



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



ALYSSON DE SÁ PEREIRA LIMA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA
Scenedesmus obliquus (TURPIN) KÜTZING ISOLADA NO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO

RECIFE

2021

ALYSSON DE SÁ PEREIRA LIMA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA

Scenedesmus obliquus (TURPIN) KÜTZING ISOLADA NO SEMIÁRIDO

PERNAMBUCANO

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

Área de concentração: Sistemas biológicos

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadores: Prof. Dra. Danielli Matias de Macêdo Dantas

Prof. Dr. Thiago Barbosa Cahú

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lima, Alysson de Sá Pereira

Investigação do potencial biotecnológico da microalga *Scenedesmus obliquus* (TURPIN) KÜTZIN isolada no semiárido pernambucano / Alysson de Sá Pereira Lima - 2021.

122 f. : il.

Orientador: Profa. Dr. Ranilson de Souza Bezerra.

Coorientadora: Profa. Dra. Danielli Matias de Macêdo Dantas.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Barbosa Cahú.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Algas. 2. Biotecnologia. 3. Biomassa. I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador). II. Dantas, Danielli Matias de Macêdo (coorientadora). III. Cahú, Thiago Barbosa (coorientadora). IV. Título.

579.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-368-2021

ALYSSON DE SÁ PEREIRA LIMA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA
Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing **ISOLADA NO SEMIÁRIDO**
PERNAMBUCANO

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

Aprovada em: 29/10/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dra. Maria Betânia de Melo Oliveira (Examinadora Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Danielli Matias de Macêdo Dantas (Examinadora Externa)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe Simone Lima,
ao meu irmão João Gabriel e à minha namorada Maraíza Santos.

Meu amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Maria, nossa Mãe, por guiarem o meu caminho, me permitindo alcançar mais um grande objetivo de vida.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por darem subsídios para a realização da presente pesquisa e permitirem o meu desenvolvimento profissional.

À Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco pelo apoio financeiro fundamental para a realização do presente estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio e ensinamentos durante minha trajetória. O senhor tem todo meu respeito e admiração. Em seu nome, também agradeço a todos do Laboratório de Enzimologia (LABENZ) que contribuíram para a realização deste estudo.

À minha coorientadora Prof^a. Dra. Danielli Matias de Macêdo Dantas, por todo apoio e amizade desde a graduação, onde me apresentou ao mundo das microalgas e sempre me deu entusiasmo para seguir em frente. Obrigado por tudo!

Agradeço em especial ao meu coorientador Dr. Thiago Barbosa Cahú, pelo acolhimento, paciência, ensinamentos e conselhos que foram essenciais para a realização da minha pesquisa e meu desenvolvimento como pesquisador. Muito obrigado!

Ao Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI) em nome do Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez pelo acolhimento e parceria que foi essencial para o desenvolvimento da pesquisa. Em especial, também agradeço a Laenne Bárbara, pela amizade, paciência e ensinamentos sobre cultivos de microalgas.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM), onde fiz parte de minha pesquisa e agradeço em especial a Rayanna Souza, pela parceria e apoio no laboratório.

Às amigas que fiz durante o mestrado, em especial Caio Assis e Jhennipher Pereira, Thiago Cahú e Bruno Veras sempre muito solícitos e presentes no dia a dia do laboratório. Também agradeço a Isabela Araújo e Cris Oliveira, pela amizade e contribuições neste estudo. Desejo muito sucesso a todos vocês!

À minha família, especialmente minha mãe Simone Lima, meu irmão João Gabriel e minha namorada Maraíza Santos, pela confiança, amor e apoio sem o qual não teria chegado tão longe.

Também agradeço aos meus primos Laís e Samuel Cabral, pela convivência e amizade, bem como a minha avó Heloísa de Sá, pelas palavras de incentivo e orações. Muito obrigado por tudo!

À Rose Melo, pela amizade e direcionamentos que sempre me ajudaram a superar momentos difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

As microalgas são uma das primeiras formas de vida do planeta e desenvolveram, ao longo de milhões de anos, uma notável diversidade bioquímica que as tornam alvo de crescentes investigações no campo da biotecnologia, com aplicações que vão desde a produção de biocombustíveis até usos como alimentos funcionais. Nesse sentido, a clorófita *Scenedesmus obliquus* têm ganhado destaque devido a sua versatilidade e capacidade de sintetizar inúmeras classes de compostos bioativos que lhes conferem um potencial nutracêutico. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial da microalga *Scenedesmus obliquus* isolada no Semiárido pernambucano quanto à produção de metabólitos bioativos e atividades biológicas, evidenciando possíveis aplicações para a biomassa, extratos e resíduos. Dessa forma, o trabalho divide-se em dois capítulos, sendo o primeiro uma revisão de literatura acerca do potencial mercadológica e nutracêutica da espécie em questão; o segundo inclui uma investigação envolvendo diferentes atividades biológicas envolvendo a *S. obliquus* isolada no Semiárido brasileiro. A microalga foi cultivada em meio Bold Basal modificado e sistema de cultivo semi-contínuo, sob parâmetros de luz, pH e temperatura controlados. Após a coleta e secagem da biomassa, foram obtidas diferentes frações a partir de extrações sequenciais usando os solventes água, etanol, acetona e hexano. A composição centesimal da biomassa seca (sem solventes) foi determinada revelando altos teores de proteínas (40,56%) e carboidratos (25,03%), com a posterior dosagem de amido da biomassa seca e residual, para determinar o nível de compostos restantes na biomassa após sucessivas extrações. Verificou-se o teor de compostos fenólicos nos extratos de etanol e acetona de 14,05 e 21,15 mg/EAG g peso seco, respectivamente. A análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) evidenciou a presença de grupos funcionais na fração de exopolissacarídeos (EPS) isolados do meio de cultura. A capacidade antioxidante foi determinada pelos métodos de sequestro de radical DPPH, com os maiores valores de $63,12 \pm 0,21\%$ para o extrato de acetona; radical ABTS com $33,38 \pm 0,47\%$ (extrato etanólico) e a capacidade antioxidante total (fosfomolibdênio) com $71,44 \pm 5,77$ mg EAA/ g peso seco para o extrato hexânico. A atividade antibacteriana realizada pelo método de microdiluição foi observada para o extrato etanólico frente a bactéria *Lysteria* sp. também apresentando os maiores níveis de hemólise ($52,45 \pm 3,28\%$). Nos testes de inibição enzimática, os extratos apresentaram potencial inibitório da atividade das proteases tripsina, quimotripsina e pepsina, além da α -amilase e lipase. Por fim, o potencial prebiótico dos EPS foi demonstrado, não apresentando mudanças no padrão de crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. plantarum*. Dessa forma, o estudo revelou a capacidade de produção de

compostos bioativos da microalga *S. obliquus* isolada do semiárido com possíveis aplicações em setores industriais, como farmacêutica e alimentícia, incluindo algumas abordagens ainda pouco exploradas para a espécie, como as atividades de inibição enzimática. Assim, os dados obtidos sugerem a potencial aplicação da biomassa e seus derivados no desenvolvimento de alimentos funcionais, necessitando de estudos complementares a respeito digestibilidade e aspectos relacionados à sua utilização e segurança alimentar.

Palavras-chave: Compostos naturais; nutracêuticos; prebióticos; antioxidantes; antimicrobiano; alga.

ABSTRACT

Microalgae are one of the primary forms of life on the planet and developed throughout billions of years a remarkable biochemical diversity which is currently the target of rising investigations in the biotechnological field, boosting applications from biofuels towards potential uses as food. Therefore, the chlorophyte *Scenedesmus obliquus* has been in the spotlight due to its versatility and capacity to synthesize multiple classes of bioactive compounds, providing them with a good nutraceutical potential. Therefore, the objective of the present study is to investigate the bioactive potential of *S. obliquus* isolated in the semiarid region of Pernambuco, as well as the production of bioactive compounds, biological activities and provide possible directions for the use of its biomass and derived products. Thus, the work is divided into two chapters: the first is a literature review about the marketing and nutraceutical potential of the species in question, and the second includes an investigation involving different biological activities involving *S. obliquus* isolated in the Brazilian semiarid region. The microalgae were cultivated in modified Bold basal medium and semi-continuous system under controlled light, pH, and temperature parameters. After biomass collection and drying, different fractions were obtained from sequential extractions using the solvents water, ethanol, acetone, and hexane. The proximate composition of dry biomass (without solvents) was determined, revealing high levels of proteins (40.56%) and carbohydrates (25.03%), with the subsequent dosage of starch from the dry and residual biomass, to determine the level of compounds remaining in the biomass after successive extractions. It was verified the content of phenolic compounds in the ethanol and acetone extracts of 14.05 and 21.15 mg/EAG g dry weight, respectively. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis showed the presence of functional groups in the fraction of exopolysaccharides (EPS) isolated from the culture medium. The antioxidant capacity was determined by the DPPH radical scavenging methods, with the highest values of $63.12 \pm 0.21\%$ for the acetone extract; ABTS radical with $33.38 \pm 0.47\%$ (ethanolic extract) and the total antioxidant capacity (phosphomolybdenum) with 71.44 ± 5.77 mg EAA/g dry weight for the hexane extract. The antibacterial activity performed by the microdilution method was observed for the ethanol extract against *Listeria* sp. also showing the highest levels of hemolysis ($52.45 \pm 3.28\%$). In enzyme inhibition tests, extracts at 1.0 mg/mL showed inhibitory potential for the activity of the proteases chymotrypsin and pepsin, in addition to α -amylase and lipase. Finally, the prebiotic potential of EPS was demonstrated, showing no changes in the growth pattern of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. plantarum*. Thus, the study revealed the ability to produce

bioactive compounds from the microalgae *S. obliquus* isolated from the semiarid region with possible applications in industrial sectors, such as pharmaceuticals and food, including some approaches that are still little explored for the species, such as enzymatic inhibition activities. Thus, the data obtained suggest the potential application of biomass and its derivatives in the development of functional foods, requiring further studies regarding digestibility and aspects related to their use and food safety.

Keywords: Natural compounds; nutraceuticals; prebiotics; antioxidants; antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Quadro 1 - Comparação dos principais modos de crescimento de microalgas e problemas associados a produção em larga escala. Adaptado de Chen *et al.*, (2011).....20

Figura 1 - Variedade morfológica do gênero *Scenedesmus*. (a) *S. obliquus*; (b) *S. armatus*; (c) *S. quadricauda*; (d) *S. acuminatus*. Fontes: UTEX.com/Algaebase.com.....23

Artigo 1 - Biotecnologia de *Scenedesmus obliquus*: prospecção e aplicações nutraceuticas

Figura 1 - Frequência das principais áreas de interesse associada às publicações científicas envolvendo a clorófito *Scenedesmus obliquus* ao longo dos últimos 20 anos. Os dados foram encontrados na base Web of Science, incluindo em seu título, resumo e palavra-chave o termo “*Scenedesmus + obliquus*”.....34

Figura 2 - Exemplos das estruturas de carotenóides. A- β -caroteno, a estrutura mais simples entre os carotenóides; B- luteína e C- zeaxantina, um estereoisômero na luteína.....41

Figura 3 - Tipos de métodos de ruptura celular para microalgas.....48

Artigo 2 - *Scenedesmus obliquus* isolada no semiárido brasileiro: composição química, atividades biológicas e potenciais aplicações

Figura 1 - Curva de crescimento da microalga *S. obliquus* ao longo de 14 dias de cultivo em meio BBM modificado (Bold Basal Medium). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.....86

Figura 2 - Gráfico de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) dos exopolissacarídeos de *S. obliquus* demonstrando os picos (1) 1.024; (2) 1.402; (3) 1.537; (4) 1.633; (5) 2.922 e (6) 3.265, que sugerem a presença de carboidratos.....89

Figura 3 - Atividades antioxidante pelo método de sequestro de radical (a) DPPH e (b) ABTS dos extratos de água, etanol, acetona e hexano de *S. obliquus* nas concentrações de 10.000-312,5 μ g/mL. As médias foram consideradas significativas a níveis de significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação à maior concentração (10.000 μ g/mL).....91

Figura 4 - Porcentagem de atividade residual para os quatro extratos, referentes às proteases (a) Amilase, (b) lipase (c) pepsina (d) quimotripsina e (e) tripsina, considerando o controle positivo como 100% de atividade. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$95

Figura 5 - Atividade prebiótica *in vitro* do exopolissacarídeo ao longo de um período de crescimento de 48 h de *L. rhamnosus* (A) e *L. plantarum* (B) com leituras a 600nm. Os respectivos resultados dos tratamentos em UFC/mL estão dispostos nas figuras (C) e (D). Controle: Meio com bactéria (C/ Bac). Controle: Meio sem bactéria (S/ Bac). Inulina (controle positivo). ExoPoli: exopolissacarídeo. As diferenças foram consideradas significativas: **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (C/ Bac), #### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (S/ Bac) e $p < 0,05$ quando comparado a inulina.....97

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Biotecnologia de *Scenedesmus obliquus*: prospecção e aplicações nutraceuticas

Tabela 1 - Variação do teor de proteínas da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> e principais condições de cultivo adotadas.....	36
---	----

Artigo 2 - *Scenedesmus obliquus* isolada no semiárido brasileiro: composição química, atividades biológicas e potenciais aplicações

Tabela 1 - Desenho experimental do ensaio hemolítico para os tratamentos de exopolissacarídeos e frações etanólica, aquosa, acetônica e hexânica de <i>Scenedesmus obliquus</i>	84
---	----

Tabela 2 - Teores de compostos e excedentes resultantes da análise de composição centesimal da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i>	88
--	----

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima dos quatro extratos de <i>S. obliquus</i> frente a <i>Listeria</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.....	90
--	----

Tabela 4 - Atividade antioxidante dos extratos de <i>S. obliquus</i> expressas em termos equivalentes a Trolox (ABTS) e ao ácido ascórbico (Capacidade antioxidante total). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e as diferenças consideradas significativas a $p < 0,05$	92
--	----

Tabela 5 - Porcentagem de hemólise apresentado pelos extratos e exopolissacarídeos a partir da biomassa de <i>S. obliquus</i> . Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$	97
---	----

Tabela 6 - Diferentes aplicações biotecnológicas para produtos de <i>S. obliquus</i> com base no presente estudo.....	98
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE MICROALGAS.....	17
3.2 CULTIVO E ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DE MICROALGAS.....	18
3.2.1 Sistemas de cultivos.....	18
3.2.2 Parâmetros de cultivo e influências no perfil químico de microalgas.....	21
3.3 <i>Scenedesmus obliquus</i> : CARACTERÍSTICAS, ASPECTOS BIOQUÍMICOS E APLICAÇÕES.....	23
3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS DE MICROALGAS.....	26
3.4.1 Atividade antioxidante.....	26
3.4.2 Atividade antibacteriana.....	27
3.4.3 Capacidade de inibição enzimática (amilase e lipase).....	28
3.4.4 Potencial prebiótico de microalgas.....	29
4 ARTIGO 1 - BIOTECNOLOGIA DE <i>Scenedesmus obliquus</i>: PROSPECÇÃO E APLICAÇÕES NUTRACÊUTICAS.....	31
5 ARTIGO 2 – <i>Scenedesmus obliquus</i> ISOLADA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES.....	74
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
REFERÊNCIAS.....	110
ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....	121
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	122

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional somado a demanda crescente pela manutenção de suprimentos alimentícios adequados e de produções sustentáveis têm impulsionado pesquisas com o intuito de incorporar fontes alternativas naturais e funcionais (FU et al., 2021). Nessa perspectiva, as microalgas exibem características fisiológicas como altas taxas de crescimento, adaptabilidade a diversos fatores ambientais e acúmulo de metabólitos bioativos que as tornam candidatas aptas à destinação de múltiplos produtos industriais (DEBOWSKI et al., 2020).

As algas compõem um grupo polifilético de organismos fotossintetizantes tipicamente divididos em macro e microalgas, incluindo nestas últimas, formas eucarióticas e procarióticas, representadas pelas cianobactérias (TORRES-TIJI et al., 2020). As microalgas, em especial, constituem uma enorme diversidade evolutiva e bioquímica, sendo reconhecidas como fontes de compostos com alto valor biotecnológico como pigmentos, vitaminas, polissacarídeos, ácidos graxos, proteínas, entre outros metabólitos (BERNAERTS et al., 2019; CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015).

A versatilidade das microalgas é demonstrada a partir das inúmeras de aplicações nas quais podem ser direcionadas, desde a produção de biocombustíveis, corantes alimentícios, suplementos funcionais, até de produtos derivados em setores da indústria como cosmética e farmacêutica (NAGARAJAN et al., 2021). As estimativas revelam um mercado anual crescente de produtos derivados de microalgas, tendo como principais representantes comerciais a cianobactéria *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) cuja biomassa é considerada segura ao consumo humano sendo comercializada como suplemento alimentar, a clorófita *Chlorella* spp. também voltada à produção de suplementos em pó, além da *Dunaliella* spp. e *Haematococcus* spp. direcionadas para a produção de pigmentos usados em diferentes setores industriais (KANDASAMY et al., 2021).

Nos últimos anos, a clorófita *Scenedesmus obliquus* tornou-se alvo de crescentes investigações devido a sua notável capacidade de síntese de biopolímeros de alto valor agregado como proteínas e lipídeos, além de pigmentos de interesse, como a luteína (CHEN et al., 2019). Ademais, somado aos aspectos fisiológicos que as conferem grande adaptabilidade a estresses ambientais (JI et al., 2018) a espécie representa uma fonte potencial para aplicações em larga escala em setores como bioenergética, biorremediação e em especial, no campo nutracêutico (CHOI et al., 2015; SILVA et al., 2020; SRINUANPAN et al., 2018).

Além disso, em razão da sua diversidade bioquímica, a biomassa microalgal e produtos derivados são retratados quanto ao desempenho de atividades terapêuticas antioxidante,

antimicrobiana, anticancerígena e inibidores enzimáticos que sugerem sua aplicação no tratamento de distúrbios metabólicos, como a diabetes (IBRAHIM et al., 2021; MARREZ et al., 2019a; SIAHBALAEI et al., 2021).

Embora diferentes abordagens documentem a utilidade de microalgas, sobretudo para *S. obliquus*, em várias aplicações multifacetadas de sua biomassa e produtos derivados (alimentos funcionais e nutracêuticos, potencial terapêutico etc.), informações complementares a respeito dos aspectos biotecnológicos de novas fontes podem fornecer uma visão abrangente sobre tendências, potenciais e perspectivas de aplicabilidade desta espécie nas diferentes vertentes tecnológicas. Portanto, o presente estudo integra no Capítulo 1 uma análise da literatura acerca do potencial nutracêutico e mercadológico de *S. obliquus* com enfoque na sua diversidade bioquímica. No Capítulo 2, foi realizada investigação de diferentes atividades biológicas de compostos obtidos, fundamentando-se na hipótese de que a espécie *S. obliquus*, isolada da região Semiárida apresente produção e acumulação de compostos na biomassa celular e extracelular.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o potencial da microalga *Scenedesmus obliquus* isolada no Semiárido pernambucano quanto à produção de metabólitos bioativos e atividades biológicas, evidenciando possíveis aplicações para a biomassa, extratos e resíduos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar um artigo de revisão sobre o estado da arte das aplicações nutracêuticas e potencial mercadológico da *S. obliquus*;
- Obter frações da biomassa utilizando diferentes solventes através de extrações subsequentes;
- Caracterizar a biomassa seca e residual quanto à presença de amido;
- Identificar a presença de compostos fenólicos e determinar composição química da biomassa;
- Isolar, caracterizar e avaliar o potencial prebiótico dos exopolissacarídeos (EPS) produzidos pela cepa

- Avaliar o potencial de moléculas bioativas dos extratos de *S. obliquus* quanto as atividades antioxidante, antibacteriana e capacidade de inibição enzimática
- Avaliar a atividade hemolítica para a análise da toxicidade dos extratos e EPS;
- Analisar possíveis aplicações para a biomassa, extratos e resíduos

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICROALGAS

As algas compreendem um grupo artificial que reúne organismos fotossintéticos macroscópicos e multicelulares (as macroalgas) e microrganismos unicelulares (as microalgas) que são amplamente encontradas em águas marinhas e continentais, totalizando uma ampla variedade de espécies (LEVASSEUR et al., 2020; SANTOS et al., 2015).

A natureza polifilética torna a classificação das algas complexa, já que engloba organismos com tipos celulares e morfológicos distintos, levando ao desenvolvimento de vários sistemas taxonômicos (HEIMANN et al., 2015). Tradicionalmente, as algas são divididas em nove classes baseadas na composição de seus pigmentos, sendo as principais: Chlorophyceae (algas verdes), Bacillariophyceae (diatomáceas), Euglenophyceae (Euglenas), Phaeophyceae (algas marrons), Dinophyceae (dinoflagelados), Chrysophyceae (algas marrom-douradas), Rhodophyceae (algas vermelhas) (RUSSELL et al., 2021).

Para microalgas, considera-se duas estruturas celulares: (i) as formas procarióticas, chamadas de cianobactérias (algas verde-azuladas) e (ii) as formas eucarióticas tendo como principais representantes as Chlorophyceae (algas verdes), Bacillariophyceae (incluem as diatomáceas) e Chrysophyceae (algas douradas) (GARCÍA et al., 2017). Estas formas de vida atribuem características que tornam o grupo bastante heterogêneo e que permitem a colonização de diferentes ambientes (REVIERS et al., 2010). Em função disso, a identificação de espécies de microalgas configura um critério importante no que diz respeito a valorização e manipulação de suas cepas para fins biotecnológicos e, nesse sentido, os avanços na biologia molecular têm propiciado uma maior confiabilidade e rapidez na identificação, sendo essencial para os sistemas atuais de classificação filogenética (KHAW et al., 2020)

As clorofíceas, por exemplo, englobam representantes predominantemente aquáticos, adotando formas planctônicas e bentônicas ou podendo serem até mesmo subaéreas, com ocorrência sob superfícies de rochas, troncos e no solo como espécies do gênero *Trentepohlia*.

Além disso, apresentam a capacidade de formar interações simbióticas com outros organismos como fungos, constituindo os chamados líquens (REVIERS et al., 2010). Alguns aspectos bioquímicos típicos do grupo incluem a presença de clorofilas a e b e outros pigmentos acessórios como carotenos e xantofilas (LELIAERT et al., 2012). O amido é o principal polissacarídeo utilizado como reserva energética e a parede celular é majoritariamente formada por celulose (VITTOVA et al., 2015).

A diversidade bioquímica das microalgas reflete na versatilidade de aplicações industriais nas quais são exploradas, incluindo produtos farmacêuticos, suplementos alimentícios, ração animal, cosméticos, biofertilizantes, além da biotecnologia ambiental que cada vez mais utiliza esses organismos como bioindicadores e em processos de biorremediação de águas residuais (RIZWAN et al., 2018). Essa variedade de compostos são foco de pesquisas que visam a investigação e aproveitamento das inúmeras atividades biológicas e a consequente valorização dos produtos a nível comercial, destacando atividades antioxidantes (ASSUNÇÃO et al., 2017), antimicrobianas (ALSENANI et al., 2020), anticancerígenas (MARREZ et al., 2019b), antivirais (IBRAHIM et al., 2021), assim como na prevenção e tratamento de disfunções metabólicas como obesidade e diabetes (GUO et al., 2021; RAMOS-ROMERO et al., 2021).

É documentado que alguns gêneros de clorofíceas são exploradas sob diferentes perspectivas biotecnológicas, principalmente *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp. e *Dunaliella* sp., além outros representantes sujeitos a potenciais aplicações como *Scenedesmus* sp. *Chlamydomonas* sp. e *Botryococcus* sp. reconhecidos pela produção de moléculas bioativas como ácidos graxos e carotenóides (BAUDELET et al., 2017). O gênero *Chlorella* possui espécies amplamente estudadas pela capacidade de sintetizar compostos de alto valor agregado como ácidos graxos, vitaminas do complexo B, proteínas e metabólitos potenciais como suplemento alimentar e intermediários para indústria cosmética, por exemplo (CORONADO-REYES et al., 2020). Outras espécies também apresentam notável capacidade de produzir e acumular moléculas de interesse biológico como a astaxantina pela *Haematococcus pluvialis* (LE-FEUVRE et al., 2020) e altos teores de proteínas, lipídeos, em especial, o β -caroteno pela *Dunaliella* salina, cujas aplicações encontram-se associadas ao setor alimentício, seja na forma de corantes ou como suplementos humano e animal, no caso deste último (SILVA et al., 2021).

3.2 CULTIVO E ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DE MICROALGAS

3.2.1 Sistemas de cultivo

Várias espécies de microalgas apresentam potencial para a produção em larga escala e uma melhor compreensão quanto ao desenvolvimento das culturas pode contribuir para a geração de uma indústria sustentável e para obtenção de produtos com alta relação custo-benefício (KHAN et al., 2018). Além da diversidade de espécies produtoras de compostos bioativos, as principais vantagens dos cultivos de microalgas relacionam-se à sua fisiologia, apresentando uma alta taxa de crescimento e eficiência fotossintética, acúmulo de compostos com alto rendimento como lipídeos e carotenóides, além de não demandarem terras agrícolas, evitando competição com culturas vegetais (DOLGANYUK et al., 2020; GRIFFITHS et al., 2011b).

Para o estabelecimento de cultivos de microalgas em ampla escala, recursos como reatores ou tanques como os raceway são necessários e comumente adotados por meio de sistemas fechados e abertos, respectivamente. Os sistemas abertos são empregados com maior frequência devido ao seu baixo custo e grande capacidade de produção, geralmente estruturados na forma de lagoas circulares ou de pistas construídas em alvenaria, fibra de vidro, mantas de isolamento, dentre outros materiais. Embora sejam economicamente viáveis, tais estruturas de cultivo possuem como principais desvantagens a dificuldade no controle de parâmetros físico-químicos da cultura, por estarem expostos à atmosfera, menor aproveitamento da luz (dependendo da região) e maior taxa de contaminação, o que afeta de forma considerável a produtividade (FARIED et al., 2017). Alternativamente, sistemas fechados conhecidos como fotobiorreatores, surgem como uma estratégia para a produção de culturas axênicas em que nesses sistemas não ocorre a troca direta de gases com a atmosfera, propiciando melhores condições para as culturas (SUPARMANIAM et al., 2019). Os fotobiorreatores mais utilizados incluem os tubulares e de painel plano (flat plate) e de modo geral favorecem uma maior produtividade volumétrica, melhor aproveitamento da luz e aumento da taxa de assimilação do CO₂ (FERNÁNDEZ et al., 2013; TAN et al., 2018), apesar de apresentar um maior custo de implementação.

Além disso, os padrões de crescimento e a diversidade bioquímica das microalgas são altamente dependentes das condições de crescimento, com destaque para quatro tipos principais as quais são submetidas nos cultivos: fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (CHEN et al., 2011), conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1: Comparação dos principais tipos de crescimento de microalgas à produção em larga escala. Adaptado de Chen et al., (2011).

	Condições de cultivo			
	Fotoautotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Fotoheterotrófico
Fontes de Energia	Luz	Carbono Orgânico	Luz e carbono orgânico	Luz
Fontes de carbono	Carbono Inorgânico	Carbono Orgânico	Carbono Inorgânico e orgânico	Carbono Orgânico
Densidade celular	Baixa	Alta	Média	Média
Tipo de reator	Aberto ou fotobiorreator fechado	Fermentador convencional	Fotobiorreator fechado	Fotobiorreator fechado
Custo	Baixo	Médio	Alto	Alto
Problemas	Baixa densidade celular e alta contaminação	Alto custo do substrato e risco de contaminação	Alto custo do equipamento/ substrato	Alto custo do equipamento / substrato
Complexidade na operação	baixa	média	alta	alta

O cultivo fotoautotrófico baseia-se na utilização da luz como fonte de energia somada à captura do CO₂ atmosférico como fonte de carbono inorgânico para a conversão em energia química por meio da fotossíntese (HUANG et al., 2010). Tal sistema tem sido empregado comumente em culturas de *Arthrospira* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. *Haematococcus* sp. e *Scenedesmus* sp., sendo fundamental um suprimento adequado de luz e carbono na forma de CO₂ (FERNÁNDEZ et al., 2021). O cultivo heterotrófico, por outro lado, caracteriza-se pela utilização de fontes de carbono orgânicas como a glicose, onde podem ser utilizados fermentadores convencionais para o acúmulo de biomassa na ausência de luz, superando dificuldades relacionadas com a intensidade e tipo de iluminação dos cultivos fotoautotróficos (NAGARAJAN et al., 2018). É importante destacar que nem todas as espécies de interesse

biotecnológico se desenvolvem de forma satisfatória em cultivos heterotróficos, e diante disso, o sistema mixotrófico apresenta-se como uma estratégia viável visando a combinação de ambos os métodos para promover um cultivo mais efetivo (CASTILLO et al., 2021), conforme observado por Shen et al., (2018) em que a produção de ácidos graxos pela *S. obliquus* foi otimizada.

3.2.2 Parâmetros de cultivo e influência no perfil químico de microalgas

Além da produtividade, alterações nos parâmetros físicos e químicos (temperatura, irradiância, sanidade, pH, etc) podem influenciar nos perfis nutritivos e bioativos da biomassa de microalgas e, compreender o impacto nestas diferenças sazonais nos constituintes bioquímicos destes organismos são de grande importância quando associada à sua aplicabilidade comercial (KUMAR et al., 2021). Condições de estresse salino, luminoso e a presença de carbono orgânico são capazes de alterar de forma considerável a síntese de metabólitos como carotenóides, proteínas e carboidratos em microalgas (MANSOURI et al. 2017), fatores que são típicos de certas regiões como o Semiárido, sendo potencialmente fontes de espécies com alto rendimento de metabólitos (COSTA et al., 2016).

Bioquimicamente, as microalgas possuem pigmentos como clorofilas, carotenóides e ficobilina, onde clorofíceas comumente apresentam clorofilas a e b enquanto em cianobactérias são detectadas a presença de clorofila, ficoeritrina e ficobilinas, que resultam em uma melhor absorção de luz em vários comprimentos de onda, uma vez que realizam a conversão para a energia química através dos fótons (CHHANDAMA et al., 2021).

Nesse sentido, a distribuição uniforme de luz compõe um fator primordial associado a produtividade da cultura. A variabilidade neste parâmetro pode ser modulada a fim de promover o acúmulo de compostos bioativos como carotenóides, conhecidos por sua atividade antioxidante e inúmeras aplicações mercadológicas (PŘIBYL et al., 2016). Além disso, a intensidade e o espectro da luz utilizada podem ser otimizados para cada espécie dependendo dos produtos desejados, como demonstrado por (GONÇALVES et al., 2019), onde a combinação de luz vermelha:verde (50:50%) promoveu o maior acúmulo de pigmentos e produtividade geral da cultura de *Scenedesmus* sp.

A composição de nutrientes dos meios de cultura é outro fator essencial para a produção de microalgas, já que o excesso ou a diminuição dos níveis de certos compostos afetam de forma significativa o crescimento e a qualidade da biomassa (YAAKOB et al., 2021). O nitrogênio, por exemplo, é um elemento intermediário na formação de moléculas biológicas como aminoácidos, proteínas, e clorofilas, e consequentemente sua proporção influencia

diretamente no potencial das culturas (ZARRINMEHR et al., 2020). Logo, a diminuição dos níveis de compostos nitrogenados favorece altos rendimentos lipídicos tal como observado para espécies oleaginosas como a *Scenedesmus* sp., cujo conteúdo pode atingir níveis em torno de 53% do peso seco (LI et al., 2015). Sob a mesma perspectiva, a depleção de fósforo é também uma estratégia que pode ser utilizada em conjunto para aumentar os teores lipídicos como demonstrado por Xin et al., (2010).

Proporcionalmente, o aumento nas concentrações de nitrogênio em um sistema de cultivo, seja na forma de nitratos, nitritos ou uréia, favorece a síntese de aminoácidos, resultando em uma maior produtividade e uma biomassa final rica em proteínas com potenciais aplicações na ração animal e suplementação na alimentação humana (CHEN et al., 2015; WANG et al., 2020). O aumento na concentração de outros elementos como fósforo e enxofre também se associa à maior eficácia na produção de carboidratos como observado para *S. acutus*, cujo incremento destes compostos levaram a obtenção de rendimentos superiores de exopolissacarídeos (PATWAL; BARANWAL, 2021b).

Assim como os macronutrientes nitrogênio e fósforo, os micronutrientes como ferro, magnésio, cobre e zinco podem atuar indiretamente, desempenhando papel em inúmeras vias metabólicas das microalgas como na síntese de clorofilas, cofatores de enzimas, sistema de reparo antioxidante, entre outras funções essenciais para seu desenvolvimento (ERMIS et al., 2020; SUNDA, 2012). Embora as células microalgais demandem baixas quantidades de metais traço, a depender da espécie, a deficiência desses elementos pode prejudicar sua fisiologia (JUNEJA et al., 2013) ou mesmo propiciar condições de otimização, como o acúmulo de lipídeos neutros como em cepas de *Scenedesmus* sp., favorecendo a sua utilização em meios seletivos com alta salinidade (ROCHA et al., 2019). Mudanças no gradiente de salinidade podem levar a maior síntese e acúmulo de lipídeos e carboidratos (HO et al., 2014) assim como demonstrado para *Chlorella vulgaris* e *S. obliquus*, com uma maior representatividade em suas biomassas de compostos como ácidos graxos como o ácido palmítico, oleico, linoleico e esteárico, de interesse para o mercado nutracêutico e bioenergético (PANDIT et al., 2017).

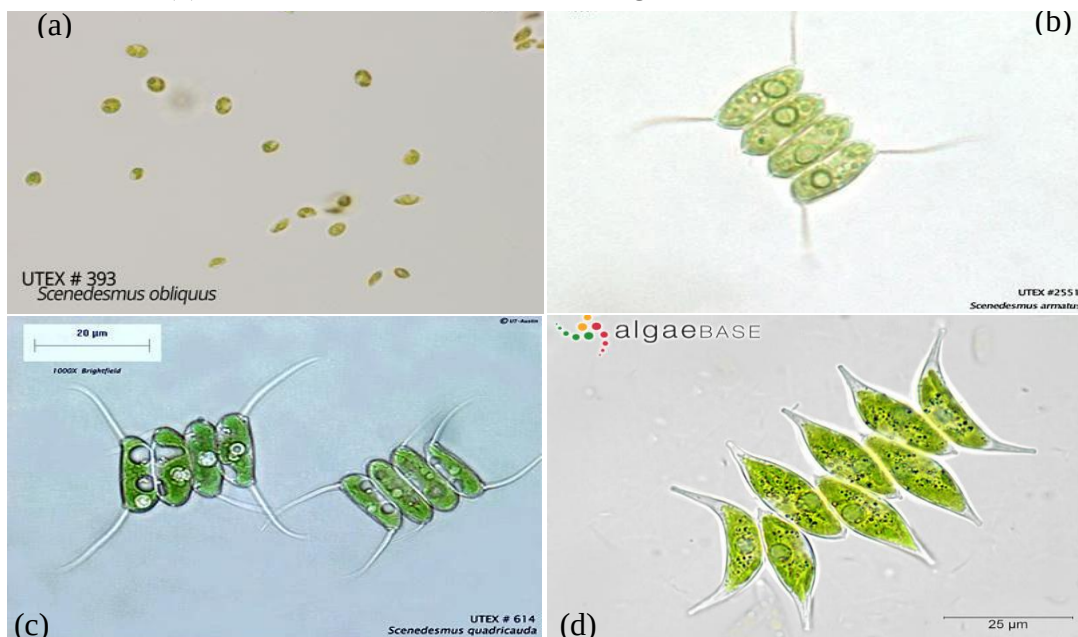
Ademais, outros fatores como temperatura e pH podem ser controlados a fim de viabilizar a produção de metabólitos antioxidantes como reportado por Guedes et al., (2011) e embora as condições destes parâmetros sejam específicas para cada espécie, o crescimento inicial geralmente se encontra na faixa de pH entre 6 e 8,76, sendo um fator importante já que pode influenciar no metabolismo e na absorção de íons na célula (HO et al., 2014; KHAN et al., 2018).

3.3 SCENEDESMUS OBLIQUUS: CARACTERÍSTICAS, ASPECTOS BIOQUÍMICOS E APLICAÇÕES

O gênero *Scenedesmus* é representado por microalgas dulcícolas caracterizadas como cenóbios planos, geralmente com 2-16 células, ocorrendo raramente com 32 células com diferentes morfologias, podendo ser fusiformes, elipsoidais ou cilíndricas dispostas de forma alternada ou linear. A reprodução é assexuada para a maioria das espécies, ocorrendo por autoesporulação em que novas colônias são liberadas com o rompimento da parede celular, e para a *S. obliquus*, foi relatada de forma rara, a reprodução sexuada isogâmica, com a formação de gametas biflagelados (FRANCESCHINI et al., 2010). Com base nesses aspectos, no estudo de Wynne e Hallan (2015), foi proposta a integração de *Scenedesmus* no gênero *Tetradesmus*, sendo esta, a classificação atual do táxon encontrada na AlgaeBase (GUIRY E GUIRY, 2021). Entretanto, como o primeiro termo é sinônimo de *Tetradesmus* e compõe a maior parte publicações atuais, no presente estudo o foi adotado o gênero *Scenedesmus*.

Muitas espécies do gênero destacam-se pela capacidade de síntese altos teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e carotenóides como a luteína que apresenta grande interesse industrial. (DAMIANI et al., 2014; SÁNCHEZ et al., 2008; VIEGAS et al., 2021). Entre elas, a *S. obliquus* (Figura 1) é uma das clorófitas mais investigadas nos últimos anos graças a sua notável capacidade de adaptação a diferentes condições de cultivo, rápido crescimento e acúmulo de compostos bioativos que expandem seu potencial desde aplicações nutracêuticas à produção de biocombustíveis (HLAING et al., 2020).

Figura 1: Variedade morfológica do gênero *Scenedesmus*. (a) *S. obliquus*; (b) *S. armatus*; (c) *S. quadricauda*; (d) *S. acuminatus*. Fontes: Utex.com/Algaebase.com.



A luteína é uma carotenóide do tipo xantofila ($C_{40}H_{56}O_2$), que assim como a zeaxantina, possui duas hidroxilas nas extremidades da cadeia carbônica, o que torna o pigmento altamente reativo contra espécies reativas de oxigênio (ROS), refletindo em uma excelente atividade antioxidante e ação preventiva contra inúmeras doenças associadas à presença de tais metabólitos (MITRA et al., 2021). Dessa forma, a luteína natural é cada vez mais valorizada devido a estas propriedades e possíveis aplicações comerciais como corante natural de medicamentos e alimentos, e nesse sentido, microalgas como a *S. obliquus* têm demonstrado a alta capacidade de síntese destes compostos em que sob condições otimizadas de luz e nutrientes, a produtividade pode alcançar 4,96 mg/L/dia (CHEN et al., (2019).

A zeaxantina é outro pigmento produzido pela espécie que também possui interesse terapêutico já que assim como a luteína, formam pigmento macular da retina humana e estão associados ao tratamento de disfunções da visão, em especial a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) (MA et al., 2016). Sob estresses de luz e salinidade, a espécie é capaz de produzir grandes quantidades de β -caroteno e luteína como carotenóides primários e astaxantina como carotenóide secundário, o que pode ampliar o as possibilidades de aplicações da cepa tendo em vista o interesse biotecnológico destes produtos (MANSOURI; HAJIZADEH, 2018).

Além de pigmentos, a *S. obliquus* é explorada devido à alta síntese de lipídeos, sobretudo em condições otimizadas de depleção de nutrientes, com investigações associadas ao seu potencial nutracêuticos. Nesse sentido, o alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), em especial ômega-3 como o ácido α -linolênico, ácido docosaexaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), que são ácidos graxos essenciais (não produzidos no corpo humano) encontram-se associados a prevenção de doenças cardíacas, desordens bronquiais, várias doenças inflamatórias, além de possuírem ação antialérgica e neuroprotetora (MANSOURI et al., 2020; REMIZE et al., 2021; SCHUNCK et al., 2018; SOLANA et al., 2014).

Os PUFAs de microalgas podem ser incorporados em formulações infantis para promoção da saúde relacionado ao desenvolvimento neural adequado, sendo um mercado que arrecada anualmente cerca de 10 bilhões dólares (ADARME-VEGA et al., 2012; UNAY et al., 2004). Além disso, vale destacar a crescente incorporação de *S. obliquus* na produção de biocombustíveis de terceira geração, já que por meio do processo de transesterificação seus lipídeos podem ser convertidos em biodiesel e, considerando também vantagens associadas aos cultivos desta microalga, como rápido crescimento, eficiência fotossintética e a facilidade em modular a composição da cepa é possível obter uma produção de maiores teores de biodiesel

quando comparado às fontes vegetais tradicionais (ABOMOHR et al., 2018; ARENAS et al., 2016; SONKAR; MALLICK, 2018).

Em relação a outros componentes químicos de interesse, o expressivo teor proteico de *S. obliquus* compreende um fator importante atrelado ao desenvolvimento de suplementos alimentares e formulações para ração animal, sendo demonstrado resultados favoráveis quanto a introdução de sua biomassa seca rica em proteínas na dieta animal (AMORIM et al., 2021). Sob condições otimizadas o conteúdo proteico da espécie resulta em um valor superior a 40% do peso seco (VENDRUSCOLO et al., 2019), cujo perfil químico revela a presença considerável de aminoácidos essenciais, que sugerem sua aplicação como suplemento alimentar (HLAING et al. 2020)

Em microalgas, os carboidratos podem ser estruturais quando presentes na parede celular, por exemplo, além de serem intermediários do ciclo fotossintético no ciclo de oxidação do carbono fotorrespiratório, constituindo também, importantes compostos de armazenamento de energia (LARKUM et al., 2003). A composição e a quantidade de carboidratos da *S. obliquus* varia dependendo da fase de colheita e as condições de cultivo, porém, em condições otimizadas envolvendo a depleção de nutrientes, o conteúdo pode alcançar valores entre 45-50% da biomassa seca, sendo que a glicose constitui maior parte do total de carboidratos (HO et al., 2017).

Além disso, o amido é o composto utilizado como reserva energética primária, sendo fundamental para a manutenção e produtividade da microalga nos ciclos dia/noite (LEÓN-SAIKI et al., 2017). Grande parte das investigações sobre polissacarídeos de *S. obliquus*, visam a produção de bioetanol por métodos fermentativos (MIRANDA et al., 2012), porém, várias espécies do gênero são capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS), polímeros sintetizados e liberados para o meio extracelular que atuam principalmente na proteção da célula frente a estresses ambientais, cujas análises *in vitro* têm demonstrado capacidades bioativas notáveis como antioxidantes, imunomoduladora e antitumoral (DELATTRE et al., 2016; PATWAL et al., 2021; ZHANG et al., 2019). Os estudos de EPS da *S. obliquus* ainda são incipientes e demandam investigações detalhadas, tendo em vista o aproveitamento completo nos cultivos e o potencial terapêutico com possíveis aplicações farmacológicas destes compostos.

Considerando as condições ambientais encontradas em regiões como o Semiárido brasileiro, os reservatórios locais podem abrigar cepas com grande plasticidade e capacidade de síntese de metabólitos bioativos (FILHO et al., 2019). Nesse sentido, investigações envolvendo tais espécies, como a *S. obliquus* do presente estudo, são primordiais para a busca

e seleção de cepas com propriedades de interesse industrial, podendo possibilitar a expansão das aplicações de microalgas e desenvolvimento de produtos sobretudo no mercado nutraceutico (SANTHAKUMARAN et al., 2020).

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS DE MICROALGAS

3.4.1 Atividade antioxidante

Qualquer sistema biológico que atua sob condições de aerobiose, produzem e estão sujeitos aos efeitos relacionados às espécies reativas de oxigênio (ROS), metabólitos de oxigênio em diferentes conformações que são altamente reativas e danosas a moléculas biológicas como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, estando associadas a inúmeras doenças crônicas e disfunções como diabetes, câncer, alterações neurológicas e cardiovasculares (FIRUZI et al., 2011). Dessa forma, compostos antioxidantes previnem danos causados pelas ROS ao doar elétrons que estabilizam os radicais livres e inibem o processo de oxidação (RAHMAN et al., 2015).

No corpo humano, os antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos, sendo que no primeiro caso, as enzimas do sistema de defesa primário são glutathione peroxidase, que reduz peróxidos, catalase que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e superóxido dismutase, que converte ânions superóxido em peróxido. Já as enzimas da defesa secundária são glicose-6-fosfato e glutathione reductase, relacionadas com a manutenção do sistema de defesa antioxidante (CAROCHO et al., 2013). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser sintéticos ou naturais, sendo estes últimos altamente valorizados a nível industrial e incluem como exemplos vitaminas, carotenóides, compostos fenólicos especialmente flavonóides, entre outros obtidos de fontes externas (NIMSE et al., 2015).

Os métodos de determinação da atividade antioxidante in vitro podem ser classificados em dois tipos: reações de transferência de hidrogênio (HAT) e reações de transferência de elétrons (ET). Ensaios amplamente utilizados como de sequestro de radical DPPH e ABTS são classificados em ambos os mecanismos em decorrência de suas diferentes interações com as amostras de antioxidantes (PRIOR et al., 2005). No primeiro caso, quando o DPPH reage com o doador de H⁺ antioxidante, o composto é reduzido a hidrazina e o decaimento da absorbância é evidente a 515-517nm, mudando a coloração de roxo para amarelo (KEDARE et al., 2011). No método ABTS, quando o composto está na presença de peróxido de hidrogênio é oxidado a um cátion ABTS⁺, e na presença de uma substância antioxidante, ocorre a diminuição na

produção do cátion, evidente na absorbância na faixa entre 600-750nm, mudando a coloração do composto de azul para transparente (SIDDEEG et al., 2021).

Um exemplo importante de ensaio que envolve a transferência de elétrons é o método fosfomolibdênio, na qual o fosfomolibdênio (IV) é reduzido a fosfomolibdênio (V) na presença de um antioxidante, dependendo de fatores como pH e temperatura, além de serem consideravelmente mais demorados que os métodos que envolvem transferência de hidrogênio (ALAM et al., 2013). Como a atividade antioxidante pode ocorrer por diferentes mecanismos, é recomendada a utilização de mais de um método de avaliação sendo estes aplicáveis para compostos lipofílicos e hidrofílicos e assim, represente a capacidade antioxidante das amostras de maneira mais confiável (KARADAG et al., 2009).

Muitas evidências sugerem que o consumo de alimentos dotados de compostos antioxidantes é bastante efetivo na melhoria da qualidade de vida ao prevenir inúmeras doenças degenerativas associadas à presença de radicais livres (ALAM et al., 2013). Nesse sentido, microalgas são fontes de compostos antioxidantes como carotenóides (luteína, β -caroteno, astaxantina), ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, além de inúmeros metabólitos secundários como compostos fenólicos (RIZWAN et al., 2018; SAFAFAR et al., 2015). Extratos da *Scenedesmus subspicatus* revelam a presença de várias classes de antioxidantes, também sugerindo uma correlação com os compostos fenólicos da cepa, demonstrando o potencial do gênero na produção de metabólitos bioativos (DANTAS et al., 2019).

3.4.2 Atividade antibacteriana

Nas últimas décadas, o aumento da resistência bacteriana culminou em um dos maiores problemas de saúde pública mundiais, estimulando a busca de novas fontes de antimicrobianos naturais em organismos terrestres e aquáticos, como as microalgas (SHANNON; ABU-GHANNAM, 2016). Atualmente, há uma extensa literatura acerca dos compostos antibacterianos produzidos por microalgas, sendo os principais: pigmentos, ácidos graxos, várias classes de metabólitos secundários como alcalóides, compostos fenólicos, terpenóides, além de uma gama de compostos aromáticos (ROJAS et al., 2020).

A avaliação da suscetibilidade bacteriana é uma etapa crucial para o desenvolvimento de novos fármacos e previsão de resultados terapêuticos, sendo os métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, as abordagens in vitro mais adotadas para este fim (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Há três alvos primários de ação dos antibióticos nas células bacterianas: a inibição da síntese da parede celular, dos ribossomos e do DNA ou RNA (atuando

na DNA topoisomerase ou RNA polimerase) (ROSSITER et al., 2017). Compostos naturais com ação antibacteriana são considerados vantajosos por geralmente apresentar mais de um alvo bacteriano, além da possibilidade de associação com os fármacos convencionais, já que em muitos casos é possível observar uma ação sinérgica (MARTELLI et al., 2018).

Extratos de microalgas como a *Chlorella* spp. recentemente demonstraram capacidade bacteriostática frente a bactérias Gram-positivas resistentes como a *Staphylococcus hyicus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus suis*, além de apresentar um perfil fitoquímica com 23 compostos com atividades antibacterianas reconhecidas (MICHELON et al., 2021). Várias espécies do gênero *Scenedesmus* são produtoras de inibidores bacterianos, como demonstrado por Habibi et al. (2018), onde a *S. dimorphus*, apresentou atividades antibacteriana contra bactérias Gram-positivas utilizando diferentes frações de extratos da biomassa, sendo ésteres, hidrocarbonetos e terpenóides os principais compostos envolvidos na atividade.

3.4.3 Capacidade de inibição enzimática (amilase e lipase)

Diabetes mellitus é uma desordem metabólica que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, sendo classificada em dois tipos: tipo 1, quando ocorre uma insuficiência na produção de insulina derivada da destruição das células β -pancreáticas, geralmente decorrentes de doenças autoimunes e predisposição genética, enquanto a tipo 2, a mais comum com uma incidência de 90% entre os casos da doença, ocorre uma resistência à insulina, estando diretamente relacionada a desordens como a obesidade, e decorre de fatores associados ao modo de vida dos pacientes, como por exemplo, a alimentação desbalanceada e sedentarismo (PARK et al., 2017). O número de casos da doença é crescente e estima-se que até 2030 afete 439 milhões de pessoas em todo o mundo (SHAW et al. 2009).

Diante desse cenário, uma estratégia terapêutica cada vez mais difundida para a diabetes mellitus tipo 2 é a diminuição dos níveis de glicose pós-prandial por meio da inibição de enzimas que atuam nas etapas finais da digestão de carboidratos como a α -amilase e α -glucosidase (SALES et al. 2012; GONG et al. 2020). A α -amilase está presente na saliva e no pâncreas atuando na hidrólise de polissacarídeos para a formação de oligossacarídeos e dextrina, que na membrana microfílica intestinal serão hidrolisados pela α -glucosidase em glicose, para a posterior absorção intestinal (SITI et al., 2020). Apesar dos fármacos antidiabéticos sintéticos serem eficazes, eles apresentam desvantagens como efeitos colaterais comuns e a diminuição da eficácia do tratamento ao longo do tempo, sendo necessária a busca contínua por novos agentes seguros e eficazes, especialmente de fontes naturais (ZHU et al., 2021).

Cannell et al. (1987), analisaram a capacidade de inibição de enzimas como a α -amilase, α -glucosidase e β -galactosidase de extratos de solventes orgânicos de 500 microalgas procarióticas e eucarióticas, revelando resultado positivos para clorófitas como *Dunaliella parva*, *S. quadricauda* e *S. subspicatus*. Recentemente, verificou-se o potencial antidiabético de *S. bajacalifornicus*, cujo extrato aquoso apresentou índices significativos de inibição de amilase, o que reforça a capacidade do gênero em produzir compostos com valor terapêutico (PATIL et al., 2019).

O índice de massa corporal é um importante fator com a resistência a insulina, de modo que grande parcela dos indivíduos com sobrepeso ou obesos também apresentam quadro de diabetes mellitus tipo 2 (AL-GOBLAN et al., 2014). A obesidade é um dos distúrbios metabólicos mais recorrentes no mundo e é caracterizada acúmulo exacerbado de gordura corporal, sendo que uma das abordagens mais efetivas para o seu tratamento é a inibição da lipase pancreática com o intuito de diminuir os monoacilgliceróis e triglicerídeos presentes no lúmen intestinal, resultando no decréscimo da absorção e acúmulo destes compostos no corpo (WAN-LOY et al., 2016).

Inibidores de lipase podem ser isolados de microalgas, como demonstrado por Zhang et al. (2019) no qual peptídeos bioativos de *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram um índice de inibição enzimática de 47,95%, sugerindo sua eficácia no tratamento da obesidade e distúrbios relacionados. Porém, estudos com microalgas ainda são insuficientes sendo necessárias novas investigações tendo em vista as diversas classes de compostos bioativos que sintetizam e as potenciais aplicações terapêuticas.

3.3.4 Potencial prebiótico de microalgas

Alimentos funcionais são aqueles que além de prover nutrição adequada para o organismo, apresentam uma ou mais atividades biológicas que favorecem a saúde do consumidor, tornando-se mais atrativos quando dotados de propriedades como antioxidantes, anti-inflamatórias ou até mesmo prebióticas. No último caso, a ação prebiótica é uma característica de certos alimentos que são dificilmente digeridos pelo corpo humano e passam por processos de fermentação pela microbiota intestinal, estimulando o crescimento seletivo de microrganismos que promovem efeitos benéficos à saúde (PATEL et al., 2021). Essas substâncias incluem principalmente fibras dietéticas, amidos resistentes, oligo e polissacarídeos como galactanos, β -glucano, xilo-oligossacarídeos (XOS), açúcares de álcool e outros compostos como mucinas, metabólitos que são comumente encontrados em macro e microalgas (RAPOSO et al., 2016).

Um estudo recente revelou que solução aquosas de *Chlorella vulgaris* quando adicionadas em leite foi capaz de estimular o crescimento de *Bifidobacterium*, demonstrando o potencial de microalgas como suplementos alimentar (HYRSLOVA et al., 2021). Além disso, microalgas são produtoras de exopolissacarídeos, substâncias cuja atividade prebiótica é relatada na literatura, e devido as mudanças de composição entre espécies, investigações são necessárias a fim de avaliar as possíveis multifuncionalidades destes compostos (ÍSIRLI, 2018; LIU et al. 2016).

O capítulo seguinte é composto por uma revisão bibliográfica narrativa onde serão abordados aspectos relacionados a biotecnologia da espécie *S. obliquus*, com ênfase no seu potencial nutracêutico, tendências e desafios mercadológicos.

4 ARTIGO 1 - BIOTECNOLOGIA DE *Scenedesmus obliquus*: PROSPECÇÃO E APLICAÇÕES NUTRACÊUTICAS

Alysson de Sá Pereira Lima¹ Thiago Barbosa Cahú¹ Danielli Matias de Macêdo Dantas², Alfredo Olivera Gálvez², Ranilson de Souza Bezerra¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil: alyssonlima-@hotmail.com (A.S.P.L)

²Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 56909-535, Recife, PE, Brasil

Resumo

Dentre as fontes naturais direcionadas ao segmento de suplementos alimentares, as microalgas fornecem uma diversidade de moléculas biológicas que somada a percepção da necessidade de alimentação saudável e qualidade de vida, impulsiona a expansão destes organismos no mercado nutracêutico. Apesar do alto rendimento de proteínas, ácidos graxos e pigmentos, a clorófita *Scenedesmus obliquus* ainda possui aplicações alimentícias pouco difundidas, tendo em vista as informações sobre segurança alimentar e eficácia na incorporação em produtos funcionais relatados na literatura. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão narrativa de literatura a respeito dos principais compostos de interesse nutracêutico da *S. obliquus* e suas funcionalidades, discutindo aspectos relacionados a otimização da produção, extração de metabólitos bioativos, bem como o potencial mercadológico da biomassa e seus subprodutos, revelando desafios que envolvem a aplicação da espécie em escala industrial.

Palavras-chave: microalga, produtos naturais, compostos bioativos, alimentação, farmacêutica

Abstract

Amongst the natural sources directed to the food supplement market, the microalgae can provide a diversity of biological molecules, that when added to the perception of healthy feeding and life quality needs, thrive the expansion of these organisms in the nutraceutical market. Considering literature data concerning food safety and the efficacy in incorporating functional products, the chlorophyte *Scenedesmus obliquus* still possesses non-widespread food

applications, regardless of its high yield as proteins, fatty acids, and pigments. Therefore, the present literature review grouped data concerning the main *S. obliquus* nutraceutical compounds of interest and their functionalities, discussing aspects related to the optimization of production and extraction of bioactive metabolites along with the market potential of biomass and its by-products, revealing challenges that involve the application of the species on an industrial scale.

Keywords: microalgae, natural products, bioactive compounds, food, pharmaceutical

1 INTRODUÇÃO

As estimativas do aumento populacional para as próximas décadas, têm sido acompanhadas por grandes desafios atrelados especialmente à demanda energética e alimentícia, os quais estimulam o interesse na exploração de novas fontes dietéticas capazes de suprir esta necessidade de forma sustentável, agregando também possíveis benefícios à saúde humana (BARSANTI; GUALTIERI, 2018; TANG et al., 2020a; VERA et al., 2018).

A busca por alimentos naturais tem se intensificado na última década acompanhando a demanda dos consumidores por produtos com características que lhes proporcionam uma melhor qualidade de vida (CAMACHO et al. 2019). Neste cenário, microalgas ganham um crescente destaque graças a produção e acúmulo de compostos bioativos com amplo interesse industrial, tais como ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, além de pigmentos antioxidantes com aplicações no setor farmacêutico e alimentício (FU et al., 2021). Algumas espécies de clorofíceas como a *Chlorella* sp, *Haematococcus* sp., *Dunaliella* sp. e a *Scenedesmus obliquus* acumulam altos teores de proteínas em sua biomassa seca, possuindo todos os aminoácidos essenciais, e por estes fatores, apresentam grande potencial de aplicações em produtos voltados à alimentação humana e animal (KRATZER et al., 2021).

Os nutraceuticos contendo microalgas representam um setor em expansão considerando os potenciais benefícios à saúde atribuído aos compostos biotivos presentes na biomassa microalgal. Nutraceuticos são alimentos fortificados que ao serem consumidos, são capazes de promover nutrição e inúmeros benefícios à saúde, possibilitando a incorporação de metabólitos bioativos em produtos de consumo regular amplamente aceitos pelo público (CAPORGNO et al., 2018; SOUYOUL et al., 2018).

A *S. obliquus* é uma das microalgas dulcícolas mais abundantes no mundo, e apesar de acumular metabólitos como carotenóides do tipo luteína e β -caroteno, e sintetizar altos conteúdos proteicos e lipídicos, sua aplicação comercial para o setor nutracêutico ainda é pouco expressiva (CHEN et al., 2019; GRIS et al., 2014; RUMIN et al., 2021; SINGH, N. et al., 2019). O potencial nutracêutico da espécie foi demonstrado por estudos anteriores (PATNAIK; MALLICK, 2019; SILVA et al. 2020), onde por meio da adição de hidrolisados proteicos a ração animal, observou-se efeitos benéficos à saúde dos animais como a manutenção do peso adequado, diminuição das taxas lipídicas e de glicose sérica, sugerindo que seu consumo pode atuar no tratamento de distúrbio metabólicos.

Abordagens recentes na literatura revisaram o potencial da *S. obliquus* quanto a produção de compostos e sua aplicação o setor bioenergético e ambiental (ISHAQ; MATIAS-PERALTA; BASRI, 2016). Nesse sentido, a presente revisão analisa a literatura a respeito da produção de metabólitos bioativos da *S. obliquus*, englobando processos de otimização de produção e extração de compostos, potencial nutracêutico e mercadológico da espécie, retratando os desafios envolvendo a sua aplicação em larga escala. Além disso, o estudo fornece informações sobre conhecimento atual da biotecnologia de *S. obliquus* que podem auxiliar na tomada de decisão para possíveis direcionamentos na indústria nutracêutica.

2 METODOLOGIA DE BUSCA E ANÁLISE DOS ESTUDOS

Para o desenvolvimento do estudo, pesquisas foram realizadas em três bases de dados: a Science Direct, a Web of Science e Pubmed e a coleta ocorreu entre julho e outubro/2021. As buscas se deram por meio de palavras-chave como “*Scenedemus obliquus*”, “*Tetrademus obliquus*”, utilizando o conectivo “AND” para adicionar termos mais específicos como “antioxidant”, “antibacterial”, “pigments”, “protein”, “lipids”, “carbohydrates”. Posteriormente, os estudos foram selecionados por meio da leitura dos títulos e resumos, onde critérios de elegibilidade foram determinados para a inclusão dos artigos, sendo selecionados àqueles publicados entre 2001 e 2021, artigos originais de pesquisa em inglês e estudos a respeito de atividades biológicas, produção e extração de macromoléculas e potencial alimentício, excluindo-se artigos de revisão de literatura ou investigações com a espécie que não se enquadravam no escopo da pesquisa. Após a triagem inicial, prosseguiu-se com uma leitura exploratória e seletiva, também observando as referências dos estudos a fim de integrar trabalhos que se incluíam nos critérios definidos, seguindo para a análise e interpretação dos artigos, e por fim, a redação da revisão.

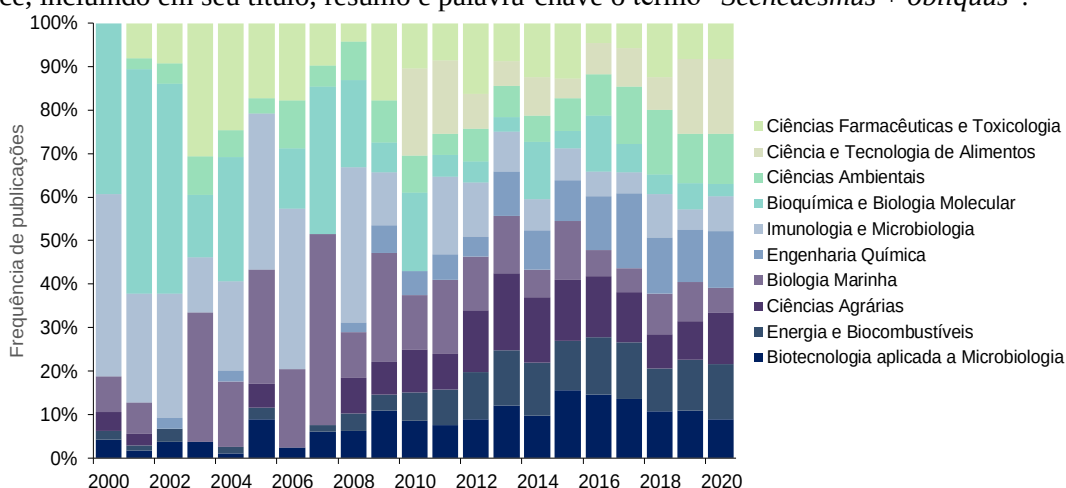
3 VISÃO GERAL DA BIOTECNOLOGIA DE *S. obliquus*

A exploração e comercialização de suplementos alimentares de caráter nutracêutico e produtos associados configuram segmentos de rápida ascensão nos últimos anos, principalmente pelo fato de que além do valor nutricional agregado desempenham papéis fisiológicos benéficos a saúde humana (KALRA, 2003; NICOLETTI, 2012).

Sob esta perspectiva, a aplicação das microalgas tem sido cada vez mais diversificada, onde representantes como as clorófitas *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Dunaliella* sp. e cianobactérias tais como a *Arthrospira platensis*, detêm a capacidade de produção de múltiplos metabólitos aplicáveis a setores farmacêuticos, cosméticos além da indústria alimentícia (ARAÚJO et al., 2021). Embora investigações biotecnológicas concentrem-se especificamente nestas principais representantes, a microalga *Scenedesmus obliquus* é também uma fonte promissora devido suas características fisiológicas intrínsecas que lhe permitem sintetizar compostos de ampla demanda comercial (AMORIM et al., 2021; CHAN et al., 2013; HEMANTKUMAR e RAHIMBHAI, 2019; NADZIR et al., 2019).

Nas últimas duas décadas, a espécie *S. obliquus* tornou-se alvo de crescentes investigações com tendências multidisciplinares (Figura 1) e estudos engajados predominantemente nos campos de pesquisa de Bioquímica e Ciências Farmacêuticas (21,98%), Energia e Biocombustíveis (14,42%) e nos últimos dez anos, na área de Ciência e Tecnologia de alimentos e Sustentabilidade (5,19%) cuja observação remete ao maior interesse na exploração e desenvolvimento de produtos nutracêuticos (ABIMBOLA et al., 2021; FERNANDES et al., 2021; PIOTROWSKA-NICZYPORUK et al., 2015; SUPRAJA et al., 2020).

Figura 1: Frequência das principais áreas de interesse associada as publicações científicas envolvendo a clorófito *Scenedesmus obliquus* ao longo dos últimos 20 anos. Os dados foram encontrados na base Web of Science, incluindo em seu título, resumo e palavra-chave o termo “*Scenedesmus + obliquus*”.



Atualmente, a *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, 1833, pertencente a família Scenedesmaceae, é considerada sinônima de *Tetrademus obliquus* (Turpin) MJ Winne, 2016 (GUIRY E GUIRY, 2021). Porém, considerando a literatura acerca da espécie e a relevância científica do seu sinônimo, o presente estudo adotou a nomenclatura *Scenedesmus obliquus* para tratar da espécie em questão.

4 MICROALGAS COMO POTENCIAIS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

4.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

4.1.1 Proteínas

Em 2017, a população mundial era estimada em 7,3 bilhões de habitantes, com um consumo de proteínas global em torno de 202 milhões de toneladas (HENCHION et al., 2017), apresentando um crescimento progressivo na demanda de fontes proteicas associada às estimativas no incremento populacional (ONU, 2019). Nesse cenário, fontes alternativas de proteínas como as microalgas destacam-se pela síntese de compostos de interesse (e.g. peptídeos e aminoácidos essenciais) que visam promover um equilíbrio nutricional adequado, em especial àquelas com uma quantidade de proteínas acima de 30% em sua biomassa seca (RITALA et al., 2017; FU et al., 2021). A cianobactéria *Arthrospira platensis*, por exemplo, é extensivamente cultivada para fins alimentícios na forma em pó, tabletes, cápsulas, sendo uma das primeiras espécies reconhecidas como suplemento alimentício devido seu alto teor proteico (47-70%) e compostos de alto valor nutracêutico (BERNAERTS et al., 2019; RAMÍREZ-RODRIGUES et al., 2021).

Proteínas são formadas por monômeros chamados aminoácidos, e sua composição e diversidade são fatores preliminares para a avaliação da qualidade de uma fonte proteica. Considerando que fontes vegetais de proteínas geralmente são carentes de aminoácidos essenciais, ou seja, àqueles que o ser humano não sintetiza naturalmente, microalgas por outro lado, podem apresentar esses aminoácidos em altas quantidades o que valoriza o seu valor nutracêutico (KOYANDE et al., 2019). Algumas microalgas destacam-se pela sua alta síntese proteica e potencial uso na indústria alimentícia, como por exemplo a *Haematococcus pluvialis*, espécies do gênero *Nannochloropsis*, a rodófito *Porphyridium cruentum* e a clorófito *Scenedesmus obliquus* (GEADA et al., 2021).

A partir do teor de proteína e grau de concentração, produtos provenientes da fração proteica das microalgas podem ser classificados como proteínas de célula inteira (40-50%), quando a célula mantém sua estrutura intacta, sendo consumida integralmente, e a partir da

extração e purificação dessas macromoléculas, são obtidos os concentrados de proteínas (60-89%), isolados proteicos (90-95%), hidrolisados (70-95%) ou ainda peptídeos bioativos (>95%), nos dois últimos casos, envolvendo hidrólise enzimática. (SOTO-SIERRA, et al. 2018). As proteínas purificadas, em especial são mais requeridas para aplicações em rações e produtos nutracêuticos pela sua alta digestibilidade geral (HLAING et al., 2020). A Tabela 1 demonstra exemplos do teor de proteínas da microalga *S. obliquus* em diferentes condições de crescimento.

Tabela 1: Variação do teor de proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* e principais condições de cultivo adotadas. sr = sem registro.

Cepa	Teor de proteínas	Condições de cultivo	Referência
<i>S. obliquus</i> (s.r)	5,1-32,3%	Meio Johnson com diferentes concentrações de fosfato e nitrato	(ÇELEKLI e BALCI, 2009)
<i>S. obliquus</i> (s.r)	14,87-26,62%	Meio Kuhl com diferentes concentração de KNO ₃	(HAMOUDA et al., 2018)
<i>Scenedesmus obliquus</i> (FACHB-417)	35,6%	Meio BG-11, regimes de luz otimizados e uso de água residual doméstica	(FAN et al., 2020)
<i>S. obliquus</i> (CPCC05)	41,1-47,3%	BG-11 sob influência de do fotoperíodo	(VENDRUSCOLO et al., 2019)
<i>S. obliquus</i> (s.r)	24,97%	Meio LC Oligo	CARNEIRO et al., 2019
<i>S. obliquus</i> (s.r)	42,8%	Meio L4-m	(AMORIM et al., 2021)
<i>S. obliquus</i> (SGM19)	42%	Meio BG-11	(SINGH et al., 2020)

A *S. obliquus* pode apresentar altos índices de aminoácidos, em especial, os essenciais como leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, lisina e treonina, como demonstrado no

estudo de OSMAN et al. (2004) com a cepa submetida a otimizações com diferentes quantidades de metais traço. No caso dos peptídeos da espécie, estes apresentam inúmeras atividades biológicas, como relatado por (MONTONE et al., 2018), onde 25 amostras demonstraram atividades antioxidante, anti-hipertensiva, capacidade de inibição de acetilcolinesterase e da enzima conversora de angiotensina, o que sugere a possível aplicação farmacológica dessas moléculas para o tratamento de inúmeras doenças neurológicas.

Uma classe de moléculas com grandes aplicações biotecnológicas são as lectinas, proteínas/glicoproteínas que se ligam a carboidratos e são bastante efetivas por exemplo, no diagnóstico relacionados a alterações relacionadas a síntese de glicanos e como marcadores celulares de certos microrganismos (MARTÍNEZ-FRANCÉS; ESCUDERO-OÑATE, 2016). Recentemente, Carneiro et al. (2019) mostraram que a *S. obliquus* além de um alto teor proteico, também produz lectinas em quantidades razoáveis, necessitando de abordagens mais profundas a respeito da bioquímica da espécie e produção de tais moléculas. Silva et al. (2020) caracterizaram uma lectina extraída e purificada da *S. obliquus*, exibindo alto peso molecular, inibição por vários íons e não aglutinação quando submetida a eritrócitos de diferentes origens, abrindo as portas para estudos nesse âmbito em diferentes cepas e avaliação de suas bioatividades.

No estudo de SUWAL et al. (2019), foi demonstrado a capacidade da espécie de produzir enzimas de interesse industrial como a β -galactosidase, enzima envolvida na hidrólise de lactose e produção de galacto-oligossacarídeos (GOS), sendo possível observar um decréscimo dos níveis de lactose no meio de cultura (21%), com o aumento nos níveis de GOS com um rendimento de 4,4 g/L. Essas moléculas são amplamente estudadas pelo sua atividade pré-biótica, e são assim reconhecidos por se enquadrarem em três critérios principais: são resistentes à acidez estomacal, à hidrólise de enzimas digestivas e não são absorvidos pela parede intestinal; podem ser fermentados pela microflora intestinal e terceiro, estimulam o crescimento ou atividade das bactérias presentes no trato gastrointestinal diretamente associadas à saúde do organismo (GIBSON et al., 2004).

A produção de enzimas industriais por microalgas apresenta algumas vantagens como os requisitos nutricionais simples (luz natural ou artificial, CO₂, água, fontes de nitrogênio e outros compostos em menor quantidade) o que pode diminuir os custos em grande escala (BRASIL et al., 2017). Anteriormente, a produtividade de β -galactosidases de *S. obliquus* foi investigada sob diferentes sistemas tróficos de cultivo, alcançando um valor máximo de 12,35 U/L/dia, sendo um rendimento considerável para a produção enzimática em larga escala (BENTAHAR et al., 2018).

4.1.2 Carboidratos

Nas microalgas, os carboidratos podem ser estruturais quando presentes na parede celular, por exemplo, além de serem intermediários do ciclo fotossintético no ciclo de oxidação do carbono fotorrespiratório, constituindo também, importantes compostos de armazenamento de energia, permitindo a manutenção das células no ciclo escuro, e frequentemente, em condições estressantes (RAVEN et al., 2003).

Estudos recentes demonstram a capacidade do gênero *Scenedesmus* em sintetizar e acumular altos teores de amido como fonte de armazenamento, alcançando rendimentos de até 37,10% do peso seco (PANDEY et al., 2020). Semelhante ao amido encontrado nas plantas superiores, nas microalgas é formado por polímeros de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4, contendo ramificações na posição α -1,6, sendo um composto bastante investigado visando a produção de bioetanol por processos fermentativos (BULÉON et al., 1998; MAIA et al., 2020). O amido tem um papel fundamental no armazenamento de energia transitória e no maior aproveitamento da energia luminosa nos ciclos dia/noite, o que está diretamente relacionado com a produtividade da microalga, como demonstrado em um estudo recente com a *S. obliquus*. (LEÓN-SAIKI et al. (2017).

Em relação à composição de carboidratos da *S. obliquus*, em condições otimizadas, o teor de açúcares pode chegar em torno de 45-50% da biomassa, sendo a glicose, o monômero predominante ao constituir 80% do conteúdo total de carboidratos, como demonstrado por HO et al., (2017). Um comparativo entre análises semi-quantitativas e quantitativas revelou que os principais monossacarídeos presentes na espécie são predominantemente glicose, galactose, manose e em menores quantidades xilose e ramnose (SCHULZE et al., 2017). Além disso, SCHULZE et al., (2016) investigou numerosas cepas de clorófitas, observando que várias espécies do gênero *Scenedesmus* são capazes de sintetizar carboidratos com diversas atividades biológicas e aplicações terapêuticas, como o β -glucano, um polímero raramente encontrado em microalgas sendo geralmente isolado de fungos e bactérias. Tal composto é amplamente estudado pelas suas notáveis características de biossegurança, exibindo principalmente atividades antivirais, antioxidantes, antitumorais e imunomoduladora (YANG; HUANG, 2021).

Polissacarídeos de microrganismos desempenham variadas funções fisiológicas dependendo da sua estrutura, desde a participação na construção de biofilmes, acúmulo de energia como reservas de carbono e são frequentemente secretados para o meio adjacente, sendo

chamados de exopolissacarídeos (EPS), e liberados tanto por mecanismos fisiológicos da célula, tanto pelos estímulos gerados por condições estressantes (DELATTRE et al., 2016). O gênero em questão, possui espécies reconhecidas pela produção e atividades biológicas das frações de EPS, como demonstrado por PATWAL et al. (2021) onde realizaram uma otimização da produção de EPS de *S. acutus* demonstrando a notável atividade imunomoduladora em testes in vitro utilizando células mononucleares do sangue periférico. Além disso a atividades antioxidantes e antitumorais foram obtidas por EPS de *Scenedesmus* sp., chegando a uma porcentagem máxima de eliminação de radicais (DPPH e hidroxila) de 68,2% e 77,5% e diminuindo de forma significativa as células de duas linhagens de câncer de cólon humano (HCT116 e HCT8) em ensaios in vitro (ZHANG et al., 2019). Os estudos em relação aos EPS de *S. obliquus* ainda são incipientes necessitando, portanto, de investigações sobre a caracterização, parâmetros de otimização e suas atividades biológicas, tendo em vista o potencial demonstrado pelo gênero e as inúmeras aplicações terapêuticas dos exopolissacarídeos.

4.1.3. Lipídeos

Em condições otimizadas, microalgas podem acumular entre 20-50% de lipídeos em sua biomassa seca (KATIYAR et al., 2020). Com base no tamanho das estruturas de hidrocarbonetos, os lipídeos podem ser divididos em cadeia média (C10-C14), cadeia longa (C15-C18) e cadeias muito longas (>C20), e dentre esses últimos, destacam-se os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), que possuem cadeias longas e incluem ácido araquidônico, ácido α e γ -linolênico e ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) que apresentam inúmeras atividades biológicas (SINGH et al., 2011).

O EPA, DHA e o ácido α -linolênico são conhecidos como ácidos graxos do tipo ômega-3, compostos altamente valorizados devido suas propriedades nutracêuticas, atuando na redução da pressão arterial e prevenção de doenças cardiovasculares, atividades antitumorais, além de exercerem um impacto positivo na manutenção da funcionalidade neuronal, podendo diminuir as chances de desenvolver problemas como o mal de Alzheimer (COLUSSI et al., 2017; MOHAJERI et al., 2015; REMIZE et al., 2021). Cápsulas alimentícias de DHA e EPA geralmente são produzidas a partir de óleo de peixe, porém, tendo em vista o constante crescimento do mercado de ômega-3 e a necessidade de novas fontes alternativas de alto rendimento, o óleo de microalgas tem demonstrado um grande potencial de comercialização voltado à saúde humana e animal (BHATTACHARYA E GOSWAMI, 2020; SANTIGOSA et al., 2021).

O gênero *Scenedesmus* é amplamente investigado por produzir altos rendimentos de triglicerídeos e PUFA's, com destaque para a espécie *S. dimorphus*, *S. acutus* e *S. obliquus* (DAMIANI et al., 2014; SHEN et al., 2020; VIDYASHANKAR et al., 2015). A *S. obliquus*, em especial, pode produzir um conteúdo lipídico em torno de 47% do peso seco, variando os teores e a composição dos ácidos graxos a depender das condições de estresse e parâmetros físico-químicos adotados (ESAKKIMUTHU et al., 2019). Sob diferentes regimes de fotoperíodo, a *S. obliquus* foi capaz de produzir um teor de PUFA's que compôs 64% do conteúdo lipídico total da cepa, demonstrando a possibilidade de sua exploração da espécie como fonte de compostos com grande demanda industrial. (VENDRUSCOLO et al., 2019).

Análises do perfil lipídico da espécie revelaram a produção de ácidos graxos de grande valor agregado, entre eles: ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido α -linolênico (C18:3 n-3) e em menores quantidades: ácido eicosapentaenóico (C20:5 n-3) e docosahexaenóico (C22:6 n-3) (BANSKOTA et al., 2018; SHAO et al., 2017). Apesar dos teores variáveis entre diferentes tratamentos, alguns fatores podem ser adotados a fim de aumentar a produtividade destes ácidos graxos, como por exemplo a adição de acetato como fonte de carbono exógeno em cultivo mixotrófico, de acordo com o proposto por Mansouri et al. (2020) cuja suplementação dos cultivos de *S.obliquus* aumentou o teor de EPA para 51,2% do conteúdo de lipídeos total. Em comparação com a *Chlorella vulgaris*, foi demonstrado que a *S. obliquus* produz um maior teor de ácido α -linolênico, que em condições otimização de privação de nitrogênio, alcançou valores de $38,0\% \pm 13,5$ do total de ácidos graxos produzidos (OTHMAN et al., 2019). Além disso, ácidos graxos tipo ômega-3 da espécie possuem atividade antioxidante, o que aumenta sua valorização como suplementos alimentares (CONDE et al., 2021).

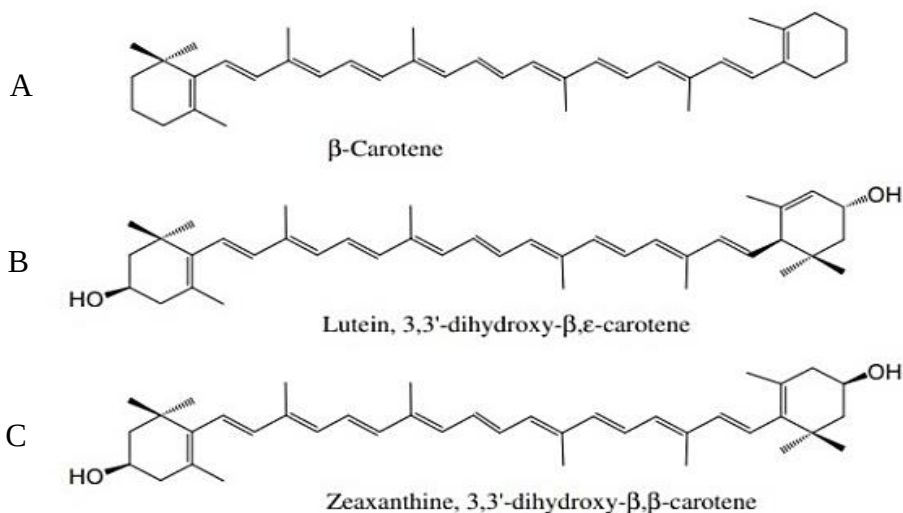
Atualmente, um dos principais problemas da produção em larga escala de lipídeos microalgais é a seleção da cepa adequada que permita uma alta produtividade de biomassa com grande acúmulo de lipídeos, onde na prática, observa-se uma relação inversa entre esses dois fatores, prejudicando o processo de extração de metabólitos (TANG et al., 2020). Nesse sentido, ferramentas de engenharia genética são promissoras uma vez que permitem entender os processos genéticos que ocorrem durante a privação de nutrientes, identificar alvos genéticos para a identificação de linhagens com alta síntese lipídica, permitindo a utilização de espécies de microalgas para produção industrial (SOÓS et al., 2021).

4.1.4. Pigmentos

De forma geral, pigmentos possuem um papel fundamental na fotossíntese, captando a luz e transferindo elétrons para os centros de reação dos dois fotossistemas, atuando também no sistema de defesa antioxidante do organismo (VENKATA SUBHASH et al., 2017). As clorofilas são moléculas formadas essencialmente por um anel de porfirina ligado a um grupo fitol, sendo os pigmentos mais abundantes entre os organismos fotossintetizantes, as quais podem ser atribuídas três funções principais: primeiro, formam sistemas eficientes de captação de luz decorrente de sua alta fotossensibilidade; segundo, transferem a energia para os centros de reação e terceiro atuam na separação de cargas na membrana fotossintética, o que posteriormente resultará na formação de ATP (SCHEER, 2006; FERRUZZI E BLAKESLEE, 2007).

Além das clorofilas, outra classe de pigmentos abundantes são os carotenóides, sendo esses acessórios e essenciais na coleta e dissipação da luz, atuando como fotoprotetores em todos os organismos fotossintéticos, nos quais sua presença pode conferir coloração vermelha, amarela e laranja (ZHANG et al., 2014). Estruturalmente, são isoprenóides lipofílicos biossintetizados a partir da ligação de duas moléculas de 20 carbonos cada, chamada pirofosfato de geranylgeranyl, que geram um esqueleto de 40 carbonos o qual deriva todas as variações de carotenóides (Britton, 1995). De acordo com a presença de grupos funcionais, os carotenóides podem ser classificados em duas categorias: os carotenos, quando o esqueleto principal é formado apenas por hidrocarbonetos, tendo como exemplos de estruturas mais simples o β -caroteno (Figura 2A) e o licopeno; e as xantofilas, cujas estruturas apresentam oxigênio na composição, como a luteína, zeaxantina (figura 2B e 2C) e astaxantina (SAINI et al., 2015).

Figura 2: Exemplos das estruturas de carotenóides. A- β -caroteno, a estrutura mais simples entre os carotenóides; B- luteína e C- zeaxantina, um estereoisômero na luteína (MANAYI et al., 2015).



Estudos recentes abordam as inúmeras atividades biológicas associadas aos carotenóides e os possíveis benefícios à saúde humana a partir do seu consumo, destacando-se a atividade pró-vitamina A do β -caroteno, anticâncer, antioxidante e neuroprotetoras (GEÖCZE et al., 2021; MITRA et al., 2021; SAINI et al., 2020), e com isso, o crescente interesse nutracêutico elevou a demanda industrial e a busca de fontes economicamente viáveis (SAINI; KEUM, 2019). A atividade antioxidante de extratos ricos em carotenóides de *S. obliquus* foi demonstrada por Patias et al. (2017), onde os valores de eliminação do radical peroxil foi 14 vezes superior aos obtidos pelo α -tocoferol. Além disso, carotenóides da espécie apresentaram 80% de sequestro do radical DPPH+, além de atividade de inibição de acetilcolinesterase e a capacidade de inibição de células das linhagens tumorais como HCT116 (câncer de colorretal), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e MCF7 (câncer de mama) (IBRAHIM et al., 2021).

A luteína e a zeaxantina, por exemplo, são pigmentos presentes na retina em uma região amarelada chamada mácula e as principais funções são de filtrar parte da luz azul e eliminar as espécies reativas de oxigênio que são constantemente produzidas pelo metabolismo, sendo assim, índices adequados de xantofilas podem prevenir distúrbios oculares como a Degeneração Macular relacionada à Idade (DMRI) (BLACK et al., 2020). Atualmente, a luteína é extraída a partir das pétalas de calêndula, que apesar dos altos níveis da xantofila, seus índices podem ser alterados sazonalmente e exige um maior processamento. Fontes alternativas como as microalgas estão sendo cada vez mais exploradas graças ao alto teor de pigmentos, a facilidade de manutenção das culturas sob parâmetros constantes, o que gera uma biomassa mais homogênea, somada à rápida taxa de crescimento com menor processamento, o que as tornam candidatas aptas para a produção em larga escala, além da possibilidade de aproveitamento de inúmeros resíduos de alto valor agregado. (FERNÁNDEZ-SEVILLA et al., 2010). Nesse sentido, o gênero *Scenedesmus* vem ganhando destaque graças a notável capacidade de certas espécies produzirem e acumularem carotenóides de alto valor comercial como astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, β -caroteno e especialmente, luteína (ABURAI et al., 2013; GONG; HUANG E HUANG 2020; PŘIBYL et al., 2016).

Como a alta produtividade de luteína e da biomassa são ótimos indicativos da viabilidade industrial, HO et al. (2015) otimizaram a produção de luteína de *S. obliquus* FSP-3 alcançando um rendimento de 4,61 mg/g e uma produtividade de 4,35 mg/L/dia a partir de diferentes estratégias de luz e fontes de nitrogênio. Tal espécie já é reconhecida pela sua alta síntese de luteína, representando uma fonte promissora para cultivo industrial (CHEN et al., 2019; SALLEHUDIN et al., 2018). Além disso, CHEN et al. (2017) demonstrou como a engenharia genética é uma ferramenta que pode ser aplicada no aumento da produção de

carotenóides, ao manipular por exemplo, a expressão da fitoeno sintase (PSY), enzima envolvida na biossíntese de β -caroteno para a *Scenedesmus* sp. CPC2, alcançando rendimentos de 31,8 mg/ g de peso seco, abrindo um leque de possibilidades de estudos com o gênero visando a melhor viabilidade comercial.

Atualmente, existem poucos estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo pigmentos como cis e trans-carotenóides, luteína, ésteres de astaxantina e fucoxantina, e diante da versatilidade e o crescente interesse na produção desses compostos, evidencia-se a necessidade de estudos nesse âmbito, demandando maiores investigações sobre a bioquímica, fisiologia e genética molecular de microalgas, esse último em especial, é fundamental considerando que diferentes enzimas estão diretamente ligadas à síntese de pigmentos (MISHRA et al., 2019).

5 FATORES ASSOCIADOS À SÍNTESE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS EM *S. obliquus*

Microalgas possuem uma alta capacidade de adaptação a fatores bióticos e abióticos, quando submetidos aos diferentes tipos de cultivo, influenciam diretamente a produção compostos específicos para cada espécie, resultando em uma excelente estratégia para a síntese de metabólitos de interesse biotecnológico (PALIWAL et al., 2017).

Os cultivos de microalgas são comumente classificados em quatro tipos principais: fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (CHEN et al., 2011). O modo fotoautotrófico é o mais implementado a nível industrial, considerando que podem ser adotados para o uso em sistemas abertos de baixo custo do tipo raceway, e é caracterizado pela utilização do CO₂ atmosférico como fonte de carbono inorgânico e necessidade de energia luminosa para a conversão em energia química por meio da fotossíntese (HUANG et al., 2010).

Os demais sistemas requerem um componente que não está presente no cultivo fotoautotrófico, o carbono orgânico, geralmente na forma de glicose, mas que pode ser obtido por fontes alternativas como água residuais, necessitando de sistemas fechados de crescimento como fotobiorreatores ou fermentadores, que pelo alto custo são menos utilizados em larga escala (LOWREY et al., 2014). No modo heterotrófico, algumas espécies são capazes de crescer em condições de escuro, produzindo energia apenas por meio dos compostos orgânicos presentes no meio, diferindo do modo mixotrófico pelo fato do último utilizar carbono da forma orgânica e inorgânica na presença de luz, utilizando, portanto, o aparato fotossintético (JAREONSIN; PUMAS, 2021). O modo fotoheterotrófico é o sistema no qual as microalgas produzem energia por meio de compostos orgânicos, já que o suprimento de luz é insuficiente

para a fixação do CO₂ atmosférico, sendo raramente usado em comparações aos demais métodos (CHEN et al., 2011). Dessa forma, diferentes condições de cultura podem ser adotadas a fim de obter compostos e interesse industrial como ácidos graxos ômega-3 e 6 na *S. obliquus* (PIASECKA et al., 2020) e nas seções seguintes, serão abordados diferentes parâmetros que podem ser modulados a fim de otimizar da produção de metabólitos de grande valor biotecnológico em *S. obliquus*, sob diferentes sistemas de cultivo.

5.1 PARÂMETROS DE LUZ, TEMPERATURA E PH

Devido sua natureza fotossintetizante, a produtividade das microalgas está intimamente relacionada ao suprimento adequado de luz, de modo que o excesso de iluminação pode desencadear processos de estresse oxidativo e consequentemente prejudicar o seu crescimento (GRIS et al., 2014). Nesse sentido, estudos sobre intensidade e tipo de luz são essenciais no desenvolvimento dos parâmetros específicos de cada espécie, promovendo a máxima produção de compostos de alto valor agregado, em especial carotenóides como a luteína, um dos pigmentos mais exploradas no gênero *Scenedesmus* (PŘIBYL et al., 2016).

Visando melhorar a viabilidade econômica da luteína e sua produtividade diária, Ho et al., (2014) avaliaram a produção do composto em seis cepas de *S. obliquus* sob diferentes estratégias relacionadas à luz, concluindo que a cepa *S. obliquus* FSP-3 quando submetida a lâmpada TL5 de luz branca na intensidade de 300 µmol/m²/s apresentou os maiores teores de luteína e produtividade, sendo 4,52 mg/g e 4,15 mg/L/dia, respectivamente.

Fontes de carbono exógenas associadas a estresse luminoso e salino como o acetato, têm demonstrado resultados promissores quanto à produção de carotenóides, como a astaxantina e luteína, influenciando diretamente a produtividade da biomassa da *S. obliquus* (MANSOURI e HAJIZADEH, 2017). A eficiência da adição de compostos orgânicos também foi avaliada por Chen et al., (2019) ao associar a condição mixotrófica a diferentes regimes de luz azul e vermelha, alcançando o teor máximo de 1,78 mg/g de luteína da *S. obliquus*.

Maroneze et al., (2019) analisaram o metabolismo das clorofilas a, b e carotenóides de *S. obliquus* sob estresse luminoso, demonstrando dados importantes sobre a aclimação da espécie em cultivos heterotróficos e fotoautotrófico cujo dados auxiliarão a modular parâmetros de otimização de cultivos e aumento de produtividade da espécie. Além de pigmentos, um estudo pioneiro demonstrou que o estresse luminoso utilizando LEDs de diferentes espectros e intensidades podem estimular o crescimento da *S. obliquus* com o aumento concomitante do teor de ácidos graxos até 42% do peso seco da microalga, sendo resultados promissores

considerando que a síntese destes compostos normalmente ocorre em diferentes fases de crescimento (CHOI et al., 2015).

Como demonstrado por Silva et al. (2018), fotoperíodo é um fator essencial no acúmulo de carboidratos, afetando a assimilação de nutrientes como o nitrogênio, o que resulta na diminuição da produtividade de *S. obliquus*. No estudo de Vendruscolo et al. (2019), foi demonstrado que a iluminação constante é um parâmetro que pode ser adotado para elevar a produtividade e o teor proteico da espécie, enquanto o fotoperíodo de 12:12h, estimula a síntese de compostos de reserva energética como carboidratos e lipídeos. Recentemente, foi realizada uma otimização da cultura de *S. obliquus* quanto à concentração de nitrogênio (NO_3), pH, temperatura e intensidade luminosa com o objetivo de elevar a produtividade da espécie em conjunto com a alta produção lipídica ($33 \pm 1,2$ mg/L/dia) e de carboidratos ($51 \pm 1,5$ mg/L/dia), representando resultados promissores para futuras aplicações industriais, tendo em vista o desafio atual de estimular o acúmulo e substâncias de reserva energética com a alta produtividade de biomassa (NADZIR et al., 2019).

Outros parâmetros como temperatura e pH podem ser associados a fim de promover o acúmulo de macromoléculas de *S. obliquus*, em que parâmetros ótimos de temperatura de $27,5^\circ\text{C}$, pH neutro e intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol/m/s}$, resultaram em um rendimento de triacilgliceróis de $0,122$ g/mol de fótons, tendo como base de cálculo a quantidade de luz fornecida ao sistema (BREUER et al., 2013). O crescimento da cultura também é dependente do pH do meio, onde valores entre 5-6 inibem o crescimento da espécie e sua produtividade aumenta à medida que os valores de pH se elevam (LACROUX et al., 2020). Uma otimização realizada por Helamieh et al. (2021) demonstrou que o tratamento usando luz verde e temperatura de cultivo de 20°C é eficaz para o acúmulo de ácidos graxos poliinsaturados de *S. obliquus* (32,9% do teor de lipídeos), promovendo também a maior produtividade de biomassa (2,42 g/L), resultados que segundo os autores, podem promover inúmeras aplicações no campo de biotecnologia de microalgas.

5.3 NUTRIENTES NOS CULTIVOS

A composição do meio de cultura é outro fator que influencia a síntese de metabólitos, e de forma geral, os nutrientes são classificados em duas categorias: materiais de alto teor (macronutrientes), como fontes de nitrogênio, carbono, fósforo e enxofre, presentes em grandes quantidades nos cultivos; e materiais de baixo teor (micronutrientes), como metais traço, principalmente magnésio, cobre, potássio, e outros compostos como silício e vitaminas. nas soluções (POURKARIMI et al., 2020). Apesar das baixas concentrações, a importância dos

metais foi demonstrada no estudo de Gorain et al. (2013), onde a diminuição dos níveis de cálcio e aumento de magnésio foram condições que favoreceram a máxima produção lipídica de *S. obliquus*. A presença de metais como o ferro também é capaz de estimular a maior produtividade da espécie ($459,20 \pm 2.37$ mg/L/dia) com aumento do conteúdo lipídico ($34,19 \pm 1.93\%$) (RAJABI ISLAMI; ASSAREH, 2019).

A produtividade de carboidratos pela *S. obliquus*, por exemplo, varia de acordo com o tipo de cultivo e os parâmetros físico-químicos, especialmente quantidade de nitrogênio, intensidade luminosa, pH e fontes de carbono (SINGH et al., 2020; BASU et al., 2013). Devido ao consumo e consequente privação de nutrientes, como nitrogênio, na fase estacionária dos cultivos, o teor de carboidratos e lipídeos aumentam significativamente em comparação à fase exponencial (HUSSAIN et al., 2020), sendo essa depleção de nutrientes, uma das estratégias adotadas para uma produção de compostos de reserva energética.

Os baixos níveis de compostos nitrogenados, como o nitrato, foram demonstrados por Wu e Miao (2014), onde o estudo alcançou rendimentos de lipídeos máximos de 54,5% para *Chlorella pyreidiosa* e 47,7% para *S. obliquus*, respectivamente. A depleção de nitrato pode ser associada a ciclos de luz/escuro é capaz de elevar o teor de carboidratos, em *S. obliquus*, principalmente na forma de amido como fonte de energia primária (MIRANDA et al. 2012).

Por outro lado, dados experimentais obtidos por RANADHEER et al. (2019) para *Scenedesmus* sp. demonstram que altos níveis de nitratos em condições toleráveis pode aumentar a eficiência do fotossistema II em até três vezes, elevando a síntese proteica, refletindo em um aumento significativo da biomassa. Além do nitrato, diferentes níveis de fosfato podem aumentar a produtividade e consequentemente, os níveis de clorofila a e proteínas e *S. obliquus* (ÇELEKLI; BALCI, 2009) o que evidencia o papel essencial de tais compostos no crescimento e produção de metabólitos da clorófito.

5.4 SALINIDADE

O estresse osmótico/salino afeta o metabolismo microalgal por inúmeros mecanismos fisiológicos, como por exemplo na diminuição da atividade das proteínas antiportadoras Na^+/H^+ , influenciando diretamente a eficiência do maquinário fotossintético e a produtividade das culturas (ANAND et al., 2019). Além da taxa fotossintética, esta condição é marcada pelo o decréscimo dos níveis de clorofilas a, b e carotenóides de *S. obliquus*, induzindo por outro lado, a produção de lipídeos na microalga, alcançando valores em torno de 32,26% na presença de 0,20M de NaCl (JI et al. 2018).

No estudo de Pandit et al. (2017), a variação de salinidade entre 0,06-0,4M induziu o acúmulo máximo de 43% de lipídeos na biomassa seca de *S. obliquus*, e assim como a *C. vulgaris*, os biomarcadores de estresse como as enzimas antioxidantes apresentaram os menores níveis na concentração de 0,06M de NaCl, sugerindo uma aclimação das clorófitas à condição salina que resultou na maior produtividade entre os tratamentos. Apesar dos impactos na produtividade de biomassa, a *S. obliquus* apresenta capacidade de cultivo em água salobra e salinas, estando atrelada à sua distribuição em ambientes extremófilos como regiões semiáridas (OLIVEIRA et al., 2019). Essas condições estão voltadas à síntese de lipídeos neutros e polares, fato que demonstra a versatilidade e nível de aclimação da espécie para o aproveitamento de águas que não são usadas em sistemas agrícolas (ROCHA et al., 2019). Em baixas concentrações de NaCl, a espécie produziu ácidos graxos bioativos como o ácido oleico e o ácido α -linolênico, compondo 41% e 21% do teor lipídico total, respectivamente (SALAMA et al., 2013).

5.5 FITOHORMÔNIOS EXÓGENOS

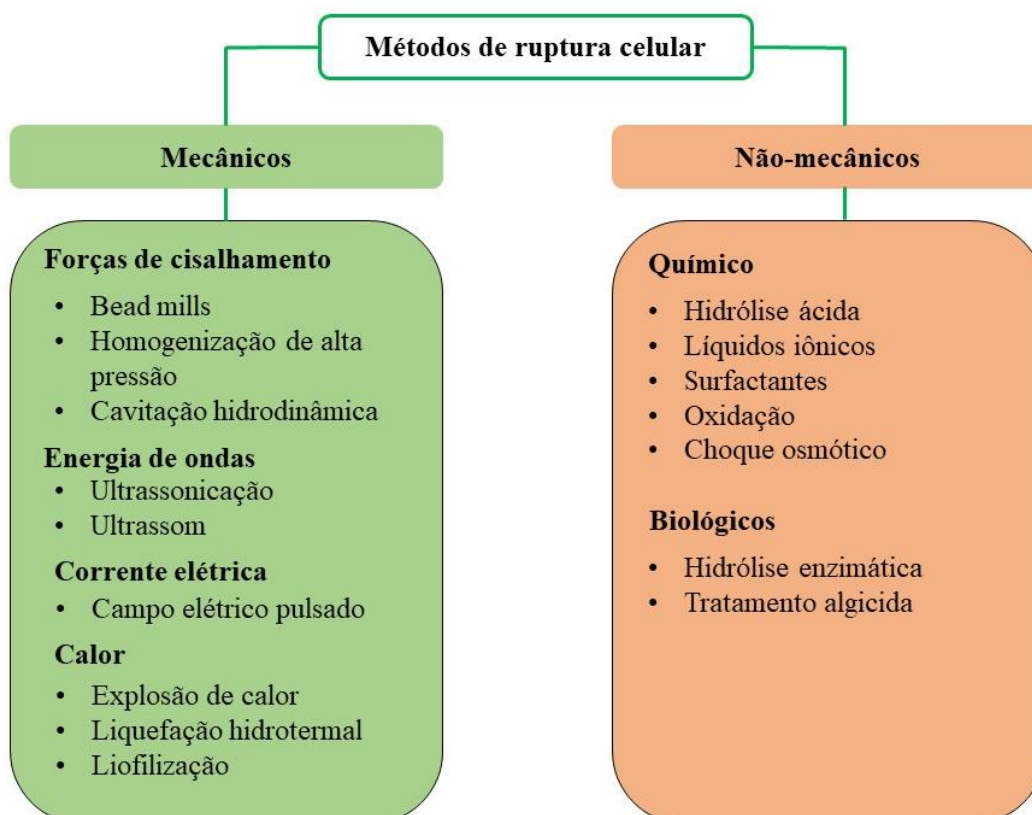
Na agricultura, os fitohormônios são aplicados à sistemas visando a otimização do crescimento vegetal com melhores respostas aos estresses ambientais. Da mesma forma, tais compostos podem ser associados a cultivos de microalgas, promovendo uma maior produtividade, melhor resposta a condições estressantes e maiores rendimentos de metabólitos primários e secundários (STIRK; VAN STADEN, 2020). Nesse sentido, RENUKA et al. (2017) adicionaram citocininas em meio sob condições de estresse de nitrogênio, onde naturalmente há um decaimento do crescimento da biomassa em função da maior síntese lipídica, observando um aumento da produtividade de até 60,7% em relação ao controle, somado a uma produtividade lipídica de 64,95% e 63,06% para os tratamentos com cinetina (1 mg.L⁻¹) e zeatina (0,1 mg.L⁻¹), respectivamente. Os mesmos autores, em um estudo mais recente, demonstraram a eficiência do uso de fitohormônios na produção lipídica de *S. obliquus*, onde através da combinação de zeatina, ácido indolacético e ácido giberélico, rendimentos lipídicos de 77,2% foram observados também sob estresse de nitrogênio (RENUKA et al., 2018).

A adição de Dietil Aminoetil hexanoato (DAH) e ácido indolacético em cultivos de *S. obliquus* também promoveu a síntese conjunto de metabólitos com alto rendimento como carboidratos (34% e 33% respectivamente), proteínas (35% e 34%) em especial ácidos graxos, alcançando valores de 56% e 59%, para ambos os tratamentos com fitohormônios (SALAMA et al., 2014).

6 MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA PARA EXTRAÇÃO DE PRODUTOS DE *S. obliquus*

Diante da variada composição bioquímica das microalgas, a extração e posterior aplicação de seus metabólitos necessita de uma etapa de fracionamento que deve ser específica para cada molécula alvo, buscando maximizar o rendimento e minimizar possíveis efeitos de inibição e síntese de produtos indesejáveis (NITSOS et al., 2020). Dessa forma, os procedimentos de pré-tratamento da biomassa têm como objetivo romper ou degradar a parede celular para a obtenção dos compostos intracelulares, tornando-os mais acessíveis para a extração com solventes (DONG et al., 2016). Como demonstrado na Figura 3, os métodos de ruptura podem ser classificados em mecânicos e não mecânicos. No primeiro caso, os principais exemplos são: o ultrassom, microondas, eletroporação, e homogeneização de alta pressão. Com relação aos métodos não mecânicos podem ser citados: métodos químicos onde se explora reagente ácidos e álcalis, além dos surfactantes e choque osmótico; e biológicos com o uso de enzimas que degradam proteínas e polissacarídeos da parede celular (KIM et al., 2013).

Figura 3: Tipos de métodos de ruptura celular para microalgas. Baseado em Lee et al., (2017).



6.1 MÉTODOS MECÂNICOS

A ruptura mecânica da parede celular varia de acordo com o método utilizado, ocorrendo por forças de cisalhamento, ondas, calor ou pulso elétrico, cujas vantagens incluem maiores rendimentos de compostos somado à facilidade de controle e escalabilidade a nível industrial (LEE et al., 2017). Para fins alimentícios, altos teores de proteínas podem ser obtidos por tratamentos mecânicos, como demonstrado por WANG et al., (2020), na qual a biomassa seca de *S. obliquus* foi submetida a ciclos de homogeneização de alta pressão, recuperando altos índices de proteínas da microalga (40,34%). O mesmo estudo ainda mostrou a melhoria da digestibilidade das proteínas em modelos *in vitro*, sugerindo potenciais aplicações como aditivos seguros de rações e para a alimentação humana.

Métodos mecânicos mais utilizados como a digestão por microondas, sonicação, autoclavagem e choque osmótico foram avaliados por Ansari et al. (2018) quanto a sua eficiência na extração de lipídeos e moléculas bioativas da *S. obliquus*. Os maiores rendimentos lipídicos foram obtidos pela extração assistida por microondas (25,39%), com recuperação de proteínas e carboidratos de 31,26% e 19,80% respectivamente, revelando a eficiência na extração sequencial de produtos da espécie. Segundo Zhou et al. (2019) a otimização de métodos como o microondas pode elevar a eficiência de extração de ácidos graxos em até 95,58%, sendo uma alternativa para produção em larga escala de lipídeos microalgais.

No caso de pigmentos antioxidantes de *S. obliquus* como a luteína, um estudo de otimização foi realizado por Chan et al., (2013), onde métodos como autoclave, ultrassonicador e bead beater foram testados e somados a diferentes solventes extratores, concluindo que o éter dietílico associado ao bead beater configuram um processo de extração mais eficiente com taxa de recuperação cinco vezes maior em comparação ao demais tratamentos. O bead beater (moinho de esferas) tem sido utilizado há anos para ruptura de certas cianobactérias e é bastante eficiente no pré-tratamento de microalgas com a parede celular rígida (Molina et al., 2013).

6.2 MÉTODOS NÃO MECÂNICOS: QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Métodos químicos, no geral, possuem alta escalabilidade, baixo consumo de energia elétrica e eficiência na extração de várias classes de compostos, apesar dos cuidados necessários na seleção dos solventes quanto a sua biotoxicidade (KIM et al., 2016). A otimização da extração de compostos de *S. obliquus* por meio da hidrólise ácida foi realizada por Vieira et al. (2021), onde a temperatura foi um fator determinante durante a hidrólise, alcançando um rendimento lipídico máximo de $210,1 \pm 10$ mg/g. O uso de surfactantes tem demonstrado grande eficiência na extração de lipídeos do gênero *Scenedesmus* (LAI et al., 2016), aumentando a

recuperação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) em até 16 vezes em comparação ao controle, sem a utilização de solventes tóxicos.

Abordagens de pré-tratamento por meio de degradação enzimática demonstram eficiência na extração de lipídeos, podendo facilitar a entrada de solventes pela digestão de polímeros da parede celular microalgal, também permitindo o acesso de microrganismos a tais compostos para fins energéticos, como na produção de bioetanol (GUARNIERI et al. 2012). Neste tipo de hidrólise, enzimas como proteases e celulasas apresentam alto nível de extração de carboidratos, proteínas e lipídeos de *S. obliquus* (ROJO et al., 2021).

Técnicas de pré-tratamento combinadas demonstram-se efetivas no rompimento de células e extração de compostos, especialmente lipídeos (ONUMAEGBU et al., 2018). A extração conjunta de açúcares redutores e proteínas de *S. obliquus* foi proposta por ELDALATONY et al. (2016), onde por meio da combinação da sonicação com a hidrólise enzimática, foi obtido um rendimento de polissacarídeos quatro vezes superior em comparação ao método mecânico e um rendimento proteico de 56%. Um outro estudo comparativo entre tratamentos enzimáticos e surfactantes (TRIVEDI et al., 2020) apresentou conclusões interessantes sobre a extração de lipídeos, com a protease neutra resultando em 75% de rendimento a partir da biomassa úmida de *S. obliquus*. A união hidrólise ácida e enzimática de forma consecutiva, apresentou grande capacidade de extração de proteínas, como proposto por Callejo-lópez et al. (2020), obtendo 81% de rendimento, abrindo um leque de possibilidades de aplicações conjuntas a fim de otimizar a obtenção de compostos.

7 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS

A extração é o processo posterior ao pré-tratamento, onde um ou mais componentes (sólido/líquido) são transferidos para uma fase líquida através de diferentes gradientes de solubilidade (MORAIS JUNIOR et al., 2020). Sistemas de solventes podem ser bastante eficientes na extração sequencial de compostos da *S. obliquus* o que pode refletir positivamente na diminuição do custo da produção, como mostrado por Ansari et al., (2017).

Uma das principais preocupações da extração por solventes, é o seu nível de toxicidade e o resíduo que pode estar no produto, e diante disso, alterações nos protocolos estão sendo realizadas como no estudo de Low et al. (2020), onde um novo método de extração de luteína de *Scenedesmus* sp. é proposto utilizando um sistema de solvente de fase binária assistido por microondas, obtendo rendimentos de até 11,92 mg/g do carotenóide. Como este, outros aprimoramentos podem ser aplicados para o gênero, como por exemplo, diminuição da mistura

dos solventes orgânicos metanol/clorofórmio, promovendo a extração eficiente de lipídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos da *S. obliquus*, tornando também o processo mais sustentável (VENDRUSCOLO et al. 2018). Seguindo o mesmo princípio, foi possível extrair altos teores de clorofilas e carotenóides de *Arthropira platisis* e *S. obliquus* utilizando uma extração exaustiva de clorofórmio seguido de etanol, demonstrando economia de solventes e tempo de extração. (VENDRUSCOLO et al., 2021).

A extração por fluídos supercríticos foi demonstrada de forma eficiente por Chronopoulou et al. (2019), resultando em altos rendimentos de vitaminas lipossolúveis e carotenóides de *S. obliquus* em comparação com métodos de extração sólido-líquido convencionais. Como apontam os autores, esse tipo de extração é considerado uma alternativa verde de alta eficiência já que se utiliza das propriedades únicas dos fluidos supercríticos como intermediários entre o estado líquido e sólido, possuindo características de ambos como a alta compressibilidade dos gases e a densidade de líquido, o que permite uma maior dissolução de compostos. Uma otimização da técnica para a *S. obliquus* consistiu no aumento da pressão, sob temperaturas de 40 e 60°C, o que favoreceu a extração de clorofilas e carotenóides, quando o sistema foi combinado com etanol 7,7% como co-solvente (GUEDES et al., 2013). Para frações lipídicas, a técnica foi bastante efetiva na extração de ácidos graxos como ômega-3 e α -linolênico, cujos rendimentos para *S. obliquus* superaram outras espécies como *Nannochloropsis salina* e a clorofícea *Chlorella protothecoides* (SOLANA et al., 2014).

Uma metodologia proposta por GILBERT-LÓPEZ et al. (2017) visou a extração e fracionamento de metabólitos de *S. obliquus* por meio de um processo sequencial utilizando solventes não tóxicos. No estudo, três etapas consecutivas, sendo elas: uma extração por fluido supercrítico usando CO₂ supercrítico (scCO₂), extração por líquidos expandidos a Gás (GLX- gas expanded liquid) e por fim, extração por líquido pressurizado (PLE- pressurized liquid extraction) resultaram em altos rendimentos de triglicerídeos na primeira etapa de extração, seguida de uma fração proveniente da GLX, onde a luteína e o β -caroteno eram os metabólitos prevalentes e na fração obtida pela PLE e no resíduo da extração, foram encontrados os maiores teores de proteínas e compostos polares como açúcares. Solventes verdes podem ser uma alternativa aos métodos convencionais, sendo ecologicamente mais viáveis, apresentando economia de tempo e energia, já que geralmente funcionam como um único sistema solvente para obtenção de compostos (JEEVAN KUMAR et al., 2017).

Uma técnica promissora que está sendo aperfeiçoada é a extração de ponto de nuvem, que se baseia em um sistema de separação de fases em soluções aquosas a partir de micelas formadas por surfactantes (YAZDI, 2011). Tais surfactantes são moléculas anfifílicas, com uma

cabeça polar e uma cauda apolar que em soluções aquosas tendem a formar agregados chamados micelas. Nesse tipo de extração, o composto de interesse é extraído para a fase rica em surfactantes, devendo posteriormente ser separada da fase aquosa e se necessário, diluída em um solvente não viscoso como acetronitrila para permitir uma maior eficiência na quantificação do metabólito por técnicas analíticas (YAZDI, 2011). No estudo de GLEMBIN et al. (2014) foi investigada a extração *in situ* de compostos hidrofóbicos da *S. obliquus* a partir do método de ponto de nuvem, obtendo rendimentos elevados de ácidos graxos em escala laboratorial e piloto, mostrando-se uma alternativa rápida e eficiente para extração por um processo único, já que se utiliza o próprio meio de cultura sem a necessidade de colheita e pré-tratamento da biomassa, um processo chamado extração *in situ*. (KLEINEGRIS et al., 2011).

Recentemente, RACHEVA et al. (2018) otimizaram o método de ponto de nuvem propondo uma extração contínua de compostos a partir do cultivo de *S. obliquus*, permitindo a reutilização da biomassa para a manutenção dos cultivos. Essa pesquisa foi pioneira na aplicação contínua da metodologia, mantendo a viabilidade das células e uma maior sustentabilidade do processo. Pesquisas são necessárias a fim de otimizar a extração e recuperação de metabólitos da *S. obliquus*, visando a união de características como a eficiência, sustentabilidade e escalabilidade, permitindo a produção industrial de moléculas de grande valor agregado.

8 TENDÊNCIAS NUTRACÊUTICAS DE *Scenedesmus obliquus*

Ao longo dos anos, as aplicações biotecnológicas das microalgas têm sido cada vez mais diversificadas, desde uso na medicina tradicional, extração de ácidos graxos para a produção de energia, extração compostos bioativos com aplicações nos variados setores industriais e principalmente, a produção de suplementos alimentares. Este último, destaca-se em especial graças ao alto teor proteico e presença de compostos que lhes conferem um carácter nutracêutico (NAGARAJAN et al., 2021).

Um estudo recente de Fuentes-Grünewald et al. (2021) propôs uma nova metodologia de duas fases (autotrófica e mixotrófica) baseada na economia circular, onde as espécies *C. vulgaris* e *S. obliquus* tiveram sua produtividade e parâmetros bioquímicos avaliados ao crescerem em um resíduo digerido anaerobicamente, analisando por fim, o potencial uso da biomassa na ração animal. Como resultados, a *S. obliquus* foi considerada um modelo para uso em escala industrial, podendo tratar aproximadamente 50 toneladas de digestado com uma

produção de biomassa de 60 ton/ano, com qualidade nutricional considerada adequada para a aplicação em rações.

Na aquicultura, as microalgas possuem um papel chave na alimentação dos primeiros estágios de vida de crustáceos e peixes em viveiros, podendo também ser aplicada à animais terrestres como suplemento da ração de bovinos (STILES et al., 2018). Devido ao seu alto teor proteico, o gênero *Scenedesmus* vem sendo cada vez mais utilizado na piscicultura, como por exemplo a *S. almeriensis* que não apresentou índices de toxicidade ou declínio anormal no padrão de crescimento de peixes como a truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) (TOMÁS-ALMENAR et al., 2018). No estudo de Patnaik et al., (2019) foi avaliado o crescimento de peixes quando submetidos à ração suplementada com *S. obliquus* provenientes de uma abordagem de biorrefinaria. Os resultados mostraram que a partir de 1 kg de biomassa úmida (pós extração de biocombustíveis) foram obtidos metabólitos de alto interesse alimentício como o β -caroteno (0,06g), proteínas (10g) e ômega-3 (2 g). Já a integração da biomassa e da fração proteica da microalga na ração animal, promoveu o maior crescimento dos animais, demonstrando a capacidade de aproveitamento integral da espécie para diferentes setores industriais.

Pigmentos como os carotenóides têm despertado um crescente interesse quanto a sua alta bioacessibilidade, ou seja, as sequências de processos digestivos que transforma o alimento (matriz) em produtos assimiláveis, tendo em vista os seus possíveis efeitos bioativos, benefícios fisiológicos e o interesse industrial como aditivos de alimentos (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009). Nesse sentido, Nascimento et al. (2021) foram os pioneiros na avaliação da bioacessibilidade da luteína e zeaxantina baseada um modelo *in vitro* utilizando células CaCO-2. Os resultados mostraram que a bioacessibilidade está intimamente ligada a natureza química do carotenóide, sendo a trans-cantaxantina (99,07%), a trans- α -caroteno (48,94%) e a trans- β -criptoxantina (31,08%) as formas mais bioacessíveis apesar das significativas variações entre compostos, tais estudos portanto, dão subsídio para futuras pesquisas na adição de tais pigmentos em alimentos funcionais.

Visando o aumento da bioacessibilidade, carotenóides livres de microalgas ou em extratos concentrados podem ser aplicados a uma matriz lipídica, demonstrado pelo estudo de Granado-Lorencio et al. (2009) onde uma cepa de *S. almeriensis* superprodutora de luteínas atingiu alto nível de micelarização no tratamento com o azeite de oliva, sendo resultados muito promissores para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Estudos neste âmbito também foram realizados com clorofilas extraídas de *S. obliquus* (FERNANDES et al., 2021), no qual extratos de clorofilas apresentaram altos níveis de bioacessibilidade na digestão *in vitro*, com

cinco tipos de clorofilas bioacessíveis, sendo uma escolha prudente para o desenvolvimento produtos de base biotecnológica.

Um alimento funcional suplementado com microcápsulas de *S. obliquus* foi desenvolvido HLAING et al. (2020), onde a biomassa utilizada foi submetida a um planejamento experimental a fim de elevar o teor de proteínas, carboidratos, ácidos graxos e produtividade de forma conjunta. O alimento teve uma boa aceitabilidade na análise sensorial, e graças ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados da cepa (63,43% p/p) e aminoácidos essenciais, o estudo obteve êxito na aplicação nutracêutica da microalga, exemplificando o potencial uso da *S. obliquus* na fortificação de alimentos.

Diante do potencial nutracêutico da microalga, Silva et al. (2020) realizaram um estudo importante quanto à eficácia e segurança na ingestão da biomassa de *S. obliquus* em um modelo *in vivo*. Na pesquisa, ratos foram submetidos a rações suplementadas com biomassa rica em proteínas em diferentes quantidades, apresentando uma alta atividade hipolipidêmica demonstrada pela diminuição dos níveis de triglicerídeos nos animais em até 70%, índice aterogênico em 80% e taxas de glicose sérica em 42% menores em comparação ao controle, resultando em uma significativa atividade hipoglicêmica. Em adição, vale ressaltar que os animais não apresentaram mudanças histológicas além dos padrões esperados, somado à boa digestão proteica observada no estudo. Por fim, os autores reforçam o enorme potencial da *S. obliquus* como um alimento funcional, dotada de compostos bioativos que podem ser aplicados no tratamento de disfunções metabólicas associadas a altos índices lipídemicos e a diabetes.

9 POTENCIAL MERCADOLÓGICO MICROALGAL E PRINCIPAIS DESAFIOS COMERCIAIS

Atualmente, a exploração industrial das microalgas é representada principalmente pelas clorófitas *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Dunaliella* sp. e pela cianobactéria *Arthrospira platensis*, visando a produção de múltiplos metabólitos com aplicações no setor alimentício, cosmético e farmacêutico (ARAÚJO et al., 2021). Porém, espécies como a *S. obliquus* são consideradas promissoras para a produção em larga escala devido suas características fisiológicas que lhe confere grande capacidade de adaptação e principalmente pela produção de compostos de amplo interesse industrial como pigmentos carotenóides, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas e polissacarídeos (AMORIM et al., 2021; CHAN et al., 2013; NADZIR et al., 2019).

Carotenóides como a luteína e o β -caroteno são produzidos em grandes quantidades pela *S. obliquus*, e possuem uma grande demanda comercial por serem compostos antioxidantes usados como aditivos de alimentos e na indústria farmacêutica (PATIAS et al., 2017). Além das propriedades nutraceuticas, o β -caroteno é amplamente aplicado em diversos setores industriais; na alimentação por exemplo, pode conferir a coloração vermelho-alaranjada a bebidas não alcóolicas, queijos e certos tipos de gorduras; na indústria farmacêutica, são utilizados como corantes de cápsulas de medicamentos, e possuem aplicações em cosméticos, apresentando grande potencial de proteção contra danos oxidativos ligados à exposição a luz UV (BOGACZ-RADOMSKA et al. 2018). Diante de uma demanda crescente, até 2024 estima-se que o mercado global de corantes alimentícios alcance 4,7 bilhões de dólares (AHUJA E RAWAT, 2018).

A espécie também é produtora de PUFA's do tipo ômega-3 e 6, que são reconhecidos pelas suas inúmeras atividades biológicas, desde controle da pressão arterial à prevenção de várias doenças neurológicas (PIASECKA et al., 2020a). Na indústria de alimentos, ômega-3 podem ser adicionados em formulações infantis, um setor que fatura anualmente 10 bilhões de dólares, estando associados ao melhor desenvolvimento pós-natal, desenvolvimento neuronal e ação imunomoduladora (ADARME-VEGA et al., 2012; RIVERA-PASQUEL et al., 2020). Além disso, o teor proteico da *S. obliquus* é de grande interesse para a indústria de ração animal e alimentação humana, seja na forma de biomassa seca ou hidrolisados proteicos ricos em aminoácidos essenciais (HLAING et al. 2020).

Os principais desafios que envolvem a aplicação comercial das microalgas são o alto custo de produção em larga escala, bem como aspectos ligados aos cultivos, como a eficiência energética adequada, alto custo do processamento para a obtenção de moléculas de interesse comercial e fatores relacionados a regulamentação dos produtos derivados de microalgas (FU et al., 2021).

Em relação à produção, uma alternativa de baixo custo e cada vez mais difundida é a utilização de águas residuais de empresas de alimentos, sendo uma opção promissora para o desenvolvimento de microalgas em condições mixotróficas, favorecendo a diminuição do custo final da biomassa (KEDDAR et al., 2020). O estudo de Gouveia et al., (2016) demonstrou a eficiência do cultivo de *S. obliquus* em águas residuais urbanas, com um custo de produção estimado em 2,4 € / kg, resultados que apesar promissores, demandam estudos a fim de otimizar a produtividade e diminuir os custos a fim de alcançar o valor ideal para tratamento de águas residuais de 0,5 € / kg. Já para o processamento da biomassa, alguns métodos de pré-tratamento demonstram fácil escalabilidade como o micro-ondas e a hidrólise ácida (FERREIRA et al.,

2016; ROJO et al., 2021) permitindo um processamento com custos reduzidos, sendo necessários estudos acerca dos métodos de extração e o uso de solventes de baixa toxicidade, a fim de tornar o processo sustentável, mais eficiente e economicamente viável (AMARO et al., 2015).

A biotecnologia de microalgas está em constante evolução visando o desenvolvimento de processos otimizados de produção de compostos de interesse industrial, como PUFA's e proteínas por meio de técnicas como o melhoramento genético das cepas, modificações de cultivo com diferentes condições de estresse, desenvolvimento de novos sistemas de cultivo, melhor utilização do fluxo de carbono e outras modificações que podem permitir a maior viabilidade da produção microalgal, aumentando a competitividade de seus produtos principalmente no mercado nutracêutico (KUSMAYADI et al., 2021).

A segurança alimentar é uma das maiores preocupações em relação ao consumo de microalgas, já que aspectos como a presença de metais pesados e contaminações por espécies produtoras de toxinas podem culminar em problemas de saúde, e consequentemente, a comercialização dos produtos, cabendo a agências de segurança, estabelecer limites aceitáveis e as formas adequadas para o consumo de microalgas (MEHARIYA et al., 2021). A regulamentação do uso de alimentos varia entre os países, sendo essencial identificar os produtos aplicáveis em cada mercado, o que influencia diretamente a produção e o alvo comercial (LAAMANEN et al., 2021). Além disso, a maioria das legislações a respeito do consumo de microalgas envolve principalmente a *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) e a *Chlorella vulgaris*, com pouca ou nenhuma informação a respeito de outras espécies como *Scenedesmus* spp. (MATOS, 2017). Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) é o órgão responsável pela segurança dos alimentos e considera as espécies *Arthrospira* spp., *Chlorella* spp., *Haematococcus* spp., *Dunaliella* spp., *Schizochytrium* spp., *Cryptocodinium cohnii* e *Porphyridium cruentum* incluídas na categoria GRAS (Generally Recognized as Safe), a qual as reconhece como fontes dietéticas seguras para o consumo humano e animal (GARCÍA et al., 2017). Já no Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) juntamente com o Ministério da Saúde publicou a Instrução Normativa nº28, de junho/2018 que autoriza o consumo seguro da *Arthrospira platensis*, sendo um marco do uso de microalgas para fim alimentício no país, já que além de viabilizar a comercialização, pode estimular a utilização de outras espécies de interesse industrial (ANVISA, 2018). Considerando os resultados de testes *in vitro* e *in vivo* envolvendo a *S. obliquus*, observa-se dados promissores a respeito de sua segurança alimentar, e somada a sua notável qualidade nutricional, efeitos hipolipolipidêmicos e hipoglicêmicos observados

sugerem sua possível utilização como alimento funcional (MARREZ et al., 2019; SILVA et al., 2020).

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O mercado alimentício de microalgas é um setor rentável e que apresenta uma crescente demanda comercial tendo em vista os benefícios à saúde relacionados ao seu consumo. O estudo demonstrou a notável capacidade de acúmulo de moléculas bioativas de grande interesse industrial da *S. obliquus*, apesar de não obter a mesma representatividade comercial quando comparada a clorófitas como a *Haematococcus pluvialis* e a *Dunaliella salina*. De modo geral, cultivos de microalgas enfrentam desafios relacionados à produção em larga escala, envolvendo altos custos de produção em condições controladas, um processamento ainda ineficiente, e no caso da *S. obliquus*, a legislação para cada país tem sido um fator limitante para sua ampla exploração. Como perspectivas, estudos com modos de cultivo alternativos e economicamente viáveis têm demonstrado resultados promissores para a espécie, demandando melhores investigações sobre o processamento da biomassa, de modo a maximizar a extração de compostos com o menor tempo e custo possível. Além disso, análises adicionais sobre sua toxicidade e segurança alimentar, são de vital importância para o desenvolvimento de legislações a respeito do uso comercial da microalga.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento da pesquisa, ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ/UFPE) e ao Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI/UFRPE) pelos subsídios que permitiram a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABIMBOLA, T.; CHRISTODOULATOS, C.; LAWAL, A. Performance and optimization studies of oil extraction from *Nannochloropsis* spp. and *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 311, p. 127295, 2021.
- ABURAI, N.; OHKUBO, S.; MIYASHITA, H.; ABE, K. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. **Algal Research**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 237–243, 2013.
- ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2012.

AMARO, H. M.; FERNANDES, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SOUSA-PINTO, I.; MALCATA, F. X.; GUEDES, A. C. Effect of solvent system on extractability of lipidic components of *Scenedesmus obliquus* (M2-1) and *Gloeotheca* sp. on antioxidant scavenging capacity thereof. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 6453–6471, 2015.

AMORIM, M. L.; SOARES, J.; VIEIRA, B. B.; LEITE, M. de O.; ROCHA, D. N.; ALEIXO, P. E.; FALCONÍ, J. H. H.; XAVIER JÚNIOR, M. de L.; ALBINO, L. F. T.; MARTINS, M. A. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 270, p. 118775, 2021. a.

AMORIM, M. L.; SOARES, J.; VIEIRA, B. B.; LEITE, M. de O.; ROCHA, D. N.; ALEIXO, P. E.; FALCONÍ, J. H. H.; XAVIER JÚNIOR, M. de L.; ALBINO, L. F. T.; MARTINS, M. A. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 270, p. 118775, 2021. b.

ANAND, V.; KASHYAP, M.; SAMADHIYA, K.; GHOSH, A.; KIRAN, B. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger? **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 127, p. 105252, 2019.

ANSARI, F. A.; GUPTA, S. K.; NASR, M.; RAWAT, I.; BUX, F. Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 182, p. 634–643, 2018.

ANSARI, F. A.; GUPTA, S. K.; SHRIWASTAV, A.; GULDHE, A.; RAWAT, I.; BUX, F. Evaluation of various solvent systems for lipid extraction from wet microalgal biomass and its effects on primary metabolites of lipid-extracted biomass. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 18, p. 15299–15307, 2017.

ARAÚJO, R.; VÁZQUEZ CALDERÓN, F.; SÁNCHEZ LÓPEZ, J.; AZEVEDO, I. C.; BRUHN, A.; FLUCH, S.; GARCIA TASENDE, M.; GHADERIARDAKANI, F.; ILMJÄRV, T.; LAURANS, M.; MAC MONAGAIL, M.; MANGINI, S.; PETEIRO, C.; REBOURS, C.; STEFANSSON, T.; ULLMANN, J. Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 7, n. January, p. 1–24, 2021.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria Colegiada** – IN Nº 28, DE 26 DE JULHO DE 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/asset_publisher/kujrw0tzc2mb/content/id/34380639/do1-2018-07-27-instrucao-normativa-in-n-28-de-26-de-julho-de-2018-34380550. Acessado em: 28/11/2021

BANSKOTA, A. H.; SPERKER, S.; STEFANOVA, R.; MCGINN, P. J.; O’LEARY, S. J. B. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. **Journal of Applied Phycology** 2018 31:1, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 309–318, 2018.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? **Algal Research**, [s. l.], v. 31, p. 107–115, 2018.

- BASU, S.; ROY, A. S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A. K. Enhanced CO₂ sequestration by a novel microalga: *Scenedesmus obliquus* SA1 isolated from bio-diversity hotspot region of Assam, India. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 369–377, 2013.
- BENTAHAR, J.; DOYEN, A.; BEAULIEU, L.; DESCHÊNES, J.-S. Investigation of β -galactosidase production by microalga *Tetradesmus obliquus* in determined growth conditions. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 301–308, 2018.
- BERNAERTS, T. M. M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. M. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 107419, 2019.
- BHATTACHARYA, M.; GOSWAMI, S. Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 25, p. 101580, 2020.
- BLACK, H. S.; BOEHM, F.; EDGE, R.; TRUSCOTT, T. G. The Benefits and Risks of Certain Dietary Carotenoids that Exhibit both Anti- and Pro-Oxidative Mechanisms—A Comprehensive Review. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2020.
- BOGACZ-RADOMSKA, L.; HARASYM, J. β -Carotene-properties and production methods. **Food Quality and Safety**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 69–74, 2018.
- BRASIL, B. dos S. A. F.; DE SIQUEIRA, F. G.; SALUM, T. F. C.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, p. 76–89, 2017.
- BREUER, G.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 1–9, 2013.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 85–112, 1998.
- CALLEJO-LÓPEZ, J. A.; RAMÍREZ, M.; CANTERO, D.; BOLÍVAR, J. Versatile method to obtain protein- and/or amino acid-enriched extracts from fresh biomass of recalcitrant microalgae without mechanical pretreatment. **Algal Research**, [s. l.], v. 50, p. 102010, 2020.
- CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 6, 2019.
- CAPORGNO, M. P.; MATHYS, A. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 5, p. 58, 2018.
- ÇELEKLI, A.; BALCI, M. The influence of different phosphate and nitrate concentrations on growth, protein and chlorophyll a content of *Scenedesmus obliquus*. **Fresenius Environmental Bulletin**, [s. l.], v. 18, p. 1363–1366, 2009.

CHAN, M. C.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHEN, C. Y.; HUANG, C. C.; CHANG, J. S. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 78, p. 24–31, 2013.

CHEN, C.-Y.; KAO, A.-L.; TSAI, Z.-C.; SHEN, Y.-M.; KAO, P.-H.; NG, I.-S.; CHANG, J.-S. Expression of synthetic phytoene synthase gene to enhance β -carotene production in *Scenedesmus* sp. CPC2. **Biotechnology Journal**, 2017.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, , v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

CHEN, W. C.; HSU, Y. C.; CHANG, J. S.; HO, S. H.; WANG, L. F.; WEI, Y. H. Enhancing production of lutein by a mixotrophic cultivation system using microalga *Scenedesmus obliquus* CWL-1. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 291, p. 121891, 2019.

CHOI, Y. K.; KUMARAN, R. S.; JEON, H. J.; SONG, H. J.; YANG, Y. H.; LEE, S. H.; SONG, K. G.; KIM, K. J.; SINGH, V.; KIM, H. J. LED light stress induced biomass and fatty acid production in microalgal biosystem, *Acutodesmus obliquus*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 145, p. 245–253, 2015.

CHRONOPOULOU, L.; DAL BOSCO, C.; DI CAPRIO, F.; PROSINI, L.; GENTILI, A.; PAGNANELLI, F.; PALOCCI, C. Extraction of carotenoids and fat-soluble vitamins from *Tetradasmus obliquus* microalgae: An optimized approach by using supercritical CO₂. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 14, 2019.

COLUSSI, G.; CATENA, C.; NOVELLO, M.; BERTIN, N.; SECHI, L. A. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 191–200, 2017.

DAMIANI, M. C.; POPOVICH, C. A.; CONSTENLA, D.; MARTÍNEZ, A. M.; DORIA, E.; LONGONI, P.; CELLA, R.; NIELSEN, E.; LEONARDI, P. I. Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 1423–1430, 2014.

DE CARVALHO CARNEIRO, D.; MASCARENHAS OLIVEIRA, M.; DA CUNHA LIMA, S. T. Estimating protein quantities from microalgae: protein per biomass percentage, spectroscopic concentration, and lectin content. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 2535–2540, 2019.

DE FARIAS SILVA, C. E.; SFORZA, E.; BERTUCCO, A. Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation: effect of irradiation regime and intensity on *Tetradasmus obliquus*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 261–270, 2018.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1159–1179, 2016.

DO NASCIMENTO, T. C.; PINHEIRO, P. N.; FERNANDES, A. S.; MURADOR, D. C.; NEVES, B. V.; DE MENEZES, C. R.; DE ROSSO, V. V.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Bioaccessibility and intestinal uptake of carotenoids from microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Food Research International**, [s. l.], v. 140, 2021.

DONG, T.; KNOSHAUG, E. P.; PIENKOS, P. T.; LAURENS, L. M. L. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, [s. l.], v. 177, p. 879–895, 2016.

ELDALATONY, M. M.; KABRA, A. N.; HWANG, J. H.; GOVINDWAR, S. P.; KIM, K. H.; KIM, H.; JEON, B. H. Pretreatment of microalgal biomass for enhanced recovery/extraction of reducing sugars and proteins. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 95–103, 2016.

ESAKKIMUTHU, S.; KRISHNAMURTHY, V.; WANG, S.; EL-FATAH ABOMOHR, A.; SHANMUGAM, S.; RAMAKRISHNAN, S. G.; SUBRMANIAM, S.; K, S. Simultaneous induction of biomass and lipid production in *Tetradesmus obliquus* BPL16 through polysorbate supplementation. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 140, p. 807–815, 2019.

FAN, H.; WANG, K.; WANG, C.; YU, F.; HE, X.; MA, J.; LI, X. A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes. **Environmental Technology and Innovation**, [s. l.], v. 19, 2020.

FERNANDES, A. S.; NASCIMENTO, T. C.; PINHEIRO, P. N.; DE ROSSO, V. V.; DE MENEZES, C. R.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Insights on the intestinal absorption of chlorophyll series from microalgae. **Food Research International**, [s. l.], v. 140, p. 110031, 2021.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 751–760, 2009.

FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 27–40, 2010.

FERREIRA, A. F.; DIAS, A. P. S.; SILVA, C. M.; COSTA, M. Effect of low frequency ultrasound on microalgae solvent extraction: Analysis of products, energy consumption and emissions. **Algal Research**, [s. l.], v. 14, p. 9–16, 2016.

FERRIGO, D.; GALLA, G.; SFORZA, E.; MOROSINOTTO, T.; BARCACCIA, G.; CESCHI BERRINI, C. Biochemical characterization and genetic identity of an oil-rich *Acutodesmus obliquus* isolate. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 149–161, 2015.

FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–12, 2007.

FU, Y.; CHEN, T.; CHEN, S. H. Y.; LIU, B.; SUN, P.; SUN, H.; CHEN, F. The potentials and challenges of using microalgae as an ingredient to produce meat analogues. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 112, n. February, p. 188–200, 2021.

FUENTES-GRÜNEWALD, C.; IGNACIO GAYO-PELÁEZ, J.; NDOVELA, V.; WOOD, E.; VIJAY KAPOORE, R.; ANNE LLEWELLYN, C. Towards a circular economy: A novel microalgal two-step growth approach to treat excess nutrients from digestate and to produce biomass for animal feed. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 320, p. 124349, 2021.

GARCÍA, J. L.; DE VICENTE, M.; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1017, 2017.

GEADA, P.; MOREIRA, C.; SILVA, M.; NUNES, R.; MADUREIRA, L.; ROCHA, C. M. R.; PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 332, p. 125125, 2021.

GEÖCZE, K. C.; BARBOSA, L. C. A.; LIMA, C. F.; FERRUZZI, M. G.; FIDÊNCIO, P. H.; SANT'ANA, H. M. P.; SILVÉRIO, F. O. Caryocar brasiliense Camb. fruits from the Brazilian Cerrado as a rich source of carotenoids with pro-vitamin A activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 101, p. 103943, 2021.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, [s. l.], v. 17, p. 259–275, 2004.

GILBERT-LÓPEZ, B.; MENDIOLA, J. A.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; HOUWELING-TAN, B.; SIJTSMA, L.; CIFUENTES, A.; HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E. Green compressed fluid technologies for downstream processing of *Scenedesmus obliquus* in a biorefinery approach. **Algal Research**, [s. l.], v. 24, p. 111–121, 2017.

GLEMBIN, P.; RACHEVA, R.; KERNER, M.; SMIRNOVA, I. Micelle mediated extraction of fatty acids from microalgae cultures: Implementation for outdoor cultivation. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 135, p. 127–134, 2014.

GONG, Y.; HUANG, J. Characterization of four untapped microalgae for the production of lipids and carotenoids. **Algal Research**, [s. l.], v. 49, p. 101897, 2020.

GORAIN, P.; BAGCHI, S.; MALLICK, N. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. **Environmental technology**, [s. l.], v. 34, n. 13–16, p. 1887–1894, 2013.

GOUVEIA, L.; GRAÇA, S.; SOUSA, C.; AMBROSANO, L.; RIBEIRO, B.; BOTREL, E. P.; NETO, P. C.; FERREIRA, A. F.; SILVA, C. M. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs: Scale-up considerations. **Algal Research**, [s. l.], v. 16, p. 167–176, 2016.

GRANADO-LORENCIO, F.; HERRERO-BARBUDO, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, G.; MOLINA-GRIMA, E.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.;

BLANCO-NAVARRO, I. In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 747–752, 2009.

GRIS, B.; MOROSINOTTO, T.; GIACOMETTI, G. M.; BERTUCCO, A.; SFORZA, E. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: Effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 172, n. 5, p. 2377–2389, 2014.

GUEDES, A. C.; GIÃO, M. S.; MATIAS, A. A.; NUNES, A. V. M.; PINTADO, M. E.; DUARTE, C. M. M.; MALCATA, F. X. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. **Journal of Food Engineering**, 2013.

GUO, W.; ZHU, S.; LI, S.; FENG, Y.; WU, H.; ZENG, M. Microalgae polysaccharides ameliorates obesity in association with modulation of lipid metabolism and gut microbiota in high-fat-diet fed C57BL/6 mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 182, p. 1371–1383, 2021.

HAMOUDA, R. A.; EL-NAGGAR, N. E. A.; ABOU-EL-SEOUD, G. W. Enhancement of pharmaceutical and bioactive components of *Scenedesmus obliquus* grown using different concentrations of KNO₃. **International Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 758–765, 2018.

HELAMIEH, M.; GEBHARDT, A.; REICH, M.; KUHN, F.; KERNER, M.; KÜMMERER, K. Growth and fatty acid composition of *Acutodesmus obliquus* under different light spectra and temperatures. **Lipids**, [s. l.], p. lipd.12316, 2021.

HEMANTKUMAR, J. N.; RAHIMBHAI, M. I. Microalgae and Its Use in Nutraceuticals and Food Supplements. In: *Microalgae - From Physiology to Application*. [s.l.] : **IntechOpen**, p. 1–11, 2019.

HENCHION, M.; HAYES, M.; MULLEN, A. M.; FENELON, M.; TIWARI, B. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. **Foods**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1–21, 2017.

HLAING, S. A. A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 1090–1099, 2020.

HO, S. H.; CHAN, M. C.; LIU, C. C.; CHEN, C. Y.; LEE, W. L.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 152, p. 275–282, 2014.

HO, S. H.; CHEN, Y. Di; CHANG, C. Y.; LAI, Y. Y.; CHEN, C. Y.; KONDO, A.; REN, N. Q.; CHANG, J. S. Feasibility of CO₂ mitigation and carbohydrate production by microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation under outdoor conditions: Effects of seasonal changes. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2017.

HO, S. H.; XIE, Y.; CHAN, M. C.; LIU, C. C.; CHEN, C. Y.; LEE, D. J.; HUANG, C. C.; CHANG, J. S. Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with *Scenedesmus obliquus* FSP-3. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 184, p. 131–138, 2015.

HUANG, G. H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 38–46, 2010.

HUSSAIN, J.; WANG, X.; SOUSA, L.; ALI, R.; RITTMANN, B. E.; LIAO, W. Using non-metric multi-dimensional scaling analysis and multi-objective optimization to evaluate green algae for production of proteins, carbohydrates, lipids, and simultaneously fix carbon dioxide. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 141, 2020.

IBRAHIM, M. R.; HAMOUDA, R. A.; TAYEL, A. A.; AL-SAMAN, M. A. Anti-cholesterol and Antioxidant Activities of Independent and Combined Microalgae Aqueous Extracts In Vitro. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], 2021.

ISHAQ, A. G.; MATIAS-PERALTA, H. M.; BASRI, H. Bioactive Compounds from Green Microalga *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 1–16, 2016.

JAREONSIN, S.; PUMAS, C. Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, n. February, 2021.

JEEVAN KUMAR, S. P.; VIJAY KUMAR, G.; DASH, A.; SCHOLZ, P.; BANERJEE, R. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. **Algal Research**, [s. l.], v. 21, p. 138–147, 2017.

JI, X.; CHENG, J.; GONG, D.; ZHAO, X.; QI, Y.; SU, Y.; MA, W. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 633, p. 593–599, 2018.

KALRA, E. K. Nutraceutical--definition and introduction. **American Association Pharmaceutical Scientists**, [s. l.], v. 5, n. 3, 2003.

KATIYAR, R.; ARORA, A. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. **Algal Research**, [s. l.], v. 46, p. 101800, 2020.

KEDDAR, M. N.; BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; AMIALI, M.; SILES, J. A.; ZERROUKI, D.; MARTÍN, M. A.; RUBIO, S. Efficient extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from microalgae with supramolecular solvents. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 251, p. 117327, 2020.

KIM, D. Y.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J. I.; LEE, K.; PARK, J. Y.; CHANG, W. S.; LEE, J. S.; OH, Y. K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 300–310, 2016.

KIM, J.; YOO, G.; LEE, H.; LIM, J.; KIM, K.; KIM, C. W.; PARK, M. S.; YANG, J. W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 862–876, 2013.

KLEINEGRIS, D. M. M.; JANSSEN, M.; BRANDENBURG, W. A.; WIJFFELS, R. H. Two-phase systems: Potential for in situ extraction of microalgal products. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 502–507, 2011.

KOYANDE, A. K.; CHEW, K. W.; RAMBABU, K.; TAO, Y.; CHU, D. T.; SHOW, P. L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 16–24, 2019.

KRATZER, R.; MURKOVIC, M. Food ingredients and nutraceuticals from microalgae: Main product classes and biotechnological production. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2021.

KUSMAYADI, A.; LEONG, Y. K.; YEN, H. W.; HUANG, C. Y.; CHANG, J. S. Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. **Chemosphere**, [s. l.], v. 271, p. 129800, 2021.

LAAMANEN, C. A.; DESJARDINS, S. M.; SENHORINHO, G. N. A.; SCOTT, J. A. Harvesting microalgae for health beneficial dietary supplements. **Algal Research**, [s. l.], v. 54, p. 102189, 2021.

LACROUX, J.; TRABLY, E.; BERNET, N.; STEYER, J. P.; VAN LIS, R. Mixotrophic growth of microalgae on volatile fatty acids is determined by their undissociated form. **Algal Research**, [s. l.], v. 47, p. 101870, 2020.

LAI, Y. S.; FRANCESCO, F. De; AGUINAGA, A.; PARAMESWARAN, P.; RITTMANN, B. E. Improving lipid recovery from *Scenedesmus* wet biomass by surfactant-assisted disruption. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 1319–1326, 2016.

LEE, S. Y.; CHO, J. M.; CHANG, Y. K.; OH, Y. K. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 244, p. 1317–1328, 2017.

LEÓN-SAIKI, G. M.; REMMERS, I. M.; MARTENS, D. E.; LAMERS, P. P.; WIJFFELS, R. H.; VAN DER VEEN, D. The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus*. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, p. 160–167, 2017.

LOW, K. L.; IDRIS, A.; MOHD YUSOF, N. Novel protocol optimized for microalgae lutein used as food additives. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 307, p. 125631, 2020.

LOWREY, J.; BROOKS, M. S.; MCGINN, P. J. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1485–1498, 2014.

MAIA, J. L. Da; CARDOSO, J. S.; MASTRANTONIO, D. J. da S.; BIERHALS, C. K.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. De. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 165, p. 2739–2749, 2020.

MANAYI, A.; ABDOLLAHI, M.; RAMAN, T.; FAZEL NABAVI, S.; HABTEMARIAM, S.; DAGLIA, M.; MOHAMMAD NABAVI, S. Lutein and cataract: from bench to bedside. **Critical Reviews in Biotechnology** [s. l.], 2015.

MANSOURI, H.; EBRAHIM NEZHAD, S. Improvement in biochemical parameters and changes in lipid profile of *Scenedesmus obliquus* by plant growth regulators under mixotrophic condition. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 140, p. 105708, 2020.

MANSOURI, H.; HAJIZADEH, F. Interaction Effects of Salinity, High Light Intensity and Acetate on Growth and Pigment Production on *Scenedesmus obliquus*. **Iranian Journal of Science and Technology**, Transaction A: Science, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 1821–1826, 2018.

MARREZ, D. A.; NAGUIB, M. M.; SULTAN, Y. Y.; HIGAZY, A. M. Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e01404, 2019.

MARTÍNEZ-FRANCÉS, E.; ESCUDERO-OÑATE, C. Cyanobacteria and Microalgae in the Production of Valuable Bioactive Compounds Provisional chapter Cyanobacteria and Microalgae in the Production of Valuable Bioactive Compounds. [s. l.], 2016.

MATOS, Â. P. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 94, n. 11, p. 1333–1350, 2017.

MD NADZIR, S.; YUSOF, N.; NORDIN, N.; ABDULLAH, H.; KAMARI, A. Optimisation of carbohydrate, lipid and biomass productivity in *Tetrademus obliquus* using response surface methodology. **Biofuels**, [s. l.], 2019.

MEHARIYA, S.; GOSWAMI, R. K.; KARTHIKEYSAN, O. P.; VERMA, P. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. **Chemosphere**, [s. l.], v. 280, p. 130553, 2021.

MIRANDA, J.; PASSARINHO, P.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 555–564, 2012.

MISHRA, A.; MEDHI, K.; MALAVIYA, P.; THAKUR, I. S. Omics approaches for microalgal applications: Prospects and challenges. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 291, p. 121890, 2019.

MITRA, S.; RAUF, A.; TAREQ, A. M.; JAHAN, S.; EMRAN, T. Bin; SHAHRIAR, T. G.; DHAMA, K.; ALHUMAYDHI, F. A.; ALJOHANI, A. S. M.; REBEZOV, M.; UDDIN, M. S.; JEANDET, P.; SHAH, Z. A.; SHARIATI, M. A.; RENGASAMY, K. R. Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 154, p. 112328, 2021.

MM, M.; LQ, Z.; EJ, L.; A, P.-G.; M, R. Chlorophyll Oxidative Metabolism During the Phototrophic and Heterotrophic Growth of *Scenedesmus obliquus*. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), [s. l.], v. 8, n. 12, 2019.

MOHAJERI, M. H.; TROESCH, B.; WEBER, P. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. **Nutrition**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 261–275, 2015.

MONTONE, C. M.; CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; LA BARBERA, G.; PIOVESANA, S.; ZENEZINI CHIOZZI, R.; LAGANÀ, A. Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 410, n. 15, p. 3573–3586, 2018.

MORAIS JUNIOR, W. G.; GORGICH, M.; CORRÊA, P. S.; MARTINS, A. A.; MATA, T. M.; CAETANO, N. S. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, [s. l.], v. 528, p. 735562, 2020.

NAGARAJAN, D.; VARJANI, S.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae – Nutritive value and techno-functional components. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 150, p. 111549, 2021.

NICOLETTI, M. Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s. l.], v. 63, n. SUPPL. 1, p. 2–6, 2012.

OLIVEIRA, C. Y. B. De; ALMEIDA, A. J. G. da S.; SILVA, M. D. V. e; SANTOS, I. de L.; DANTAS, D. M. D. M. Prospecting the First Culture Collection of Algae of the Pernambuco Semiarid, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 27, 2019.

ONUMAEGBU, C.; MOONEY, J.; ALASWAD, A.; OLABI, A. G. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 93, p. 16–26, 2018.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **World population prospects 2019**
<https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/> (2019), Acesso 1 Sep. 2021

OSMAN, M. E. H.; EL-NAGGAR, A. H.; EL-SHEEKH, M. M.; EL-MAZALLY, E. E. Differential effects of Co²⁺ and Ni²⁺ on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 169–178, 2004.

OTHMAN, F. S.; JAMALUDDIN, H.; IBRAHIM, Z.; HARA, H.; YAHYA, N. A.; IWAMOTO, K.; MOHAMAD, S. E. Production of α -linolenic Acid by an Oleaginous Green Algae *Acutodesmus obliquus* Isolated from Malaysia. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1297–1306, 2019.

PALIWAL, C.; MITRA, M.; BHAYANI, K.; BHARADWAJ, S. V. V.; GHOSH, T.; DUBEY, S.; MISHRA, S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 244, p. 1216–1226, 2017.

PANDEY, A.; GUPTA, A.; SUNNY, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, S. Multi-objective optimization of media components for improved algae biomass, fatty acid and starch biosynthesis from *Scenedesmus* sp. ASK22 using desirability function approach. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 150, p. 476–486, 2020.

PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 15, p. 13437–13451, 2017.

PATIAS, L. D.; FERNANDES, A. S.; PETRY, F. C.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. **Food Research International**, [s. l.], v. 100, p. 260–266, 2017.

PATNAIK, R.; MALLICK, N. Individual and combined supplementation of carbon sources for growth augmentation and enrichment of lipids in the green microalga *Tetradismus obliquus*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 205–219, 2019.

PATNAIK, R.; SINGH, N.; BAGCHI, S.; RAO, P.; MALLICK, N. Utilization of *Scenedesmus obliquus* Protein as a Replacement of the Commercially Available Fish Meal Under an Algal Refinery Approach. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019

PATWAL, T.; BARANWAL, M. *Scenedesmus acutus* extracellular polysaccharides produced under increased concentration of sulphur and phosphorus exhibited enhanced proliferation of peripheral blood mononuclear cells. **3 Biotech**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 171, 2021.

PIASECKA, A.; NAWROCKA, A.; WIĄCEK, D.; KRZEMIŃSKA, I. Agro-industrial by-product in photoheterotrophic and mixotrophic culture of *Tetradismus obliquus*: Production of $\omega 3$ and $\omega 6$ essential fatty acids with biotechnological importance. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

PIOTROWSKA-NICZYPORUK, A.; BAJGUZ, A.; TALAREK, M.; BRALSKA, M.; ZAMBRZYCKA, E. The effect of lead on the growth, content of primary metabolites, and antioxidant response of green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 19112–19123, 2015.

POURKARIMI, S.; HALLAJISANI, A.; NOURALISHAHI, A.; ALIZADEHDAKHEL, A.; GOLZARY, A. Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 29, p. 101771, 2020.
PŘIBYL, P.; PILNÝ, J.; CEPÁK, V.; KAŠTÁNEK, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, [s. l.], v. 16, p. 69–75, 2016.

RACHEVA, R.; TIETGENS, N.; KERNER, M.; SMIRNOVA, I. In situ continuous countercurrent cloud point extraction of microalgae cultures. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 190, p. 268–277, 2018.

RAJABI ISLAMI, H.; ASSAREH, R. Effect of different iron concentrations on growth, lipid accumulation, and fatty acid profile for biodiesel production from *Tetradismus obliquus*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 3421–3432, 2019.

RAMÍREZ-RODRIGUES, M. M.; ESTRADA-BERISTAIN, C.; METRI-OJEDA, J.; PÉREZ-ALVA, A.; BAIGTS-ALLENDE, D. K. *Spirulina platensis* protein as sustainable

ingredient for nutritional food products development. **Sustainability (Switzerland)**, [s. l.], v. 13, n. 12, 2021.

RAMOS-ROMERO, S.; TORRELLA, J. R.; PAGÈS, T.; VISCOR, G.; TORRES, J. L. Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in the Prevention and Treatment of Metabolic Alterations. **Nutrients** 2021, Vol. 13, Page 563, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 563, 2021.

RANADHEER, P.; KONA, R.; SREEHARSHA, R. V.; VENKATA MOHAN, S. Non-lethal nitrate supplementation enhances photosystem II efficiency in mixotrophic microalgae towards the synthesis of proteins and lipids. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 283, p. 373–377, 2019.

REMIZE, M.; BRUNEL, Y.; SILVA, J. L.; BERTHON, J. Y.; FILAIRE, E. Microalgae n-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries. **Marine drugs**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 1–29, 2021.

RENUKA, N.; GULDHE, A.; SINGH, P.; ANSARI, F. A.; RAWAT, I.; BUX, F. Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. **Energy Conversion and Management**, [s. l.], v. 140, p. 14–23, 2017.

RENUKA, N.; GULDHE, A.; SINGH, P.; BUX, F. Combined effect of exogenous phytohormones on biomass and lipid production in *Acutodesmus obliquus* under nitrogen limitation. **Energy Conversion and Management**, [s. l.], v. 168, p. 522–528, 2018.

RITALA, A.; HÄKKINEN, S. T.; TOIVARI, M.; WIEBE, M. G. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, 2017.

RIVERA-PASQUEL, M.; FLORES-ALDANA, M.; PARRA-CABRERA, M.; DAVID, A.; GARC, A.; MALDONADO-HERN. Effect of Milk-Based Infant Formula Fortified with PUFAs on Lipid Profile, Growth and Micronutrient Status of Young Children: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. **Nutrients**, [s. l.], 2020.

ROCHA, D. N.; MARTINS, M. A.; SOARES, J.; VAZ, M. G. M. V.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; COVELL, L.; MENDES, L. B. B. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 289, p. 121644, 2019.

ROJO, E. M.; PIEDRA, I.; GONZÁLEZ, A. M.; VEGA, M.; BOLADO, S. Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 335, p. 125256, 2021.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 657–674, 2019.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S.; DAGLIA, M.; RENGASAMY, K. R. Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 157, p. 104830, 2020.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, [s. l.], v. 76, p. 735–750, 2015.

SALAMA, E. S.; KABRA, A. N.; JI, M. K.; KIM, J. R.; MIN, B.; JEON, B. H. Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 172, p. 97–103, 2014.

SALAMA, E. S.; KIM, H. C.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; JI, M. K.; OH, Y. K.; KIM, S. H.; JEON, B. H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 827–833, 2013.

SALLEHUDIN, N. J.; RAUS, *; MUSTAPA, M.; OTHMAN, R.; MEL. Screening of lutein content in several fresh-water microalgae. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 2307–2312, 2018.

SANTIGOSA, E.; BRAMBILLA, F.; MILANESE, L. Microalgae Oil as an Effective Alternative Source of EPA and DHA for *Gilthead Seabream* (*Sparus aurata*) **Aquaculture. Animals** : an Open Access Journal from MDPI, [s. l.], v. 11, n. 4, 2021.

SCHEER, H. Chapter 1 An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. [s. l.], p. 1–26, 2006.

SCHULZE, C.; STREHLE, A.; MERDIVAN, S.; MUNDT, S. Carbohydrates in microalgae: Comparative determination by TLC, LC-MS without derivatization, and the photometric thymol-sulfuric acid method. *Algal Research*, [s. l.], v. 25, p. 372–380, 2017.

SCHULZE, C.; WETZEL, M.; REINHARDT, J.; SCHMIDT, M.; FELTEN, L.; MUNDT, S. Screening of microalgae for primary metabolites including β -glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β -glucan production. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 2719–2725, 2016.

SHAO, Y.; FANG, H.; ZHOU, H.; WANG, Q.; ZHU, Y.; HE, Y. Detection and imaging of lipids of *Scenedesmus obliquus* based on confocal Raman microspectroscopy. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2017.

SHEN, X. F.; GAO, L. J.; ZHOU, S. B.; HUANG, J. Le; WU, C. Z.; QIN, Q. W.; ZENG, R. J. High fatty acid productivity from *Scenedesmus obliquus* in heterotrophic cultivation with glucose and soybean processing wastewater via nitrogen and phosphorus regulation. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 708, p. 134596, 2020.

SILVA, A. J.; CAVALCANTI, V. L. R.; PORTO, A. L. F.; GAMA, W. A.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P.; BEZERRA, R. P. The green microalgae *Tetradasmus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 103–110, 2020. a.

SILVA, M. E. T. Da; CORREA, K. de P.; MARTINS, M. A.; DA MATTA, S. L. P.; MARTINO, H. S. D.; COIMBRA, J. S. dos R. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic

activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 65, p. 103711, 2020. b.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 26–34, 2011.

SINGH, N.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, V. S. Microalgal bio-refinery approach for utilization of *Tetradismus obliquus* biomass for biodiesel production. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 32, p. 760–763, 2020. a.

SINGH, N.; ROY, K.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, V. S. Investigations in ultrasonic enhancement of β -carotene production by isolated microalgal strain *Tetradismus obliquus* SGM19. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 58, p. 104697, 2019.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 92, p. 311–318, 2014.

SOÓS, V.; SHETTY, P.; MARÓTI, G.; INCZE, N.; BADICS, E.; BÁLINT, P.; ÖRDÖG, V.; BALÁZS, E. Biomolecule composition and draft genome of a novel, high-lipid producing Scenedesmaceae microalga. **Algal Research**, [s. l.], v. 54, p. 102181, 2021.

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

SOUYOUL, S. A.; SAUSSY, K. P.; LUPO, M. P. Nutraceuticals: A Review. **Dermatology and Therapy**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 5, 2018.

STILES, W. A. V.; STYLES, D.; CHAPMAN, S. P.; ESTEVES, S.; BYWATER, A.; MELVILLE, L.; SILKINA, A.; LUPATSCH, I.; FUENTES GRÜNEWALD, C.; LOVITT, R.; CHALONER, T.; BULL, A.; MORRIS, C.; LLEWELLYN, C. A. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 267, p. 732–742, 2018.

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 44, p. 107612, 2020.

SUPRAJA, K. V.; BUNUSHREE, B.; BALASUBRAMANIAN, P. Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 151, n. April, p. 112453, 2020.

SUWAL, S.; BENTAHAR, J.; MARCINIAK, A.; BEAULIEU, L.; DESCHÊNES, J. S.; DOYEN, A. Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetradismus obliquus*. **Algal Research**, [s. l.], v. 39, p. 101470, 2019.

CONDE, T. A.; NEVES, B. F.; COUTO, D.; MELO, T.; NEVES, B.; COSTA, M.; SILVA, J.; DOMINGUES, P.; DOMINGUES, M. R. Microalgae as Sustainable Bio-Factories of

Healthy Lipids: Evaluating Fatty Acid Content and Antioxidant Activity. **Marine drugs**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 357, 2021.

TANG, D. Y. Y.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; TAO, Y.; HO, S. H.; SHOW, P. L. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 304, p. 122997, 2020. a.

TANG, D. Y. Y.; YEW, G. Y.; KOYANDE, A. K.; CHEW, K. W.; VO, D.-V. N.; SHOW, P. L. Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1967–1985, 2020.

TOMÁS-ALMENAR, C.; LARRÁN, A. M.; DE MERCADO, E.; SANZ-CALVO, M. A.; HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. *Scenedesmus almeriensis* from an integrated system waste-nutrient, as sustainable protein source for feed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 497, p. 422–430, 2018.

TRIVEDI, J.; ATRAY, N.; AGRAWAL, D. Evaluating Cell Disruption Strategies for Aqueous Lipid Extraction from Oleaginous *Scenedesmus obliquus* at High Solid Loadings. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 122, n. 4, 2020.

VENDRUSCOLO, R. G.; FACCHI, M. M. X.; MARONEZE, M. M.; FAGUNDES, M. B.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; BARIN, J. S.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R. Polar and non-polar intracellular compounds from microalgae: Methods of simultaneous extraction, gas chromatography determination and comparative analysis. **Food Research International**, [s. l.], v. 109, p. 204–212, 2018.

VENDRUSCOLO, R. G.; FAGUNDES, M. B.; MARONEZE, M. M.; DO NASCIMENTO, T. C.; DE MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R. *Scenedesmus obliquus* metabolomics: effect of photoperiods and cell growth phases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 727–739, 2019.

VENDRUSCOLO, R. G.; FERNANDES, A. S.; FAGUNDES, M. B.; ZEPKA, L. Q.; DE MENEZES, C. R.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R. Development of a new method for simultaneous extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgal biomass. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], 2021.

VENKATA SUBHASH, G.; RAJVANSHI, M.; NAVISH KUMAR, B.; GOVINDACHARY, S.; PRASAD, V.; DASGUPTA, S. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 244, p. 1304–1316, 2017.

VERA, C. R. De; CRESPIÁN, G. D.; DARANAS, A. H.; LOOGA, S. M.; LILLSUNDE, K.-E.; TAMMELA, P.; PERÄLÄ, M.; HONGISTO, V.; VIRTANEN, J.; RISCHER, H.; MULLER, C. D.; NORTE, M.; FERNÁNDEZ, J. J.; SOUTO, M. L. Marine Microalgae: Promising Source for New Bioactive Compounds. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 317, 2018.

VIDYASHANKAR, S.; VENUGOPAL, K. S.; SWARNALATHA, G. V.; KAVITHA, M. D.; CHAUHAN, V. S.; RAVI, R.; BANSAL, A. K.; SINGH, R.; PANDE, A.; RAVISHANKAR,

G. A.; SARADA, R. Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 77, p. 75–91, 2015.

VIEIRA, B. B.; SOARES, J.; AMORIM, M. L.; BITTENCOURT, P. V. Q.; DE CÁSSIA SUPERBI, R.; DE OLIVEIRA, E. B.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; MARTINS, M. A. Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 269, p. 118711, 2021.

WU, H.; MIAO, X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 170, p. 421–427, 2014.

WANG, Y.; TIBBETTS, S. M.; BERRUE, F.; MCGINN, P. J.; MACQUARRIE, S. P.; PUTTASWAMY, A.; PATELAKIS, S.; SCHMIDT, D.; MELANSON, R.; MACKENZIE, S. E. A rat study to evaluate the protein quality of three green microalgal species and the impact of mechanical cell wall disruption. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 11, 2020.

YANG, W.; HUANG, G. Extraction methods and activities of natural glucans. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 112, p. 50–57, 2021.

YAZDI, A. S. Surfactant-based extraction methods. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 918–929, 2011.

ZHANG, J.; LIU, L.; REN, Y.; CHEN, F. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 761–767, 2019.

ZHANG, J.; SUN, Z.; SUN, P.; CHEN, T.; CHEN, F. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. **Food and Functional**, [s. l.], 2014.

ZHOU, X.; JIN, W.; TU, R.; GUO, Q.; HAN, S. fang; CHEN, C.; WANG, Q.; LIU, W.; JENSEN, P. D.; WANG, Q. Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 221, p. 502–508, 2019.

5 ARTIGO 2 - *Scenedesmus obliquus* ISOLADA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES.

Alysson de Sá Pereira Lima¹, Thiago Barbosa Cahú¹, Danielli Matias de Macêdo Dantas², Bruno Oliveira de Veras¹, Laenne Bárbara Silva de Moraes², Rayanna Sophia de Souza², Francisca Crislandia Oliveira Silva¹, Maria Isabela Ferreira de Araújo¹, Alfredo Olivera Gálvez², Ranilson Bezerra de Souza¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil: alyssonlima-@hotmail.com (A.S.P.L)

²Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 56909-535, Recife, PE, Brasil

Resumo

Microalgas são organismos fotossintetizantes com grande diversidade bioquímica, e assim, podem ser aplicadas em diferentes campos biotecnológicos. Porém, o conhecimento a respeito das potencialidades de moléculas bioativas ainda é insuficiente, sobretudo, num contexto de ascensão no mercado nutracêutico. O presente estudo teve como objetivo realizar uma investigação do potencial biotecnológico da clorófita *Scenedesmus obliquus* isolada no Semiárido brasileiro quanto a recuperação de compostos, atividades biológicas e possíveis aplicações da biomassa e seus derivados. A microalga foi cultivada em meio BBM modificado (Bold Basal Medium) usando sistema semicontínuo e sob parâmetros de temperatura, luminosidade e pH controlados. A caracterização química preliminar da biomassa se deu por meio da quantificação do teor de proteína, carboidratos e amido (biomassa seca e residual, após extração). Além disso, um concentrado de exopolissacarídeos foi obtido e analisado. O processo de extração de compostos envolveu três ciclos para cada um dos solventes utilizados, compondo as frações aquosa, etanólica, acetônica e hexânica, que foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos e atividades antioxidante, antibacteriana, capacidade de inibição enzimática e atividade hemolítica. O potencial antioxidante variou entre os diferentes extratos, onde os valores de sequestro de DPPH variaram entre 17,51-63,12%, para o radical ABTS os extratos revelaram valores entre 6,82-22,89%, e para a redução de fosfomolibdênio foram observados resultados entre 18,40 -71,44 mg EAA/ g peso seco. Além disso, a capacidade de inibição enzimática foi verificada para todos os tratamentos, com valores de inibição significativa ($p < 0,001$) para as proteases quimotripsina (34,78-45,8%) e pepsina (16,64-

27,27%), além da α -amilase (24,79%) e lipase (31,05%). No teste de atividade antibacteriana, apenas o extrato etanólico apresentou inibição contra *Lysteria* sp. (CIM=256 μ g/mL). Tal fração apresentou também os maiores níveis significativos ($p<0,001$) de hemólise (31,88-52,45%). O potencial prebiótico dos exopolissacarídeos (EPS) de *S. obliquus* foi demonstrado, estimulando o crescimento das cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. plantarum*. Assim, os dados gerados neste estudo sugerem a presença de moléculas com potencial biotecnológico e nutracêutico. Os resultados obtidos com a cepa de *S. obliquus* isolada do semiárido, uma espécie local, revelam o potencial destas microalgas ainda pouco estudadas. Mais estudos complementares podem evidenciar tais propriedades e revelar mais informações quanto a sua segurança alimentar e aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: Clorófita, nutracêutico, produtos naturais, antioxidante, prebiótico, exopolissacarídeo.

Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms with great biochemical diversity, and thus can be applied in different biotechnological fields. However, knowledge about the potential of bioactive molecules is still insufficient, especially in the context of rising in the nutraceutical market. The present study aimed to investigate the biotechnological potential of the chlorophyte *Scenedesmus obliquus* isolated in the semi-arid region of Brazil, the recovery of compounds, biological activities, and possible applications of biomass and its derivatives. The microalgae were cultivated in a modified BBM medium (Bold Basal Medium) using a semi-continuous system and under controlled temperature, luminosity, and pH parameters. The preliminary chemical characterization of the biomass was done through the quantification of the protein, carbohydrates, and starch content (dry and residual biomass, after extraction). In addition, an exopolysaccharide concentrate was incorporated and analyzed. The compound extraction process involved three cycles for each of the solvents used, composing the daily, ethanolic, acetic, and hexane fractions, which were evaluated for the content of phenolic compounds and antioxidant, antibacterial activities, enzymatic inhibition capacity, and hemolytic activity. The antioxidant potential varied between the different extracts, where the DPPH sequestration values ranged between 17.51-63.12%, for the ABTS radical the extracts showed values between 6.82-22.89%, and for the reduction of phosphomolybdenum results were observed between 18.40 -71.44 mg EAA/g dry weight. In addition, the enzyme inhibition capacity was verified for all treatments, with significant inhibition values ($p<0.001$) for the proteases chymotrypsin (34.78-45.8%) and pepsin (16.64-27.27%), in addition to α -amylase (24.79%) and lipase

(31.05%). In the antibacterial activity test, only the ethanol extract showed inhibition against *Lysteria* sp. (MIC=256 µg/ml). This fraction also presented the highest significant levels ($p<0.001$) of hemolysis (31.88-52.45%). The prebiotic potential of exopolysaccharides (EPS) of *S. obliquus* was demonstrated, stimulating the growth of strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. plantarum*. Thus, the data generated in this study suggest the presence of molecules with biotechnological and nutraceutical potential. The results obtained with the strain of *S. obliquus* isolated from the semiarid region, a local species, reveal the potential of these microalgae, which are still poorly studied. More complementary studies can evidence such properties and reveal more information about their food safety and therapeutic applications.

Keywords: Chlorophyte, nutraceutical, natural products, antioxidant, prebiotic, exopolysaccharide.

1 INTRODUÇÃO

As estimativas de crescimento demográfico mundial para os próximos anos indicam a necessidade de um aumento na produção de alimentos alternativos com alto valor nutricional (FU et al., 2021). Além disso, a busca por um estilo de vida mais saudável e o desejo pela longevidade tem gerado interesse na exploração de novas fontes de produtos naturais e impulsionado pesquisas que auxiliem na compreensão do potencial biotecnológico destes recursos (por exemplo, microalgas) (BARSANTI et al., 2018; HENCHION et al., 2017; TANG et al., 2020; VERA et al., 2018).

Microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes, comumente encontrados em regiões marinhas e continentais, cujo termo em geral é usado para agrupar representantes procariotos (cianobactérias) e eucariotos (Chlorophyta, por exemplo) (KRATZER et al., 2021). A complexidade fisiológica desses organismos atrelada a estratégias adaptativas à diferentes condições ambientais os configuram como importantes produtores de moléculas bioativas (LEVASSEUR et al., 2020), como proteínas, carboidratos, lipídeos e metabólitos que conferem grande potencial de aplicações na alimentação humana, suplementos alimentícios, além de serem fontes de extração de compostos com alto valor biotecnológico como enzimas (MORENO-GARCIA et al., 2017).

A demanda por produtos de origem natural, em especial microalgas, tem crescido juntamente com o conhecimento sobre os benefícios do consumo regular de sua biomassa (NAGARAJAN et al., 2021). Apesar disso, a limitação de informações visando uma melhor

elucidação dos mecanismos e propriedades terapêuticas revela a necessidade de investigações mais aprofundadas e que contribuam para obtenção de produtos seguros e multifuncionais, sobretudo, para setores biotecnológicos em expansão como o mercado nutracêutico (SANTHAKUMARAN et al., 2020). Dessa forma, diferentes abordagens conduzidas na literatura visam não só a busca por novas cepas ricas em compostos bioativos, como também a otimização das condições de cultivo, permitindo o melhor aproveitamento do potencial agregado das espécies (ABU-GHOSH et al., 2021; RUGNINI et al., 2020).

Entre as clorófitas mais investigadas nos últimos anos, o gênero *Scenedesmus* destaca-se por apresentar características vantajosas como a alta taxa de crescimento, somado a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos e carboidratos (ROCHA et al., 2017; FENG et al., 2014). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o potencial alimentício de produtos derivados de *Scenedesmus obliquus*, como hidrolisados proteicos e carotenóides, culminando em resultados favoráveis quanto a digestibilidade, e efeitos na redução efetiva nos níveis de glicose e triacilgliceróis no sangue, sendo considerados seguros para o consumo (NASCIMENTO et al., 2020; NASCIMENTO et al. 2021; SILVA et al., 2020). Alternativamente, o potencial de moléculas obtidas a partir de extratos de *S. obliquus* também foi observado, onde diferentes extratos e frações derivadas da espécie exibiram capacidade antioxidante, bem como atividade antimicrobiana e anticâncer (GUEDES et al., 2013; MARREZ et al., 2019)

Espécies como a *S. obliquus* possuem um grande potencial para geração de insumos nutracêuticos e graças a sua notável adaptabilidade, diferentes parâmetros das culturas podem ser modulados a fim de promover a produção de biomassa com altos rendimentos metabólitos (HAMOUDA et al., 2018; MANSOURI et al., 2018; PATNAIK et al., 2019). Apesar disso, a variabilidade nos fatores que determinam as condições de cultivo, como o níveis de nutrientes, salinidade e intensidade luminosa podem influenciar no acúmulo de compostos bioativos em microalgas (PŘIBYL et al., 2016; HLAING et al., 2020) e consequentemente nas atividades biológicas como demonstrado por Guedes et al. (2011), onde parâmetros de temperatura e pH exerceram grande influência no teor de metabólitos antioxidantes de *S. obliquus*. A influência sazonal no conteúdo bioquímico também foi documentada para outras clorófitas como *Dunaliella salina* (PISAL & LELE, 2005). Ademais, a variação sazonal acentuada pode refletir indiretamente na ocorrência de comunidades fitoplânctônicas (REGO et al., 2020; (KUMAR et al., 2021). Nesse sentido, Oliveira et al., (2019), avaliando a ocorrência de grupos de microalgas de alto valor biotecnológico no Semiárido pernambucano, identificaram *Desmodesmus* sp.,

Chlorella sp. e *Scenedesmus* sp., referidos pela capacidade significativa de adaptação e produção de metabólitos bioativos em diferentes condições ambientais.

No presente estudo foi realizado a investigação do potencial biotecnológico de *S. obliquus* isolada no Semiárido pernambucano, em relação ao perfil químico da biomassa (composição centesimal), presença de exopolissacarídeos e atividades biológicas (antioxidante, antibacteriana, capacidade de inibição enzimática, potencial prebiótico). Para isso, o estudo fundamenta-se na hipótese de que as condições ambientais características da região Semiárida as quais a espécie *S. obliquus* foi isolada viabilizam e/ou favorecem a produção e acumulação de compostos na biomassa celular e extracelular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A microalga foi previamente isolada e depositada no cepário do Laboratório de Biotecnologia de Microalgas na Unidade Acadêmica de Serra Talhada – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os solventes usados na produção dos extratos foram de grau analítico da marca Merck®. Os demais reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

2.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A microalga *Scenedesmus obliquus* utilizada neste trabalho foi coletada na zona litorânea do reservatório Açude Cachoeira II, localizado na cidade de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (7°57'19"S 38°20'6"O), cuja ocorrência foi previamente identificada por Oliveira et al. (2019). O cultivo das cepas de *S. obliquus* ocorreu no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Para tanto, utilizou-se o meio de cultura BBM modificado (Bold Basal Medium, OLIVEIRA et al., 2020)) (Anexo I), com luminosidade de 3.000 lux, temperatura de 21°C e pH variando entre 7 e 11,9 ao longo do período de crescimento da microalga. O sistema de cultivo empregado foi semi-contínuo, com aumento progressivo do volume das culturas em recipientes com volume máximo de 15 litros (em quadruplicatas). A curva de crescimento foi previamente mensurada a partir da contagem diária das células com câmara de Neubauer e microscópio óptico com ampliação de 40x ao longo de 14 dias, utilizando um cultivo piloto nas mesmas condições descritas, visando um melhor entendimento do crescimento microalgal. A etapa de preparo da biomassa se deu a partir do método de floculação com policloreto de alumínio (140 mg/L), adicionado nos recipientes no final da fase exponencial das culturas (12º dia), seguida de centrifugação a 10.000 g e liofilização das amostras.

2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

2.2.1 Isolamento dos exopolissacarídeos (EPS)

O isolamento dos exopolissacarídeos foi realizado de acordo com Drira et al. (2021). Em resumo, 200 mL de meio de cultivo foi centrifugado a 10.000 g para remoção de células e partículas. O líquido sobrenadante foi adicionado de dois volumes de etanol absoluto, mantendo a mistura a -20°C por 24 h e em sequência, a solução foi centrifugada e seca em estufa a 50 °C pelo mesmo período, sendo que o conteúdo final de EPS foi determinado gravimetricamente. Somado a este procedimento, foi realizada uma análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FI-IR), onde as amostras foram submetidas à uma varredura no intervalo de (4.000-400 cm⁻¹).

2.2.2 Obtenção dos extratos

Para obtenção dos extratos, 1g da biomassa liofilizada foi macerada em cadinho e pistilo e suspensa consecutivamente em 10 mL de cada solvente (água, etanol, acetona e hexano) a uma proporção de 1:10. O banho ultrassônico foi utilizado por 30 minutos como método de pré-tratamento para facilitar a ruptura da parede celular e obtenção dos compostos intracelulares (GERDE et al. 2012). O processo envolveu três ciclos para cada uma das soluções dos extratos, com períodos intercalados pela centrifugação e coleta do sobrenadante. As soluções etanólicas, acetônicas e hexânicas passaram por secagem em estufa a 50°C enquanto as aquosas foram submetidas a liofilização.

2.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR DA BIOMASSA SECA E EXTRATOS

2.3.1 Composição centesimal

A composição centesimal da biomassa seca de *S. obliquus* foi realizada visando a determinação dos teores de proteína bruta, pelo método analítico Dumas, umidade e voláteis, pela perda por secagem, além da fibra bruta, extrato etéreo e cinzas, por gravimetria (Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2017; AOCS, 2017), sendo a porcentagem de carboidratos mensurada pela equação 1:

$$CT=100\%-(\text{proteínas}+\text{lipídeos}+\text{matéria mineral}+\text{umidade}) \quad \text{Equação (1)}$$

Em que: CT= carboidratos totais

2.3.2 Quantificação de amido da biomassa seca e residual

O amido foi estimado pelo método descrito por Pandey et al. (2020). Em síntese, 50 mg da biomassa seca e da biomassa residual, proveniente de todas as extrações com solventes, foram suspensas em 20 ml de etanol 80% (v/v), em triplicata, mantidas em temperatura ambiente por 12 h em tubos de centrifuga de 50 mL. Após o período, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 15 min e o sobrenadante coletado e armazenado. Com o pellet, 5 mL de água destilada e 6,5 mL de ácido perclórico 52% (v/v) foram adicionados, permanecendo em um agitador de tubos por 10 min. Após o processo, os conteúdos foram centrifugados por 20 min a 2.000 g, repetindo essas etapas por três ciclos. Os sobrenadantes coletados a cada ciclo foram armazenados em recipientes âmbar, com o volume completado para 50 mL com água destilada. Posteriormente, os tratamentos provenientes das duas biomassas passaram por filtros de papel (Whatman 40) e por fim o líquido resultante foi submetido ao método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1950), sendo a quantidade de amido estimada multiplicando os valores pelo fator 0,9. A quantidade de amido foi expressa em porcentagem de peso seco da biomassa.

2.3.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais dos extratos seguiu a metodologia de Prazeres et al. (2019) com adaptações, cuja técnica tem como referência o método Folin-Ciocalteu. Para tal, os extratos foram inicialmente preparados a uma concentração de 10 mg/mL, em DMSO, transferindo-se 20 µL para uma placa de 96 poços, seguida da adição 100µl do reagente Folin-Ciocalteu (1:10). Após o intervalo de três minutos, adicionou-se 80 µL de carbonato de sódio (75 g/L) e após 2 horas de reação a absorbância foi medida a 750 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes a ácido gálico por g de peso seco da amostra (mg EAG/g peso seco), a partir de uma curva padrão de ácido gálico em diferentes concentrações (31,25 - 1000 µg / mL). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.4.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada a partir da mensuração da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos, conforme a metodologia proposta pelo Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI M100 (CLSI, 2017). Foram testadas bactérias potencialmente patogênicas de alimentos, sendo *Escherichia coli* UFPEDA224, *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396, *Enterococcus faecalis* UFPEDA09, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 e *Listeria* sp. obtidas no Departamento de Antibióticos da UFPE. As cepas foram cultivadas em placas de Petri com

Ágar Mueller-Hinton por 24h em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 35 °C. As suspensões bacterianas foram realizadas em caldo Mueller-Hinton com padronização de 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Para realização do ensaio antibacteriano, os extratos foram suspensos em caldo Mueller-Hinton e tendo suas concentrações correspondentes a 2.048 µg/mL. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada (1:2) em placas contendo 100 µL do meio de cultura para a obtenção de concentrações que variaram de 1.024-32 µg/mL, adicionando ao fim, 10µL do inóculo bacteriano. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico azitromicina em concentrações entre 258-16 µg/mL. Após a incubação a 25 °C por 24h, foi adicionado 10 µL de resazurina 0,1%, cuja mudança de coloração de violeta para róseo evidencia crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração em que não houve mudança de coloração. Todos os nsaios foram realizados em triplicata.

2.4.2 Atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de *S. obliquus* foi determinada adotando-se os métodos: (1) Capacidade antioxidante total (CAT); (2) Sequestro de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil); e (3) ABTS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.3 Capacidade antioxidante total (CAT)

A atividade antioxidante total dos extratos foi determinada pelo método descrito por Prieto et al. (1999), baseado na redução de molibdênio (IV) a molibdênio (V) em pH ácido. Em resumo, 60 µL das amostras dos extratos a 10.000 µg/mL foram transferidas para tubos de centrífuga, adicionados a 600 µL da solução de fosfomolibdênio (molibdato de amônia a 4 mM, fosfato de sódio a 28 mM e ácido sulfúrico 0,6 M), então aquecidos em banho seco a 95°C por 90 minutos. Ao fim do período, 200µl das soluções em triplicata foram transferidas para placas de 96 poços para a leitura da absorbância a 695 nm usando DMSO como branco. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes a ácido ascórbico por grama de peso seco. Uma curva padrão foi obtida a partir das concentrações 31,25-1.000µg/mL de ácido ascórbico.

2.4.4 Sequestro de radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de sequestro de radicais livres baseado na doação de íons de hidrogênio pelos extratos, utilizando o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de acordo com o método de Veras et al. (2020) e

Kose et al. (2010). O procedimento envolveu a adição de 40 µL de cada extrato previamente preparados em concentrações entre 10.000-312,5 µg/mL em DMSO em placa de 96 poços juntamente com 250 µL da solução de DPPH 0,2 mM dissolvido em etanol. Após 25 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de microplacas (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer, BioRad California, EUA) a 517 nm e a porcentagem de inibição do radical foi determinada pela equação 2:

$$I(\%) = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que: A_c = absorbância do controle; A_s = absorbância da amostra.

Além da porcentagem de inibição, os resultados foram expressos em equivalência ao padrão ácido ascórbico (mg EAA/g peso seco) nas concentrações de 31,25-1.000 µg/mL.

2.4.5 Eliminação do radical ABTS

A atividade antioxidante usando o radical ABTS consiste em reduzir o radical catiônico equivalente (ABTS⁺) na presença de agentes redutores nas amostras testadas (Sen et al. 2021). A técnica baseou-se no método descrito por Rasesa et al. (2021), onde uma solução padrão obtida com ABTS a 7 mM e persulfato de potássio a 140mM foi mantida em temperatura ambiente por 16h, e após o período, 1 mL da solução inicial (padrão) foi dissolvida em etanol e calibrada a uma absorbância de 0,7 a 734 nm (solução de uso). No ensaio, 2 µL de cada extrato diluído em DMSO nas concentrações de 10.000-312,5 µg/mL foram transferidos para uma placa de 96 poços e adicionou-se 200 µL da solução-uso de ABTS. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 6 minutos de reação, em um comprimento de 734 nm, com os resultados expressos em termos de porcentagem de inibição do radical, seguindo a Equação 1 descrita na seção anterior. Além da porcentagem, os resultados foram expressos como µmol equivalente a Trolox por grama de amostra, por meio de uma curva padrão obtida através nas concentrações de 125-4000 µM de Trolox.

2.5 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

2.5.1 Inibição de proteases

A atividade de inibição enzimática das proteases tripsina e quimotripsina foi determinada pelo método descrito por Bezerra et al. (2005). Os extratos foram diluídos a 1 mg/mL em DMSO 1% (v/v) para permitir a melhor homogeneização das amostras, e as proteases preparadas a 1 mg/mL em tampão Tris-HCL 0,1M, pH 8,0. Os substratos utilizados para a atividade de tripsina e quimotripsina foram respectivamente Nα -bezoil-DL-arginina-p-

nitroanilida (BApNA) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SApNA), ambos a 8mM. Utilizando uma placa de 96 poços, 140µL de Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 foram adicionados em triplicata, seguida da adição de 30 µL do substrato, 15 µL dos extratos e 15 µL da enzima. Após 15 minutos de reação, foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro a 405nm. O branco foi preparado nas mesmas condições exceto pela ausência de enzima (branco de substrato) ou ausência de substrato (branco de amostra). A porcentagem de inibição foi determinada considerando o controle negativo (Tris-HCl 0,1M, pH 8) como 100% de atividade, sendo representada pela porcentagem atividade residual de cada enzima.

Para o ensaio de inibição de pepsina, uma solução de hemoglobina suína 2% (m/v) foi preparada em tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,0 adicionando-se em tubos de centrífuga 200 µL da solução de hemoglobina, 60 µL dos extratos e 60 µL da enzima previamente preparada a 1 mg/mL no mesmo tampão. Após 15 minutos, 320 µL de TCA 10% foram adicionados aos tubos, seguido de centrifugação a 1000 rpm por 10 min. As absorbâncias foram determinadas a 260 nm usando como controle negativo DMSO 1% para todos os testes. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de atividade residual das enzimas, considerando o controle negativo como 100% de atividade enzimática. (PAVLISKO et al., 1997).

2.5.2 Inibição de α -amilase

Para determinar a atividade inibitória da amilase, 125 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 foi adicionado em triplicata em tubos de centrífuga juntamente com um volume de 125 µL de uma solução de amido 2%, 10 µL dos extratos (1 mg/mL em DMSO 1%, v/v) e 10 µL da enzima (1 mg/mL) (BERNEFELD, 1995). Após 10 minutos a 37°C, seguidos de mais 20 minutos em temperatura ambiente, 20 µL de cada tratamento foram submetidos ao banho seco com 200 µL de solução com ácido dinitrosalicílico (DNSA), aquecidos a 100°C por 10 min. Depois de resfriados, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm, com os resultados sendo dispostos a partir da porcentagem de atividade residual, considerando DMSO 1% (v/v) como controle negativo.

2.5.3 Inibição de lipase

Com base no método descrito por Nery et al. (2018), o sistema para atividade de lipase utilizou uma solução composta de goma arábica 0,1%, Triton 100-X 0,4% e Tris-HCl 0,05 M e pH 8,0, e o substrato p-nitrofenol palmitato a 4 mM dissolvido em isopropanol. Para o ensaio, em tubos de centrífuga, 243 µL da solução contendo goma arábica foi adicionada juntamente com 27 µL do substrato, 15 µL dos extratos (1mg/mL) e 15 µL da lipase (4 mg/mL). Após 10

min de reação, os tratamentos foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos e em seguida, 200 µL foram transferidos para placas de 96 poços para a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. Os resultados foram representados como porcentagem de atividade residual considerado o controle negativo (DMSO 1% v/v) como 100% de atividade.

2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E EPS

A avaliação da atividade hemolítica seguiu o protocolo descrito por Paula et al. (2012). Primeiramente, o sangue foi coletado por punção cardíaca em camundongos (linhagem Swiss, 60 dias de vida e 90g, n=3), previamente anestesiados, utilizando uma seringa contendo 0,14 mL do agente anticoagulante citrato fosfato dextrose, completando o volume de sangue até 1 mL. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1000 rpm para descarte do sobrenadante e lavagem do hematócrito com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, por três vezes. Após essa etapa, o conteúdo foi transferido para tubos Falcon e diluídos até a concentração de 5% (v/v) utilizando PBS. O procedimento de coleta de sangue foi realizado de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Utilização de Animais de Laboratório (CEUA-UFPE), processo nº 0055/2021 (Anexo B).

Para o ensaio, os extratos de água, etanol, acetona e hexano, além de uma fração de exopolissacarídeos da microalga, foram padronizados a 10 mg/mL utilizando DMSO 1% em PBS. As diluições dos tratamentos estão descritas na Tabela 1. Após uma hora de experimento, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 min e a absorbância lida a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, adotando como o controle positivo como 100% de hemólise.

Tabela 1: Desenho experimental do ensaio hemolítico para os tratamentos de exopolissacarídeos e frações etanólica, aquosa, acetônica e hexânica de *Scenedesmus obliquus*.

Tratamentos (µL)	Hematócrito a 5% (µL)	DMSO 1%
50 (1 mg/mL)	100	350
25 (0,5 mg/mL)	100	375
10 (0,2 mg/mL)	100	390
5 (0,1 mg/mL)	100	395
0	100	400 (Controle negativo)
0	100	400 (H ₂ O/controle positivo)

2.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DOS EPS DE *S. obliquus*

A atividade prebiótica *in vitro* da fração de EPS de *S. obliquus* foi realizada de acordo com a metodologia de Santos et al., (2021) com modificações. Primeiramente, as cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. plantarum* foram cultivadas em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) por 24 h a 37°C. Após o período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos e o pellet foi ressuspensão em solução salina 0,9% e padronizado a uma concentração celular de 10⁷ UFC/mL. A amostra de EPS e de inulina (controle positivo) foram filtradas com filtro de seringa com membrana de 0,22 µm, sendo posteriormente adicionadas a 1 mL de caldo MRS em tubos de centrífuga estéreis, com a concentração final de 0,25% (m/v) para a realização do teste. No ensaio, a solução bacteriana foi adicionada às amostras de forma a diluir sua concentração inicial para 10⁶ UFC/mL, e por fim os tratamentos foram mantidos a 37°C por 24 e 48h. Em cada período, 100µL das amostras foram retirados para realizar uma diluição de 10⁻¹ a 10⁻⁸ em solução salina 0,9% (m/v) estéril, para em seguida, realizar o semeio das seis últimas diluições em placas de Petri contendo meio ágar MRS, permitindo assim a melhor contagem das colônias. Paralelamente, as absorbâncias dos tratamentos foram lidas a 600 nm no tempo 0h, 24h e 48h a fim observar a dinâmica de crescimento das cepas, e sendo assim, os resultados foram representados como UFC/mL e em função da absorbância das amostras.

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com tratamentos realizados em triplicata. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguidas do teste de Tukey ($p < 0,05$) e expressos em média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram efetuadas por meio do software GraphPad Prism®.

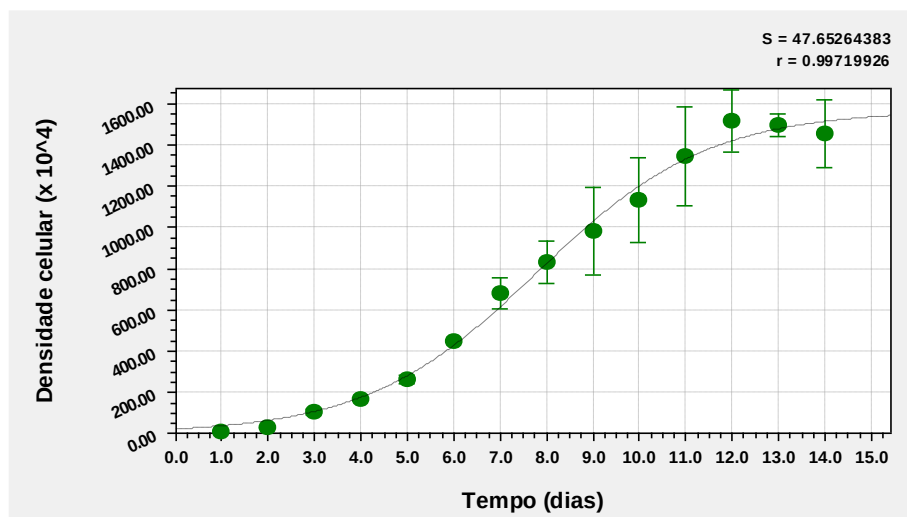
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CURVA DE CRESCIMENTO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS

A curva de crescimento da *S. obliquus* mostra o comportamento do cultivo ao longo de 14 dias, em que a densidade celular (concentração inicial = 10×10^4 células/mL) atingiu seu valor máximo no 12º dia de cultivo, equivalendo ao final da fase exponencial de crescimento na qual foi realizada as coletas posteriores, com densidade máxima de $1.516,25 \times 10^4$ células/mL (Figura 1). Após as etapas de preparo da biomassa o rendimento final total obtido foi de 25,56 g (0,426 g/L), sendo valores próximos em relação aos padrões detectados para a espécie sob condições de cultivo com altas concentrações de nitrogênio (AMORIM et al.,

2021). Alguns fatores podem estar associados à essa diferença de produtividade, em especial, a intensidade luminosa, taxa de assimilação de CO₂ e o tipo de cultivo de adotado (GIM et al., 2014), sendo estes, fatores que devem ser levados em consideração para o estabelecimento de cultivos em ampla escala. Já os rendimentos das extrações sequenciais com água, etanol, acetona e hexano variaram de 13,6 mg/g de biomassa seca (hexano) a 219,1 mg/g de biomassa seca (água), com valores intermediários observados para os extratos etanólico e acetônico com diferença de 76,8% e 90,87%, respectivamente, em relação ao tratamento de maior rendimento.

Figura 1: Curva de crescimento da microalga *S. obliquus* ao longo de 14 dias de cultivo em meio BBM modificado (Bold Basal Medium). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.



Um método de extração sequencial baseado na polaridade dos solventes foi proposto buscando explorar a biomassa de forma integral e gerar quatro extratos com frações diferentes de compostos bioativos. Métodos sequenciais da biomassa de *S. obliquus* mostraram grande eficácia na extração de carotenóides como luteína e β -caroteno, refletindo em um processo economicamente viável e sustentável pela diminuição de solventes tóxicos utilizados nos métodos convencionais. (DI CAPRIO et al., 2020). Como esperado, o rendimento dos extratos apresentou uma diminuição gradativa ao longo dos ciclos de extrações, porém segundo Ansari et al. (2017), a sequência da extração pode ser modulada para a obtenção de metabólitos específicos com altos rendimentos, visto que tal processo pode diminuir consideravelmente o custo de produção. Além disso, métodos de extração que utilizam biomassa em quantidades reduzidas surgem como uma solução para o problema enfrentado pelas pesquisas em escala de laboratório, já que os cultivos necessitam de uma fase experimental de tamanho reduzido para a otimização de parâmetros, e com isso, a biomassa geralmente se torna limitada para todos os

experimentos propostos, onde essas abordagens se mostram adequadas para garantir a obtenção de rendimentos suficientes para as todas as investigações (VENDRUSCOLO et al., 2021).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SECA E EXTRATOS

Os resultados da caracterização química preliminar da biomassa estão expressos na Tabela 2. O teor de proteínas foi superior (40,56%) entre os compostos analisados, mostrando-se como o principal componente celular seguido de carboidratos com teor médio de 25,03% e lipídeos (0,93%). Além disso, o teor de amido quantificado para a biomassa seca ($22,04\% \pm 0,435$) e residual ($24,23\% \pm 0,23$), correspondeu a mais que a metade dos valores observados de carboidratos totais.

Os valores significativos de proteína eram esperados considerando que o meio BBM modificado apresenta três vezes mais compostos nitrogenados em comparação ao meio convencional (ver anexo I). Estas observações indicam uma produtividade significativa em relação a outras abordagens envolvendo meios de cultivo distintos para a espécie *S. obliquus* (HAMOUDA et al., 2018; FAN et al., 2020; CARNEIRO et al., 2019). No estudo de Oliveira et al., (2020), por exemplo, a *S. obliquus* cultivada em meio BBM convencional apresentou um rendimento proteico inferior (teor máximo $21,04\% \pm 0,44$), sugerindo uma relação direta entre a condição nutricional adequada no cultivo e a eficiência na produção de uma biomassa microalgal mais proteica. Isso, por sua vez, configura um fator particularmente importante em estudos nos quais investigam o potencial nutracêutico de microalgas (AFIFY et al., 2018; SILVA et al., 2020), especialmente para a produção de suplementos alimentícios.

Em geral, a maior produção de carboidratos e lipídeos ocorre na fase estacionária, quando os níveis de nitrogênio estão mais baixos pelo consumo da cultura microalgal e inicia-se a síntese de compostos utilizados como reserva energética (HUSSAIN et al., 2020), embora outros fatores como fotoperíodo, a intensidade luminosa e taxa de fixação de CO₂ também têm papel essencial no acúmulo destes metabólitos da *S. obliquus* (HO et al., 2013a; KUMAR et al., 2019). Assim, a coleta da biomassa na fase exponencial, onde ocorre a síntese proteica e consequente aumento da produtividade da cultura, pode explicar os baixos níveis relativos de carboidratos e lipídeos observados (RANADHEER et al., 2019). Os valores de amido (22-24%) quantificados foram próximos teor de carboidratos (25,03%) da biomassa e corroboram com o estudo de Jaeger et al. (2014) onde a cepa *S. obliquus* de tipo selvagem apresentou um teor inicial de 17% de amido, elevando para 25% do peso seco. Além disso, o estudo de

Pandey et al. (2020) demonstra o potencial do gênero na produção de amido e a potencial aplicação da biomassa na produção de bioetanol por métodos fermentativos.

Tabela 2: Teores de compostos e excedentes resultantes da análise de composição centesimal da biomassa de *Scenedesmus obliquus*.

Compostos	Teor na biomassa (%)
Proteína bruta	40,56
Carboidratos	25,03
Extrato Etéreo	0,93
Fibra bruta	0,18
Matéria mineral	25,94
Umidade	7,36

Em relação ao teor de compostos fenólicos totais dos extratos, apenas os tratamentos de etanol e acetona apresentaram níveis detectáveis de polifenóis sendo estes 14,05 e 21,15 mg/EAG g peso seco, respectivamente. Os resultados observados foram próximos dos obtidos por Santhakumaran et al. (2020), além de que valores mínimos foram detectados a partir do extrato aquoso ($1,25 \pm 0,21$ mg/EAG g peso seco). Como demonstrado no estudo de Do et al. (2014) extratos etanólicos e acetônicos apresentam níveis consideráveis de compostos fenólicos totais de fontes vegetais, e isso se deve provavelmente pela formação de complexos com maior solubilidade de solventes desta natureza. Estes compostos são cada vez mais explorados em microalgas principalmente pela correlação com a capacidade antioxidante das espécies (GOIRIS et al., 2012; PATIL et al., 2019).

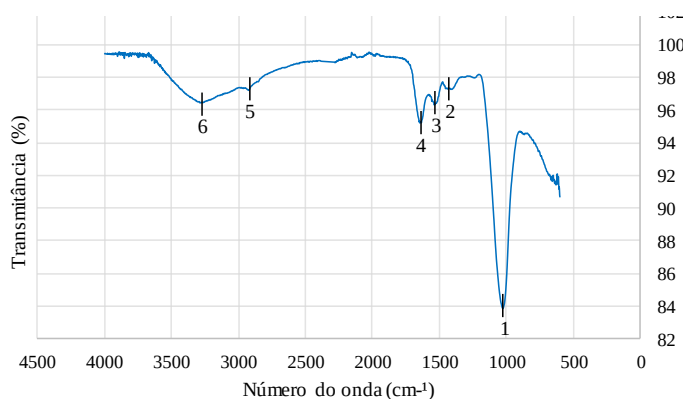
3.3. RENDIMENTO E ANÁLISE DE FT-IR DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

O rendimento da fração EPS obtida foi de 10,8 mg (aproximadamente 41,54 mg/L de meio, 0,004%), indo de encontro as observações efetuadas por Sivaramakrishnan et al. (2020) para *Scenedesmus* sp. sob condições de estresse. Alguns parâmetros afetam de forma significativa o teor de exopolissacarídeos, como a linhagem da microalga, condições de operação como o pH da cultura, temperatura e a disponibilidade de nutrientes (XIAO et al., 2016). Tal fato foi demonstrado por Angelaalincy et al. (2017), em que a diminuição do pH, juntamente com aumento da salinidade do meio pode aumentar consideravelmente a produção de EPS chegando ao máximo rendimento de 0,086 mg/mL (86 mg/L).

Na análise de FT-IR foram observados picos variáveis referentes à regiões específicas (Figura 2) em que o pico de $1,024\text{ cm}^{-1}$ sugere a ocorrência de vibração de alongamento C-O (EL-NAGGAR et al., 2020), além de uma flutuação menos intensa observada em $1,402\text{ cm}^{-1}$ correspondente a grupos carboxílicos COO^- e geralmente relacionados à ácidos urônicos e aminoácidos, o que sugere a natureza ácida dos EPS (BADIREDDY et al., 2010). Já o pico de $1,537\text{ cm}^{-1}$ associa-se com a ocorrência de um grupamento amino (ISMAIL et al., 2010), $1,633\text{ cm}^{-1}$ e equivale a vibração de $\text{C}=\text{O}$, sugerindo uma inter-relação com as estruturas secundárias de proteínas (BADIREDDY et al., 2010) e ainda a banda relativa a $2,922\text{ cm}^{-1}$ correspondente à vibração do alongamento assimétrico de $-\text{CH}_2$ (WANG et al., 2012), normalmente associado a hexoses como galactose e glicose ou desoxihexoses tais como fucose e ramnose (ISMAIL et al., 2010). Por fim, a banda longa cujo pico inclui o intervalo entre $3,200\text{--}3,400\text{ cm}^{-1}$ ($3,265\text{ cm}^{-1}$) refere-se à vibração do radical $-\text{OH}$ ou grupamento $-\text{NH}$ de amins (XU et al., 2008).

Em clorófiticas como a *Dunaliella salina*, análises recentes dos EPS por FTIR demonstram a presença de grupos funcionais como $\text{C}=\text{O}$, $-\text{OH}$ e $\text{C}-\text{H}$, sugerindo forte ligação com estruturas de polissacarídeos (GOYAL et al., 2019), (GOYAL et al., 2019), cujos grupos funcionais descritos no presente estudo já foram relatados em estudos para *Scenedesmus* sp., como o $-\text{NH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2$ e $\text{C}-\text{O}$ (PATWAL et al., 2021; (DEVI et al., 2021). Dessa forma, os dados sugerem que a fração de substâncias poliméricas é formada majoritariamente por carboidratos e o conhecimento a respeito do perfil bioquímico de polissacarídeos matriciais de *S. obliquus* pode permitir uma melhor expansão destes sob a perspectiva de aplicabilidade, dado que a potencialidade de EPS vêm sendo demonstrada como agentes antitumorais, antioxidantes e imunomoduladoras (PATWAL et al., 2021; ZHANG et al., 2019). Apesar disso, investigações complementares são necessárias para o melhor entendimento da estrutura e funcionalidades desse biopolímero.

Figura 2: Gráfico de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) dos exopolissacarídeos de *S. obliquus* demonstrando os picos (1) 1.024; (2) 1.402; (3) 1.537; (4) 1.633; (5) 2.922 e (6) 3.265, que sugerem a presença de carboidratos.



3.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS

Os resultados referentes à Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de água, etanol, acetona e hexano estão representadas na Tabela 2. Os tratamentos utilizando extrato etanólico apresentaram atividade inibitória (256 µg/mL) para *Listeria* sp. enquanto os demais tratamentos apresentaram uma CIM superior a 1.024 µg/mL (maior concentração). Inúmeras doenças estão intimamente ligadas a presença de patógenos em alimentos, e dessa forma, crescentes estudos estão sendo direcionados visando a neutralização destes agentes, sobretudo a partir de fontes antimicrobianas naturais, considerando a importância dessa inibição do ponto de vista dos produtos, podendo aumentar o tempo de prateleira, e dos benefícios relacionados a saúde do consumidor (PISOSCHI et al., 2018).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima dos quatro extratos de *S. obliquus* frente a *Listeria* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas* sp.

Tratamentos/ CIM (µg/mL)	<i>Listeria</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
Água	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024
Etanol	256	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024
Acetona	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024
Hexano	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024	> 1.024
Azitromicina (controle)	2	4	16	16	8	16

As atividades antibacteriana de extratos de microalgas geralmente estão associadas à quantidade e composição de ácidos graxos livres presentes na biomassa, exercendo tal atividade por diferentes mecanismos como a interrupção da cadeia transportadora de elétrons, lise celular, inibição de enzimas e diminuição da absorção de nutrientes (DESBOIS E SMITH, 2009). Pesquisas anteriores relataram que os ácidos graxos de cadeia longa de *S. obliquus* podem estar diretamente relacionados à inibição de bactérias como *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e ainda *Pseudomonas aeruginosa* (CATARINA GUEDES et al., 2011).

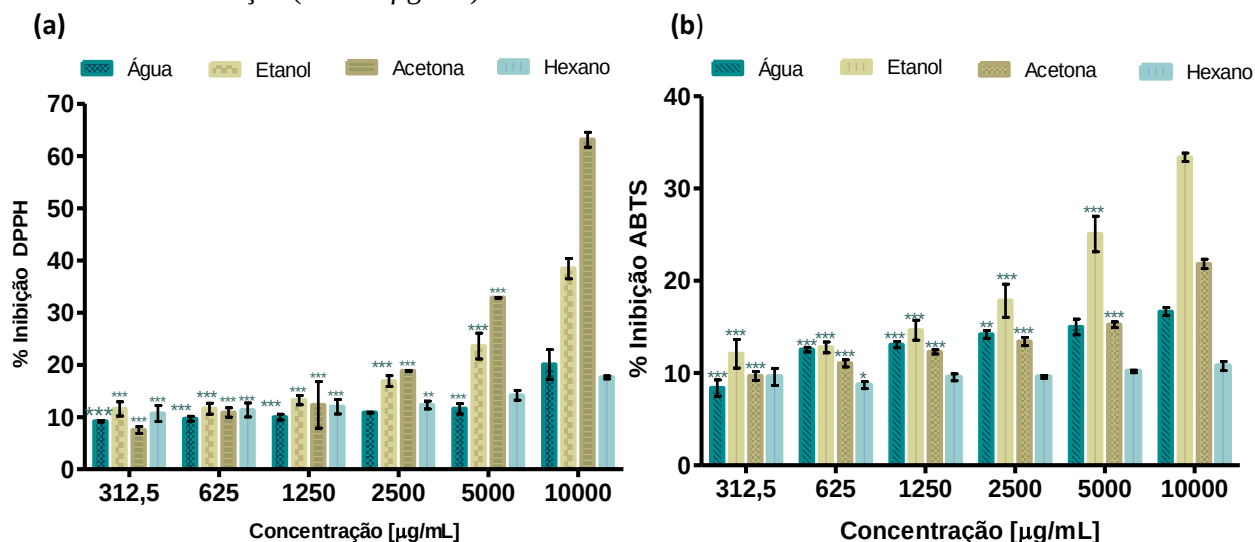
Considerando o baixo teor de lipídeos na biomassa do presente estudo (0,93%), é possível que a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta e longa não tenha sido suficiente para promover a inibição das bactérias avaliadas. Tal constatação também foi observada por Alsenani et al. (2020) que apesar identificar ácidos graxos de *Scenedesmus* sp., tal como o ácido

linolênico, os teores não foram elevados o suficiente para alcançar altos valores de CIM, inibindo bactérias gram-positivas e negativas apenas na maior concentração testada (1 mg/ml). Diante dos dados observados, apesar da baixa capacidade de inibição, fatores relacionados aos cultivos podem ser adotados visando estimular à síntese de metabólitos antibacterianos, sendo necessárias mais investigações a respeito dos compostos envolvidos e suas potenciais aplicações no mercado dietético.

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Foram investigadas as atividades antioxidantes dos quatro extratos de *S. obliquus* a partir dos métodos de eliminação do radical DPPH, ABTS e a Capacidade Antioxidante Total (CAT). Como resultados, os dados relativos à capacidade antioxidante dos radicais DPPH e ABTS foram expressos em porcentagem de inibição (Figura 3) e em termos equivalente de mg eq. AA/mg peso seco e $\mu\text{mols eq. Trolox/ g}$ de peso seco para ambos os métodos, respectivamente (Tabela 4).

Figura 3: Atividades antioxidante pelo método de sequestro de radical (a) DPPH e (b) ABTS dos extratos de água, etanol, acetona e hexano de *S. obliquus* nas concentrações de 10.000-312,5 $\mu\text{g/mL}$. As médias foram consideradas significativas a níveis de significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação à maior concentração (10.000 $\mu\text{g/mL}$).



Como observado, todos os tratamentos apresentaram atividades antioxidantes, mesmo que em níveis diferentes. Para o sequestro do radical DPPH, o extrato de acetona apresentou os maiores índices de eliminação sendo $63,12\% \pm 1,42$ ($21,94 \pm 0,21$ mg eq. AA/mg peso seco), já no método ABTS, o extrato etanólico alcançou a inibição máxima de $33,38\% \pm 0,47$ (TEAC de $139,03 \pm 3,21$) nas concentrações de 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Os dados demonstram um padrão de dose-dependência com a esperada diminuição das capacidades antioxidantes nas concentrações mais baixas. Neste caso, altas concentrações podem ser indicadas para futuras aplicações de

modo a elevar o teor de compostos antioxidantes nas condições testadas, refletindo na maior valorização dos produtos derivados de *S. obliquus*.

Tabela 4: Atividade antioxidante dos extratos de *S. obliquus* expressas em termos equivalentes a Trolox (ABTS) e ao ácido ascórbico (Capacidade antioxidante total). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e as diferenças consideradas significativas a $p < 0,05$.

Extratos	DPPH (mg ácido ascórbico/ g de peso seco)	ABTS (μ mol de Trolox/ g de peso seco)	Capacidade antioxidante total (mg ácido ascórbico/ g de peso seco)
Água	12,61 $\pm$ 1,51	25,7 $\pm$ 3	18,40 $\pm$ 0,76
Etanol	15,84 $\pm$ 0,45	139,03 $\pm$ 3,21	20,19 $\pm$ 0,912
Acetona	21,94 $\pm$ 0,21	60,7 $\pm$ 3,46	58,77 $\pm$ 3,60
Hexano	1,09 $\pm$ 0,15	14,3 $\pm$ 3,46	71,44 $\pm$ 5,77

A porcentagem de inibição no método DPPH foi significativamente superior que a relatada por Ibrahim et al., (2021) no qual o tratamento de *S. obliquus* alcançou atividade máxima de 16,81% utilizando um extrato na concentração e 15 mg/mL. Os valores de TEAC obtidos do teste ABTS também foram superiores em relação aos dados obtidos pela *S. obliquus* e *S. dimorphus* em um estudo recente de Santhakumaran et al., (2020). As menores atividades para os extratos de água e hexano nos métodos DPPH e ABTS, estão em concordância aos resultados relatados por Bulut et al. (2019), onde também foi demonstrado que solventes como acetona e etanol/água apresentaram percentuais mais expressivos. Isso se deve ao fato de que a *S. obliquus* é grande produtora de produção de carotenóides como β -caroteno e luteína, além de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) que apresentam notável capacidade antioxidante (PATIAS et al., 2017; CONDE et al., 2021). Solventes orgânicos como acetona são comumente usados na extração de carotenóides da espécie, como demonstrado por Amaro et al., (2015) e segundo os autores, o extrato etanólico é capaz de isolar parte dos PUFAs e carotenóides com caráter hidrofóbico, o que reflete diretamente na atividade antioxidante dos dois tratamentos. Outro fator que está intimamente ligado a atividade antioxidante, são os teores de compostos fenólicos totais como observado para a *S. subspicatus* (DANTAS et al., 2019). Considerando que apenas o extrato de etanol e acetona apresentaram teores detectáveis de tais metabólitos, possivelmente há uma correlação com a atividade antioxidante obtida, em adição aos fatores abordados anteriormente.

A Capacidade Antioxidante Total (CAT) (Tabela 4), apresentou a maior atividade no extrato de hexano $71,44 \pm 5,77$ mg eq. AA/g seguida do tratamento de acetona com $58,77 \pm 3,60$ mg eq. AA/g. Os valores foram significativamente superior aos obtidos por El-tablawy et al., (2020) que obteve valores máximos de CAT de 36,33 mg eq. AA/g de peso seco para o extrato metanólico, na mesma concentração testada (10 mg/mL). O hexano é um solvente apolar bastante eficiente na extração de lipídeos da biomassa microalgal, especialmente PUFA's (ROCHA et al., 2019), isso sugere que apesar do baixo teor de lipídeos obtido na biomassa, a alta concentração do extrato de hexano possivelmente favoreceu o acúmulo de compostos lipofílicos bioativos o que refletiu no aumento da atividade oxidante.

As diferenças observadas nos dados em comparação aos descritos na literatura, podem estar relacionadas aos parâmetros de cultivo e sua relação com a produção de compostos antioxidantes, como os carotenóides de *S. obliquus* (GUEDES et al., 2011). O estresse luminoso e bem como a depleção de compostos nitrogenados são estratégias efetivas e bastante aplicadas para a espécie visando o acúmulo de carotenóides e ácidos graxos com inúmeras aplicações terapêuticas (PAGELS et al., 2021; SHEN et al., 2015). Dessa forma, os resultados obtidos se mostram essenciais para a valorização do potencial dietético da microalga e sugerem possíveis modulações nos parâmetros de cultivo a fim de otimizar a produção de metabólitos bioativos.

3.6 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A capacidade de inibição das enzimas tripsina, quimotripsina, pepsina, amilase e lipase pelos diferentes extratos de *S. obliquus* foram expressos em termos de porcentagem de atividade residual (Figura 5). Para a tripsina, apenas o extrato etanólico apresentou uma inibição significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo ($91,68\% \pm 1,99$), diferente do tratamento com quimotripsina em que todos os extratos apresentaram inibições significativas ($p > 0,001$), em especial o extrato aquoso ($54,59\% \pm 1,37$) e hexânico ($54,2\% \pm 1,81$). Para a pepsina, os extratos também apresentando inibição ($p > 0,001$) porém em menor nível em relação à quimotripsina, com o extrato etanólico apresentando os maiores valores ($72,73\% \pm 2,70$).

Fatores antinutricionais podem ser divididos em dois grupos principais, o primeiro corresponde a espécies de natureza proteica, como inibidores de proteases e lectinas, já o segundo, corresponde a compostos não proteicos, sendo os principais as saponinas, alcalóides e alguns tipos de compostos fenólicos como os taninos (SÁNCHEZ-CHINO et al., 2015). Tais compostos quando ingeridos, podem afetar a assimilação de nutrientes e consequentemente gera efeitos fisiológicos deletérios ao organismo, possuindo papel importante na caracterização de novas fontes dietéticas seguras (THAKUR et al., 2019). Um estudo recente aponta a presença

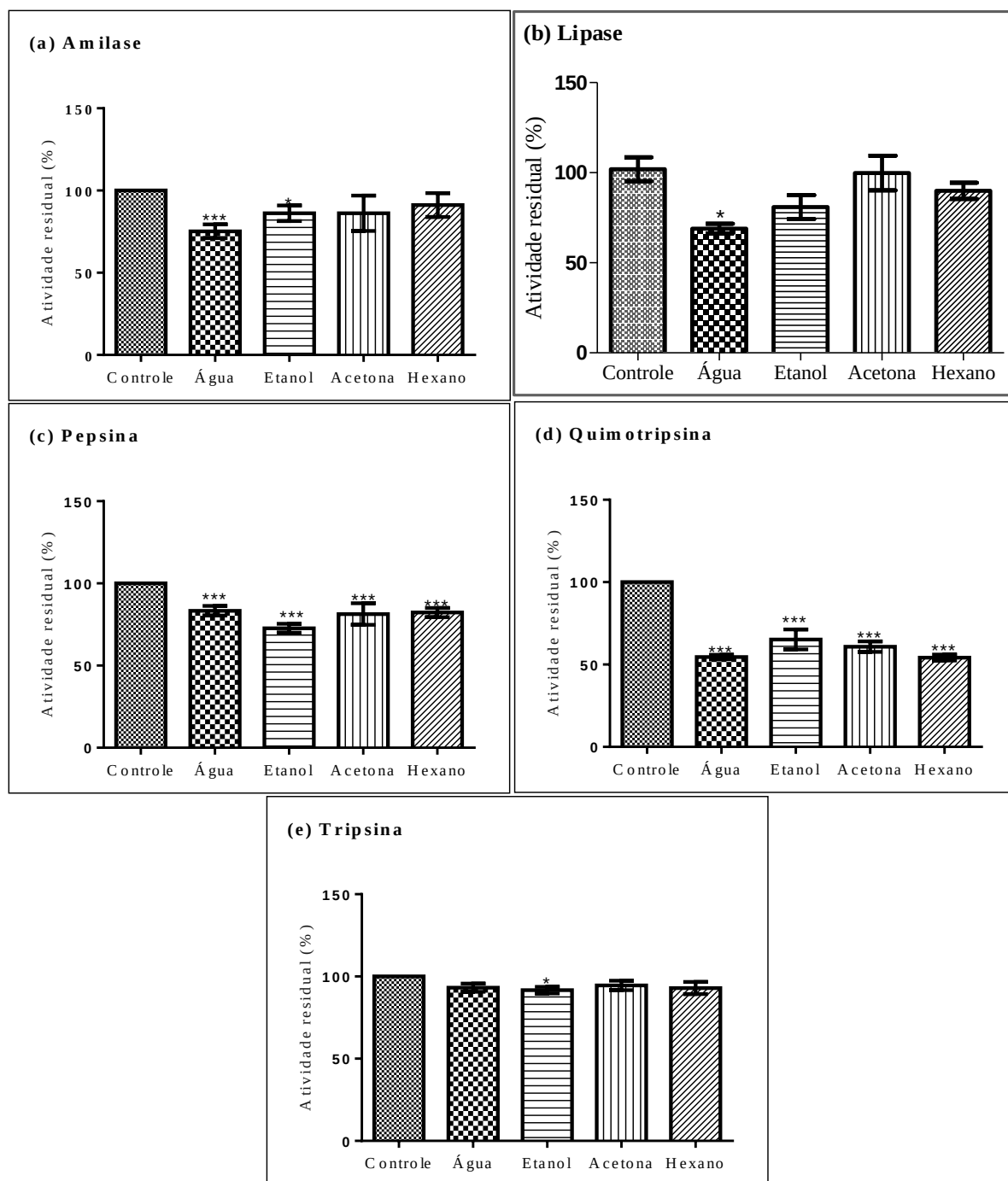
de inibidores de proteases digestivas em macroalgas como a *Ulva ohoi*, onde o efeito inibitório foi dependente da dosagem do extrato aquoso, não ficando claro o tipo de mecanismo envolvido na inibição (VIZCAÍNO et al., 2020).

O conhecimento sobre inibidores de proteases de microalgas ainda é escasso, porém, estudos *in vivo* tem demonstrado resultados promissores sobre a segurança alimentar da biomassa e compostos do gênero *Scenedesmus* (PATNAIK et al., 2019; TOMÁS-ALMENAR et al., 2018), o que sugere que a nível fisiológico, tais fatores antinutricionais, possivelmente não afetam de forma significativa a digestibilidade e o consumo da microalga.

A inibição de enzimas digestivas como a α -amilase é demonstrada como uma estratégia para retardar a digestão de carboidratos com a consequentemente diminuição dos níveis de glicose pós-prandial. Entretanto, diante dos possíveis efeitos colaterais de inibidores sintéticos, fontes naturais estão sendo cada vez mais exploradas tendo em vista a diversidade de metabólitos bioativos com potencial ação antidiabética (RAHIMZADEH et al., 2014). A diabetes mellitus tipo 2 é um distúrbio metabólico caracterizado pelo estado de hiperglicemia associada ao aumento da resistência periférica da insulina, em conjunto uma relativa deficiência do hormônio, em decorrência da disfunção das células β (VIEIRA et al., 2019).

No presente estudo, as maiores inibições de α -amilase foram observadas no extrato de água ($75,21\% \pm 4,21$), seguida do extrato etanólico com $86,15\% \pm 4,73$. Inibições moderadas de amilase por frações de aminoácidos de *S. obliquus* foram demonstradas recentemente por Siahbalaei et al. (2021), onde foi obtido uma EC50 de $298 \pm 9,0 \mu\text{g/mL}$ o que corrobora com o fato de o extrato aquoso apresentar as maiores concentrações de proteína entre os tratamentos. Para *S. bajacalifornicus*, os maiores índices de inibição também foram obtidos no extrato aquoso (60%), já o extrato etanólico da espécie apresentou 28,63% de inibição enzimática, sendo resultados superiores ao do presente estudo. Além de inibidores de natureza proteica, estudos mostram que a inibição de amilase pode estar associada a inúmeros metabólitos, como por exemplo, compostos fenólicos (flavonóides e taninos), carotenóides e ácidos graxos (PAPOUTSIS et al., 2021), e possivelmente, as diferenças nas concentrações destes compostos expliquem as divergências encontradas com a literatura.

Figura 4: Porcentagem de atividade residual para os quatro extratos, referentes às proteases (a) Amilase, (b) lipase (c) pepsina (d) quimotripsina e (e) tripsina, considerando o controle positivo como 100% de atividade. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$.



No ensaio de inibição de lipase, apenas o extrato aquoso apresentou inibição significativa ($p > 0,05$) com atividade residual de $(68,95\% \pm 2,67)$. Assim como no teste de amilase, é possível que a fração aquosa (extraída com NaCl 0,9%) de fato contenha a maior quantidade de proteínas e peptídeos bioativos capazes de inibir moderadamente as atividades das enzimas. A gordura proveniente dos alimentos é absorvida no intestino pela ação da lipase pancreática que hidrolisa os triacilgliceróis gerando ácidos graxos e monoacilgliceróis que são

facilmente assimiláveis (MOHAMED et al., 2014). Os inibidores de lipase são utilizados como estratégia para diminuir a digestão da gordura, com a consequente diminuição dos níveis de lipídeos no sangue, atuando, portanto, no tratamento de doenças metabólicas como a obesidade (LIU et al., 2020). Além de um problema de um problema de saúde pública mundial, estudos apontam a obesidade como dos fatores de risco que desencadeiam a resistência à insulina, que leva ao desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2, entre outros problemas crônicos (RATHOD et al., 2021).

O estudo realizado por SILVA et al., (2020b) demonstrou o potencial nutracêutico das proteínas da *S. obliquus* em modelos in vivo exibindo atividades hipoglicêmica e hipolipidêmica, não apresentando nenhuma alteração significativa no peso dos animais e na digestibilidade proteica. Uma outra proposta que pode ser adotada é o consórcio de microalgas, como exibido por KUMAR et al., (2015), onde a *S. dimorphus* e *Schroederiella apiculata* foi aplicado em um estudo in vivo envolvendo ratos Wistar como modelo de síndrome metabólica induzida, observando ao fim dos experimentos que as proteínas e fibras das microalgas foram capazes de reverter a condição dos animais de forma significativa, diminuindo os efeitos das alterações metabólicas relacionadas à obesidade. Os resultados das análises, apoiados em dados promissores da literatura, sugere o potencial da espécie no tratamento de disfunções crônicas e uso seguro na alimentação, necessitando de estudos complementares sobre a segurança alimentar da cepa.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E EXOPOLISSACARÍDEOS

Quando avaliada a atividade hemolítica dos extratos de *S. obliquus* observou-se que a fração aquosa e hexânica não apresentaram capacidade significativa de hemólise frente à solução de eritrócitos de camundongo em nenhuma das concentrações testadas (1000, 500, 200 e 100 µg/mL). Saponinas são moléculas hidrofóbicas cíclicas que apresentam ação lítica notável em eritrócitos relatadas para o gênero *Scenedesmus*, onde são comumente extraídos em solventes como etanol e acetona. (PATIL et al., 2019; MANAARGADOO-CATIN et al., 2016). Tal fato explicaria os maiores níveis de hemólise observados no extrato etanólico de 31,88% ± 3,26 e 52,45% ± 3,28 para as concentrações de 1000 e 500 µg/mL, respectivamente. A fração de EPS apresentou níveis significativos nas duas maiores concentrações testadas (1000 e 500 µg/mL) especialmente para o extrato etanólico. De modo geral, a maior parte dos

tratamentos apresentaram níveis baixos ou ausência de hemólise, informações estas que serão essenciais para futuros delineamentos e aplicações da *S. obliquus*.

Tabela 5: Porcentagem de hemólise apresentado pelos extratos e exopolissacarídeos a partir da biomassa de *S. obliquus*. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Água	Etanol	Acetona	Hexano	EPS	Controle Positivo
1000	-	31,88 $\pm$ 3,26***	1,53 $\pm$ 0,22***	-	8,45 $\pm$ 0,58***	100 $\pm$ 3,18
500	-	52,45 $\pm$ 3,28***	2,14 $\pm$ 0,41***	-	6,89 $\pm$ 1,45***	-
200	-	-	-	-	1,22 $\pm$ 0,48***	-
100	-	-	-	-	-	-

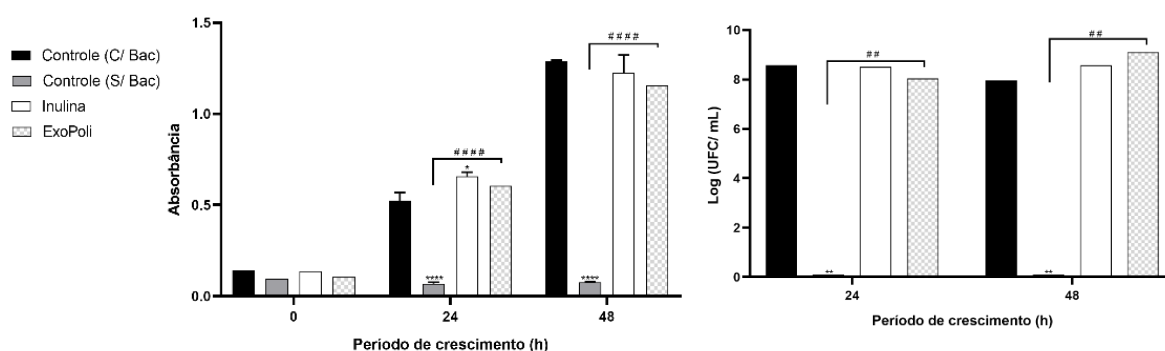
3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DOS EPS

Quanto a avaliação dos ensaios prebióticos, observa-se que, os tratamentos com EPS (em função da absorbância e em UFC/mL) foram capazes de promover o crescimento de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* (Figura 6) aumentando o número de colônias e consequentemente a absorbância ao longo do período de 48h. O mesmo padrão foi observado para o controle inulina, um prebiótico comercial, não havendo diferenças significativas entre as amostras de EPS e o controle utilizado.

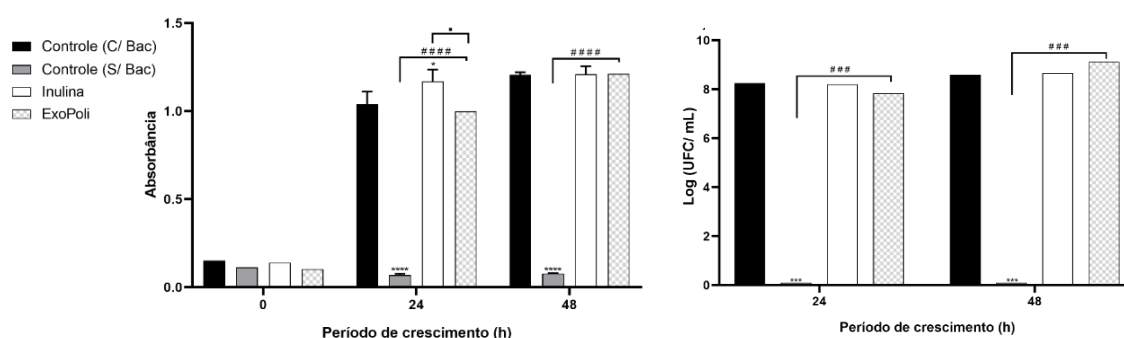
Poucos estudos foram realizados sobre o potencial prebiótico de polissacarídeos de microalgas, nos quais envolvem principalmente espécies como *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* e *Euglena* sp. (BHATTAD et al., 2021; LEAL et al., 2017). Exopolissacarídeos de fontes bacterianas são bastante estudados graças a seus potenciais aplicações dietéticas como emulsificantes, estabilizantes, intensificadores de viscosidade e atividade antioxidante e prebiótica, sendo cada mais aplicados a produtos lácteos como iogurtes (KORCZ E VARGA 2021; TIWARI et al., 2021). Os resultados sugerem que os EPS produzidos pela *S. obliquus* podem promover efeitos benéficos à saúde como uma fonte dietética segura.

Figura 5: Atividade prebiótica *in vitro* do exopolissacarídeo ao longo de um período de crescimento de 48 h de *L. rhamnosus* (A) e *L. plantarum* (B) com leituras a 600nm. Os respectivos resultados dos tratamentos em UFC/mL estão dispostos nas figuras (C) e (D). Controle: Meio com bactéria (C/ Bac). Controle: Meio sem bactéria (S/ Bac). Inulina (controle positivo). ExoPoli: exopolissacarídeo. As diferenças foram consideradas significativas: **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (C/ Bac), ### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (S/ Bac) e $p < 0,05$ quando comparado a inulina.

A *Lactobacillus rhamnosus*



B *Lactobacillus plantarum*



3.9. IMPLICAÇÕES DA PESQUISA

Atualmente, a biomassa de microalgas pode ser direcionada para diversos setores industriais, desde o desenvolvimento de fármacos, produção de biocombustíveis ou integradas nas dietas humana e animal. Neste caso, elas oferecem uma fonte de proteínas com uma qualidade superior a inúmeras fontes vegetais altamente consumidas como arroz, vegetais e trigo, além de produzirem inúmeras classes de moléculas bioativas, conferindo a estes alimentos um notável potencial nutracêutico (RIZWAN et al., 2018). As informações obtidas no presente estudo contribuem para o conhecimento de uma espécie obtida em um reservatório local, e com base nos resultados obtidos, múltiplos direcionamentos podem ser adotados para investigações futuras com a *S. obliquus* do Semiárido brasileiro e seus produtos derivados, como sugerido na Tabela 6.

Tabela 6: Diferentes aplicações biotecnológicas para produtos de *S. obliquus* com base no presente estudo.

Principais resultados	Setores	Possíveis aplicações	Referências
-----------------------	---------	----------------------	-------------

Proteínas (40,56%)	Alimentação humana e animal	Suplementação	(SILVA et al., 2020; GONG et al., 2019)
Carboidratos (25,03%)	Alimentação humana e animal	Prebióticos	(ÇELEKLI et al., 2019)
Exopolissacarídeos		Evitar danos causados por espécie reativas de oxigênio (síndromes metabólicas, e prevenção de inúmeras doenças)	(IBRAHIM et al., 2021; ASLAM et al., 2021)
Atividade antioxidante (DPPH- 63,12%; ABTS- 33,38%; CAT- 71,44 ± 5,77 mg EAA/ g)	Alimentação Farmácia Cosmética		
Inibição enzimática (α -amilase e lipase)	Nutracêutica Farmácia	Tratamento de disfunções metabólicas como obesidade e diabetes tipo II.	(UNNIKRISHNAN et al., 2015; SIBI et al., 2015)

4 CONCLUSÕES

No presente estudo, foi realizada uma investigação do potencial biotecnológico da clorófito *S. obliquus* isolada no Semiárido pernambucano (Brasil). Os dados obtidos revelam o potencial da microalga como produtora de compostos antioxidantes, inibidores de enzimas de interesse terapêutico como a α -amilase e lipase, além de demonstrar atividade prebiótica frente a duas espécies de lactobacilos. Na atividade antibacteriana, não foi observada inibição significativa dos extratos e os ensaios hemolíticos sugerem a presença de componentes antinutricionais como saponinas, em especial no extrato etanólico, sendo pouco significativa para a fração de acetona e EPS e nula para as frações de água e hexano. Após sucessivas extrações, foi possível avaliar a presença de compostos como amido na biomassa residual, necessitando de maiores investigações que possibilitem o aproveitamento integral do produto. A composição centesimal revelou um alto teor de proteínas na biomassa o que evidencia o seu grande valor dietético para uso animal e na alimentação humana. Em geral, a hipótese inicial

foi confirmada e estudos complementares são necessários para a avaliação da segurança alimentar da *S. obliquus* como fonte de compostos nutracêuticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento da pesquisa, ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ/UFPE) e ao Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI/UFRPE) pelos subsídios que permitiram a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABU-GHOSH, S.; DUBINSKY, Z.; VERDELHO, V.; ILUZ, D. Unconventional high-value products from microalgae: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 329, n. February, p. 124895, 2021.
- AFIFY, A. E. M. M. R.; EL BAROTY, G. S.; EL BAZ, F. K.; ABD EL BAKY, H. H.; MURAD, S. A. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 399–408, 2018.
- AHMAD ANSARI, F.; SHRIWASTAV, A.; KUMAR GUPTA, S.; RAWAT, I.; BUX, F. Exploration of microalgae biorefinery by optimizing sequential extraction of major metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], 2017.
- ALSENANI, F.; TUPALLY, K. R.; CHUA, E. T.; ELTANAHY, E.; ALSUFYANI, H.; PAREKH, H. S.; SCHENK, P. M. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 1834–1841, 2020.
- AMARO, H. M.; FERNANDES, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SOUSA-PINTO, I.; MALCATA, F. X.; GUEDES, A. C. Effect of 100âncer100l system on extractability of lipidic 100âncer100lula of *Scenedesmus obliquus* (M2-1) and *Gloeotheca* sp. on 100âncer100lular scavenging capacity thereof. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 6453–6471, 2015.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **AOCS**. Official Procedure. Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction. P. 1-4, 2017;
- AMORIM, M. L.; SOARES, J.; VIEIRA, B. B.; LEITE, M. de O.; ROCHA, D. N.; ALEIXO, P. E.; FALCONÍ, J. H. H.; XAVIER JÚNIOR, M. de L.; ALBINO, L. F. T.; MARTINS, M. A. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 270, 2021.
- NA, M.; GAO, L.; ZHAO, W.; CHEN, W.; LI, M. Effects of nitrogen forms and supply mode on lipid production of microalga *Scenedesmus obliquus*. **Energies**, [s. l.], v. 13, n. 3, 2020.

ANGELAALINCY, M.; SENTHILKUMAR, N.; KARPAGAM, R.; GNANA KUMAR, G.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Enhanced Extracellular Polysaccharide Production and Self-Sustainable Electricity Generation for PAMFCs by *Scenedesmus* sp. SB1. **ACS Omega**, [s. l.], 2017.

ASLAM, A.; BAHADAR, A.; LIAQUAT, R.; SALEEM, M.; WAQAS, A.; ZWAWI, M. Algae as na attractive source for cosmetics to 101âncer environmental stress. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 772, p. 144905, 2021.

BADIREDDY, A. R.; CHELLAM, S.; GASSMAN, P. L.; ENGELHARD, M. H.; LEA, A. S.; ROSSO, K. M. Role of 101âncer101lular polymeric substances in bioflocculation of activated sludge microorganisms under glucose-controlled conditions. **Water Research**, [s. l.], v. 44, n. 15, p. 4505–4516, 2010.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? **Algal Research**, [s. l.], v. 31, p. 107–115, 2018.

BHATTAD, T.; KORADIYA, A.; PRAKASH, G. Prebiotic activity of paramylon isolated from heterotrophically grown *Euglena gracilis*. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. e07884, 2021.

BOLD, H.C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bull. Torrey Bot. Club.**, 76, 101–8, 1949.

CATARINA GUEDES, A.; BARBOSA, C. R.; AMARO, H. M.; PEREIRA, C. I.; XAVIER MALCATA, F. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial 101âncer101l 101âncer101 food pathogens. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 862–870, 2011.

ÇELEKLI, A.; ALSLIBI, Z. A.; BOZKURT, H. üseyin. Influence of incorporated *Spirulina platensis* on the growth of microflora and physicochemical properties of ayran as a functional food. **Algal Research**, [s. l.], v. 44, p. 101710, 2019.

CONDE, T. A.; NEVES, B. F.; COUTO, D.; MELO, T.; NEVES, B.; COSTA, M.; SILVA, J.; DOMINGUES, P.; DOMINGUES, M. R. Microalgae as Sustainable Bio-Factories of Healthy Lipids: Evaluating Fatty Acid Content and Antioxidant Activity. **Marine drugs**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 357, 2021.

DANTAS, D. M. de M.; OLIVEIRA, C. Y. B. De; COSTA, R. M. P. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. das G.; GÁLVEZ, A. O.; BEZERRA, R. de S. Evaluation of 101âncer101lular and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 318–326, 2019.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Métodos Analíticos**. Método n.53. p.247-248, 2017;

DE CARVALHO CARNEIRO, D.; MASCARENHAS OLIVEIRA, M.; DA CUNHA LIMA, S. T. Estimating protein quantities from microalgae: protein per biomass 101âncer101lula, spectroscopic concentration, and lectin 101âncer101l. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 2535–2540, 2019.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2009.

DEVI, N. D.; TIWARI, R.; GOUD, V. V. Cultivating *Scenedesmus* sp. on substrata coated with cyanobacterial-derived 102âncer102lular polymeric substances for enhanced biomass productivity: a novel harvesting approach. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], p. 1–13, 2021.

DI CAPRIO, F.; ALTIMARI, P.; PAGNANELLI, F. Sequential extraction of lutein and β -carotene from wet microalgal biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 95, n. 11, p. 3024–3033, 2020.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Effect of extraction 102âncer102l on total phenol 102âncer102l, total flavonoid 102âncer102l, and 102âncer102lular activity of *Limnophila* 102âncer102lu. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 296–302, 2014.

DRIRA, M.; ELLEUCH, J.; HLIMA, H. Na; HENTATI, F.; GARDARIN, C.; RIHOUEY, C.; CERF, D. Le; MICHAUD, P.; ABDELKAFI, S.; FENDRI, I. Optimization of exopolysaccharides production by *porphyridium sordidum* and their potential to induce defense responses in *arabidopsis thaliana* 102âncer102 fusarium oxysporum. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–18, 2021.

EL-NAGGAR, N. E. A.; HUSSEIN, M. H.; SHAABAN-DESSUUKI, S. A.; DALAL, S. R. Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–19, 2020.

EL-TABLAWEY, N. H.; MANSOUR, H. A.; SHAABAN, A. E. S. M. Antioxidant activities of some edaphic algae in Egypt. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2020.

FAN, H.; WANG, K.; WANG, C.; YU, F.; HE, X.; MA, J.; LI, X. A comparative study on growth characters and 102âncer102lul removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes. **Environmental Technology and Innovation**, [s. l.], v. 19, 2020.

FENG, P.; YANG, K.; XU, Z.; WANG, Z.; FAN, L.; QIN, L.; ZHU, S.; SHANG, C.; CHAI, P.; YUAN, Z.; HU, L. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 173, p. 406–414, 2014

FU, Y.; CHEN, T.; CHEN, S. H. Y.; LIU, B.; SUN, P.; SUN, H.; CHEN, F. The potentials and challenges of using microalgae as na 102âncer102lula to produce meat analogues. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 112, n. February, p. 188–200, 2021.

GIM, G. H.; KIM, J. K.; KIM, H. S.; KATHIRAVAN, M. N.; YANG, H.; JEONG, S.-H.; KIM, S. W. Comparison of biomass production and total lipid 102âncer102l of freshwater

green microalgae cultivated under various culture conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 2013 37:2, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 99–106, 2013.

GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; DE BRABANTER, J.; DE COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid 103âncer103l. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1477–1486, 2012.

GONG, Y.; BANDARA, T.; HUNTLEY, M.; JOHNSON, Z. I.; DIAS, J.; DAHLE, D.; SØRENSEN, M.; KIRON, V. Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential 103âncer103lula in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, [s. l.], v. 501, p. 455–464, 2019.

GOYAL, M.; BARANWAL, M.; PANDEY, S. K.; REDDY, M. S. Hetero-Polysaccharides Secreted from *Dunaliella salina* Exhibit Immunomodulatory Activity Against Peripheral Blood Mononuclear Cells and RAW 264.7 Macrophages. *Indian Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 428, 2019.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; PEREIRA, R. D.; MALCATA, F. X. Effects of temperature and pH on growth and 103âncer103lular 103âncer103l of the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1218–1224, 2011.

GUEDES, A. C.; GIÃO, M. S.; SEABRA, R.; FERREIRA, A. C. S.; TAMAGNINI, P.; MORADAS-FERREIRA, P.; MALCATA, F. X. Evaluation of the 103âncer103lular activity of cell extracts from microalgae. **Marine drugs**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1256–1270, 2013.

HAMOUDA, R. A.; EL-NAGGAR, N. E. A.; ABOU-EL-SEOUD, G. W. Enhancement of pharmaceutical and bioactive 103âncer103lula of *Scenedesmus obliquus* grown using 103âncer103lu concentrations of KNO₃. **International Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 758–765, 2018.

HENCHION, M.; HAYES, M.; MULLEN, A. M.; FENELON, M.; TIWARI, B. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. **Foods**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1–21, 2017.

HLAING, S. A. A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through 103âncer optimization and development of microalgae based functional chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 1090–1099, 2019.

HO, S. H.; KONDO, A.; HASUNUMA, T.; CHANG, J. S. Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 163–171, 2013. A.

HO, S. H.; LI, P. J.; LIU, C. C.; CHANG, J. S. Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 145, p. 142–149, 2013. B.

HUSSAIN, J.; WANG, X.; SOUSA, L.; ALI, R.; RITTMANN, B. E.; LIAO, W. Using non-metric multi-dimensional scaling analysis and multi-objective optimization to evaluate green

algae for production of proteins, carbohydrates, lipids, and simultaneously fix 104âncer104 dioxide. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 141, 2020.

IBRAHIM, M. R.; HAMOUDA, R. A.; TAYEL, A. A.; AL-SAMAN, M. A. Anti-cholesterol and Antioxidant Activities of Independent and Combined Microalgae Aqueous Extracts In Vitro. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], 2021.

IBRAHIM, N. A.; MATLOUB, A. A.; EL-SAYED, A. E. K. B.; ALY, H. F.; ABDELSAMIAE, A. S. Phytochemical and biological studies of carotenoids in some microalgae (*Dunaliella salina*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina platensis*). **Egyptian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 2343–2353, 2021. B.

ISMAIL, B.; NAMPOOTHIRI, K. M. Production, purification and structural characterization of na exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 192, n. 12, p. 1049–1057, 2010.

KORCZ, E.; VARGA, L. Exopolysaccharides from lactic acid 104âncer104l: Techno-functional application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 110, p. 375–384, 2021.

KRATZER, R.; MURKOVIC, M. Food Ingredients and Nutraceuticals from Microalgae: Main Product Classes and Biotechnological Production. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2021.

KUMAR, G.; NGUYEN, D. D.; HUUY, M.; SIVAGURUNATHAN, P.; BAKONYI, P.; ZHEN, G.; KOBAYASHI, T.; XU, K. Q.; NEMESTÓTHY, N.; CHANG, S. W. Effects of light intensity on biomass, carbohydrate and fatty acid compositions of three 104âncer104lu mixed consortia from natural ecological water bodies. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 230, p. 293–300, 2019.

KUMAR, K. S.; KUMARI, S.; SINGH, K.; KUSHWAHA, P. Influence of Seasonal Variation on Chemical Composition and Nutritional Profiles of Macro- and Microalgae. **Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing**, p. 14-71, 2021;

KUMAR, S. A.; MAGNUSSON, M.; WARD, L. C.; PAUL, N. A.; BROWN, L. A Green Algae Mixture of *Scenedesmus* and *Schroederiella* Attenuates Obesity-Linked Metabolic Syndrome in Rats. **Nutrients**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 2771, 2015.

JAEGER, L.; VERBEEK, R. E. M.; DRAAISMA, R. B.; MARTENS, D. E.; SPRINGER, J.; EGGINK, G.; WIJFFELS, R. H. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) 104âncer104 104âncer104lul and characterization. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2014.

RUGNINI, L.; ROSSI, C.; ANTONAROLI, S.; RAKAJ, A.; BRUNO, L. The influence of light and 104âncer104lu starvation on morphology, biomass and lipid 104âncer104l in seven strains of green microalgae as a source of biodiesel. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1–13, 2020.

LEAL, B. E. S.; PRADO, M. R.; GRZYBOWSKI, A.; TIBONI, M.; KOOP, H. S.; SCREMIN, L. B.; SAKUMA, A. C.; TAKAMATSU, A. A.; SANTOS, A. F. Dos; CAVALCANTI, V. F.; FONTANA, J. D. Potential prebiotic oligosaccharides from aqueous

thermopressurized phosphoric acid hydrolysates of microalgae used in treatment of gaseous steakhouse waste. **Algal Research**, [s. l.], v. 24, p. 138–147, 2017.

LEVASSEUR, W.; PERRÉ, P.; POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 41, p. 107545, 2020.

LIU, T. T.; LIU, X. T.; CHEN, Q. X.; SHI, Y. Lipase Inhibitors for Obesity: A Review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 128, p. 110314, 2020.

MANAARGADOO-CATIN, M.; ALI-CHERIF, A.; POUGNAS, J. L.; PERRIN, C. Hemolysis by surfactants — A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 228, p. 1–16, 2016.

MANSOURI, H.; HAJIZADEH, F. Interaction Effects of Salinity, High Light Intensity and Acetate on Growth and Pigment Production on *Scenedesmus obliquus*. **Iranian Journal of Science and Technology**, Transaction A: Science, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 1821–1826, 2018.

MARREZ, D. A.; NAGUIB, M. M.; SULTAN, Y. Y.; HIGAZY, A. M. Antimicrobial and 105âncer105lul activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e01404, 2019. A.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ELKHAYAT, E. S.; EL DINE, R. S. Natural anti-obesity 105âncer105. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 269–284, 2014.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. S. V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 76, n. January, p. 493–506, 2017.

NASCIMENTO, T. C.; CAZARIN, C. B. B.; MARÓSTICA, M. R.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Microalgae carotenoids intake: Influence on cholesterol levels, lipid peroxidation and 105âncer105lular enzymes. **Food Research International**, [s. l.], v. 128, p. 108770, 2020.

NASCIMENTO, T. C.; PINHEIRO, P. N.; FERNANDES, A. S.; MURADOR, D. C.; NEVES, B. V.; DE MENEZES, C. R.; DE ROSSO, V. V.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Bioaccessibility and intestinal uptake of carotenoids from microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Food Research International**, [s. l.], v. 140, p. 110780, 2021.

NAGARAJAN, D.; VARJANI, S.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae – Nutritive value and techno-functional 105âncer105lula. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 150, p. 111549, 2021.

OLIVEIRA, C. Y. B.; ALMEIDA, A. J. G. da S.; SILVA, M. D. V. e; SANTOS, I. de L.; DANTAS, D. M. D. M. Prospecting the First Culture Collection of Algae of the Pernambuco Semiarid, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 27, 2019.

OLIVEIRA, C. Y. B.; VIEGAS, T. L.; DA SILVA, M. F. O.; FRACALOSSO, D. M.; LOPES, R. G.; DERNER, R. B. Effect of trace metals on growth performance and accumulation of lipids, proteins, and carbohydrates on the green microalga *Scenedesmus obliquus*. **Aquaculture International**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 1435–1444, 2020.

PAGELS, F.; AMARO, H. M.; TAVARES, T. G.; CASAL, S.; MALCATA, F. X.; SOUSA-PINTO, I.; GUEDES, A. C. Effects of irradiance of red and blue:red LEDs on *Scenedesmus obliquus* M2-1 optimization of biomass and high added-value compounds. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 1379–1388, 2021.

PANDEY, A.; GUPTA, A.; SUNNY, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, S. Multi-objective optimization of media 106âncer106lula for improved algae biomass, fatty acid and starch biosynthesis from *Scenedesmus* sp. ASK22 using desirability function approach. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 150, p. 476–486, 2020.

PAPOUTSIS, K.; ZHANG, J.; BOWYER, M. C.; BRUNTON, N.; GIBNEY, E. R.; LYNNG, J. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 338, p. 128119, 2021.

PATIAS, L. D.; FERNANDES, A. S.; PETRY, F. C.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. **Food Research International**, [s. l.], v. 100, p. 260–266, 2017.

PATIL, L.; KALIWAL, B. B. Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with in vitro pharmacological applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 979–994, 2019.

PATNAIK, R.; SINGH, N.; BAGCHI, S.; RAO, P.; MALLICK, N. Utilization of *Scenedesmus obliquus* Protein as a Replacement of the Commercially Available Fish Meal Under an Algal Refinery Approach. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019.

PATWAL, T.; BARANWAL, M. *Scenedesmus acutus* 106âncer106lular polysaccharides produced under increased concentration of sulphur and phosphorus exhibited enhanced proliferation of peripheral blood mononuclear cells. **3 Biotech**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 171, 2021.

PAVLISKO, A.; RIAL, A.; DE VECCHI, S.; COPPES, Z. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Parona signata* “Palometa”. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 289–308, 1997.

PŘIBYL, P.; PILNÝ, J.; CEPÁK, V.; KAŠTÁNEK, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, [s. l.], v. 16, p. 69–75, 2016.

PRIOR, R. L.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemical**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 4.290-4.302, 2005.

RAHIMZADEH, M.; JAHANSHAH, S.; MOEIN, S.; MOEIN, M. R. Evaluation of alpha-amylase inhibition by *Urtica dioica* and *Juglans regia* extracts. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 465, 2014.

RANADHEER, P.; KONA, R.; SREEHARSHA, R. V.; VENKATA MOHAN, S. Non-lethal nitrate supplementation enhances photosystem II efficiency in mixotrophic microalgae towards the synthesis of proteins and lipids. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 283, p. 373–377, 2019.

RATHOD, P.; YADAV, R. P. Anti-diabesity potential of various multifunctional natural molecules. **Journal of Herbal Medicine**, [s. l.], v. 27, p. 100430, 2021.

REGO, A. H. G.; RANGEL-JUNIOR, A.; COSTA, I. A. S. Brazilian Journal of Biology Phytoplankton scenario and microcystin in water during extreme drought in semiarid tropical water supplies, Northeastern Brazil. **Braz. J. Biol.**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 1–11, 2020.

ROCHA, D. N.; MARTINS, M. A.; SOARES, J.; VAZ, M. G. M. V.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; COVELL, L.; MENDES, L. B. B. Combination of trace elements and salt stress in 107âncer107lu cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 289, p. 121644, 2019.

ROCHA, R. P.; MACHADO, M.; VAZ, M. G. M. V.; VINSON, C. C.; LEITE, M.; RICHARD, R.; MENDES, L. B. B.; ARAUJO, W. L.; CALDANA, C.; MARTINS, M. A.; WILLIAMS, T. C. R.; NUNES-NESI, A. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. **Algal Research**, [s. l.], v. 28, p. 139–150, 2017.

RUGNINI, L.; ROSSI, C.; ANTONAROLI, S.; RAKAJ, A.; BRUNO, L. The influence of light and 107âncer107lu starvation on morphology, biomass and lipid 107âncer107l in seven strains of green microalgae as a source of biodiesel. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1–13, 2020.

SÁNCHEZ-CHINO, X.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; DÁVILA-ORTIZ, G.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJADAR, E.; SÁNCHEZ-CHINO, X.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; AVILA-ORTIZ, G. D.; ALVAREZ-GONZÁLEZ, I. Nutrient and Nonnutrient Components of Legumes, and Its Chemopreventive Activity: A Review. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], p. 1–10, 2015.

SANTHAKUMARAN, P.; AYYAPPAN, S. M.; RAY, J. G. Nutraceutical applications of twenty-five species of rapid-growing green-microalgae as indicated by their antibacterial, 107âncer107lular and mineral 107âncer107l. **Algal Research**, [s. l.], v. 47, p. 101878, 2020.

SANTOS, D. K. D. do N.; BARROS, B. R. da S.; FILHO, I. J. da C.; JÚNIOR, N. da S. B.; DA SILVA, P. R.; NASCIMENTO, P. H. do B.; LIMA, M. do C. A. De; NAPOLEÃO, T. H.; DE MELO, C. M. L. Pectin-like polysaccharide extracted from the leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus promotes 107âncer107lular, immunomodulatory and prebiotic effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], v. 26, p. 100263, 2021.

SHEN, X. F.; LIU, J. J.; CHU, F. F.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with 107âncer107lul

phosphorus supply in heterotrophic cultivation. **Applied Energy**, [s. l.], v. 158, p. 348–354, 2015.

SIAHBALAEI, R.; KAVOOSI, G.; NOROOZI, M. Protein nutritional quality, amino acid profile, anti-amylase and anti-glucosidase properties of microalgae: Inhibition and mechanisms of action through in vitro and in 108âncer studies. **LWT**, [s. l.], v. 150, p. 112023, 2021.

SIBI, G. Inhibition of lipase and inflammatory mediators by *Chlorella* lipid extracts for antiacne treatment. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 7, 2015.

SILVA, M. E. T. Da; CORREA, K. de P.; MARTINS, M. A.; DA MATTA, S. L. P.; MARTINO, H. S. D.; COIMBRA, J. S. dos R. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 65, 2020.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; SURESH, S.; PUGAZHENDHI, A.; MERCY NISHA PAULINE, J.; INCHAROENSAKDI, A. Response of *Scenedesmus* sp. to microwave treatment: Enhancement of lipid, exopolysaccharide and biomass production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 312, p. 123562, 2020.

TANG, D. Y. Y.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; TAO, Y.; HO, S. H.; SHOW, P. L. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 304, p. 122997, 2020.

THAKUR, A.; SHARMA, V.; THAKUR, A.; VISHAL SHARMA, C. Na overview of anti-nutritional factors in food. **International Journal of Chemical Studies**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2019.

TIWARI, S.; KAVITAKE, D.; DEVI, P. B.; HALADY SHETTY, P. Bacterial exopolysaccharides for improvement of technological, functional and rheological properties of yoghurt. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 183, p. 1585–1595, 2021.

TOMÁS-ALMENAR, C.; LARRÁN, A. M.; DE MERCADO, E.; SANZ-CALVO, M. A.; HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. *Scenedesmus almeriensis* from na integrated system waste-nutrient, as sustainable protein source for feed to 108âncer108 trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 497, p. 422–430, 2018.

UNNIKRISHNAN, P. S.; SUTHINDHIRAN, K.; JAYASRI, M. A. Alpha-amylase Inhibition and Antioxidant Activity of Marine Green Algae and its Possible Role in Diabetes Management. **Pharmacognosy Magazine**, [s. l.], v. 11, n. Suppl 4, p. S511, 2015.

VENDRUSCOLO, R. G.; FERNANDES, A. S.; FAGUNDES, M. B.; ZEPKA, L. Q.; DE MENEZES, C. R.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R. Development of a new method for simultaneous extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgal biomass. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], 2021.

VERA, C. R. De; CRESPI N, G. D.; DARANAS, A. H.; LOOGA, S. M.; LILLSUNDE, K.-E.; TAMMELA, P.; PER L , M.; HONGISTO, V.; VIRTANEN, J.; RISCHER, H.; MULLER, C. D.; NORTE, M.; FERNÁNDEZ, J. J.; SOUTO, M. L. Marine Microalgae: Promising Source for New Bioactive Compounds. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 317, 2018.

VIEIRA, R.; SOUTO, S. B.; S NCH Z-LÓPEZ, E.; MACHADO, A. L.; SEVERINO, P.; JOSE, S.; SANTINI, A.; FORTUNA, A.; GARCÍA, M. L.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome—Review of Classical and New Compounds: Part-I. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 152, 2019.

VIZCAÍNO, A. J.; GALAFAT, A.; SÁEZ, M. I.; MARTÍNEZ, T. F.; ALARC N, F. J. Partial Characterization of Protease Inhibitors of *Ulva ohnoi* and Their Effect on Digestive Proteases of Marine Fish. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 6, 2020.

WANG, Y.; ZHOU, Q.; LI, B.; LIU, B.; WU, G.; IBRAHIM, M.; XIE, G.; LI, H.; SUN, G. Differentiation in MALDI-TOF MS and FTIR spectra between two closely related species *Acidovorax oryzae* and *Acidovorax citrulli*. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 182, 2012.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1225–1244, 2016.

XU, H.; LIU, Y. Mechanisms of Cd²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ biosorption by aerobic granules. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 400–411, 2008.

ZHANG, J.; LIU, L.; REN, Y.; CHEN, F. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 761–767, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou a notável capacidade de síntese de moléculas de interesse biotecnológico pela *S. obliquus* e suas possíveis aplicações no setor alimentício. Além disso, para seu ingresso no setor nutracêutico, foram demonstrados alguns desafios que devem ser superados, como o alto custo de produção e processamento de seus metabólitos, além de aspectos relacionados a legislação, demandando maiores estudos sobre métodos de otimização das culturas e biossegurança, possibilitando sua comercialização de forma mais rentável e o desenvolvimento de regulações envolvendo o seu consumo. Em relação   *S. obliquus* isolada no Semiárido pernambucano, diferentes frações de extratos foram obtidas a partir de extrações sequenciais com diferentes solventes, cujas frações revelaram a presença de múltiplos metabólitos de interesse industrial, com destaque ao alto teor de proteínas e carboidratos na biomassa seca, sendo estes majoritariamente compostos de amido. A partir dos diferentes extratos e frações de EPS foram obtidas atividades biológicas de grande valor nutracêutico,

como antioxidantes, inibição de α -amilase e lipase, além da atividade prebiótica dos exopolissacarídeos, confirmando a hipótese inicial. Dessa forma, o estudo agregou conhecimento sobre uma espécie oriunda do semiárido pernambucano, evidenciando sua versatilidade e os possíveis direcionamentos da biomassa e dos produtos extracelulares e residuais, com o aproveitamento integral da microalga. Por fim, estudos complementares são necessários visando uma melhor elucidação da composição química da cepa, além de investigações sobre sua segurança alimentar e possíveis aplicações nutracêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABOMOHR, A. E. F.; ELADEL, H.; EL-ESAWI, M.; WANG, S.; WANG, Q.; HE, Z.; FENG, Y.; SHANG, H.; HANELT, D. Effect of lipid-free microalgal biomass and waste glycerol on growth and lipid production of *Scenedesmus obliquus*: Innovative waste recycling for extraordinary lipid production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 249, p. 992–999, 2018.
- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology** 2013 12:2, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 131–151, 2013.
- ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories** 2012 11:1, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2012.
- AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [s. l.], v. 7, p. 587, 2014.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALSENANI, F.; TUPALLY, K. R.; CHUA, E. T.; ELTANAHY, E.; ALSUFYANI, H.; PAREKH, H. S.; SCHENK, P. M. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 1834–1841, 2020.
- AMORIM, M. L.; SOARES, J.; VIEIRA, B. B.; LEITE, M. de O.; ROCHA, D. N.; ALEIXO, P. E.; FALCONÍ, J. H. H.; XAVIER JÚNIOR, M. de L.; ALBINO, L. F. T.; MARTINS, M. A. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 270, 2021.
- ARENAS, E. G.; RODRIGUEZ PALACIO, M. C.; JUANTORENA, A. U.; FERNANDO, S. E. L.; SEBASTIAN, P. J. Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges. **International Journal of Energy Research** [s. l.], 2016.

- ASSUNÇÃO, M. F. G.; AMARAL, R.; MARTINS, C. B.; FERREIRA, J. D.; RESSURREIÇÃO, S.; SANTOS, S. D.; VAREJÃO, J. M. T. B.; SANTOS, L. M. A. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 865–877, 2017.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 71, 2016.
- BAUDELET, P. H.; RICOCHON, G.; LINDER, M.; MUNIGLIA, L. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, p. 333–371, 2017.
- BERNAERTS, T. M. M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. M. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 107419, 2019.
- CANNELL, R. J. P.; KELLAM, S. J.; OWSIANKA, A. M.; WALKER, J. M. Microalgae and Cyanobacteria as a source of glycosidase inhibitors. **Journal of General Microbiology**, [s. l.], v. 133, n. 7, p. 1701–1705, 1987.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.
- CASTILLO, T.; RAMOS, D.; GARCÍA-BELTRÁN, T.; BRITO-BAZAN, M.; GALINDO, E. Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 176, p. 108183, 2021.
- CHEN, C. Y.; LEE, P. T.; CHUNG, H. T.; LO, T. C.; HUANG, C. C.; SHOW, P. L.; LIN, C. H.; CHANG, J. S. Improving protein production of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E by photobioreactor design and cultivation strategies. **Biotechnology journal**, [s. l.], v. 10, p. 905–914, 2015.
- CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.
- CHEN, W. C.; HSU, Y. C.; CHANG, J. S.; HO, S. H.; WANG, L. F.; WEI, Y. H. Enhancing production of lutein by a mixotrophic cultivation system using microalga *Scenedesmus obliquus* CWL-1. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 291, p. 121891, 2019.
- CHHANDAMA, M. V. L.; SATYAN, K. B.; CHANGMAI, B.; VANLALVENI, C.; ROKHUM, S. L. Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 15, p. 100771, 2021.
- CHOI, Y. K.; KUMARAN, R. S.; JEON, H. J.; SONG, H. J.; YANG, Y. H.; LEE, S. H.; SONG, K. G.; KIM, K. J.; SINGH, V.; KIM, H. J. LED light stress induced biomass and fatty acid production in microalgal biosystem, *Acutodesmus obliquus*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 145, p. 245–253, 2015.

CORONADO-REYES, J. A.; SALAZAR-TORRES, J. A.; JUÁREZ-CAMPOS, B.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 2061, p. 1–11, 2020.

COSTA, D. F. Da; BARBOSA, J. E. de L.; DANTAS, Ê. W. Productivity–diversity relationships in reservoir phytoplankton communities in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, [s. l.], v. 129, p. 64–70, 2016.

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. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 190, 2015.

DAMIANI, M. C.; POPOVICH, C. A.; CONSTENLA, D.; MARTÍNEZ, A. M.; DORIA, E.; LONGONI, P.; CELLA, R.; NIELSEN, E.; LEONARDI, P. I. Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 1423–1430, 2014.

DANTAS, D. M. de M.; OLIVEIRA, C. Y. B. De; COSTA, R. M. P. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. das G.; GÁLVEZ, A. O.; BEZERRA, R. de S. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 318–326, 2019.

DEBOWSKI, M.; ZIELIŃSKI, M.; KAZIMIEROWICZ, J.; KUJAWSKA, N.; TALBIERZ, S. Microalgae Cultivation Technologies as an Opportunity for Bioenergetic System Development—Advantages and Limitations. **Sustainability 2020, Vol. 12, Page 9980**, [s. l.], v. 12, n. 23, p. 9980, 2020.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1159–1179, 2016.

DOLGANYUK, V.; BELOVA, D.; BABICH, O.; PROSEKOV, A.; IVANOVA, S.; KATSEROV, D.; PATYUKOV, N.; SUKHIKH, S. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1–24, 2020.

ERMIS, H.; GUVEN-GULHAN, U.; CAKIR, T.; ALTINBAS, M. Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

FARIED, M.; SAMER, M.; ABDELSALAM, E.; YOUSEF, R. S.; ATTIA, Y. A.; ALI, A. S. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 79, p. 893–913, 2017.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; REIS, A.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M.; VERDELHO, V.; LLAMAS, B. The role of microalgae in the bioeconomy. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 61, p. 99–107, 2021.

FILHO, S. L. N.; FRANÇA, E. J.; JÚNIOR, M. M.; MOURA, A. N. Interactions between benthic microalgae, nutrients and benthic macroinvertebrates in reservoirs from the semi-arid Neotropical region. **Fundamental and Applied Limnology**, [s. l.], p. 237–254, 2019.

FIRUZI, O.; MIRI, R.; TAVAKKOLI, M.; SASO, L. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, p. 3871–3888, 2011.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B. De; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. **ArtMed**, v. 148, 2010.

FU, Y.; CHEN, T.; CHEN, S. H. Y.; LIU, B.; SUN, P.; SUN, H.; CHEN, F. The potentials and challenges of using microalgae as an ingredient to produce meat analogues. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 112, n. February, p. 188–200, 2021.

GARCÍA, J. L.; VICENTE, M. De; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1017, 2017.

GONÇALVES, V. D.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; TRIGUEROS, D. E. G.; SCHUELTER, A. R.; KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N. Combination of Light Emitting Diodes (LEDs) for photostimulation of carotenoids and chlorophylls synthesis in *Tetrademus* sp. **Algal Research**, [s. l.], v. 43, p. 101649, 2019.

GONG, L.; FENG, D.; WANG, T.; REN, Y.; LIU, Y.; WANG, J. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: Potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 6320–6337, 2020.

GRIFFITHS, M. J.; DICKS, R. G.; RICHARDSON, C.; HARRISON, S. T. Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel. Biodiesel - **Feedstocks and Processing Technologies**, [s. l.], n. November, 2011.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; PEREIRA, R. D.; MALCATA, F. X. Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1218–1224, 2011.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2021. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 21 October 2021.

GUO, W.; ZHU, S.; LI, S.; FENG, Y.; WU, H.; ZENG, M. Microalgae polysaccharides ameliorates obesity in association with modulation of lipid metabolism and gut microbiota in high-fat-diet fed C57BL/6 mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 182, p. 1371–1383, 2021.

HABIBI, Z.; IMANPOUR NAMIN, J.; RAMEZANPOUR, Z. Evaluation of antimicrobial activities of microalgae *Scenedesmus dimorphus* extracts against bacterial strains. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 23–34, 2018.

HEIMANN, K.; HUERLIMANN, R. Chapter 3 - Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species . In: KIM, S. **Handbook of marine microalgae – Biotechnology advance**, AP, 2015.

HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; RAVIKUMAR, R.; CARVALHO, I. S. Microalgae taxonomy and breeding. **Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics**, [s. l.], n. June, p. 44–53, 2013.

HLAING, S. A. A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 1090–1099, 2020.

HO, S. H.; CHEN, Y. Di; CHANG, C. Y.; LAI, Y. Y.; CHEN, C. Y.; KONDO, A.; REN, N. Q.; CHANG, J. S. Feasibility of CO₂ mitigation and carbohydrate production by microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation under outdoor conditions: Effects of seasonal changes. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2017.

HO, S. H.; YE, X.; HASUNUMA, T.; CHANG, J. S.; KONDO, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1448–1459, 2014.

HUANG, G. H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 38–46, 2010.

HYRSLOVA, I.; KRAUSOVA, G.; SMOLOVA, J.; STANKOVA, B.; BRANYIK, T.; MALINSKA, H.; HUTTL, M.; KANA, A.; DOSKOCIL, I.; CURDA, L. Prebiotic and immunomodulatory properties of the microalga *Chlorella vulgaris* and its synergistic triglyceride-lowering effect with bifidobacteria. **Fermentation**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1–10, 2021.

IBRAHIM, M. R.; HAMOUDA, R. A.; TAYEL, A. A.; AL-SAMAN, M. A. Anti-cholesterol and Antioxidant Activities of Independent and Combined Microalgae Aqueous Extracts *In Vitro*. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], 2021.

İSPIRLI, H.; DEMIRBAŞ, F.; DERTLI, E. Glucan type exopolysaccharide (EPS) shows prebiotic effect and reduces syneresis in chocolate pudding. *Journal of Food Science and Technology*, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 3821, 2018.

Jl, X.; CHENG, J.; GONG, D.; ZHAO, X.; QI, Y.; SU, Y.; MA, W. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 633, p. 593–599, 2018.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 4607–4638, 2013.

KANDASAMY, S.; ZHANG, B.; HE, Z.; BHUVANENDRAN, N.; EL-SEESY, A. I.; WANG, Q.; NARAYANAN, M.; THANGAVEL, P.; DAR, M. A. Microalgae as a multipotential role in commercial applications: Current scenario and future perspectives. **Fuel**, [s. l.], v. 308, p. 122053, 2022.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods** 2009 2:1, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of food science and technology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 412, 2011.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

KHAW, Y. S.; KHONG, N. M. H.; SHAHARUDDIN, N. A.; YUSOFF, F. M. A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 172, p. 105890, 2020.

LE-FEUVRE, R.; MORAGA-SUAZO, P.; GONZALEZ, J.; MARTIN, S. S.; HENRÍQUEZ, V.; DONOSO, A.; AGURTO-MUÑOZ, C. Biotechnology applied to *Haematococcus pluvialis* Fotow: challenges and prospects for the enhancement of astaxanthin accumulation. **Journal of Applied Phycology** 2020 32:6, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 3831–3852, 2020.

LELIAERT, F.; SMITH, D. R.; MOREAU, H.; HERRON, M. D.; VERBRUGGEN, H.; DELWICHE, C. F.; DE CLERCK, O. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LEÓN-SAIKI, G. M.; REMMERS, I. M.; MARTENS, D. E.; LAMERS, P. P.; WIJFFELS, R. H.; VAN DER VEEN, D. The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus*. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, p. 160–167, 2017.

LEVASSEUR, W.; PERRÉ, P.; POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 41, p. 107545, 2020.

LI, X.; WANG, M.; LIAO, X.; CHEN, H.; DAI, Y.; CHEN, B. Two stages of N-deficient cultivation enhance the lipid content of microalga *Scenedesmus* sp. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 503–512, 2015.

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1–19, 2016.

MA, L.; LIU, R.; DU, J. H.; LIU, T.; WU, S. S.; LIU, X. H. Lutein, Zeaxanthin and Meso-zeaxanthin Supplementation Associated with Macular Pigment Optical Density. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2016.

MANSOURI, H.; EBRAHIM NEZHAD, S. Improvement in biochemical parameters and changes in lipid profile of *Scenedesmus obliquus* by plant growth regulators under mixotrophic condition. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 140, p. 105708, 2020.

MANSOURI, H.; HAJIZADEH, F. Interaction Effects of Salinity, High Light Intensity and Acetate on Growth and Pigment Production on *Scenedesmus obliquus*. **Iranian Journal of Science and Technology**, Transaction A: Science, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 1821–1826, 2018.

MARREZ, D. A.; NAGUIB, M. M.; SULTAN, Y. Y.; HIGAZY, A. M. Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 3, 2019.

MARTELLI, G.; GIACOMINI, D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 158, p. 91–105, 2018.

MICHELON, W.; DA SILVA, M. L. B.; MATTHIENSEN, A.; SILVA, E.; PILAU, E. J.; DE OLIVEIRA NUNES, E.; SOARES, H. M. Microalgae produced during phycoremediation of swine wastewater contains effective bacteriostatic compounds against antibiotic-resistant bacteria. **Chemosphere**, [s. l.], v. 283, p. 131268, 2021.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 104, p. 342–348, 2012.

MITRA, S.; RAUF, A.; TAREQ, A. M.; JAHAN, S.; EMRAN, T. Bin; SHAHRIAR, T. G.; DHAMA, K.; ALHUMAYDHI, F. A.; ALJOHANI, A. S. M.; REBEZOV, M.; UDDIN, M. S.; JEANDET, P.; SHAH, Z. A.; SHARIATI, M. A.; RENGASAMY, K. R. Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 154, p. 112328, 2021.

NAGARAJAN, D.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Heterotrophic microalgal cultivation. In: **Bioreactors for Microbial Biomass and Energy**, p. 117-163, 2018.

NAGARAJAN, D.; VARJANI, S.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae – Nutritive value and techno-functional components. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 150, p. 111549, 2021.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 15, p. 13437–13451, 2017.

PARK, J.; JANG, H. J. Anti-diabetic effects of natural products an overview of therapeutic strategies. **Molecular and Cellular Toxicology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–20, 2017.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; AWASTHI, M. K.; VARJANI, S.; BHATIA, S. K.; TSAI, M.-L.; HSIEH, S.-L.; CHEN, C.-W.; DONG, C.-D. Emerging prospects of macro- and microalgae as prebiotic. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–16, 2021.

PATIL, L.; KALIWAL, B. B. Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with in vitro pharmacological applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 979–994, 2019.

PATWAL, T.; BARANWAL, M. *Scenedesmus acutus* extracellular polysaccharides produced under increased concentration of sulphur and phosphorus exhibited enhanced proliferation of peripheral blood mononuclear cells. **3 Biotech**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1–9, 2021.

- PŘIBYL, P.; PILNÝ, J.; CEPÁK, V.; KAŠTÁNEK, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, [s. l.], v. 16, p. 69–75, 2016.
- PRIOR, R. L.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, 2005.
- RAHMAN, M. M.; ISLAM, M. B.; BISWAS, M.; KHURSHID ALAM, A. H. M. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. **BMC Research Notes** 2015 8:1, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.
- RAMOS-ROMERO, S.; TORRELLA, J. R.; PAGÈS, T.; VISCOR, G.; TORRES, J. L. Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in the Prevention and Treatment of Metabolic Alterations. **Nutrients** 2021, Vol. 13, Page 563, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 563, 2021.
- RAPOSO, M. F. de J.; MORAIS, A. M. M. B. De; MORAIS, R. M. S. C. De. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2016.
- REMIZE, M.; BRUNEL, Y.; SILVA, J. L.; BERTHON, J. Y.; FILAIRE, E. Microalgae n-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries. **Marine drugs**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 1–29, 2021.
- RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 92, p. 394–404, 2018.
- ROCHA, D. N.; MARTINS, M. A.; SOARES, J.; VAZ, M. G. M. V.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; COVELL, L.; MENDES, L. B. B. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 289, p. 121644, 2019.
- ROJAS, V.; RIVAS, L.; CÁRDENAS, C.; GUZMÁN, F. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 24, 2020.
- ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. **Chemical reviews**, [s. l.], v. 117, n. 19, p. 12415, 2017.
- RUSSELL, C.; RODRIGUEZ, C.; YASEEN, M. High-value biochemical products & applications of freshwater eukaryotic microalgae. **Science of The Total Environment**, [s. l.], p. 151111, 2021.
- SAFAFAR, H.; WAGENEN, J. Van; MØLLER, P.; JACOBSEN, C. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.
- SALES, P. M.; DE SOUZA, P. M.; SIMEONI, L. A.; MAGALHÃES, P. de O.; SILVEIRA, D. α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 141–183, 2012.

- SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; ACIÉN, F. G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 398–405, 2008.
- SANTHAKUMARAN, P.; AYYAPPAN, S. M.; RAY, J. G. Nutraceutical applications of twenty-five species of rapid-growing green-microalgae as indicated by their antibacterial, antioxidant and mineral content. **Algal Research**, [s. l.], v. 47, p. 101878, 2020.
- SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. S. R.; ABREU, M. H.; ROCHA, S. M.; SILVESTRE, A. J. D. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 183, p. 122–128, 2015.
- SCHUNCK, W. H.; KONKEL, A.; FISCHER, R.; WEYLANDT, K. H. Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 183, p. 177–204, 2018.
- SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 14, n. 4, 2016.
- SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], p. 4–14, 2009.
- SHEN, X. F.; HU, H.; MA, L. L.; LAM, P. K. S.; YAN, S. K.; ZHOU, S. B.; ZENG, R. J. FAMEs production from: *Scenedesmus obliquus* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures under different nitrogen conditions. **Environmental Science: Water Research and Technology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 461–468, 2018.
- SIAHBALAEI, R.; KAVOOSI, G.; NOROOZI, M. Protein nutritional quality, amino acid profile, anti-amylase and anti-glucosidase properties of microalgae: Inhibition and mechanisms of action through in vitro and in silico studies. **LWT**, [s. l.], v. 150, p. 112023, 2021.
- SIDDEEG, A.; ALKEHAYEZ, N. M.; ABU-HIAMED, H. A.; AL-SANEA, E. A.; AL-FARGA, A. M. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 1633–1644, 2021.
- SILVA, M. E. T. Da; CORREA, K. de P.; MARTINS, M. A.; DA MATTA, S. L. P.; MARTINO, H. S. D.; COIMBRA, J. S. dos R. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 65, p. 103711, 2020.
- SILVA, M. R. O. B. Da; MOURA, Y. A. S.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; VIANA MARQUES, D. de A.; BEZERRA, R. P. Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. **Algal Research**, [s. l.], v. 58, p. 102396, 2021.
- SITI HALIMATUL MUNAWAROH, H.; GUMILAR, G. G.; NURJANAH, F.; YULIANI, G.; AISYAH, S.; KURNIA, D.; WULANDARI, A. P.; KURNIAWAN, I.; NINGRUM, A.;

KOYANDE, A. K.; SHOW, P. L. In-vitro molecular docking analysis of microalgae extracted phycocyanin as an anti-diabetic candidate. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 161, p. 107666, 2020.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 92, p. 311–318, 2014.

SONKAR, S.; MALLICK, N. An alternative strategy for enhancing lipid accumulation in chlorophycean microalgae for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 2179–2192, 2018.

SRINUANPAN, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTSAN, P.; KATO, Y.; ASANO, Y. Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: Nutrient starvations and cost-effective harvesting process. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 122, p. 507–516, 2018.

SUNDA, W. G. Feedback Interactions between Trace Metal Nutrients and Phytoplankton in the Ocean. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. JUN, 2012.

SUPARMANIAM, U.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; LEE, K. T.; SHUIT, S. H. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 115, p. 109361, 2019.

TAN, X. B.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; WONG, C. Y.; LEE, K. T. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 17–30, 2018.

TORRES-TIJI, Y.; FIELDS, F. J.; MAYFIELD, S. P. Microalgae as a future food source. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 41, p. 107536, 2020.

UNAY, B.; SARICI, S.; ULAŞ, U.; AKIN, R.; ALPAY, F.; GÖKÇAY, E. Nutritional effects on auditory brainstem maturation in healthy term infants. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, [s. l.], v. 89, n. 2, 2004.

VENDRUSCOLO, R. G.; FAGUNDES, M. B.; MARONEZE, M. M.; DO NASCIMENTO, T. C.; DE MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R. *Scenedesmus obliquus* metabolomics: effect of photoperiods and cell growth phases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 727–739, 2019.

VIEGAS, C.; GOUVEIA, L.; GONÇALVES, M. Aquaculture wastewater treatment through microalgal. Biomass potential applications on animal feed, agriculture, and energy. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 286, p. 112187, 2021.

VITOVA, M.; BISOVA, K.; KAWANO, S.; ZACHLEDER, V. Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1204–1218, 2015.

WAN-LOY, C.; SIEW-MOI, P. Marine Algae as a Potential Source for Anti-Obesity Agents. **Marine Drugs** 2016, Vol. 14, Page 222, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 222, 2016.

WANG, Y.; TIBBETTS, S. M.; BERRUE, F.; MCGINN, P. J.; MACQUARRIE, S. P.; PUTTASWAMY, A.; PATELAKIS, S.; SCHMIDT, D.; MELANSON, R.; MACKENZIE, S. E. A rat study to evaluate the protein quality of three green microalgal species and the impact of mechanical cell wall disruption. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 11, 2020.

WYNNE, M. J.; HALLAN, J. K. Reinstatement of Tetrademus G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). **Feddes Repertorium**, [s. l.], v. 126, p. 83–86, 2015.
XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 2010.

YAAKOB, M. A.; MOHAMED, R. M. S. R.; AL-GHEETHI, A.; ASWATHNARAYANA GOKARE, R.; AMBATI, R. R. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 10–20, 2021.

ZARRINMEHR, M. J.; FARHADIAN, O.; HEYRATI, F. P.; KERAMAT, J.; KOUTRA, E.; KORNAOS, M.; DANESHVAR, E. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 153–158, 2020.

ZHANG, J.; LIU, L.; REN, Y.; CHEN, F. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 761–767, 2019. a.

ZHANG, R.; CHEN, J.; MAO, X.; QI, P.; ZHANG, X. Separation and Lipid Inhibition Effects of a Novel Decapeptide from *Chlorella pyrenoidosa*. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 19, 2019. b.

ZHU, Y.; ZHAO, J.; LUO, L.; GAO, Y.; BAO, H.; LI, P.; ZHANG, H. Research progress of indole compounds with potential antidiabetic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 223, p. 113665, 2021.

ANEXO A – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Reagentes	Bold Basal Medium	BBM modificado (2020)
CaCl ₂ 2 H ₂ O	2,5g	2,5g
CoCl ₂ 6H ₂ O	-	0,4g
CuSO ₄ 5 H ₂ O	1,57g	1,57g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O	-	-
FeCl ₃ 6H ₂ O	-	-
FeSO ₄ 7 H ₂ O	4,98g	4,98g
H ₂ SO ₄	1mL	1mL
H ₃ BO ₃	11,42g	11,42g
K ₂ HPO ₄ 3 H ₂ O	9,8g	2,5g
KH ₂ PO ₄	17,5g	6,0g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	7,5g	-
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,44g	1,44g
MoO ₃	0,71g	6,61g
Na ₂ EDTA	50g	50g
Na ₂ Glicerofosfato	-	-
NaCl	2,5g	2,5g
NaNO₃	25g	100g
ZnCl ₂	-	8,82g

Tabela: Composição do meio BBM convencional (Bold, 1949) e modificado (OLIVEIRA et al., 2020).

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 23 de agosto de 2021

Ofício nº56/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Prof. Ranilson de Souza Bezerra
Departamento de Bioquímica
Centro de Biociências
processo nº0055/2021

Certificamos que a proposta intitulada “**Investigação do potencial biotecnológico da microalga *Scenedesmus obliquus* isolada no semiárido pernambucano**”, registrado com o nº0055/2021 sob a responsabilidade da **Prof. Ranilson de Souza Bezerra** envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/07/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/07/2021 a 31/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogenico
Nº de animais	03
Peso/Idade	60 dias (40g)
Sexo	Machos (03)
Origem: Biotério de Criação	Biotério Convencional do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório de Enzimologia (LABENZ) do Departamento de Bioquímica (UFPE)

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691