e 5A) no grupo EM-25 ($2,91 \pm 1,80\%$), quando comparado com os controles CC ($30,56 \pm 3,90\%$) e CP ($40,54 \pm 5,89\%$). A densidade de colágeno também foi avaliada, e foi observado um maior aumento nos dois grupos tratados com extrato de microalgas (EA-25: $49,75 \pm 2,26\%$ e EM-25: $57,13 \pm 2,13\%$), o que não foi evidenciado nos controles CC e CP ($34,51 \pm 1,90\%$, $32,52 \pm 6,78\%$, respectivamente) (Fig. 3 e 5B).

Figura 3 - Análise histopatológica das feridas tratadas com CC (controle Carbopol®), CP (controle positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de extracto autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de extracto mixotrófico) no 3º, 7º e 12º dias de pós-operatório. As fotografias mostram clara evidência de epitelização, redução de células inflamatórias e fibroblastos e deposição de colágeno em grupos tratados com extrato de microalgas, principalmente no grupo EM-25, com presença de anexos cutâneos como folículo piloso (HF) e glândulas sebáceas (G) no D12. Coloração Tricromo de Masson, ampliação de 400x e as barras de escala representam 20 µm. B: sangramento; BV: vaso sanguíneo; C: colagénio; F: células de fibroblastos; IC: células inflamatórias.



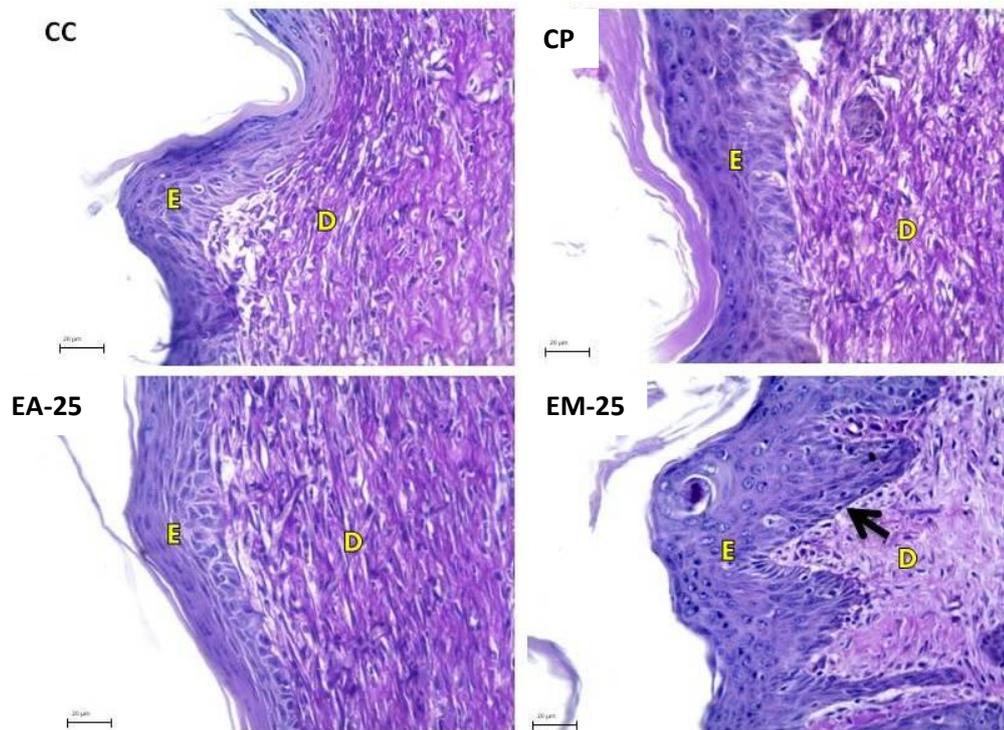
Fonte: O autor (2018).

O grupo tratado com EM-25 também apresentou uma redução significativa de células inflamatórias ($3,10 \pm 0,60\%$) quando comparado aos controles, demonstrando uma atividade antiinflamatória (Figuras 3 e 5C). No mesmo grupo foi observada maior presença de anexos cutâneos ($30,27 \pm 1,30\%$), como folículo piloso e glândulas sebáceas, o que não foi alcançado nos demais grupos (CC: $3,80 \pm 0,89\%$; CP: $2,70 \pm 0,55\%$; EA-25: $4,80 \pm 1,3\%$) (Figuras 3 e 5D), comprovando a capacidade de reepitelização tecidual.

A coloração de PAS foi realizada para observar estruturas ricas em carboidratos, como tecidos conectivos, muco, glicocálix e lâmina basal. As imagens

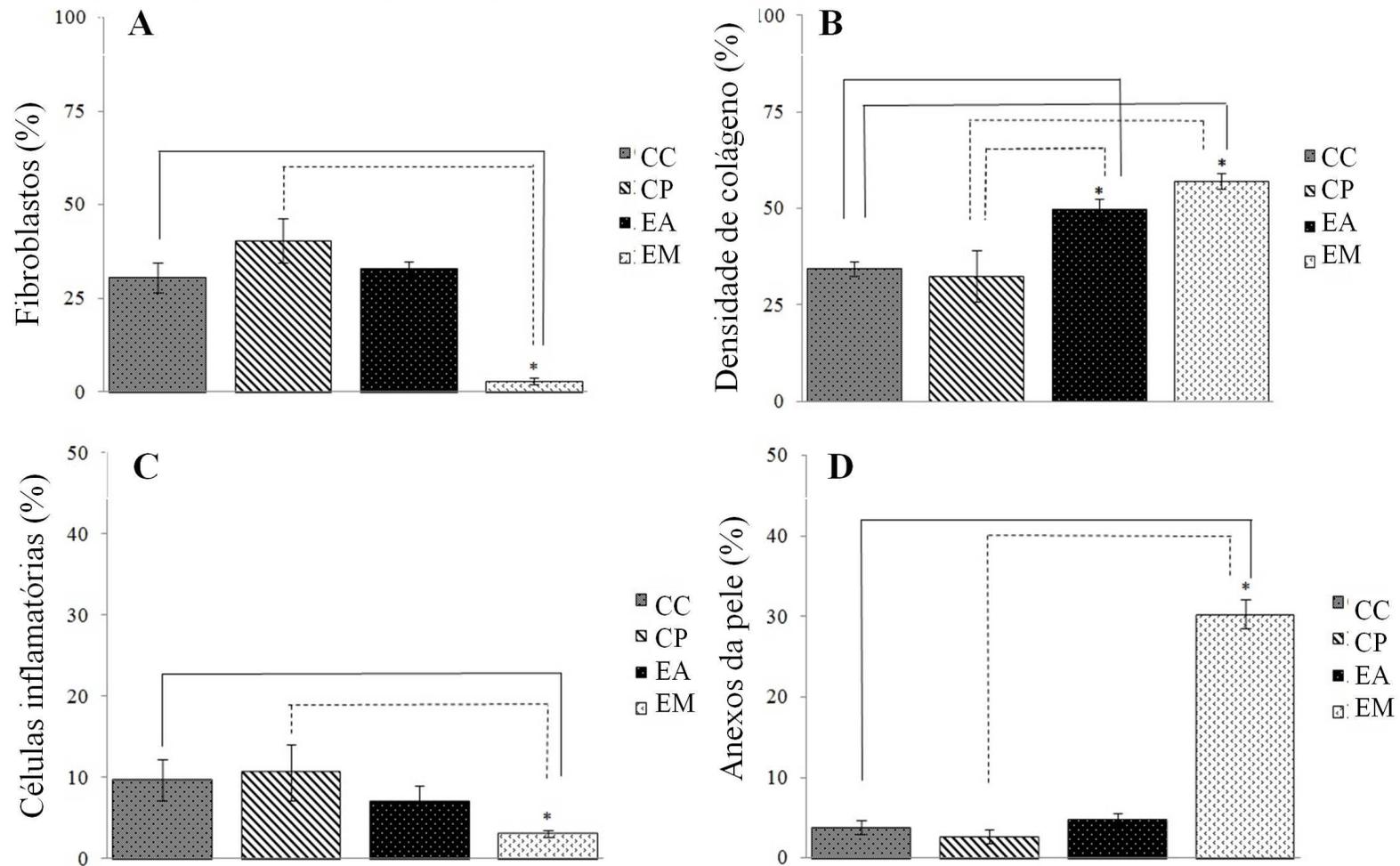
mostramram a formação de lâmina basal bem definida no grupo EM-25 (fig. 4), quando comparada aos demais grupos. Esse resultado corrobora a capacidade completa de reepitelização desse extrato em feridas cutâneas.

Figura 4 – Análise histopatológica das feridas tratadas com CC (Controle Carbopol®), CP (Controle Positivo - Neocetheo®), EA-25 (Carbopol® + 25% de extrato autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de extrato mixotrófico) no 12º dia pós-operatório. As fotografias mostram evidência de epitelização e presença de lâmina basal (seta) no grupo tratado com EM-25. Coloração de ácido periódico de Schiff, ampliação de 400x e as barras de escala representam 20 µm. E: epiderme; D: derme.



Fonte: O autor (2018).

Figura 5 – Análises morfométricas das feridas tratadas com CC (Controle Carbopol®), CP (Controle Positivo - Neocetho®), EA-25 (Carbopol® + 25% de extrato autotrófico) e EM-25 (Carbopol® + 25% de extrato mixotrófico) no 12º dia pós-operatório. Uma menor quantidade de fibroblastos (A) e células inflamatórias (C) é observada no grupo EM-25. Uma maior densidade de colágeno (B) e anexos da pele são apresentados no mesmo grupo. Os dados são descritos como média \pm DP, $p < 0,05$.



Fonte: O autor (2018).

As formulações EA-25 e EM-25 mostraram resultados de análises macroscópicas significativamente maiores na oclusão da ferida quando comparados aos grupos EA-10 e EM-10. Por outro lado, a administração tópica de uma pomada contendo 10% do pó de *Chlorella sorokiniana* produzido pela indústria francesa Roquette Frères (Lestrem, França) foi realizada em um ensaio de cicatrização de feridas em camundongos, e apresentou uma eficiente cicatrização a partir do 6º dia de tratamento (HIGALGO-LUCAS et al., 2014). Em nosso estudo, extratos da biomassa de *C. vulgaris* foram utilizados, a fim de aumentar a disponibilidade de compostos ativos intracelulares, o que poderia consequentemente aumentar a capacidade de reepitelização do tecido em um menor período de tempo.

3.3 Caracterização e atividades biológicas dos extratos de microalga

3.3.1 Concentração proteica e atividade hemaglutinante

O conteúdo proteico foi de $1,011 \pm 0,02$ mg/mL em EA e $1,174 \pm 0,01$ mg/mL em EM. A atividade hemaglutinante dos extratos de microalga demonstrou que os extratos EA e EM apresentaram títulos de hemaglutinação similares de $\geq 2^{48}$ para sangue de coelhos. Em relação ao sistema sanguíneo humano ABO, apenas o extrato mixotrófico apresentou atividade $\geq 2^{24}$, exclusivamente para o tipo B. A atividade antioxidante foi de $33,63 \pm 0,52\%$ no EA e $54,64 \pm 0,37\%$ no EM.

A microalga *Chlorella vulgaris* sintetiza mais proteínas quando cultivada em ambientes ricos em nitrogênio; e quando o nitrogênio é limitado no meio de cultura, ela reduz sua síntese proteica. A milhocina é um subproduto que contém uma grande quantidade de nitrogênio em sua composição, induzindo a produção de proteínas na biomassa de microalgas (CHIANI et al., 2010). Melo et al. (2018) cultivaram *C. vulgaris* em diferentes subprodutos agroindustriais, e observaram uma maior produção de proteína na biomassa cultivada com o uso de milhocina, quando comparada ao cultivo autotrófico. Os mesmos resultados foram encontrados neste estudo, onde o extrato de *C. vulgaris* cultivada com milhocina apresentou uma quantidade significativamente maior de proteína quando comparada à condição autotrófica.

A atividade cicatrizante de feridas a partir de algas e microalgas ainda não é bem relatada na literatura. Nascimento-Neto et al. (2012) extraíram uma lectina da macroalga *Bryothamnion seaforthii* e a utilizaram em um ensaio de cicatrização. Foi

observada uma oclusão efetiva da ferida, maior densidade de colágeno, forte presença de anexos cutâneos e uma completa reestruturação epitelial no grupo tratado com a lectina, quando comparados aos demais. As lectinas são proteínas de origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a compostos contendo carboidratos e de aglutinar células e glicoconjugados, sem induzir qualquer modificação química nos mesmos. A ligação lectina-carboidrato na superfície dos glóbulos vermelhos permite a interconexão e formação de uma rede dessas células, favorecendo a atividade hemaglutinante. Algumas algas vermelhas também apresentam lectinas com diversas propriedades biológicas, como antivirais, anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatórias e antinociceptivas (SINGH; WALIA, 2017). Além disso, elas também se apresentam como uma alternativa promissora no tratamento de feridas cutâneas devido ao seu potencial cicatrizante (CAGLIARI et al., 2018).

Porto et al. (2016) purificou lectinas a partir da biomassa de *C. vulgaris* cultivada sob condições autotróficas, e obteve uma atividade hemaglutinante $> 2^{36}$ contra eritrócitos de coelho usando extrato bruto, e uma atividade de 185.130 AH/mg de lectina purificada. Os resultados obtidos a partir do extrato bruto foram semelhantes aos encontrados neste trabalho utilizando a mesma metodologia. Assim, pode-se considerar que os extratos de *C. vulgaris* avaliados neste estudo podem conter proteínas da classe das lectinas, as quais auxiliam no processo de cicatrização, como já relatado em outros estudos.

3.3.2 Perfil fitoquímico e ensaio antioxidante

A prospecção fitoquímica qualitativa está descrita na Tabela 1. Em EA foram encontrados esteroides/triterpenos e taninos condensados. No EM, as principais classes de metabólitos secundários observadas foram esteroides/triterpenos, saponinas e açúcares. A atividade antioxidante foi de $33,63 \pm 0,52\%$ em EA e $54,64\% \pm 0,37$ em EM.

Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos autotrófico e mixotrófico de *Chlorella vulgaris* através de cromatografia de camada delgada

Metabólitos secundários	EA	EM
Alcalóides	-	-
Cumarinas	-	-
Esteroides/Triterpenos	+	+
Flavonóides	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	-
Taninos condensados	+	-
Saponinas	-	+
Açúcares	-	+

EA = extrato obtido da biomassa de *C. vulgaris* cultivada em condição autotrófica

EM = extrato obtido da biomassa de *C. vulgaris* cultivada em condição mixotrófica

+ = presente na amostra

- = ausente na amostra

Fonte: O autor (2019).

Análises fitoquímicas dos extratos de *Chlorella vulgaris* revelaram a presença de compostos como flavonóides, taninos, compostos fenólicos, terpenos e saponinas (SYED et al., 2015). No presente estudo, os dados demonstram a presença de triterpenos, taninos condensados e saponinas em extratos de microalgas, o corroborando com os resultados anteriores. Esses metabólitos secundários já foram relatados na literatura para atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antimicrobianas e favorecem o processo de cicatrização de feridas, devido ao seu efeito sobre os mediadores celulares envolvidos no processo, criando um microambiente que promove a reparação tecidual e favorece o processo de cicatrização e remodelação tecidual (ZARIN et al., 2016; SINGH et al., 2017).

O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no local da ferida é decisivo no processo de regeneração tecidual. Os antioxidantes são capazes de eliminar a atividade dos radicais livres e inibir sua propagação de reação, favorecendo o processo de cura (PARWANI et al., 2013). As propriedades de eliminação de radicais livres dos compostos de *C. vulgaris* provavelmente protegeram o tecido das feridas dos danos oxidativos e reduziram o risco de inflamação, contribuindo para uma melhor cicatrização.

3.3.3 Atividade antibacteriana

O percentual de inibição do crescimento bacteriano foi calculada usando a CIM, e os resultados demonstraram que o EA foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas testadas na sua maior concentração (100 mg/mL). Em relação ao EM, este foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* na CIM de 0,781 mg/mL, *E. faecalis* em 50 mg/mL e *E. coli* na concentração de 100 mg/mL.

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias frequentemente encontradas causando infecções na pele (KOFTERIDIS et al., 2012; ALHARBI et al., 2018). No presente estudo, tanto o EA como o EM de *C. vulgaris* apresentaram excelentes resultados contra as cepas testadas. Esses resultados foram melhores que os encontrados por Syed et al. (2015), que analisaram o extrato etanólico de *C. vulgaris* cultivada em condições autotróficas, na concentração de 100 mg/mL, contra *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. e obtiveram atividade antimicrobiana apenas para *Klebsiella* sp.. Esses dados comprovam que os extratos utilizados no presente estudo reduzem a população bacteriana local, auxiliando no processo de remodelação do tecido lesado. Agentes antimicrobianos eficazes proporcionam uma cicatrização melhor e mais rápida em uma ou mais fases do processo, formando uma barreira contra populações microbianas (SUNTAR et al., 2013).

4 Conclusão

Neste estudo um hidrogel contendo extratos de *Chlorella vulgaris* cultivada sob condição mixotrófica proporcionou uma cicatrização mais rápida de feridas em camundongos. Comparado com os grupos controle, o EM-25 promoveu maior deposição de colágeno e presença de anexos cutâneos, redução de fibroblastos e células inflamatórias, além de presença de lâmina basal. Além disso, o extrato do mesmo grupo apresentou elevada quantidade de proteínas, alta capacidade antioxidante, presença de fitoquímicos como esteroides, triterpenos e saponinas, excelente atividade hemaglutinante e atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas encontradas na pele. As propriedades pró-cicatrizantes e antiinflamatórias deste hidrogel indicam a possibilidade de uma nova formulação

tópica potencial para o tratamento de vários distúrbios da pele, como a cicatrização de feridas agudas e crônicas.

4 CONCLUSÃO

- 1) O cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* promoveu uma altas taxas de crescimento e produtividade celular, especialmente utilizando 1% de milhocina, obtendo um X_m de 2,10 g/L e P_{max} de 0,20 g/L/dia;
- 2) A microalga removeu altas taxas de nutrientes, como N e P, e reduziu os níveis de DQO dos cultivos;
- 3) A fitorremediação dos subprodutos agroindustriais com *C. vulgaris* reduziu totalmente o poder tóxico, citotóxico e genotóxico da milhocina, minimizou o potencial tóxico do soro de queijo e o genotóxico da vinhaça;
- 4) Uma patente de invenção da formulação em hidrogel com atividade cicatrizante foi depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial;
- 5) A formulação contendo 25% do extrato da biomassa cultivada em condição mixotrófica com milhocina (EM-25) apresentou alta capacidade de regeneração tissular a partir do 7º dia de tratamento;
- 6) O grupo EM-25 obteve maior deposição de colágeno, redução de células fibroblásticas e inflamatórias e evidente presença de anexos da pele no 12º dia de tratamento;
- 7) O extrato da biomassa cultivada em condição mixotrófica com milhocina foi caracterizado e apresentou uma concentração proteica de 1,174 mg/mL, atividade hemaglutinante de 2^{48} frente a sangue de coelho, atividade antioxidante de 54,64%, presença de esteroides, triterpenos e saponinas e atividade antibacteriana contra cepas de *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- ABE, K.; IMAMAKI, A.; HIRANO, M. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal of Applied Phycology**. v. 14, p. 129-134, 2002.
- ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE QUEIJO. Disponível em <https://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/producao-de-queijos-no-brasil-perde-folego-em-2015-100443n.aspx>. Acesso em setembro de 2017.
- ABREU, A.M.; RENAUD, B.; OLIVEIRA, B.O. Atendimento a pacientes com feridas crônicas nas salas de curativos das policlínicas de saúde. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**. v. 15, n. 2, p. 42-49, 2013.
- ABREU, A.P., FERNANDES, B., VICENTE, A.A., TEIXEIRA, J., DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**. v. 118, p. 61–66, 2012.
- ALHARBI, N.S., KHALED, J.M., KADAIKUNNAN, S., ALOBAIDI, A.S., SHARAFADDIN, A.H., ALYAHYA, S.A., ALMANAA, T.N., ALSUGHAYIER, M.A., SHEHU, M.R. Prevalence of *Escherichia coli* strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. **Saudi Journal of Biological Sciences**, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.11.016>., 2018.
- ALKHAMIS, Y; QIN, J.G. Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. **Journal of Applied Phycology**. v. 28, p. 35-42, 2015.
- AMADO, I.R.; VÁZQUEZ, J.A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA J.A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**. v. 198, p. 54–61, 2016.
- AMARTEY A. LEUNG J. Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* t-13. *Bulletin of the Chemists and Technologists*. v. 19, p. 65-71, 2000.
- ANNABI,N., RANA, D., SHIRZAEI SANI, E., PORTILLO-LARA, R., GIFFORD, J.L., FARES, M.M., MITHIEUX, S.M., WEISS, A.S. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. **Biomaterials**. v. 139, p. 229-243, 2017.
- APARICIO, J.D.; BENIMELI, C.S.; ALMEIDA, C.A.; POLTI, M.A.; COLIN, V.L. Integral use of sugarcane vinasse for biomass production of actinobacteria: Potential application in soil remediation. **Chemosphere**. v. 181, p. 478-484, 2017.
- AYED, H.B.; BARDA, S.; MOALLA, D.; JRIDI, M.; MAALEJ, H.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T.; JACQUES, P.; NASRI, M.; HMIDET, N. Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavensis* A21. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1023–1030, 2015.

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M.H.; RAHIMI, R. **Archives of Dermatological Research**. v. 306, p. 601–617, 2014.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARI, E., ARCIOLA, C.R., VIGANI, B., CRIVELLI, B., MORO, P., MARRUBINI, G., SORRENTI, M., CATENACCI, L., BRUNI, G., CHLAPANIDAS, T., LUCARELLI, E., PERTEGHELLA, S., TORRE, M.L. *In Vitro* Effectiveness of Microspheres Based on Silk Sericin and *Chlorella vulgaris* or *Arthrospira platensis* for Wound Healing Applications. **Materials (Basel)**. v. 10, p. 983., 2017.

BARRIENTOS, S., BREM, H., STOJADINOVIC, O., TOMIC-CANIC, M. Clinical Application of Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. **Wound Repair Regen**. v. 22(5), p. 569–578, 2014.

BEIJERINCK, M. Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Ztg**, v. 48, p. 729, 1890.

BENEMANN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Journal of Industrial Microbiology**, v.31, n.5, p.247-256, 1990.

BISCHOFF, H. W., BOLD, H. C. Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algae species. **University of Texas Publications number 63**. v. 18, p. 1-95, 1963.

BISWAS, T.K., PANDIT, S., CHAKRABARTI, S., BANERJEE, S., POYRA, N., SEAL, T. Evaluation of *Cynodon dactylon* for wound healing activity. **J. Ethnopharmacol**. v. 197, p. 128–137, 2017.

BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo, 2004. Disponível em <http://www.bapbaptista.com>. Acesso em agosto de 2017.

BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanotece microscopica* Nägelli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono em vinhaça**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente), UFSCar, Araras, 2012.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento de *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), UFPR, Curitiba, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M,E, BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT Food Sci. Technol**. v. 28 (1), p 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS**. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília : Funasa, 2014.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, suppl. 7, p. 12s-34s, 2006.

BRUIN, P. et al. A new porous polyetherurethane wound covering. **Journal of Biomedical Materials Research**, USA, v. 24, n. 2, p. 217-226, 1990.

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 171–183, 2015.

CAGLIARI, R., KREMER, F.S., PINTO, L.S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 119, p. 811-820, 2018.

CALIXTO, C. D., SANTANA, J.K.S., LIRA, E.B., SASSI, P.G.P., ROSENHAIM, R., SASSI, C.F.C., CONCEIÇÃO, M.M., SASSI, R. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource. Technology**. v. 221, p. 438–446, 2016.

CARDOZO, K.H.M.; GUARANTINI, T.; BARROS, M.P.; et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**., v. 146, p. 60-78, 2007.

CAROTA, E.; CROGNALE, S.; D'ANNIBALE, A.; GALLO, A.M.; STAZI, S.R.; PETRUCCIOLI, M. A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**. v. 584–585, p. 554–560, 2017.

CHANDIKA, P.; KO, S.C.; JUNG, W.K. Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 24–35, 2015.

CHIANI, M., AKBARZADEH, A., FARHANGI, A., MEHRABI, M.R. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 13, p. 1151-1155, 2010.

CHRISTOFOLETTI, C.A., ESCHER, J.P., CORREIA, J.E., MARINHO, J.F.U., FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**. v. 33, p. 2752 – 2761, 2013.

CHRISTOFOLETTI, C.A., FRANCISCO, A., PEDRO-ESCHER, J., GASTALDI, V.D., FONTANETTI, C.S. Diplopods as soil bioindicators of toxicity after application of residues from sewage treatment plants and ethanol industry. **Microsc. Microanal.** v. 22, p. 1098–1110, 2016.

CHRISTOPHER, E. Kinetic aspects of epidermal healing. In: MAIBACH, H.; ROOVE, D. (Ed.). **Epidermal wound healing**. St. Louis: Mosby, 1972.

CHU, C.Y., HUANG, R., LIN, L.P. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 33, p. 967– 973, 2006.

CHUBACHI, H.; SAITO, M.; TAKEKOSHI, H.; YUASA, K.; HIRANAKA, T. Anti-inflammatory effect of *Chlorella pyrenoidosa* on chronic dermatitis in beagles. **Med. Biol.** v. 153, 575-581, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute Performance **Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27^a ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2017.

COLIN, V.L.; CORTES, A.A.J.; APARICIO, J.D.; AMOROSO, M.J. Potential application of a bioemulsifier-producing actinobacterium for treatment of vinasse. **Chemosphere**. v.144, p. 842-847, 2016.

COLOMBO, B.; PEPÈ, S.T.; REIS, M.; SCAGLIA, B.; ADANI, F. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. **Bioresource Technology**. v. 218, p. 692–699, 2016.

CONAMA, 2005. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução nº 357, Brazil. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em janeiro de 2019.

CORRÊA, N.M., CAMARGO JÚNIOR, F.B., IGNÁCIO, R.F., LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 41(1), p. 73-78, 2005.

CORREIA, J.E., CHRISTOFOLETTI, C.A., MARCATO, A.C.C., MARINHO, J.F.U., FONTANETTI, C.S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 135, p. 319–326, 2017.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart (Camaratu Bean). **Appl. Biochem. Biotech.** v. 55, p. 261- 273, 1995.

CUELLAR-BERMUDEZ, S.P., AGUILAR-HERNANDEZ, I., CARDENAS-CHAVEZ, D.L., ORNELAS-SOTO, N., ROMERO-OGAWA, M.A., PARRA-SALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microb. Biotechnol.** v. 8, p. 190–209, 2015.

DANTAS, D.C.; QUEIROZ, M.L. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Immunopharmacology**. v. 21, n. 8, 499–508, 1999.

DAS, B.; SREYA SARKAR, S.; MAITI, S.; BHATTACHARJEE, S. Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Materials Today: Proceedings**. v. 3, p. 3253–3257, 2016.

DOUCHA, J. The *Chlorella* programme in the Czech Republic. **Inst. Microbiol. Czech. Acad. Sci.** v. 16, 1998.

EBRAHIMINEZHAD, A.; RASOUL-AMINI, S.; GHOSHON, M.B; et al. *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L-asparaginase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 214–217, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Agência Embrapa de informação Tecnológica. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em julho de 2017.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. **Bioresource Technology**. v.155, p. 170–176, 2014.

FARD, S.G.; TAN, R.R.; MOHAMMED, A.A.; MENG, G.Y.; MUHAMAD, S.K.S.; AL-JASHAMY, K.A.; MOHAMED, S. Ethanolic Extract of *Eucheuma cottonii* Promotes *in vivo* Hair Growth and Wound Healing. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 5, p. 6373–6380, 2011.

FILIPOVIC, S.S.; RISTIC, M.D.; SAKAC, M.B. Technology of Corn Steep Application in Animal Mashs and their Quality. *Romanian Biotechnological Letters*. v. 7, n. 3, p. 705-710, 2002.

FOX, L.T, MAZUMDER, A., DWIVEDI, A., GERBER, M., PLESSIS, J., HAMMAN, J.H. *In vitro* wound healing and cytotoxic activity of the gel and whole-leaf materials from selected aloe species. **J. Ethnopharmacol.** v. 200, p. 1–7, 2017.

FROST AND SULLIVAN. Strategic Analysis of the Global Chlorella Powder Ingredients Market: Increased Interest in Identifying a Viable Fishmeal Replacement will Drive Adoption of Chlorella Powders. 2015. Disponível em: <http://www.frost.com/sublib/display-report.do?id=NFD3-01-00-00-00>. Acesso em janeiro de 2019.

FRYKBER, R.G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n.9, p. 560-582, 2015.

FUKUMOTO, L.R., MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agr. Food Chem.** v. 48, n. 8, p. 3597–3604, 2000.

GORCZYCA, G.; TYLINGO, R.; SZWEDA, P.; AUGUSTIN, E.; SADOWSKA, M.; MILEWSKI, S. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 901–911, 2014.

GOULD, L.; ABADIR, P.; BREM, H.; CARTER, M.; CONNER-KERR, T.; DAVIDSON, J.; DIPIETRO, L.; FALANGA, V.; FIFE, C.; GARDNER, S. GRICE, E.; et al. Chronic Wound Repair and Healing in Older Adults: Current Status and Future Research. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 63, n. 3, p. 427–438, 2015.

GREGOR, S.; MAEGELE, M.; SAUERLAND, S.; KRAHN, J.F.; PEINEMANN, F.; LANGE, S. Negative Pressure Wound Therapy - A Vacuum of Evidence? **Archives of Surgery**, v.143, n. 2, p. 189-196, 2008.

GRINNELL, F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. **Journal of Cell Science**, England, v. 101, p. 1-5, 1992.

GROBBELAAR, J.U. Algal Nutrition Mineral Nutrition.In.: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing Ltd, 2004.

GUEST, J.F.; AYOUB, N.; MCILWRAITH, T.; UCHEGBU, I.; GERRISH, A.; WEIDLICH, D.; VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. **BMJ Open**, v. 5, e009283, 2015.

GUIA DA FARMÁCIA, 2016. Disponível em <http://www.guiadafarmacia.com.br/edicao-257-reajuste-de-precos/426-suplementos-especiais/fito-2016/10793-fitoterapicos-ganham-espaco>. Acesso em agosto de 2017.

GÜVEN K.C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 269-284, 2010.

HALL, L.W., CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**. Ballière, Tindall, Londres., 1991.

HATA, J. Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells, *Marchantia polymorpha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 65-74, 2000.

HIDALGO-LUCAS, S.; BISSON, J-F.; DUFFAUD, A.; NEJDI, A.; GUERIN-DEREMAUX, L.; BAERT, B.; SANIEZ-DEGRAVE, M-H.; ROZAN, P. Benefits of oral and topical administration of ROQUETTE *Chlorella sp.* on skin inflammation and wound healing in mice. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 13, p.93-102.

IMABA, 2008. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Informação Técnica nº 175/08/CGASQ/DIQUA. Disponível em: http://www2.mma.gov.br/port/conama/processos/EFABF603/Ofi_08_2008DIQUAIBA_MA_Completo.pdf. Acesso em janeiro de 2019.

JOHNSTON, D. E. Skin and subcutaneous tissue. In: BOJRAB, M.J. (Ed.). **Pathophysiology in small animal surgery**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. p. 405.

JONG-YUH, C.; MEI-FEN, S. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. **Life Sciences**, v. 77, p. 980–990. 2005.

KIM, B.S.; PARK, I.K.; HOSHIBA, T.; JIANG,H.L.; CHOI, Y.J.; AKAIKE, T.; CHO, C.S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**. v. 36, p. 238–268, 2011.

KIM, J., LEE, C-H. Wound healing potential of a polyvinyl alcohol-blended pectin hydrogel containing *Hippophae rhamnoides* L. extract in a rat model. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 99, p. 586–593, 2017.

KOFTERIDIS, D.P., VALACHIS, A., KOUTSOUNAKI, E., MARAKI, S., MAVROGENI, E., ECONOMIDOU, F.N., DIMOPOULOU, D., KALBAKIS, K., GEORGOULIAS, V., SAMONIS, G. Skin and soft tissue infections in patients with solid tumours. **Sci. World J.** v. 2012, p. 1-6, 2012.

KORDJAZI, M.; Shabanpour, B.; Zabihi, E.; Faramarzi, M.A.; Feizi, F.; Gavlighi, H.A.; Feghi, M.A.; Hosseini, S.A. Sulfated Polysaccharides Purified from Two Species of

Padina Improve Collagen and Epidermis Formation in the Rat. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**. v. 2, n. 4, p. 156-163, 2013.

KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science and Technology**. v. 49, n. 5, p.614–619, 2012.

KUBATKA, P.; KAPINOV, A.; KRU-ZLIAK, P.; KELLO, M.; DESANKA V.; KAJO K.; et al. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. **Nutrition**, v. 31, p. 560–569, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8a ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2010.

LAIME, E.M.O., FERNANDES, P.D., OLIVEIRA, D.C.S., FREIRE, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 5, p. 16–29, 2011.

LANANAN, F.; ABDUL HAMID, S.H.; DIN, W.N.S.; ALI, N.A.; KHATOON, H.; JUSOH, A.; ENDUT, A. Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). **Int. Biodeterior. Biodegrad**. v. 95, p. 127-134, 2014.

LAWRENCE, W.T.; DIEGELMANN, R. Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, v.12, 157-169, 1994.

LI, T., KIRCHHOFF, H., GARGOURI, M., FENG, J., COUSINS, A.B., PIENKOS, P.T., GANG, D.R., CHEN, S. Assessment of photosynthesis regulation in mixotrophically cultured microalga *Chlorella sorokiniana*. **Algal Res**. v. 19, p. 30–38, 2016.

LIMA E SILVA, T.A.; LUNA, J.M.; MORAES FILHO, M.A.. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

LIN, Y.H.; CHEN, G.W.; YEH, C.H.; SONG, H.; TSAI, J.S. Purification and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides and the Antihypertensive Effect of *Chlorella sorokiniana* Protein Hydrolysates. **Nutrients**. v. 10, p. 1-14, 2018.

LIU, B.; YANG, M.; QI, B.; CHEN, X.; SU, Z.; WAN, Y. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As. 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**. v. 52, 212-219, 2010.

LIU, X.; WANG, X.; XU, J.; XIA, J.; LV, J.; ZHANG, T.; WU, Z.; DENG, Y.; HE, J. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. **Industrial Crops and Product**. v. 78, 154-160, 2015.

LODHI, S.; AK, S. Preliminary pharmacological evaluation of *Martynia annua* Linn leaves for wound healing. **Asian Pac. J. Trop. Biomed**. v. 1, p. 421–427, 2011.

MA, T.H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutat. Res.** v. 426, p. 103–106, 1999.

MAHBOOB, S.; RAUF, A.; ASHRAF, M.; et al. High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. **Aquaculture International.** v.20, p. 455–466, 2012.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N.S.; et al. Avanços na Pesquisa de bioativos de algas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, 2011.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, England, v. 20, n. 20, 2005.

MASOJÍDEK, J.; PRÀŠIL, O. The development of microalgal biotechnology in the Czech Republic. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 37, p. 1307–1317, 2010.

MAVER, T.; MAVER, U.; STANA, K.K.; SMRKE, D.M.; KREFT, S. A review of herbal medicines in wound healing. **International Journal of Dermatology.** v. 54, n. 7, p. 740–751, 2015.

MELO, R.G.; ANDRADE, A.F.; BEZERRA R.P.; CORREIA, D.S.; SOUZA, V.C.; BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; VIANA MARQUES, D.A.; PORTO, A.L.F. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by products. **Chemosphere.** v. 204, p. 344 – 350, 2018.

MIRZAIE, M.M.A.; KALBASI, M.; MOUSAVI, S.M.; GHOBADIAN, B. Statistical evaluation and modeling of cheap substrate-based cultivation medium of *Chlorella vulgaris* to enhance microalgae lipid as new potential feedstock for biolubricant. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, DOI: 10.1080/10826068.2015.1031398, 2015.

MORRIS, H. J.; CARRILLO, O.; ALMARALES, A.; BERMUDEZÁ, R.C.; LEBEQUE, Y.; FONTAINE, R.; LLAURADO, G.; BELTRAN, Y. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 40, p. 456-460, 2007.

NAIR, R.B.; TAHERZADEH, M.J. Valorization of sugar-to-ethanol process waste vinasse: A novel biorefinery approach using edible ascomycetes filamentous fungi. **Bioresource Technology.** v. 221, p. 469–476, 2016.

NAMSA, N.D.; TAGC, H.; MANDAL, M.; KALITAC, P.; DAS, A.K. An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit community of Arunachal Pradesh, India. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 125, p. 234–245, 2009.

NAMVAR, F., BAHARARA, J., MAHDI, A.A. Antioxidant and Anticancer Activities of Selected Persian Gulf Algae. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v.29, p. 13–20, 2014.

NASCIMENTO, R.P.; JUNIOR, N.A.; PEREIRA JR, N.; BOM, E.P.S.; COELHO, R.R.R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 48, p. 529-535, 2009.

NASCIMENTO-NETO, L.G.; CARNEIRO, R. F.; SILVA, S.R.; SILVA, B.R.; ARRUDA, F.V.; CARNEIRO, V.A.; NASCIMENTO, K.S.; et al. Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. **Marine Drugs**. v.10, n. 1936-1954, 2012.

NASIR, N.M.; BAKAR, N.S.A; LANANAN, F.; HAMID, S.H.A.; LAM, S.S.; JUSOH, A. Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bioharvesting. **Bioresource Technology**. v. 190, p. 492–498, 2015.

NODA, K.; OHNO, N.; TANAKA, K.; KAMIYA, N.; OKUDA, M.; YADOMAE, T.; NOMOTO, K.; SHOYAMA, Y. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Planta Medica**. v. 62, n. 5, p. 423–426, 1996.

NOGUCHI, N.; KONISHI, F.; KUMAMOTO, S.; MARUYAMA, I., ANDO, Y., YANAGITA, T. Beneficial effects of *Chlorella* on glucose and lipid metabolism in obese rodents on a high-fat diet. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, p. 95-105, 2013.

OTSUKI T, SHIMIZU K, IEMITSU M, KONO I. Multicomponent supplement containing *Chlorella* decreases arterial stiffness in healthy young men. **J Clin Biochem Nutr**. v. 53, p. 166- 169, 2013.

ÖZ, B.E.; SALTAN-IŞCAN, G.; AKKOL, E.K.; SÜNTAR, I.; KELEŞ, H.; ACIKAR, Ö.B. Wound healing and anti-inflammatory activity of some *Ononis* taxons. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 1096–1105, 2017.

PAL, P.; SRIVAS, P.K.; DADHICH, P.; DAS, B.; MAITY, P.P.; MOULIK, D.; DHARA, S. Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1507–1518, 2016.

PANAHI Y.; GHAMARCHEHREH, M.E.; BEIRAGHDAR, .; ZARE, R.; JALALIAN, H.R.; SAHEBKAR, A. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. **Hepatogastroenterology**. v. 59, p. 2099-2103, 2012.

PANAHI, Y; BADELI, R.; KARAMI, G.R.; et al. A randomized controlled trial of 6-week *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with major depressive disorder. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 23, p. 598–602, 2015.

PANOBIANCO, M. S.; SAMPAIO B.A.L.; CAETANO, E.A.; INOCENTI, A.; GOZZO, T.O. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e

não-portadoras de diabetes mellitus. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v.11, p.15-22, 2012.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 2321–2334, 2007.

PARICHEHREH, R.; GHESHLAGHI, R.; MAHDAVI, M.A.; ELKAMEL, A. Optimization of lipid production in *Chlorella vulgaris* for biodiesel production using flux balance analysis. **Biochemical Engineering Journal**. v. 141, p. 131–145, 2019.

PARWANI, L; BHATNAGAR, M.; BHATNAGAR, A.; SHARMA, V. Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing. **Journal of Applied Phycology**. v. 26, p.1473 – 1482, 2013.

PEDRO-ESCHER, J., MAZIVIERO, G.T., FONTANETTI, C.S. Mutagenic action of sugar cane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **J. Ecosyst. Ecogr.** v. 4, p. 1-4, 2014.

PELED, Z. M. et al. Response to tissue injury. **Clinics in Plastic Surgery**, USA, v. 27, p. 489-500, 2000.

PETROVA, M.B. Morfofunktional'nye osobennosti zazhivleniia kozhnoi rany u krys pri vozdeistvii nizkointensivnogo lazernogo izlucheniia. **MorfologijaN**, v. 102, n. 6, p. 112-121, 1992.

PIETRAMAGGIORI, G.; YANG, H.J.; SCHERER, S.S.; KAIPAINEN, A.; CHAN, R.K.; ALPEROVICH, M. Effects of poly-N-acetyl glucosamine (pGlcNAc) patch on wound healing in db/db mouse. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**. v. 64, n. 3, p. 803–808, 2008.

PIPES, W. O.; GOTAAS, H. B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in seawage. **Applied Microbiology**, v.8, p.163-169, 1960.

PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 7159-7170, 2009.

PORTO, A.L.F., CAVALCANTI, V.L.R., BEZERRA, R.P., VIANA MARQUES, D.A., HERCULANO, P.N., NASCIMENTO, C.O., COSTA, R.M.P.B. **Processo de extração de lectinas a partir de micro-organismos fotossintetizantes**. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Brazil Patents. Pub. No.: BR 1020160256160, 2016.

PRATA, M.B., HADDAD, C.M., GOLDENBERG, S., SIMÕES, M.J, MOURA, LA.R., TRABULSI, L.R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.** v. 3 (2), p. 43–48, 1988..

PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**. v. 110, p. 48–68, 2012.

PUGH, N.; ROSS, S.A.; ELSOHLY, H.N.; ELSOHLY, M.A.; PASCO, D.S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent

immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flosaque* and *Chlorella pyrenoidosa*. **Planta Medica**. v. 67, n. 8, p. 737–742, 2001.

QI, J.; KIM, S.M. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 95, p. 106-114, 2017.

QUEIROZ, J.S.; BLASCOA, I.M.; GAGLIANO, H.; et al. *Chlorella vulgaris* reduces the impact of stress on hypothalamic–pituitary–adrenal axis and brain c-fos expression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 65, p. 1–8, 2016.

RAMOS, A.L.; TORELLO, C.O.; QUEIROZ, M.L. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**. v. 62, n. 8, p. 1170–1180, 2010.

RIAÑO, B.; BLANCO, S.; BECARES, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Bioremediation and biomass harvesting of anaerobic digested cheese whey in microalgal-based systems for lipid production. **Ecological Engineering**, v. 97, p. 40–45, 2016.

RICHMOND, A. Microalgal Culture – Biotechnology an Applied Phycology. **Blackwell Science Ltd**, n. 4, 2004.

ROCHA, H.A.O.; ALVES, L.G.; LEITE, E.L. **Aproveitamento integral de algas marinhas**. In: Alex Augusto Gonçalves (Org.). Tecnologia do Pescado – Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação. 1 ed. São Paulo, 2011.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; GUIL-GUERRERO, J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chemistry**. v. 108, p. 1023–1026, 2008.

RUSSO, D.A.M.T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; OTHMANE M.; YVES P.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.35, p. 265–278, 2014.

SAKARIKA, M.; KORNAROS, M. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. **Bioresource Technology**. v. 273, p. 237–243, 2019.

SALATI, S., IMPORZANO, G., MENIN, B., VERONESI, D., SCAGLIA, B., ABBRUSCATO, P., MARIANI, P., ADANI, F. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. **Bioresource Technology**. v. 230, p. 82–89, 2017.

SALMAN, B.; KEREM, M.; BEDIRLI, A.; KATIRCIOGLU, H.; OFLUOGLU, E.; AKIN, O.; ONBASILAR, I.; OZSOY, S.; HAZIROGLU, R. Effects of *Chlorella* sp. microalgae extract on colonic anastomosis in rats with protein–energy malnutrition. The

Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. **Colorectal Disease**. v. 10, p. 469–478, 2007.

SANTOS, R.R.; ARAÚJO, O.Q.F.; MEDEIROS, J.L.; CHALOU, R.M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 2016.

SAXENA, J.; TANNER, R.S. Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 28, p. 1553–1561, 2012.

SENNI, K.; PEREIRA, J.; GUENICHE, F.; DELBARRE-LADRAT, C.; SINQUIN, C.; RATISKOL, J.; GODEAU, G.; FISCHER, A.M.; HELLEY, D.; COLLIEC-JOUAULT, S. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1664–1681, 2011.

SEO-HYEON, S.; IN-HYE, K.; TAEK-JEONG, N. Effect of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* on proliferation of IEC-6 cells. **International Journal Of Molecular Medicine**, v. 29, p. 741-746, 2012.

SEZER, A.D.; HATIPOGLU, F.; CEVHER, E.; OĞURTAN, Z.; BAS, A.L.; AKBUĞA, J. *AAPS PharmSciTech*.v. 8, p. 94–101, 2007.

SHEIH I.; FANG, T.; TUNG-KUNG W. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, p. 279–284, 2009.

SIBI, G.; RABINA, S. Inhibition of Pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella Vulgaris* extracts. **Pharmacognosy Research**. v. 8, n. 2, p. 118-122, 2016.

SILVA, A.P.M.; BONO, J.A.M.; PEREIRA, F.A.R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.18, n.1, p.38-43, 2014.

SILVA, M.A.S; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.11, n.1, p.108–114, 2007.

SILVA, P.E.C.; BARROS, R.C.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; BRANDÃO, R.M.P.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L.F. *In vitro* thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. **J. Chromatogr. B**. v. 1092, p. 524-529, 2018.

SILVER, I. A. Basic physiology of wound healing in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 14, n. 1, p. 7-15, 1982.

SINCLAIR, R.D.; RYAN, T.J. A great war for antiseptics. **Wound Management**, v. 4, p. 16-18, 1993.

SINGER, A. D.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p.738-46, 1999.

SINGH, H., ALI, S.S., KHAN, N.A., MISHRA, A., MISHRA, A.K. Wound healing potential of *Cleome viscosa* Linn. seeds extract and isolation of active constituent. **South African Journal of Botany**. v. 112, p. 460-465, 2017.

SINGH, R.S.; WALIA, A.K. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal of Applied Phycology**. v. 30, p. 1833 – 1858, 2017.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**. v. 57, p. 1–11, 1996.

SIVARANJANI, V., PHILOMINATHAN, P. Synthesize of Titanium dioxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves and evaluation of wound healing activity. **Woun. Medicine**. v. 12, p. 1–5, 2016.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**. v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990.

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of oil-bearing Microalgae for Biodiesel. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 341-348, 2008.

SOUZA QUEIROZ, J., BARBOSA, C.M., ROCHA, M.C., BINCOLETTI, C., PAREDES-GAMERO, E.J., QUEIROZ, M.L., PALERMO NETO, J. *Chlorella vulgaris* treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 29, p. 39–50, 2013.

SU, X.; LIU, X.; WANG, S.; LI, B.; PAN, T.; LIU, D.; WANG, F.; DIAO, Y.; LI, K. Wound-healing promoting effect of total tannins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in rats. **Burns**, v. 43, p. 830-838, 2017.

SUNTAR, I., AKKOL, E.K., KELES, H., YESILADA, E., SARKER, S.D. Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: isolation of apigenin as an active component. **J. Ethnopharmacol.** v. 149, p. 103–110, 2013.

SYED, S.; ARASU A.; PONNUSWAMY I. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v.7, p.185-190, 2015.

TAZIMA, M.F.G.S., VICENTE, Y.A.M.V.A., MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**. v. 41, n. 3, p. 259–264, 2008.

TRABELSI, I.; KTARI, N.; SLIMA, S.B.; TRIKI, M.; BARDAA, S.; MNIF, H.; SALAH, R.B. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 194–201, 2017.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggy waste. **Ecological Engineering**. v. 28, n.2, p. 158-165, 2006.

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A.H.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus*

pararoseus strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, n. 2, p. 207-213, 2013.

VECINA, J.F.; OLIVEIRA, A.G.; ARAUJO, T.G.; BAGGIO, S.R.; TORELLO, C.O.; SAAD, M.J.; QUEIROZ, M.L. *Chlorella* modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. **Life Sciences**. v. 95, n. 1, p. 45–52, 2014.

VINAGRE, A.M. **Efeito anti-ulcerogênico do extrato de *Chlorella vulgaris***. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular), UNICAMP, Campinas, 2005.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2a ed., Springer, Munique, 1996.

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

WANG, L., LI, Y., CHEN, P., MIN, M., CHEN, Y., ZHU, J., RUAN, R.R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 2623–2628, 2010b.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835, 2003.

WHO, 2005. **Epidemiology and management of common skin diseases in children in developing countries**. World Health Organization, Geneva, WHO/FCH/CAH/05.12.

WHO, 2010. **Wound and lymphoedema management**. World Health Organization, Geneva, WHO/HTM/NTD/GBUI/2010.1

WIJESSEKARA, I.; KIM, S. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1080–1093, 2010.

WINTER, G. D. Formation of the scab and rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, Londres, v. 193, p. 293-294, 1962.

XIAO, Y., REIS, L.A., FERIC, N., KNEE, E.J., GU, J., CAO, S., LASCHINGER, C., LONDONO, C., ANTOLOVICH, J., MCGUIGAN, A.P., RADISIC, M. Diabetic wound regeneration using peptide-modified hydrogels to target re-epithelialization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 113 (40), p. 5792 - 5801, 2016.

YAMAMOTO, M.; FUJISHITA, M.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Research**, v. 117, p. 257–264, 2004.

YATES, C.C.; WHALEY, D.; BABU, R.; ZHANG, J.; KRISHNA, P.; BECKMAN, E.; PASCULLE, A.W.; WELLS, A. **Biomaterials**, v. 28, p. 3977–3986, 2007.

YEH, K-L.; CHANG, J-S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**. v. 6, p.1358-1366, 2011.

ZARIN, M.A., WAN, H.Y., ISHA, A., ARMANIA, N. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. **Food Science and Human Wellness**. v. 5, p. 65-75, 2016.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect . **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 42, p. 8505- 8517, 2017.

ZHANG, Q.; FONG, C.C.; YU, W.K.; CHEN, Y.; WEI, F.; KOON, C.M.; LAU, K.M.; LEUNG, P.C.; LAU,C.B.; FUNG, K.P.; YANG, M. Herbal formula Astragali Radix and Rehmanniae Radix exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF-beta) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition **Phytomedicine**. v. 20, p. 9–16, 2012.

ZHANG, Z., WANG, S., DIAO, Y., ZHANG, J., LV, D. Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. **Lipids Health Dis**. v. 9, p. 24, 2010.

ZIMMERMAN, L.M.; VEITH, I. **Great ideas in the History**. Baltimore, Wilkins & Wilkins Co., 1961.