

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

Pró Reitoria de Pesquisa e Pós - Graduação Campus Central

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado

GABRIELA PEREIRA DA SILVA ALVES

**PROTOCOLO DE CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS NA MICROALGA *SCENEDESMUS
OBTUSUS***

Anápolis

2025

GABRIELA PEREIRA DA SILVA ALVES

PROTOCOLO DE CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS NA MICROALGA *SCENEDESMUS*
OBTUSUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado, da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Cerrado. Orientador Prof^a. Dra. Fernanda Melo Carneiro.

Anápolis

2025



Alves, Gabriela Pereira da Silva.

Protocolo de cultivo e identificação de compostos bioativos na microalga
Scenedesmus obtusus/ Gabriela Pereira da Silva Alves. – 2024

73f.: 21 figs, 4 tabs.

Orientador: Prof^ª. Fernanda Melo Carneiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, Campus de Ciências
Exatas e Tecnológicas, 2024.

Bibliografia.

ESTADO DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS - UEG
COORDENAÇÃO STRICTO SENSU - RECURSOS NATURAIS DO CERRADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM RECURSOS NATURAIS DO CERRADO

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO Nº 05/2025

ATA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e quatro dias de fevereiro de 2025, às 09 horas, no auditório da Universidade Estadual de Goiás Campus Metropolitano Unidade Goiânia Laranjeiras foi realizada a sessão de Banca de Defesa de dissertação de MESTRADO da discente **GABRIELA PEREIRA DA SILVA ALVES**, que apresentou o trabalho intitulado "**Protocolo de cultivo e identificação de compostos bioativos na microalga *Scenedesmus obtusus***". A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes Professores: Dra. Fernanda Melo Carneiro - Presidente da banca e orientadora (PPGRENAC/UEG); Dr. Leonardo Luiz Borges (membro interno UEG); Dra. Patricia Sousa Lima (membro externo- UEG). Os examinadores arguíram na ordem citada, tendo a candidata respondido SATISFATORIAMENTE. A Banca Examinadora passou a julgamento, em sessão secreta, tendo sido a candidata:

aprovado aprovado com sugestões de alterações reprovado.

Observações: As considerações pontuais dos avaliadores foram encaminhadas para a finalização do trabalho de dissertação de mestrado.

Reaberta a sessão, a orientadora proclamou o resultado e encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que vai ser assinada por mim presidente da banca e demais membros da banca examinadora.

Orientadora: Dra. Fernanda Melo Carneiro

Examinador Interno: Dr. Leonardo Luiz Borges

Examinadora externa: Dra. Patricia Sousa Lima

Discente: Gabriele Pereira da Silva Alves



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA MELO CARNEIRO**, **Docente de Ensino Superior**, em 24/02/2025, às 15:50, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **PATRICIA DE SOUSA LIMA**, **Docente**, em 24/02/2025, às 16:04, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **LEONARDO LUIZ BORGES**, **Docente de Ensino Superior**, em 24/02/2025, às 16:42, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site http://sei.go.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=1 informando o código verificador **70989012** e o código CRC **4E571D6B**.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD/UEG)

Na qualidade de titular dos direitos de autor / autora, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, conforme a **Lei nº 9610/98**, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Estando ciente que o conteúdo disponibilizado é de inteira responsabilidade do autor / autora.

Dados do autor (a)

Nome Completo Gabriela Pereira da Silva Alves

E-mail gabrielapsajc@gmail.com

Dados do trabalho

Título PROCOLO DE CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NA MICROALGA *SCENEDESMUS OBTUSUS*

Tipo

() Tese (X) Dissertação () Dissertação e Produto Técnico Tecnológico (PTT) () Tese e Produto Técnico Tecnológico (PTT)

Curso/Programa RECURSOS NATURAIS DO CERRADO - RENAC

Concorda com a liberação do documento:

SIM

NÃO Em caso de não autorização o período de embargo é de **um ano** a partir da data de defesa, prorrogável por mais um ano, caso haja necessidade de exceder o prazo, a extensão do prazo necessita de justificativa junto à coordenação do curso.

Assinalar justificativa para o caso de impedimento e não liberação do documento:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica; Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Porangatu - GO, 22/04/2025

Local

Data

Assinatura autor

Assinatura do orientador



AGRADECIMENTOS

A jornada de enfrentar o novo é uma das mais desafiadoras que podemos empreender. Requer coragem para abrir mão de momentos preciosos ao lado da família, conhecidos e dos amigos, para priorizar os estudos em um período crucial de crescimento e aprendizagem. Porém, ao longo dessa jornada acadêmica, tive a convicção que não estive sozinha. A fé em Deus foi uma fonte inabalável de força e esperança, guiando-me através das adversidades e iluminando o caminho em direção ao progresso. Agradeço a Ele por Sua constante presença e por me fortalecer nos momentos de desânimo.

Muitas pessoas contribuíram de maneiras significativas para que este trabalho pudesse ser concluído. Com palavras de encorajamento, apoio logístico, ensinamento e compreensão foram fundamentais para me manter focada e determinada. Por isso, expresso minha sincera gratidão a todos que estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando, compartilhando de momentos de angústia, dúvida, mas também, de alegria e aprendizagem. Durante este caminho, enfrentei algumas dificuldades e obstáculos, mas também encontrei oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Ao longo deste trabalho de mestrado, esses desafios foram constantes, mas a vontade de aprender e progredir me manteve motivada.

Este momento não teria sido possível sem o apoio, compreensão e amor da minha família, pais e irmã, que estiveram sempre presentes, acreditando em mim em momentos que até eu mesmo duvidava que teria a coragem para prosseguir.

Sou profundamente grata ao meu esposo por compreender e apoiar minha decisão de embarcar nessa jornada de aprendizado, mesmo que isso tenha significado períodos de ausência e viagens semanais. Sua aceitação foi fundamental para que eu pudesse me dedicar ao meu mestrado com um pouco mais de tranquilidade e foco. Obrigada por estar sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Agradeço à Universidade Estadual de Goiás - UEG pelo programa de mestrado oferecido - Programa de Recursos Naturais do Cerrado – RENAC por proporcionar o ambiente acadêmico para o desenvolvimento deste trabalho e possibilitar que diversas pessoas das mais diferentes regiões vivenciem e aprofundem ensino, pesquisa e extensão de maneira gratuita e com qualidade. Agradeço também pela Bolsa de Pós-Graduação Stricto Sensu por meio da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PrP) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) concedida a mim durante dezoito meses que me possibilitou custear o investimento em minha educação e qualificação positivamente.



Sou imensamente grata aos meus professores do curso pelo seu compromisso, dedicação e orientação ao longo do curso, bem como aos meus colegas de classe pela colaboração, apoio mútuo e amizade que tornaram esta jornada de aprendizado ainda mais enriquecedora.

À minha orientadora, professora Fernanda Melo Carneiro, devo um agradecimento especial. Seu conhecimento, colaboração, empatia e bom ânimo foram essenciais para o sucesso deste trabalho. Com a sua orientação, este trabalho tornou-se significativo. Obrigada por fazer parte desta experiência transformadora.

Agradeço também aos participantes da pesquisa, pelo tempo e dedicação em contribuir com seus insights e experiências, tornando concreto as fases dessa pesquisa, especialmente à Professora Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula, aos Doutorandos Monatha e Leonardo, ao Técnico de Laboratório Gabriel e a aluna de Iniciação Científica Isabela .

À banca examinadora, composta pelos Professores Dra. Patrícia de Sousa Lima e Dr. Leonardo Luiz Borges agradeço por dedicarem seu tempo e expertise na avaliação do meu trabalho acadêmico. Suas contribuições e feedbacks são inestimáveis e fundamentais para o aprimoramento deste estudo.

Que este estudo sirva de alicerce sólido para pesquisas futuras, inspirando outros a alcançarem sucesso em suas jornadas acadêmicas.



Sumário

RESUMOGERAL.....	9
ABSTRACT.....	10
1. Introdução Geral.....	11
2. ReferênciasBibliográficas.....	15
Capítulo 1 – Protocolo de cultivo de <i>Scenedesmus obtusus</i> (Chlorophyceae) para acúmulo de biomassa e triagem de compostos bioativos.....	18
Resumo.....	19
1. Introdução.....	20
2. Metodologia.....	22
2.1 Etapas do protocolo de cultivo.....	23
2.1.1 Isolamento de amostras de microalgas.....	23
2.1.2 Esterilização de material.....	23
2.1.3 Preparo para cultivo da microalga.....	23
2.1.4 Inoculação do cultivo da microalga.....	24
2.1.5 Condições de cultivo (incubadora)	24
2.1.6 Reposição de meio nutritivo.....	25
2.1.7 Identificação e monitoramento do crescimento da microalga.....	25
2.1.8 Monitoramento do crescimento da microalga e colheita da biomassa.....	26
2.2 Análise de dados.....	28
3. Resultados.....	29
4. Discussão.....	34
5. Conclusão.....	37
6. Referências bibliográficas.....	38
Material Suplementar.....	44
Capítulo 2 –Triagem de metabólitos fenólicos por CLAE-DAD em <i>Scenedesmus obtusus</i>	50
1. Introdução.....	52
2. Material e Métodos.....	53
2.1 Teste de flavonoides.....	53
2.1.1 Reação da cianidina ou de Shinoda.....	51
2.1.2 Reação Oxalo-Bórica.....	54
2.1.3 Reação com Ácido Sulfúrico Concentrado.....	54
2.2 Testes para Compostos Fenólicos em geral.....	54
2.2.1 Reação com Hidróxidos Alcalinos.....	54



2.2.2 Reação com Cloreto de Alumínio.....	54
2.2.3 Reação com Cloreto Férrico.....	55
2.3 Teste para Antraquinonas.....	55
2.4 Teste de Cumarinas.....	55
2.5 Teste de Taninos.....	56
2.5.1 Reação com Gelatina.....	56
2.5.2 Reação com Alcaloides.....	56
2.5.3 Reação com Sais Metálicos.....	56
2.5.4 Reação com Hidróxidos Alcalinos.....	57
2.6 Teste para Compostos Nitrogenados – Alcaloides.....	57
2.6.1 Reativo de Mayer.....	57
2.6.2 Reativo de Dragendorff.....	57
2.6.3 Reativo de Bouchardat.....	57
2.6.4 Reativo de Bertrand.....	58
2.6.5 Reativo de Hager.....	58
2.6.6 Ácido Tânico.....	58
2.7 Testes para Compostos Terpênicos.....	58
2.7.1 Reativo de Liebermann-Burchard.....	58
2.7.2 Reação de Pesez.....	59
2.7.3 Reação de Keller-Kiliani.....	59
2.7.4 Reação de Kedde.....	59
2.8 Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	59
3. Resultados.....	61
4. Discussão.....	65
5. Referências Bibliográficas.....	70



RESUMO GERAL

As microalgas, como seres fotossintetizantes, têm a capacidade de produzir uma variedade de compostos com alto valor agregado. Elas respondem a estímulos e mudanças em seu ambiente, ajustando seus processos metabólicos para promover o crescimento, desenvolvimento e produção de metabólitos secundários. Os compostos produzidos por microalgas apresentam atividades biológicas e despertam interesse comercial em várias áreas, incluindo nutracêutica, alimentícia, aquicultura, de biocombustíveis, biorremediação e cosmetologia. Por meio de seu aparato fotossintético, esses micro-organismos contribuem para a fixação de CO₂ e a produção de O₂, reduzindo os impactos gerados pelas ações humanas, como o efeito estufa, e servindo como uma fonte renovável de recursos. O objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo de cultivo para uma espécie de microalga do gênero *Scenedesmus* com intuito de acumular biomassa e investigar classes de compostos presentes nela. O trabalho foi estruturado em dois capítulos. O primeiro, refere-se ao desenvolvimento do protocolo de cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Chlorophyceae) com intuito de otimizar o acúmulo de biomassa. No segundo capítulo, investigou-se as classes de componentes presentes na biomassa da microalga estudada. Foi utilizado cultivo do tipo *Fed-Batch* com meio BG11, controle de temperatura e fotoperíodo. O monitoramento do cultivo foi feito por densidade óptica e contagem de células. Os primeiros picos populacionais ocorreram nos primeiros 10 dias de cultivo. No entanto, para maximizar a biomassa, esta foi centrifugada e posteriormente seca, com uma média de 55 dias (DP = 36,4) e uma concentração de $4,72 \times 10^7$ indivíduos/mL. A alga investigada apresentou um rendimento de biomassa de 1.70 g/L. Centrifugação e secagem foram os métodos para a colheita de biomassa e posterior operação de investigação. A partir da biomassa seca, fez-se testes qualitativos para classes de compostos exibidos na microalga, sendo alcaloides e flavonoides as classes sugeridas nessa análise. Após as análises qualitativas, o material foi submetido a cromatografia líquida a líquido de alta eficiência para a busca de compostos destas categorias. Três espectros da biomassa de microalgas foram similares aos espectros de padrões analíticos utilizados para comparação, o que sugere a presença de resveratrol, quercetina e kampferol. Este trabalho gera subsídios para estudos futuros que podem explorar a otimização do cultivo com maiores quantidades dos compostos investigados.

Palavras-chave: *Scenedesmus obtusus*; cultura *Fed-Batch*; resveratrol; quercetina; kampferol; biomassa.



ABSTRACT

Microalgae, as photosynthetic organisms, possess the ability to produce a variety of high-value compounds. Like any living organism, they respond to stimuli and changes in their environment by adjusting their metabolic processes to promote growth, development, and the production of secondary metabolites. The compounds produced by microalgae exhibit biological activities and have garnered commercial interest across various industries, including nutraceuticals, food, aquaculture, biofuels, bioremediation, and cosmetics. Through their photosynthetic apparatus, these microorganisms contribute to CO₂ fixation and O₂ production, mitigating the impacts of human activities, such as the greenhouse effect, and serving as a renewable resource. The objective of this study was to establish a cultivation protocol for the microalgae genus *Scenedesmus* to accumulate biomass and investigate the classes of compounds present within it. The study was structured into two chapters. The first chapter focused on developing a cultivation protocol for *Scenedesmus obtusus* (Chlorophyceae) to optimize biomass accumulation and compound production. The second chapter investigated the classes of components present in the biomass of the studied microalgae. A Fed-Batch cultivation system using BG11 medium, with controlled temperature and photoperiod, was employed. Cultivation monitoring was conducted through optical density measurements and cell counting. Initial population peaks occurred within the first 10 days of cultivation; however, to accumulate additional biomass, the biomass was centrifuged and subsequently dried, with an average cultivation time of 55 days (SD=36.4) and a cell density of 4.72×10^7 individuals/mL. The investigated algae yielded a biomass production of 1.70 g/L. Centrifugation and drying were the methods used for biomass harvesting and subsequent analysis. Qualitative tests were performed on the dried biomass to identify the classes of compounds present, with alkaloids and flavonoids being the suggested classes in this analysis. A chromatogram was generated to assess the profile of metabolites synthesized by the microalgae. Three spectra from the microalgae biomass were similar to the spectra of analytical standards used for comparison: resveratrol, quercetin, and kaempferol. Future studies may explore the optimization of cultivation and the purification of these compounds for specific commercial applications.

Keywords: *Scenedesmus obtusus*; Fed-Batch culture; resveratrol; quercetin; kaempferol; biomass.



1. Introdução Geral

As microalgas são organismos eucariontes fotossintetizantes que constituem a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos (Abdel-Raouf; Al-Homaidan; Ibraheem, 2012). A biodiversidade das microalgas é estimada em aproximadamente 800 mil espécies, porém, até 2018 foram oficialmente descritas entre 40.000 a 50.000 espécies (Morançais; Mouget; Dumay, 2018). A base de dados on-line AlgaeBase adota a classificação realizada por Guiry (2024), a qual aponta a distribuição desse valor mencionado anteriormente em 14 filos e 63 classes com possibilidade de crescimento, por ainda existir espécies de algas não descritas. As microalgas são organismos eucariontes e apresentam espécies unicelulares, cenobiais, coloniais ou filamentosas (Franceschini *et al.*, 2009). As cianobactérias, que são organismos procariontes fotossintetizantes, compõem a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos juntamente com as microalgas constituindo a mesma comunidade ecológica (Vieira *et al.*, 2022).

Por meio da fotossíntese, as algas convertem a energia solar em energia química, aproximadamente 6% da energia da fotossíntese convertida em biomassa pelas algas, quando a luz é completamente utilizada, sem sombreamento (Benemann, 1978). Essa energia é constituída por compostos químicos com atividades biológicas, chamados de compostos bioativos. Mediante o seu metabolismo, as cianobactérias e microalgas produzem compostos de diferentes classes químicas com capacidade aleloquímica (Chaïb *et al.*, 2021), aplicações potenciais como algicidas, herbicidas e inseticidas (Berry *et al.*, 2008), potencial farmacêutico como antibacterianas, antifúngicas, antivirais, citotóxicas, agentes anticancerígenos, imunomoduladoras (Singh *et al.*, 2011), aplicações em cosméticos, como protetores solares, e alimentos funcionais ou nutracêuticos, entre outros (Pulz; Gross, 2004).

Há um crescente interesse em estudar e explorar as microalgas devido ao seu potencial para produção de uma variedade de bioprodutos. Tal interesse é corroborado pelas indústrias de cosméticos, nutracêuticos, biomateriais e matérias-primas para biorrefinarias (Liang; Zhu; Jiang, 2019). A crescente competitividade das matérias-primas e a escassez dos recursos naturais destacam a importância das microalgas, pois possibilitam a obtenção de diversos bioprodutos a partir de sua biomassa (Calijuri *et al.*, 2022). As microalgas fornecem uma variedade de compostos bioativos, que incluem carboidratos, proteínas, pigmentos, esteróis, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), vitaminas, minerais, alcaloides e outros compostos não classificados nessas categorias (Kaur *et al.*, 2023). As substâncias bioativas são moléculas orgânicas de baixa massa molecular que apresentam uma ampla diversidade química e efeitos diversos sobre organismos vivos, sendo associadas às mudanças em seu comportamento,



fisiologia ou metabolismo (Embrapa, 2013). A substância bioativa pode ser extraída de plantas, animais, minerais, microrganismos, fungos, algas ou produzida sinteticamente (De Alimentos, Gerência-Geral *et al.*, 2020).

Atualmente, os países industrializados estão intensificando seus esforços na produção de produtos de alto valor provenientes de algas, dadas as suas propriedades químicas que exibem uma ampla variedade de atividades biológicas. Essa diversidade funcional abre perspectivas promissoras para aplicações nos setores de alimentos funcionais ou nutracêuticos, cosméticos e indústrias farmacêuticas (Cardoso *et al.*, 2014). Os potenciais antioxidantes de microalgas podem ser úteis à saúde a fim de melhorar o bem-estar humano (Pereira; Cotas; Valado, 2024). Há uma tendência global nas últimas duas décadas para substituir antioxidantes artificiais por opções naturais (Safafar *et al.*, 2015).

Esse aumento de popularidade se deve ao reconhecimento dos impactos negativos que os materiais sintéticos causam à saúde e ao meio ambiente (Amberg; Fogarassy, 2019). Na composição de produtos naturais, o interesse por antioxidantes naturais como alternativa aos antioxidantes sintéticos aumentou (Coulombier; Jauffrais; Lebouvier, 2021). As evidências fornecidas em estudos mundiais aliado ao interesse crescente de produtos com propriedades antioxidantes de fontes naturais mais acessíveis e menos convencionais, demonstram que as microalgas impulsionam o mercado por fornecerem esses compostos com contribuições para manter a saúde e produzir respostas adaptativas ao estresse oxidativo, contribuindo assim para retardar o envelhecimento (Guedes *et al.*, 2013). As microalgas apresentam a vantagem de poderem ser cultivadas sem demandar recursos valiosos, como água doce ou terra arável, que são essenciais para outras necessidades humanas, podendo o custo de produção ser mais baixo (Torres-Tiji; Fields; Mayfield, 2020). Quase todos os antioxidantes naturais disponíveis comercialmente são derivados de plantas terrestres (Goiris *et al.*, 2012). Acredita-se, no entanto, que as microalgas podem ser um recurso alternativo de antioxidantes naturais, que supera em diversidade as plantas superiores (Li *et al.*, 2007). Nem todas as espécies de microalgas são igualmente adequadas para essa finalidade, devido a diferenças na constituição de seus compostos bioativos, taxa de crescimento, rendimento, facilidade de cultivo entre outros fatores.

A literatura sobre a atividade antioxidante das microalgas ainda é limitada, sendo importante identificar essa fonte dentro do grupo de microalgas e investigar a relação entre seu conteúdo fenólico e sua capacidade antioxidante (Li *et al.*, 2007). Empresas estão investindo na produção biotecnológica de produtos naturais utilizando microalgas em diferentes setores. *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis*, *Dunaliella salina*, *Phaeodactylum tricorutum*,

Haematococcus pluvialis, *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus obliquus* e *Tetraselmis suecica* são importantes espécies de microalgas conhecidas e comercializadas por suas moléculas bioativas com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, antimicrobiano (Wong *et al.*, 2022). Extratos de microalgas são comumente utilizados em produtos faciais e para cuidados com a pele, como cremes antienvelhecimento, loções refrescantes e emolientes, além de agentes anti-irritantes em peelings. Além disso, os benefícios dos carotenoides foram comprovados no tratamento de psoríase, uma condição inflamatória da pele. Esses compostos também desempenham um papel importante como estabilizadores em cosméticos e produtos de proteção solar (Jahan *et al.*, 2017).

Entre os carotenoides produzidos por plantas e microalgas, estão as xantofilas, luteína e zeaxantina, comprovados em melhorar a saúde ocular, prevenindo contra catarata e degeneração macular (Nwachukwu; Udenigwe; Aluko, 2016). Aldeídos e compostos alcoólicos foram detectados na microalga *Schizochytrium limacinum*, os quais podem ser usados como aromatizantes alimentares (Hosoglu, 2018). A produção de combustível renovável a partir de *Botryococcus braunii* é uma potencialidade dessa microalga devido a seu volume de hidrocarbonetos podendo reduzir o impacto ambiental decorrente do uso de petróleo e carvão (Banerjee *et al.*, 2002). Dermochlorella DG[®] da CODIF Research & Nature produzido a partir de *Chlorella vulgaris*, uma microalga verde; o XCELL-30[®] da Greensea, desenvolvido a partir de microalgas endêmicas de Madagascar; a AstaPure[®] astaxantina, da Alga Technologies, obtida da microalga *Haematococcus pluvialis*; a *Dunaliella salina*, uma microalga verde do fitoplâncton australiano, usada em suplementos alimentares; e o Astaxanthin AstaLif[®], da Astareal - Fuji Chemical Industries, desenvolvido a partir da alga verde *Haematococcus* são produtos comercializados por suas propriedades antioxidantes naturais.

Nesse sentido, induzir células a diferentes formas de estresse pode aumentar a produção de metabólitos secundários com potencial uso como antioxidante (Skjånes; Rebours; Lindblad, 2013). Estresses abióticos como temperatura, salinidade, radiação UV e privação de nutrientes podem desencadear a biossíntese de metabólitos. A taxa de crescimento das microalgas varia consideravelmente com a temperatura. *Chaetoceros* sp. FIKU035 demonstrou alta adaptabilidade, crescendo em temperaturas entre 25 e 40 °C. Já *Tetraselmis suecica* FIKU032 não resistiu a temperaturas acima de 30 °C, enquanto *Nannochloropsis* sp. FIKU036 apresentou crescimento ideal a 25 °C. Entre as três espécies de microalgas, *Chaetoceros* sp. FIKU035 foi a mais tolerante a variações térmicas, exibindo a maior taxa de crescimento específico (Chaisutyakorn; Praiboon; Kaewsuralikhit, 2018). O estresse de salinidade na microalga de



água doce *Chlorella vulgaris* YH703 foi investigado por Yun et al. (2019) como estratégia para aumentar o potencial de produção de biocombustível. O estudo mostrou que a microalga *Chlorella vulgaris* YH703 com tratamentos com NaCl apresentou potencial de produção de biocombustível aumentada. Um estudo revelou que a exposição a baixos níveis de radiação UV-C pôde melhorar a composição da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii*, além de modular sua resposta ao estresse oxidativo (Colina *et al.*, 2020). Estresse nutricional foi relatado como influenciador no acúmulo de lipídios em quatro cepas de microalgas *Botryococcus* spp. (Yeesang; Cheirsilp, 2011). Além disso, há uma variedade de métodos para a colheita da biomassa, entre os quais se destacam a centrifugação, floculação, filtração, flotação, separação magnética, eletrólise, ultrassom e imobilização (Kim *et al.*, 2013). A seleção da técnica de colheita a ser utilizada leva em consideração as características das microalgas, como tamanho e densidade (Olaizola, 2003). O gênero *Scenedesmus* apresenta uma grande variação morfológica dentro de suas espécies. Segundo a literatura, este gênero de algas verdes é um dos mais comuns e cosmopolitas, sendo encontrado em diversos tipos de ambientes aquáticos, desde oligotróficos até eutróficos, com uma predominância maior nestes últimos. Sua capacidade de rápida colonização de novos ambientes faz com que seja uma das primeiras algas a se estabelecer em diferentes corpos d'água. É comum encontrar múltiplas espécies desse gênero em chafarizes ou tanques de jardins públicos, onde também há uma grande abundância de exemplares, evidenciando a variação morfológica presente dentro de cada espécie (Bicudo; Menezes, 2006). Por isso, *Scenedesmus* se torna um bom modelo para estudos sobre variação morfológica, aplicações biotecnológicas, importância ecológica, adaptação e resistência, além de seu uso como indicador ambiental, contribuindo para avanços na ecologia, biotecnologia e conservação ambiental.

Referências Bibliográficas

ABDEL-RAOUF, Neveen; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Agricultural importance of algae. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 54, p. 11648-11658, 2012.

ALGATECH, 2019. Disponível em: <https://www.algatech.com/algatech-product/astapure-natural-astaxanthin/> Acesso em 15 nov. 2024

AMBERG, Nora; FOGARASSY, Csaba. Green consumer behavior in the cosmetics market. **Resources**, v. 8, n. 3, p. 137, 2019

ASTAREAL, 2018. Disponível em: <https://astareal.com/story-1/>. Acesso em 16 nov. 2024.

BANERJEE, Anirban *et al.* Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 245-279, 2002.

BENEMANN, John R. **Biofuels: a survey**. Electric Power Research Inst.(EPRI), Palo Alto, CA (United States), 1978.

BERRY, John P. *et al.* Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. **Marine drugs**, v. 6, n. 2, p. 117-146, 2008.

BICUDO, CE de M.; MENEZES, Mariângela. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. **São Carlos, Rima**, 2006.

BIOTECHNOLOGIES GREENSEA, 1988. Disponível em: <https://www.greentech.fr/pt/greensea-as-algas-e-microalgas/>. Acesso em 20 nov. 2024.

CALIJURI, Maria Lúcia *et al.* Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 305, p. 135508, 2022.

CARDOSO, Susana *et al.* Bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian Peninsula. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 896-917, 2014.

CHAÏB, Slimane *et al.* Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research. **Algal Research**, v. 54, p. 102213, 2021.

CHASUTYAKORN, Panjaphol; PRAIBOON, Jantana; KAEWSURALIKHIT, Chatcharee. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 37-45, 2018.

CODIF TECHNOLOGIE NATURELLE, 2000. Disponível em: <https://www.codif-tn.com/en/active/16-dermochlorella-dg-face>. Acesso em 08 nov. 2024.

COLINA, Francisco *et al.* Low UV-C stress modulates *Chlamydomonas reinhardtii* biomass composition and oxidative stress response through proteomic and metabolomic changes involving novel signalers and effectors. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-19, 2020.

COULOMBIER, Noémie; JAUFFRAIS, Thierry; LEBOUVIER, Nicolas. Antioxidant compounds from microalgae: A review. **Marine drugs**, v. 19, n. 10, p. 549, 2021.

DE ALIMENTOS, Gerência-Geral *et al.* Substâncias bioativas: perguntas e respostas. 2020.

EMBRAPA, Substâncias bioativas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/141757/1/substancia-GP-substancias-sioativas.pdf> , <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/gp/bioativos-nanomateriais>. Acesso em 04 nov. 2024

FRANCESCHINI, Iara Maria *et al.* **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed Editora, 2009.

GOIRIS, Koen *et al.* Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of applied phycology**, v. 24, p. 1477-1486, 2012.

GUEDES, A. Catarina *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. **Marine drugs**, v. 11, n. 4, p. 1256-1270, 2013.

GUIRY, Michael D. How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. **Journal of Phycology**, 2024.

HOSOGLU, Müge Isleten. Aroma characterization of five microalgae species using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. **Food chemistry**, v. 240, p. 1210-1218, 2018.

JAHAN, Afroz *et al.* Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: A review. **Phycologia**, v. 56, n. 4, p. 410-422, 2017.

KAUR, Manpreet *et al.* Microalgal bioactive metabolites as promising implements in nutraceuticals and pharmaceuticals: inspiring therapy for health benefits. **Phytochemistry Reviews**, v. 22, n. 4, p. 903-933, 2023.

KIM, Jungmin *et al.* Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 6, p. 862-876, 2013.

LI, Hua-Bin *et al.* Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 771-776, 2007.

LIANG, Ming-Hua *et al.* High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 15, p. 2423-2441, 2019.

MORANÇAIS, Michèle; MOUGET, Jean-Luc; DUMAY, Justine. Proteins and pigments. In: **Microalgae in health and disease prevention**. Academic Press, p. 145-175. 2018.

NWACHUKWU, Ifeanyi D.; UDENIGWE, Chibuike C.; ALUKO, Rotimi E. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function,

and health claim status. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 74-84, 2016.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003.

PEREIRA, Leonel; COTAS, João; VALADO, Ana. Antioxidants from microalgae and their potential impact on human well-being. **Exploration of Drug Science**, v. 2, p. 292-321, 2024.

PLANKTON AUSTRALIA, 2014. Disponível em:
<http://www.planktonaustralia.com/index.php/australian-marine-phytoplankton/>. Acesso em 13 nov. 2024.

PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

SAFAFAR, Hamed *et al.* Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339-7356, 2015.

SINGH, Rahul Kunwar *et al.* Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 6, p. 401-412, 2011.

SKJÅNES, Kari; REBOURS, Céline; LINDBLAD, Peter. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172-215, 2013.

TORRES-TIJI, Yasin; FIELDS, Francis J.; MAYFIELD, Stephen P. Microalgae as a future food source. **Biotechnology advances**, v. 41, p. 107536, 2020.

VERDELHO VIEIRA, Vítor *et al.* Clarification of most relevant concepts related to the microalgae production sector. **Processes**, v. 10, n. 1, p. 175, 2022.

WONG, Jia Fei *et al.* A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 5, p. 1156-1170, 2022.

YEESANG, Chittra; CHEIRSILP, Benjamas. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3034-3040, 2011.

YUN, Chol-Jin *et al.* The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. **Biomass and Bioenergy**, v. 127, p. 105277, 2019.

Capítulo 1 – Protocolo de cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Chlorophyceae) para acúmulo de biomassa e triagem de compostos bioativos

Resumo

As algas desempenham um papel crucial na cadeia alimentar aquática, gerando oxigênio e compostos orgânicos. Elas são atrativas para bioprospecção devido à sua rica diversidade e composição química, superando fontes alimentares tradicionais em proteínas, carboidratos e lipídios. Microalgas acumulam metabólitos secundários importantes para a sobrevivência que podem ter ação antioxidante, apresentando grande potencial para matérias-primas promissoras para bioativos de diversos produtos de diferentes setores industriais. Esse trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo de cultivo para a microalga do gênero *Scenedesmus* presente em uma represa artificial do Cerrado com intuito de acumular biomassa para posteriormente investigar classes de compostos presentes nela. Foi utilizada a técnica de cultivo *Fed-Batch*. Para tanto, estabeleceu-se condições de cultivo e produção de biomassa com meio nutritivo BG-11, ajustes de pH ($7.1 \pm 0,1$) a 25°C , aeração contínua e iluminação de 12:12h. O crescimento celular foi monitorado por contagem, absorvância e transmitância. Valores máximos de alta absorvância e baixa transmitância e número acima de $4,67 \times 10^5$ indivíduos/mL foram utilizados como limite para colheita e centrifugação do cultivo. A espécie *Scenedesmus obtusus* predominou na cultura, com rendimento de biomassa 1.70g/L. Os picos de contagem já ocorreram com 8 dias de cultivo $3,1 \times 10^7$ indivíduos/mL. Com intuito de maximizar o acúmulo de biomassa e avaliar o comportamento da microalga, os cultivos foram conduzidos por períodos entre 17 e 176 dias. O cultivo apresentou picos populacionais seguidos de declínio, portanto, não apresentou fase estacionária. Isso pode sugerir que a população apresentou estresse luminoso ou mesmo de limitação de recurso. Esses resultados destacam o potencial de *Scenedesmus obtusus* como fonte de biomassa e compostos bioativos, ao mesmo tempo em que indicam a necessidade de otimização das condições de cultivo para maximizar a acumulação de biomassa e garantir a estabilidade do processo. Além disso, os estresses indicados pelos picos populacionais podem representar sucesso na produção de metabólitos desejáveis como antioxidantes.

Palavras-chave: Biomassa; cultivo Fed-Batch; microalga; metabólitos secundários.



Chapter 1 – Cultivation Protocol for *Scenedesmus obtusus* (Chlorophyceae) for Biomass Accumulation and Bioactive Compound Screening

Abstract

Algae play a crucial role in the aquatic food chain, generating oxygen and organic compounds. They are attractive for bioprospecting due to their rich diversity and chemical composition, surpassing traditional food sources in proteins, carbohydrates, and lipids. Microalgae accumulate secondary metabolites essential for survival, which may exhibit antioxidant activity, making them a promising raw material for bioactive compounds in various industrial sectors. This study aimed to establish a cultivation protocol for a *Scenedesmus* microalga found in an artificial reservoir in the Brazilian Cerrado to accumulate biomass for subsequent investigation of its compound classes. The Fed-Batch cultivation technique was employed, with growth conditions optimized using BG-11 nutrient medium, pH adjustment (7.1 ± 0.1) at 25°C , continuous aeration, and a 12:12h light-dark cycle. Cell growth was monitored through cell counting, absorbance, and transmittance measurements. The culture was harvested and centrifuged upon reaching maximum absorbance, minimum transmittance, and cell counts above 4.67×10^5 individuals/mL. The species *Scenedesmus obtusus* dominated the culture, yielding 1.70 g/L of biomass. Peak cell density (3.1×10^7 individuals/mL) was achieved by day 8. To maximize biomass accumulation and assess microalgal behavior, cultivation periods ranged from 17 to 176 days. The culture exhibited population peaks followed by decline, lacking a stationary phase, which may indicate light stress or resource limitation. These results highlight the potential of *Scenedesmus obtusus* as a source of biomass and bioactive compounds while underscoring the need for cultivation optimization to enhance biomass accumulation and process stability. Additionally, the stress indicated by population peaks may promote the production of desirable metabolites, such as antioxidants.

Keywords: Biomass; Fed-Batch cultivation; microalgae; secondary metabolites.



1. Introdução

As algas desempenham um papel crucial na cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos, atuando como produtores primários responsáveis pela geração de oxigênio e compostos orgânicos (Cardoso *et al.*, 2014). Elas apresentam uma rica biodiversidade, e com muitas espécies ainda a serem descritas, especialmente dentro da classe das clorófitas (Guiry, 2012). A variedade na composição química desses organismos os torna atrativos para bioprospecção e exploração comercial como fontes de uma ampla gama de biomoléculas (Borowitzka, 2013). Microalgas oferecem uma rica fonte de proteínas, ácidos graxos, vitaminas e pigmentos por meio de seu metabolismo primário (De Moraes *et al.*, 2015). Em certas espécies, a composição química de proteína, carboidrato e lipídio supera até mesmo as fontes alimentares tradicionais, oferecendo alternativas valiosas para a nutrição humana e animal (Spolaore *et al.*, 2006). Além disso, muitas delas são matérias-primas promissoras para a produção de bioativos em aplicações cosméticas, impulsionando o desenvolvimento de produtos mais saudáveis e ecologicamente sustentáveis (Ariede *et al.*, 2017). Para atender aos princípios de sustentabilidade, os sistemas de produção devem ser viáveis nos aspectos técnico e econômico, além de ambiental e socialmente responsáveis em todas as etapas de cultivo, colheita e processamento (Vuppaladadiyam *et al.*, 2018). A utilização de gases de combustão industriais como fonte de CO₂, a captura de CO₂ e seu uso para reprodução de energia (Iglina; Iglina; Pashchenko, 2022), águas residuais (AR) como meio nutriente (Dalrymple *et al.*, 2013), aplicações como biorremediadoras de metais pesados em ecossistemas (Manikandan *et al.*, 2022) são exemplos de desenvolvimento sustentável com microalgas a fim de poupar energia, diminuir o impacto ambiental e com boa relação custo-benefício.

Microalgas de diferentes origens geralmente apresentam semelhanças em termos de composição celular, especialmente em relação às quantidades de proteínas, lipídios e carboidratos, quando cultivadas em condições de crescimento ideais. No entanto, para uma única espécie, a composição celular pode variar consideravelmente dependendo das condições de cultivo (Hu, Qiang; 2013). Os metabólitos secundários, substâncias produzidas por esses organismos, não são necessários para seu crescimento, desenvolvimento ou reprodução. Eles são gerados como uma resposta do organismo ao ambiente ao seu redor ou como uma defesa contra predadores, contribuindo para sua sobrevivência (Skjånes; Rebours; Lindblad, 2013; Dewick, 2002). Microalgas e cianobactérias acumulam esses metabólitos, como flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos, alcaloides, vitaminas, pigmentos e polissacarídeos (Bouyahya *et*

al., 2024). As vias metabólicas para a síntese de tais compostos são derivadas dos intermediários acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-desoxixilulose 5-fosfato para serem utilizados nas vias do acetato, chiquimato, mevalonato e desoxixilulose fosfato, respectivamente (Dewick, 2002).

A taxa de produção de biomassa e a capacidade de acumulação de biomoléculas fazem das microalgas um candidato potencial para substituir produtos/processos convencionais baseados em fósseis e para desenvolver uma bioeconomia circular sustentável (Mehariya *et al.*, 2021). A bioeconomia surge como uma resposta ao crescente reconhecimento da escassez de recursos naturais e da degradação ambiental, propondo soluções baseadas na gestão sustentável do meio ambiente e na produção consciente. Ela integra práticas de uso eficiente de matérias-primas renováveis e promove inovações tecnológicas que conciliam desenvolvimento econômico com a preservação do ecossistema (Orejuela-Escobar *et al.*, 2021).

A aplicação de microalgas está em consonância com os fundamentos da economia circular, que prioriza a minimização de resíduos, a otimização do uso de recursos energéticos e a mitigação das emissões de poluentes (Ahmad; Ashraf, 2023). As microalgas reduzem a emissão de carbono por utilizarem CO₂ atmosférico mitigando o aquecimento global (Goveas *et al.*, 2022). A recuperação de águas residuais com microalgas substitui sistemas de tratamento convencionais bastante caros e minimizam o impacto ambiental por metais pesados em aquíferos (Plöhn *et al.*, 2021). Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis estão em destaque sendo uma alternativa de energia renovável de encontro a ODS 7, energia acessível e limpa, proposta nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas (Oves; Qari; Ismai, 2022; Oliveira *et al.*, 2022). Na busca por práticas mais sustentáveis, a indústria de cosméticos verdes abraça a incorporação de microalgas em produtos de cuidados pessoais. Devido às grandes diferenças na fisiologia e composição das espécies, os processos de refinaria mais viáveis dependem das espécies cultivadas e das condições de crescimento (Van Den Broek *et al.*, 2018).

Portanto, as microalgas apresentam vantagens em relação às plantas terrestres na síntese de compostos bioativos, pois seus rendimentos fotossintéticos superam os das plantas terrestres (Wijffels; Barbosa; Eppink, 2010). Microalgas são fontes de vários metabólitos bioativos e, para tanto, existe a necessidade de se estabelecer condições de cultivo que otimizem a produção desses metabólitos (Hassan *et al.*, 2022). Mudanças nos parâmetros físicos (temperatura, intensidade de luz, fotoperíodo) ou químicos (nutrientes, nitrogênio, fósforo, pH e salinidade) expõem as microalgas a condições estressantes, levando ao acúmulo de biomassa que resulta em produtos e biomoléculas de alto valor (Procházková *et al.*, 2014). Fatores abióticos

desempenham um papel crucial na produção de metabólitos secundários por microalgas, uma característica que pode ser explorada para obtenção de metabólitos de interesse com aplicações de alto valor (Paliwal *et al.*, 2017). A luz é um dos principais fatores que regula essa atividade. O regime claro-escuro influencia o crescimento e a produtividade de biomassa. Um estudo realizado com cinco espécies de clorófitas observou resultados diferentes para o crescimento da cultura das espécies de algas examinadas, dependendo do fotoperíodo aplicado (Krzemińska *et al.*, 2014).

Esse trabalho se propõe a desenvolver um protocolo de cultivo de microalgas e secagem de biomassa, com investigação da composição dessa biomassa. O protocolo está embasado em parâmetros semelhantes aos realizados em outros trabalhos para outras espécies de microalgas. Além disso, pretende-se identificar as condições ideais de crescimento e produção de biomassa verificando o tempo ideal para a colheita da microalga em estudo.

2. Metodologia

Com intuito de desenvolver o protocolo de cultivo da espécie *Scenedesmus obtusus*, segue-se as seguintes etapas: isolamento da microalga, preparo do meio de cultura, monitoramento da densidade de microalgas e da densidade óptica, reposição do meio de cultura (cultivo Fed-Batch), centrifugação, congelamento e secagem da biomassa (Figura 1).

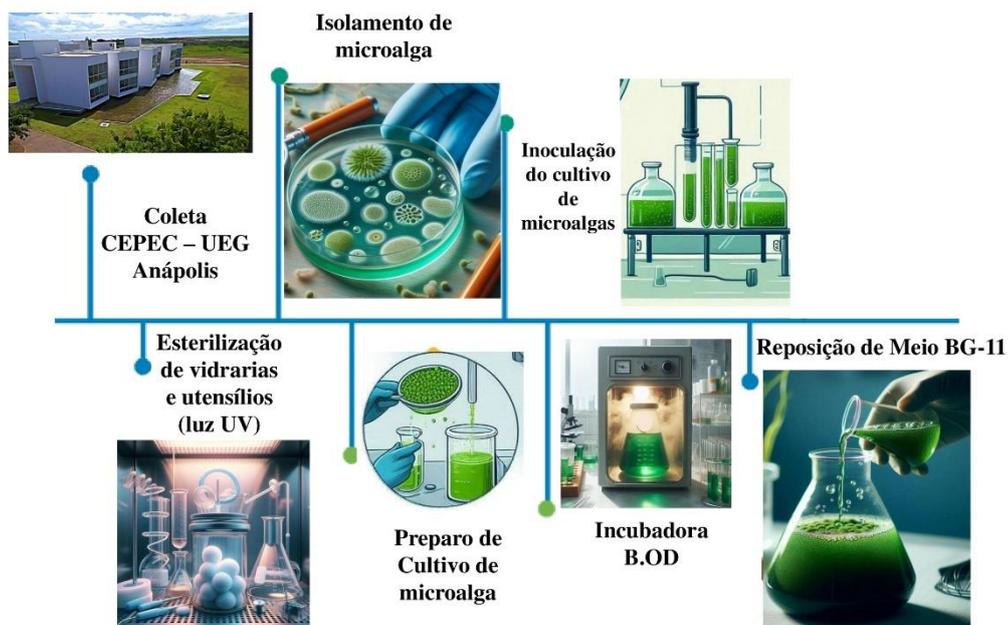


Figura 1. Representação esquemática das etapas de coleta, preparo, elaboração, conservação, manutenção do inóculo de microalgas para cultivo e acúmulo de biomassa. 1) Coleta de amostra do espelho d'água no Centro de Pesquisa e Educação Científica-CEPEC, Universidade Estadual de Goiás – Anápolis; 2) Isolamento de microalga em laboratório. 3) Esterilização de vidrarias, instrumentos e utensílios na capela de fluxo sob luz UV; 4) Preparo de alíquotas de microalgas; 5) Inoculação de microalgas; 6) Incubação em B.O.D; 7) Reposição de meio nutritivo

BG-11. Fluxograma gerado com auxílio da ferramenta Bing Image Creator.

2.1 Etapas do protocolo de cultivo

Uma amostra líquida foi coletada do espelho d'água do Centro de Pesquisa e Educação Científica - CEPEC, localizado na Universidade Estadual de Goiás - UEG, Campus Central, Anápolis, GO.

2.1.1 Isolamento de amostras de microalgas

A primeira inoculação da alíquota de microalgas em placas de Petri contendo meio BG-11 e ágar foi realizada antes do isolamento, sendo as placas armazenadas em incubadora tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio - BOD a 25 °C (± 2 °C), com um fotoperíodo de 12 horas luz:12 horas escuro. O isolamento da microalga no meio BG-11 foi conduzido por meio da técnica de semeadura por esgotamento, utilizando o antifúngico Fluconazol, da farmacêutica MedQuímica, nas concentrações de 0,05 g/L e 0,1 g/L. O repique foi realizado com o auxílio de uma alça bacteriológica, dentro de uma câmara de fluxo laminar (Teixeira, 2024).

2.1.2 Esterilização de material

Todas as vidrarias e instrumentos para manuseio e armazenamento da amostra foram esterilizados em autoclave. A manipulação das amostras ocorreu dentro do fluxo laminar que, previamente, era higienizada com álcool 70% e esterilizada com luz UV por 20 minutos para qualquer procedimento.

2.1.3 Preparo para cultivo da microalga

Utilizou o meio nutritivo BG-11 para o cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Tabela 1). Usou um agitador magnético modelo 114-1 ETHIK TECHNOLOGY para garantir a completa dissolução dos sais. Após a diluição, o pH foi ajustado para atingir o valor de $7.1 \pm 0,1$, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) conforme necessário. Em seguida, a solução foi transferida para frascos reagentes de vidro com tampa de rosca e autoclavada por 20 min. Após arrefecer, os frascos foram armazenados em um refrigerador convencional.

Tabela 1: Composição do meio mineral padrão BG-11. Fonte: Rippka *et al.*, (1979).

Ingredientes	Unidade	Quantidade
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	g	1,5
Fosfato de Potássio bifásico (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O)	g	0,04
Sulfato de Magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	g	0,075

Cloreto de Cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	g	0,036
Cítric Acid	g	0,006
Ferric Ammonium Citrate	g	0,006
EDTA (disodium magnesium salt)	g	0,001
Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)	g	0,02
Trace-Metal Mix A ₅ +Co* (mL)	mL	1
Água desionizada (mL)	mL	1000

*Trace metal mix A₅+Co contains (g l^{-1}): H_3BO_3 , 2.86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.222; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.390; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0494.

2.1.4 Inoculação do cultivo da microalga

As amostras foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 1L e 2L. O cultivo foi estabelecido em meio líquido com a proporção de 1:10 (alga em meio líquido: meio BG-11 líquido). A densidade celular algal inicial foi de $3,15 \times 10^6$ Indivíduos/mL.

2.1.5 Condições de cultivo (incubadora)

O cultivo foi realizado em uma incubadora sob condições fotoautotróficas de crescimento. A incubadora utilizada foi modelo SL224 SOLAB, com controle de temperatura a 25°C , e fotoperíodo 12h:12h (luz – escuridão), com aeração contínua por compressor de aeração, a uma vazão de ar de 6L/min, e iluminação artificial proveniente de uma lâmpada de LED de 17 W, posicionada a uma distância de 40 cm da fonte de iluminação. Essas condições foram mantidas constantes ao longo do ciclo. Para evitar contaminação, os frascos foram cobertos com rolhas de algodão com gaze.

A agitação dos cultivos foi realizada de forma contínua por meio de compressores de ar Boyu SC 7500 conectados à incubadora. O sistema utilizou uma mangueira de silicone acoplada a uma pedra porosa para a injeção de ar atmosférico no cultivo, garantindo uma eficiente dissolução dos gases. A mangueira foi inserida no frasco Erlenmeyer, que foi vedado com um tampão de algodão. A aeração garante uma distribuição uniforme de nutrientes, oxigênio e dióxido de carbono na cultura de microalgas, proporcionando condições favoráveis para o crescimento celular. Além disso, a aeração ajuda a evitar a sedimentação das microalgas, mantendo-as em suspensão e facilitando a absorção da luz necessária para a fotossíntese o que acelera o acúmulo de biomassa (Suh; Lee, 2003; Tredici *et al.*, 2004).

O cultivo deste estudo foi mantido sob 25°C . A temperatura do cultivo é um fator restritivo adicional, uma vez que exerce uma influência significativa nas reações metabólicas, afetando diretamente a taxa de crescimento das microalgas (Souto; Andrade; Gatti, 2014). Em adição à temperatura, o potencial hidrogeniônico (pH) é um fator essencial às microalgas. O pH



do meio nutriente apresenta influência no crescimento das microalgas (Tripathi; Singh; Thakur, 2015). O pH está diretamente ligado com o bom funcionamento celular das microalgas, por isso o seu controle é de vital importância para o melhor desenvolvimento dos cultivos. Para Andrade; Filho (2014), a faixa ideal de pH para alcançar a maior densidade de microalgas está entre 7,5 e 9,0. Nesse trabalho, o pH do meio de cultivo estabelecido foi de $7.1 \pm 0,1$ e foi acompanhado por meio de um medidor de pH, da marca IONLAB, modelo PHB500, previamente calibrado com solução tampão de 4,00, 7,00 e 10,0.

2.1.6 Reposição de meio nutritivo

A cultura é denominada Fed-Batch pela adição gradual de meio BG-11 (Jacinavicius *et al.*, 2013), mantendo os mesmos parâmetros iniciais do cultivo. O meio de cultura BG-11 é uma formulação amplamente utilizada para o cultivo de microalgas verdes em laboratório, especialmente para espécies de cianobactérias de água doce (Grobbelaar *et al.*, 2004). Desenvolvido por Rippka e colaboradores em 1979, o BG-11 é um meio nutritivo bem equilibrado que fornece os nutrientes essenciais necessários para o crescimento saudável das microalgas (Tabela 1).

2.1.7 Identificação e monitoramento do crescimento da microalga

A identificação da microalga foi realizada com base em suas características morfológicas, utilizando chave para identificação e descrições, observadas por microscopia ótica (Bicudo; Menezes, 2006; Ramos; Bicudo; Moura, 2015; Wehr, Sheath; Kocielek, 2015). Na primeira semana de cultivo a espécie que se estabeleceu foi a microalga verde *Scenedesmus obtusus*. O acompanhamento do crescimento da microalga envolveu coletas periódicas a cada três dias nas primeiras duas semanas e depois uma coleta semanal, utilizando o método de contagem de Uthermol (1958) com microscópio invertido (Olympus) com aumento de 400x. Para facilitar a contagem, as amostras foram diluídas em água destilada em uma proporção de 1:50 mL e contadas em uma câmara de Uthermol de 2mL. Devido a alta densidade, mesmo com a diluição, foram contados 10 campos aleatórios por amostra (Figura 2).



Figura 2. Ilustração esquemática de acompanhamento de crescimento e contagem de células algais. 1A – Coleta de alíquota do cultivo; 2A – Diluição de alíquota coletada; 3A – Preparo da Câmara de Uthermol; 4A – Análise e contagem da amostra; 5A – Registro de contagem em planilha. 1B – Coleta da amostra do cultivo; 2B – Amostra aplicada na cubeta para espectrofotômetro; 3B – Leitura de Absorbância e Transmitância a 680nm e 750nm no espectrofotômetro; 4B – Registro de leitura espectrofotométrica em planilha. O fluxograma foi gerado com auxílio da ferramenta Bing Image Creator.

Concomitante à contagem, uma alíquota da amostra do cultivo foi analisada no espectrofotômetro nos modos de Absorbância e Transmitância, no mesmo dia em que foi realizada contagem. As algas fotossintetizantes utilizam a luz na faixa de 400 a 700 nm, correspondente à radiação solar. Essa faixa é absorvida pelos pigmentos fotossintéticos (Andrade; Filho, 2014). Nesse contexto, o crescimento das algas foi determinado monitorando diariamente a absorbância e a transmitância da suspensão de algas nos comprimentos de onda de 680 e 750 nm em espectrofotômetro (UV-200 - RS LW científico) permitindo acompanhar e determinar a curva padrão de crescimento da cultura (Ram; Paliwal; Mishra, 2019; Krzemińska *et al.*, 2014; Tripathi; Singh; Thakur, 2015).

2.1.8 Monitoramento do crescimento da microalga e colheita de biomassa

Com o intuito de ter o máximo aproveitamento de biomassa de alga, quando o cultivo alcançou a máxima absorbância (próximo a 3000) com máximo volume (2L), a amostra foi retirada da incubadora e submetida a um processo de centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, mantendo outros conjuntos de cultivos reservados para futuros ciclos. O sobrenadante foi descartado, e as células obtidas passaram por duas lavagens com água destilada, repetindo o processo de centrifugação em cada etapa. O sedimento de biomassa foi então transferido para

Tubos Falcon de 50mL, utilizando pipeta e espátula, e armazenado em um freezer convencional a - 18 °C para posterior secagem em placas de Petri em uma estufa com circulação de ar a 40°C, modelo ESTF-6120-0062 LABORESTABILLE, por aproximadamente 24 horas, garantindo a remoção eficaz da umidade. Após a secagem, a biomassa foi armazenada em um dessecador para preservar suas características até ser submetida às técnicas analíticas planejadas (Figura 3).



Figura 3. Ilustração esquemática do processo para obtenção de biomassa microalgal. 1 – Cultivo concentrado é centrifugado; 2 – Colheita da biomassa obtida pela centrifugação transferida para tubo falcon; 3 – Biomassa é congelada; 4 – Biomassa é descongelada em temperatura ambiente; 5 – Secagem de biomassa em estufa com circulação de ar; 6 – Biomassa seca; 7 – Biomassa seca armazenada. O fluxograma foi gerado com auxílio da ferramenta Bing Image Creator.

Durante o tempo de experimento, foram feitos 24 cultivos para o acúmulo de biomassa. No entanto, 12 cultivos tiveram maior tempo de cultura permitindo mais que três leituras subsequentes para análises de tendências temporais, nomeados (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K), (L). Com o intuito de maximizar a biomassa da microalga, ao atingir o pico de crescimento (absorbância 3000 e densidade média $2,3 \times 10^7$ Indivíduos./mL) ocorreu a adição de meio nutritivo BG11 e foi aguardado picos populacionais subsequentes. Assim, conseguiu-se um maior acúmulo de biomassa, gerando um maior estresse populacional. Portanto, os tempos de crescimento e monitoramento dos parâmetros relatados acima variaram entre os cultivos.



2.2 Análise de dados

Para identificar os picos populacionais formação de curvas com número de indivíduos das espécies dominantes ao longo dos dias de cultivo até o momento da obtenção de biomassa (máxima absorvância). Além disso, realiza-se o cálculo da taxa de crescimento e a identificação das fases. Também, o acompanhamento do crescimento populacional no cultivo com curvas de Absorvância e Transmitância a 680nm e 750nm ao longo dos dias de cultivo. A fase de crescimento exponencial é marcada por altos valores de absorvância, enquanto a fase estacionária apresenta baixos valores de transmitância, refletindo uma maior densidade celular que dificulta a passagem de luz.

O crescimento microbiano é segmentado em 5 fases, cada uma desempenhando um papel crucial no ciclo de vida das microalgas: I) Fase Lag: Nesta etapa inicial, ocorre a adaptação ou indução de crescimento. As microalgas ajustam-se ao ambiente do meio de cultivo, preparando-se para o aumento subsequente na taxa de crescimento. II) Fase Log ou de Crescimento Exponencial: Este estágio é caracterizado por um crescimento rápido e exponencial das microalgas. Durante essa fase, as células se reproduzem ativamente, resultando em um aumento significativo na biomassa. III) Fase de Redução de Crescimento ou Transição: À medida que os recursos do meio de cultivo se tornam limitados ou as condições ambientais se alteram, ocorre uma desaceleração no crescimento. Nesta fase, as microalgas transitam para uma condição de redução de crescimento, preparando-se para uma possível estabilização. IV) Fase Estacionária de Crescimento: Nesta etapa, a taxa de crescimento se estabiliza, alcançando um equilíbrio entre a reprodução e a morte celular. As microalgas atingem uma densidade populacional máxima sustentável, onde o número de novas células produzidas é compensado pelo declínio natural ou morte de células mais antigas. V) Fase de Declínio ou Morte Celular: Quando ocorre uma limitação crítica de substrato ou se acumulam metabólitos tóxicos, as microalgas entram em uma fase de declínio. Nesse estágio, a taxa de mortalidade celular supera a taxa de reprodução, resultando em uma redução global na biomassa (Andrade; Filho, 2014).

Para o cálculo do rendimento da biomassa divide-se o peso da massa seca em gramas ao final da secagem pelo volume em litros utilizado. Para verificar se a absorvância ou a transmitância explicam a densidade populacional faz-se uma regressão linear simples onde a absorvância ou a transmitância é a variável independente e a densidade óptica a variável dependente. Para verificar a associação entre a densidade de células e a densidade óptica, correlaciona-se os valores de densidade populacional com a absorvância e a transmitância através de uma correlação de Pearson.

3. Resultados

O crescimento populacional de *Scenedesums obtusus* oscilou em picos populacionais com subsequentes quedas. Os picos populacionais ocorreram em intervalos de 4 dias (Figura 4). A máxima densidade ocorreu com 89 dias de cultivo e foi de $6,7 \times 10^7$ Indivíduos/mL.

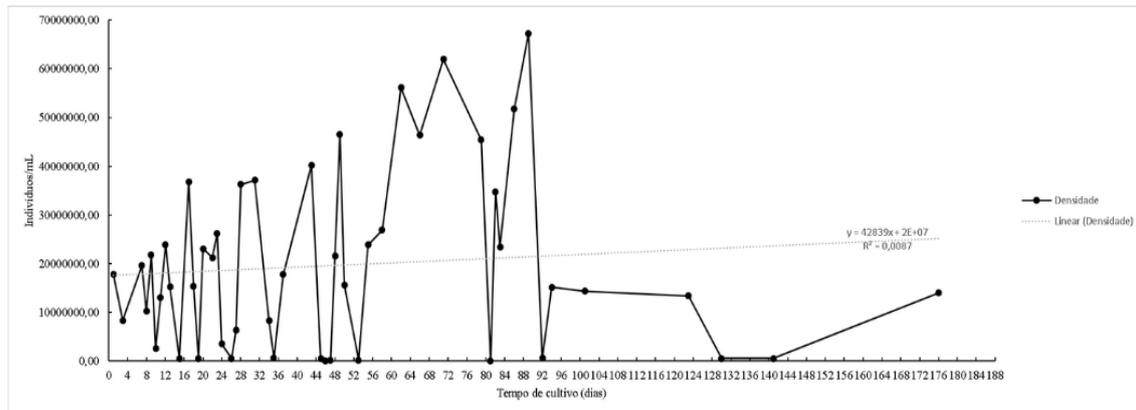
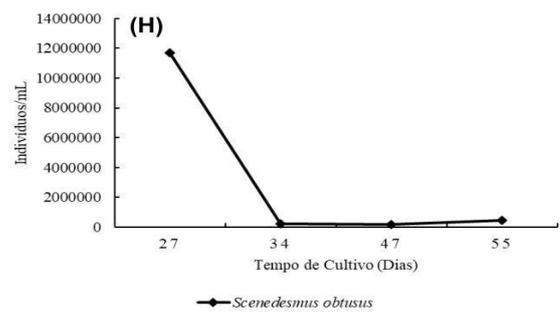
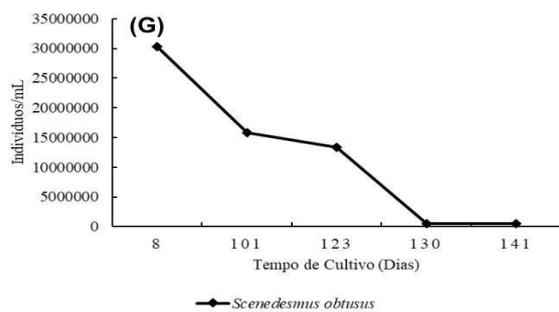
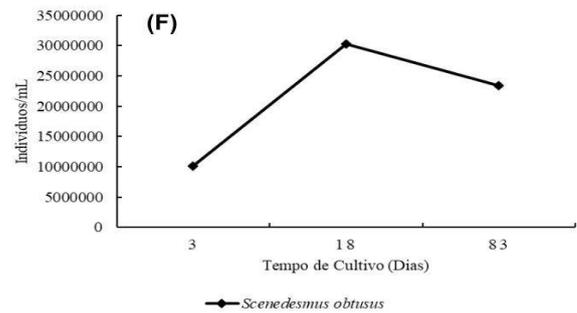
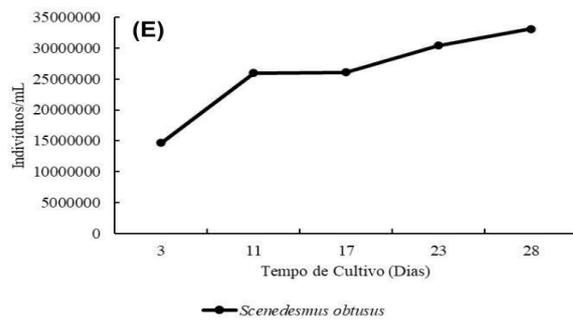
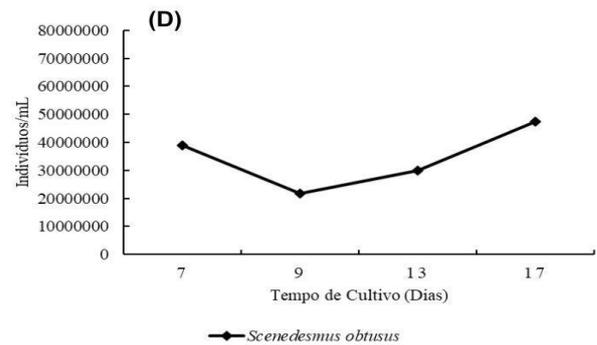
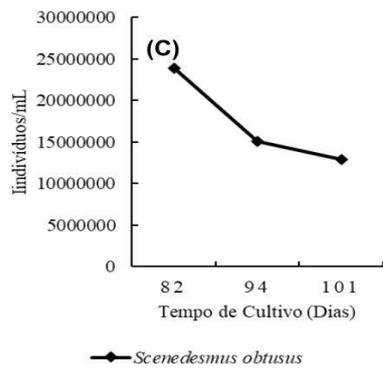
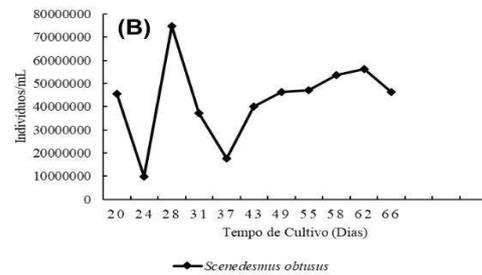
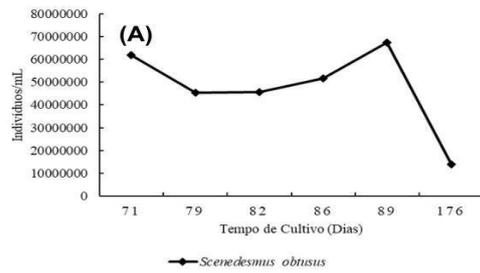


Figura 4. Densidade populacional após 24 cultivos (aproximadamente 180 dias).

Para cultivos que tiveram contagens já nos primeiros dias, os primeiros picos populacionais são observados com 7 (D- 4×10^7 Ind./mL), 8 (G- 3×10^7 Ind./mL), 10 (K- 5×10^7 Ind./mL), 11 (E- $2,5 \times 10^7$ Ind./mL), 18 (F e I- 3×10^7 e $2,5 \times 10^7$ Ind./mL) e 20 (B- $4,5 \times 10^6$ Ind./mL) dias (Figura 5). Nos cultivos que tiveram um tempo maior de acompanhamento é possível perceber que acima de 90 dias já começa uma queda bem acentuada (cultivos G e A), diminuindo as densidades para próximo de 0 (cultivo G, Figura 5). O pico populacional do cultivo H não apresentou o mesmo padrão de flutuação de picos percebidos nos demais cultivos. Por ora, não foi possível determinar a causa desse evento, e não houve sinais de contaminação. O tempo médio para secagem de cada cultivo foi de 55 dias (DP = 36,4), com valores mínimos e máximos de 17 e 176 dias, respectivamente. A mediana observada foi de 45 dias. O rendimento de biomassa verificado foi de 1.70 g/L.



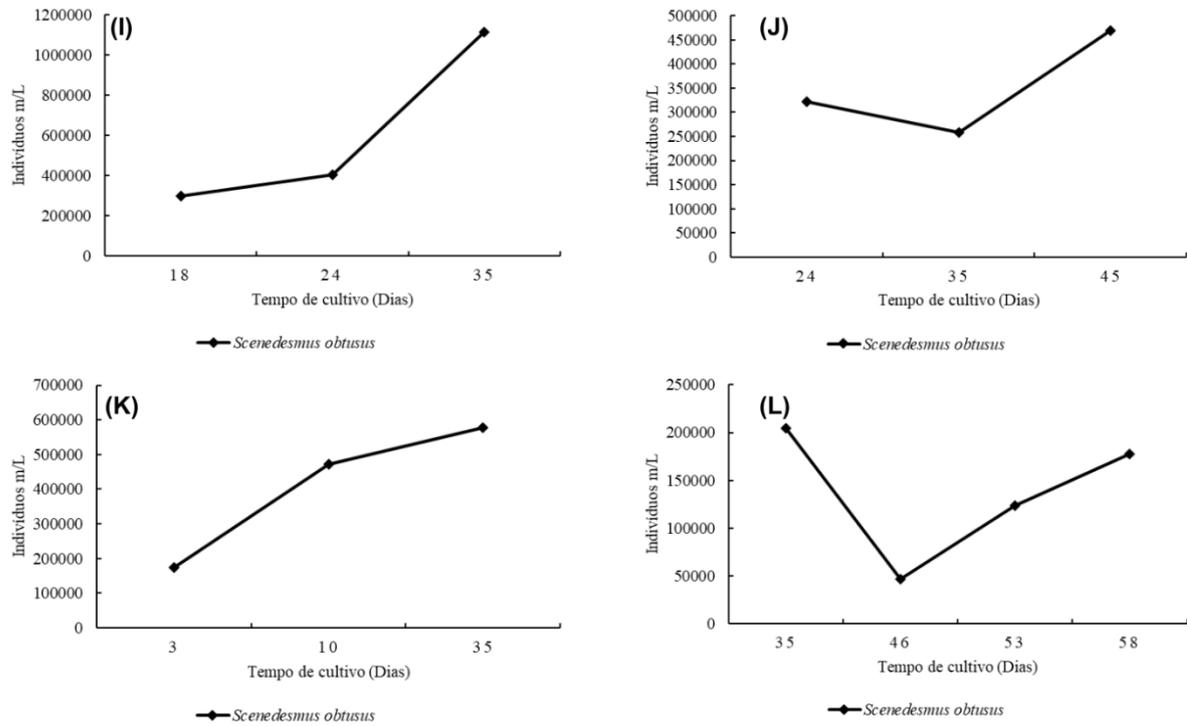


Figura 5. Desempenho de crescimento *Scenedesmus obtusius* nos cultivos com mais de três leituras. Condição de cultivo: meio BG-11, iluminação 12:12h, pH 7.1 e a 25°C.

Na fase inicial do cultivo ocorreram mais três espécies da classe Chlorophyceae (*Chlorella sp1*, *Monoraphidium minutum* e *Tetradesmus dimorphus*), mas com densidades muito pequenas quando comparado a espécie *Scenedesmus obtusius*. Em geral, a maior dominância da espécie alvo, ocorreu após subseqüentes picos populacionais (Figura 6).

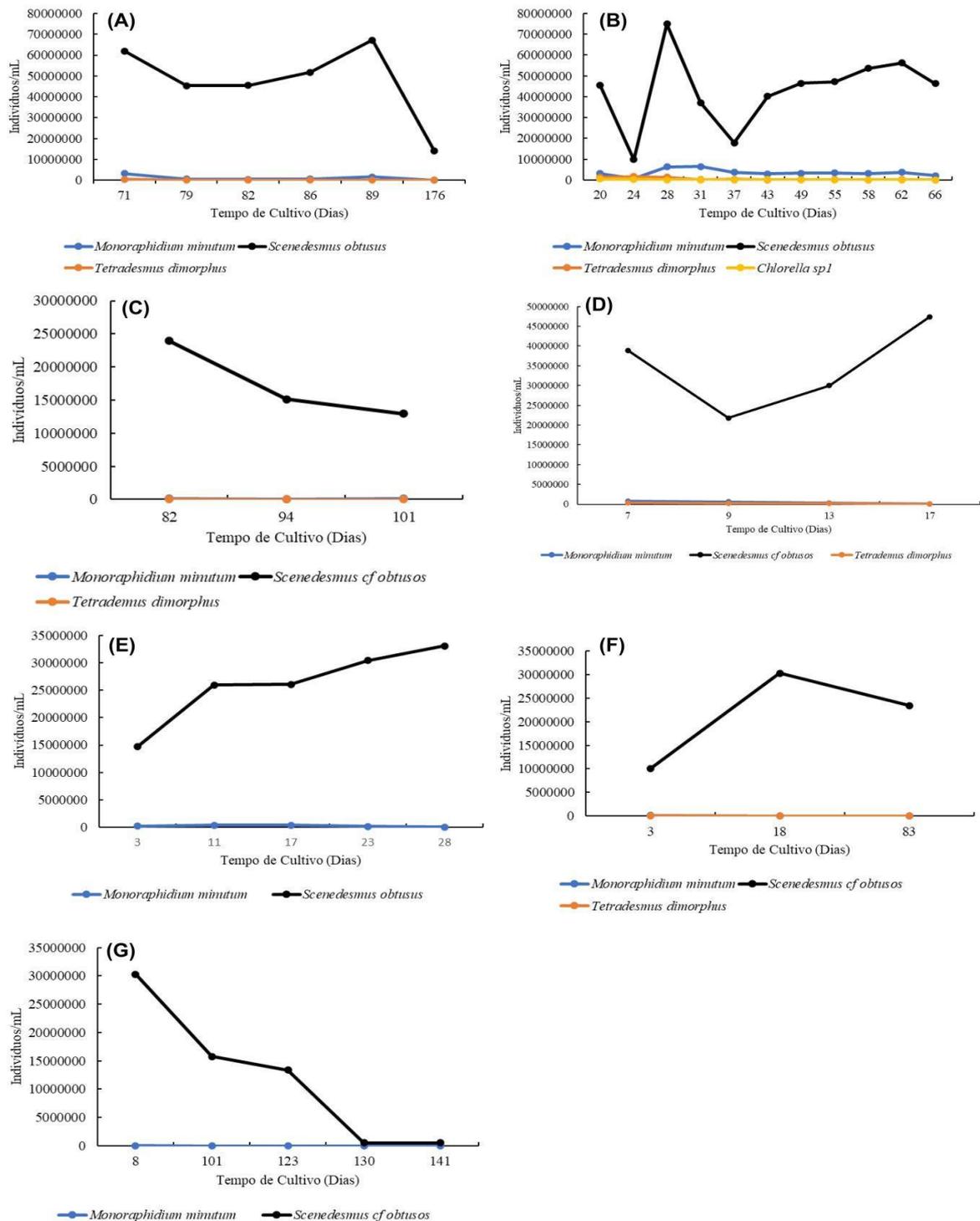


Figura 6. Desenvolvimento de cultivos iniciais com mais de uma espécie presente. *Scenedesmus obtusus* ocorre simultaneamente com *Chlorella sp1*, *Monoraphidium minutum* e *Tetrademus dimorphus* no cultivo (A),(B), (C), (D), (E), (F) e (G).

As curvas de absorvância no comprimento de onda 680 e 750 nm respectivamente para cada cultivo indicam que todos cultivos atingiram a saturação máxima (Figura 7). As curvas de transmitância no comprimento de onda 680 e 750nm respectivamente para cada cultivo

indicam que todos os cultivos atingiram valores próximos de 0 (Figura 7).

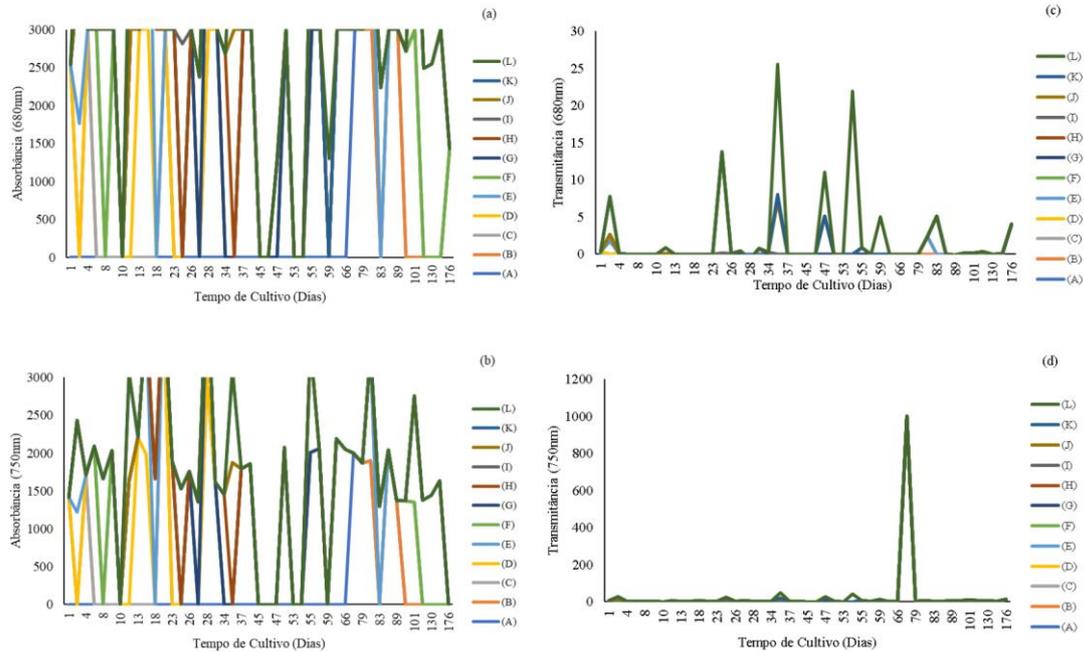


Figura 7. Curvas de absorvância dos cultivos (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K) e (L) para os comprimentos de onda 680 nm (A) e 750 nm (B). Curvas de transmitância dos cultivos (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K) e (L) para os comprimentos de onda 680 nm (C) e 750 nm (D).

A absorvância e a transmitância não foram explicadas pela densidade populacional de *Scenedesmus obtusius* (Figura 8).

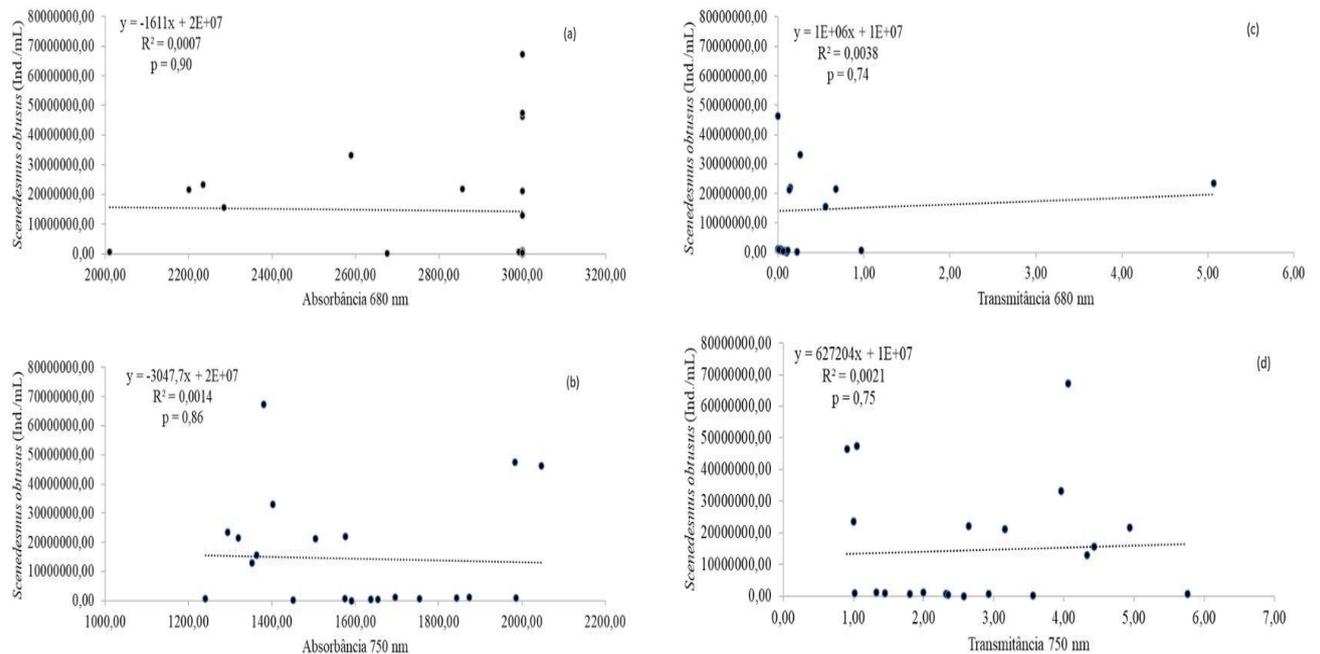


Figura 8. Regressão simples entre a absorvância e a densidade populacional de *Scenedesmus obtusius* a 680nm (a)

e 750 nm (b). Regressão simples entre a transmitância e a densidade populacional de *Scenedesmus obtusius* a 680nm (c) e 750 nm (d). A regressão foi realizada com base nos dados coletados e organizados em uma tabela no Excel, fazendo uso da função análise de dados do programa.

4. Discussão

Os diferentes tipos de sistemas utilizados no cultivo de microalgas influenciam no rendimento de biomassa. No sistema fechado com aeração em escala laboratorial encontramos o mesmo rendimento encontrado em outro estudo em sistema fechado com birreator (1,7 g/L - 1,7 kg/m³; Oliveira *et al.*, 2022). Sistemas abertos como lagoa aberta, a biomassa atingida é de 0,05–0,5 kg/m³; em tanque aerado 0,02–0,8 kg/m³; lagoas de pista, 0,5–1,5 kg/m³; camada fina, 10–50 kg/m³ enquanto para sistemas fechados, fotobiorreator alcança 2–5 kg/m³ e fermentador 5–20 kg/m³ (Oliveira *et al.*, 2022). O rendimento de biomassa de *Chlorella* spp. foi de 0,98 g/L em meio BG-11 suplementado com bicarbonato e glicose (1%) (Kirrolia; Bishnoi; Singh, 2014). Valores similares de rendimento ao observado neste estudo foram obtidos em cultivos em fotobiorreatores de *Scenedesmus* sp. em meio BG-11 (Controle) e em águas residuais do processamento de queijo com concentração celular máxima observada com 11 dias de ambas culturas (Mercado *et al.*, 2020). Isso pode sugerir a possibilidade do uso de um tempo menor para o cultivo e o aproveitamento de águas residuárias.

Entre meios disponíveis para cultura de microalgas, BG11, M₄N (Ilavarasi *et al.*, 2011), Bold's Basal Medium - BBM (Lam; Lee, 2014), Fog (Kothari *et al.*, 2012) e SK (Ogbonna; Tanaka, 1998), *Scenedesmus* sp. ASK22 em BG-11 apresentou crescimento mais alto entre os meios selecionados (Pandey *et al.*, 2020). Ram; Paliwal; Mishra (2019), conduziram culturas de *Scenedesmus* sp. e analisaram o crescimento, produtividade de biomassa e composição bioquímica encontrando melhores índices com meio BG-11 com 21 dias de cultivo. A duração do cultivo mencionada foi divergente à estudada por Aitzetmüller *et al.* (1969) em culturas de algas verdes, especificamente *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, com centrifugação após 5,5 a 6 semanas. Guerra *et al.* (2022), realizaram ensaios com a espécie de microalga *Scenedesmus* sp. em meios de cultivo Guillard e Chu, avaliando o aumento na eficiência de produção de lipídios e biomassa. Os resultados obtidos no experimento em relação à biomassa seca (g/L⁻¹) variaram entre 0,1489 e 1,8130 apontando pouca diferença para a biomassa seca obtida com o protocolo feito neste trabalho (1,70 g/L). Fodorpatiki *et al.* (2013) investigaram o impacto das condições nutricionais na produção de biomassa e compostos de valor em *Scenedesmus acuminatus* cultivadas em meio basal de Bold. Com seis dias de cultivo, verificaram que a adição de 10 mM de bicarbonato de potássio e o



aumento da concentração de nitrato no meio de cultivo, de $0,25 \text{ g/L}^{-1}$ para $1,25 \text{ g/L}^{-1}$, resultaram em um aumento significativo na produção de biomassa de algas. Diante dos registros apontados, nota-se que o crescimento e a composição de algas estão relacionados ao conteúdo de nutrientes de seu meio. Por meio de alterações no teor de nutrientes do meio de crescimento, a produção de biomassa e sua composição final podem ser mais rentáveis.

O cultivo não apresentou padrão de crescimento microbiano em 5 fases (inicial, exponencial, redução, estacionária e fase de declínio), ocorreu um padrão de picos populacionais com as fases exponencial e declínio. Baumgartner et al. (2013) encontraram comportamento similar de células microalgais do gênero *Scenedesmus* onde não apresentaram a fase estacionária. Possivelmente, esse comportamento ocorreu em função da limitação de nutrientes ou saturação da fotossíntese ou o fotoperíodo aplicado como fator estressante. À medida que foi sendo feita a reposição de meio na cultura, promovia uma diluição e uma diminuição da DO com conseqüente recuperação para nova fase de multiplicação. Esse comportamento é a resposta da célula como resultado da mudança percebida. Essa alimentação retorna os nutrientes para a microalga e permite estender a duração da cultura e observar mudança na densidade. Isso reflete a adaptação das microalgas em resposta às novas condições de cultivo (Ranjbar *et al.*, 2008; Richmond, 2004).

Tempo de cultivos reduzidos em função do objetivo de estudo e inóculos com concentrações satisfatórias para um volume ideal de cultivo são encontrados na literatura. Por exemplo, culturas de *Scenedesmus* sp. ISTGA1 foram cultivadas em meio BG-11 suplementado com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) por 14 dias, o qual apresentou um padrão de crescimento aumentado quando suplementado com diferentes concentrações de 10 e 100mM (Tripathi; Singh; Thakur, 2015). Culturas de *Scenedesmus acutus* foram incubadas em meio KC por 28 dias para determinação de padrões para produtividade de biomassa e ácidos graxos, e apresentou crescimento máximo aos 22 dias (fase exponencial tardia) (El-Sheekh *et al.*, 2017). Experimento com *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. com duração de 15 dias foi realizado para avaliar o crescimento destas microalgas e o potencial para remoção de nutrientes tratadas com efluente doméstico (Santos *et al.*, 2022).

O estudo analisa a relação entre absorvância, transmitância e densidade celular em culturas de microalgas. Observou-se que a absorvância atingiu valores elevados (até 3.000) ao longo de 47,5 dias, indicando uma alta concentração de células durante a fase de crescimento exponencial. Estudos anteriores, como os de Alejos-Cabrera et al. (2023) e Gómez et al. (2016), mostraram forte correlação entre absorvância e densidade celular, com altos coeficientes de determinação ($R^2 > 0,98$), validando a espectrofotometria como método preditivo confiável na

biotecnologia de microalgas. No entanto, o presente estudo encontrou limitações na linearidade da relação entre absorvância e densidade celular, possivelmente devido à saturação do espectrofotômetro por altas concentrações de células (absorvância até 3000).

A temperatura do cultivo é um fator restritivo adicional, uma vez que exerce uma influência significativa nas reações metabólicas, afetando diretamente a taxa de crescimento das microalgas (Souto; Andrade; Gatti, 2014). Huseby, *et al.* (2013). A escolha adequada da temperatura é essencial para otimizar a produtividade e a qualidade dos produtos obtidos a partir das microalgas. A cepa *Scenedesmus almeriensis* apresenta melhor desenvolvimento em temperaturas entre 25°C e 28°C. Temperaturas acima dessa faixa são prejudiciais e resultam em uma redução na produtividade da biomassa (Fernández-Sevilla; Acien Fernández; Molina, 2010). El-Sheekh *et al.* (2017) trabalhando com *Scenedesmus acutus* constataram que não houve diferença significativa na produtividade de biomassa a 25 e 30°C com 0.41 e 0.42 g.l⁻¹.d⁻¹, respectivamente. O cultivo deste estudo foi mantido sob 26°C, observando um bom desempenho para a espécie cultivada. A redução ou aumento da temperatura também pode influenciar a produção de metabólitos secundários, como pigmentos, antioxidantes e compostos bioativos. Tjahjono *et al.* (1994), constataram aumento de astaxantina em *Haematococcus* em função do aumento de temperatura. Liu; Lee, (2000) verificaram o aumento de carotenoides pela alga verde *Chlorococcum sp* em condições de aumento de temperatura.

O principal desafio no cultivo em larga escala de microalgas fotoautotróficas reside na utilização eficiente da luz intensa para a produção em massa de células e metabólitos secundários por meio da fotossíntese (Richmond, 2004). As microalgas realizam a fotossíntese oxigênica. Nela, é fundamental a presença de luz em períodos ideais para o seu desenvolvimento. É comum utilizar um ciclo de 12 horas de luz seguido por 12 horas de escuridão para manter cultivos em laboratório. Esse ciclo claro-escuro permite um melhor desempenho da atividade fotossintética e evita a ocorrência de fotoinibição (Costa *et al.*, 2014). O regime de luz é um parâmetro importante na produção de biomassa influenciando, por exemplo, a taxa de crescimento e produção de biomassa em *Chlorella vulgaris* foi observado (Amini Khoeyi; Seyfabadi; Ramezanpour, 2012).

Em adição à temperatura, o potencial hidrogeniônico (pH) é um fator essencial às microalgas (Tripathi; Singh; Thakur, 2015). Para Andrade; Filho (2014), a faixa ideal de pH para alcançar a maior densidade de microalgas está entre 7,5 e 9,0. Durante o dia, a fotossíntese consome CO₂, o que pode elevar o pH. No entanto, a respiração das microalgas promove a liberação e dissolução do CO₂ no meio, o que pode reduzir o pH (Embrapa, 2000).

Tripathi; Singh; Thakur (2015) conduziram um experimento cultivando *Scenedesmus sp.* em



meio de cultura BG-11, com pH inicial de 7,4 e um fotoperíodo de 18 horas. Eles investigaram a influência do pH variando-o de 7 a 10 e observaram que a microalga alcançou sua maior produtividade em pH 8, mostrando um crescimento mais robusto em condições alcalinas. Este resultado é comparável ao obtido por Difusa et al. (2015) nas espécies *Scenedesmus* ADIITEC-II e GUBIOTJT116, cultivadas em meio BG-11, incubadas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo claro e escuro de 16:8 h, e submetidas a diferentes valores de pH (5,0 ao 9,0). O crescimento de ambas as espécies e a produtividade máxima de biomassa foi observado em pH 7,0. Ao ponto que condições mais ácidas ou muito básicas dos valores mencionados foram sugeridos, observaram densidade e produtividade de biomassa reduzidas.

A escolha da tecnologia de colheita adequada é determinada pelo valor dos produtos desejados, pela concentração de biomassa e pelo tamanho das células das microalgas em questão (Li *et al.*, 2008). A técnica escolhida para este trabalho foi a centrifugação. É uma técnica comum e eficaz para separar quase todos os tipos de microalgas do meio de cultura (Grima *et al.*, 2013; Goiris *et al.*, 2012; Tripathi; Singh; Thakur, 2015; Dantas *et al.*, 2019). Após a centrifugação, as microalgas sedimentadas são coletadas do fundo do tubo com auxílio de espátula e pipeta e o meio de cultura sobrenadante é descartado (Pahl *et al.*, 2013).

As condições utilizadas neste protocolo foram eficazes em promover o crescimento celular e a produção de biomassa ao longo do tempo de cultivo. No entanto, ajustes na metodologia devem ser propostos para alcançar um rendimento de biomassa ainda maior, com valores significativos associados à potencialização dos metabólitos produzidos pelo organismo estudado. Essas modificações podem incluir variações nos parâmetros de cultivo, como intensidade de luz, pH, nutrientes, e tempo de cultivo, visando otimizar a produção de biomassa e a acumulação de metabólitos desejados.

5. Conclusão

O protocolo de cultivo foi estabelecido a partir dos resultados desse estudo. As microalgas são altamente disponíveis para exploração, um recurso natural para alimentar a economia circular e minimizar impactos ambientais. O uso de meio BG-11 para as culturas foi satisfatório para o crescimento das microalgas e produção de biomassa. A microalga apresentou um bom desenvolvimento no modelo Fed-Batch, exibindo picos de crescimento em um período de tempo significativo. Contudo, o cultivo foi estendido para aumentar a produção de biomassa. A metodologia empregada indicou picos populacionais já nos estágios iniciais do protocolo, permitindo que o cultivo pudesse ser centrifugado aos 28 dias. Ainda assim, optou-se por

continuar utilizando o sistema Fed-Batch para promover o acúmulo adicional de biomassa. O protocolo estabelecido, com duração média de 55 dias (DP = 36,4), resultou em um rendimento de 1,70 g/L, um valor comparável ao observado em outros estudos envolvendo o mesmo gênero ou grupos similares de microalgas.

A inexistência de uma fase estacionária no cultivo sugere que as condições praticadas no protocolo propiciaram o estresse populacional nas microalgas, e sucederam a produção de compostos em resposta ao estresse proposto. A contagem e a verificação da absorvância e transmitância do cultivo de microalgas foram ferramentas essenciais para monitorar o crescimento e a saúde do cultivo. A máxima densidade aconteceu com 89 dias de cultivo atingindo $6,7 \times 10^7$ indivíduos/mL. Esse rigoroso processo de preparação da biomassa assegurou a obtenção de amostras secas e livres de contaminantes, estabelecendo uma base sólida para análises precisas e confiáveis nas etapas subsequentes de investigação.

O protocolo padronizado permite rotinas em comum sobre condições de cultivo, como temperatura, pH, e composição do meio de cultura, assegurando que os microrganismos cresçam em um ambiente controlado e previsível. Além disso, a padronização facilita a comparação de resultados entre diferentes estudos e laboratórios, promovendo a validação científica e a aplicação industrial dos processos de cultivo.

6. Referências Bibliográficas

AHMAD, Ashfaq; ASHRAF, Syed Salman. Sustainable food and feed sources from microalgae: Food security and the circular bioeconomy. **Algal Research**, p. 103185, 2023.

AITZETMÜLLER, K. *et al.* Loroxanthin, a unique xanthophyll from *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 8, n. 9, p. 1761-1770, 1969.

AMINI KHOEYI, Zahra; SEYFABADI, Jafar; RAMEZANPOUR, Zohreh. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. **Aquaculture International**, v. 20, p. 41-49, 2012.

ANDRADE, Diva Souza; AC FILHO, Microalgas de Águas Continentais. Potencialidades e desafios do cultivo. **ANDRADE, Diva Souza; COLOZZI FILHO, Arnaldo. Microalgas de águas continentais**, v. 1, 2014.

ANDRADE; FILHO, Microalgae of continental waters Volume 1: strengths and challenges of cultivation. **Microalgae of continental waters Volume 1: strengths and challenges of cultivation.**, 2014.

ARIEDE, Maíra Bueno *et al.* Cosmetic attributes of algae-A review. **Algal research**, v. 25, p. 483-487, 2017.

BICUDO, CE de M.; MENEZES, Mariângela. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). São Carlos. **Rima**. **473p**, 2006

BOROWITZKA, Michael A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of applied phycology**, v. 25, p. 743-756, 2013.

BOUYAHYA, Abdelhakim *et al.* Bioactive substances of cyanobacteria and microalgae: Sources, metabolism, and anticancer mechanism insights. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 170, p. 115989, 2024.

CABRERA, RUTH MILAGROS ALEJOS; HUAMÁN, Gheraldine Abegail Ynga; REYES, Wilmer Alexis Gaspar. Uso del método espectrofotométrico para la cuantificación celular de microalgas marinas de uso en la acuicultura. **Revista ION: Investigación, Optimización y Nuevos Procesos en Ingeniería**, v. 36, n. 3, p. 75-84, 2023.

CERCA, N. *et al.* Influence of batch or fed-batch growth on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Letters in applied microbiology**, v. 39, n. 5, p. 420-424, 2004.

CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 73-84, 2004.

COSTA, Antônio *et al.* Microalgas de Águas Continentais. Potencialidades e desafios do cultivo. **Microalgas de águas continentais**, v. 1, 2014.

DA SILVA BAUMGARTNER, Tatiana R. *et al.* Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

DALRYMPLE, Omatoyo K. *et al.* Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. **Aquatic biosystems**, v. 9, p. 1-11, 2013.

DANTAS, Danielli Matias de Macedo *et al.* Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 4, p. 318-326, 2019.)

DE MORAIS, Michele Greque *et al.* Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DIFUSA, Amrita *et al.* Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus species*. **Biofuels**, v. 6, n. 1-2, p. 37-44, 2015.

EL-SHEEKH, Mostafa *et al.* Effect of temperature on growth and fatty acids profile of the biodiesel producing microalga *Scenedesmus acutus*. **BASE**, 2017.

EMBRAPA. Parâmetros ambientais e qualidade da água na piscicultura. Brasília, 2000.

(Recomendações Técnicas, v. 8).

FERNÁNDEZ-SEVILLA, José M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 27-40, 2010.

FODORPATAKI, Laszlo *et al.* Influence of inorganic nutrients on parameters of biomass production in a local strain of the microalga *Scenedesmus acuminatus*. **Contributii Botanice**, v. 48, 2013.

GOIRIS, Koen *et al.* Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of applied phycology**, v. 24, p. 1477-1486, 2012

GRIMA, Emilio Molina; ACIÉN FERNÁNDEZ, Francisco Gabriel; ROBLES MEDINA, Alfonso. Downstream processing of cell mass and products. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**, p. 267-309, 2013.

GROBBELAAR, Johan U. *et al.* Algal nutrition: mineral nutrition. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, p. 97-115, 2004.

GUERRA, Witter Duarte *et al.* Avaliação do rendimento de biomassa e lipídeos empregando diferentes regimes de cultivo em *Scenedesmus* sp. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e18411124565-e18411124565, 2022.

GUIRY, Michael D. How many species of algae are there?. **Journal of phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012.

HASSAN, Saqib *et al.* Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 999-1029, 2022.

HU, Qiang. Environmental effects on cell composition. **Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology**, p. 114-122, 2013.

HUSEBY, Siv *et al.* Chemical diversity as a function of temperature in six northern diatom species. **Marine drugs**, v. 11, n. 11, p. 4232-4245, 2013.

IGLINA, Tatyana; IGLIN, Pavel; PASHCHENKO, Dmitry. Industrial CO₂ capture by algae: a review and recent advances. **Sustainability**, v. 14, n. 7, p. 3801, 2022.

ILAVARASI, Asokaraja *et al.* Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production. **Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 540-545, 2011.

JACINAVICIUS, FERNANDA RIOS *et al.* Manual para cultivo de cianobactérias. **São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente**, 2013.

KIRROLIA, Anita; BISHNOI, Narsi R.; SINGH, Rajesh. Response surface methodology as a decision-making tool for optimization of culture conditions of green microalgae *Chlorella* spp. for biodiesel production. **Annals of microbiology**, v. 64, p. 1133-1147, 2014.

KOTHARI, Richa *et al.* Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: an integrated approach for treatment and biofuel production. **Bioresource technology**, v. 116, p. 466-470, 2012.

KRZEMIŃSKA, Izabela *et al.* Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, p. 735-741, 2014.

LAM, Man Kee; LEE, Keat Teong. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a pilot-scale sequential-baffled column photobioreactor for biomass and biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 399-410, 2014.

LI, Yanqun *et al.* Biofuels from microalgae. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

LIU, Bei-Hui; LEE, Yuan-Kun. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. **Journal of applied phycology**, v. 12, p. 301-307, 2000.

M CARDOSO, Susana *et al.* Bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian Peninsula. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 896-917, 2014.

MANIKANDAN, Arumugam *et al.* Emerging role of microalgae in heavy metal bioremediation. **Journal of basic microbiology**, v. 62, n. 3-4, p. 330-347, 2022.

MATTHIENSEN, A.; MICHELON, W. Produção de microalgas em sistema semiaberto: estrutura e funcionamento de tanques semicirculares (raceway tanks). 2022.

MEHARIYA, Sanjeet *et al.* Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. **Chemosphere**, v. 280, p. 130553, 2021.

MERCADO, Ingrid *et al.* Enhancement of biomass and lipid productivities of *Scenedesmus* sp. cultivated in the wastewater of the dairy industry. **Processes**, v. 8, n. 11, p. 1458, 2020.

MORANÇAIS, Michèle; MOUGET, Jean-Luc; DUMAY, Justine. Proteins and pigments. In: **Microalgae in health and disease prevention**. Academic Press, 2018. p. 145-175.

OGBONNA, James C.; TANAKA, Hideo. Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 1-2, p. 65-72, 1998.

OLIVEIRA, Carlos Yure B. *et al.* An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. **Journal of Environmental Management**, v. 320, p. 115897, 2022.

OREJUELA-ESCOBAR, Lourdes *et al.* Prospects of microalgae for biomaterial production and environmental applications at biorefineries. **Sustainability**, v. 13, n. 6, p. 3063, 2021.

OVES, Mohammad; QARI, Huda A.; ISMAIL, I. M. Biofuel formation from microalgae: a renewable energy source for eco-sustainability. **Curr World Environ**, v. 17, n. 1, p. 4-19, 2022

PAHL, Stephen L. *et al.* Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. **Algae for biofuels and energy**, p. 165-185, 2013.

PALIWAL, Chetan *et al.* Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource technology**, v. 244, p. 1216-1226, 2017.

PANDEY, Ashutosh *et al.* 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**, v. 150, p. 476-486, 2020.

PLÖHN, Martin *et al.* Wastewater treatment by microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 173, n. 2, p. 568-578, 2021.

PROCHÁZKOVÁ, Gita *et al.* Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal of applied phycology**, v. 26, p. 1359-1377, 2014.

RAM, Shristi; PALIWAL, Chetan; MISHRA, Sandhya. Growth medium and nitrogen stress sparked biochemical and carotenogenic alterations in *Scenedesmus* sp. CCNM 1028. **Bioresource technology reports**, v. 7, p. 100194, 2019.

RAMOS, Geraldo José Peixoto; BICUDO, Carlos Eduardo de Mattos; MOURA, Carlos Wallace do Nascimento. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, p. 549-566, 2015.

RANJBAR, Reza *et al.* High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 575-580, 2008.

RICHMOND, Amos *et al.* (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell science, 2004.

RIPPKA, Rosmarie *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

SANTOS, Rafaela Seara *et al.* Avaliação do crescimento de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. em efluente doméstico tratado. **DAE**, v. 70, n. 238, p. 42-55, 2022.

SKJÅNES, Kari; REBOURS, Céline; LINDBLAD, Peter. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172-215, 2013.

SOUTO, Adriano Rausch; ANDRADE, Elisangela Angelo; GATTI, Iara Cintra de Arruda; Microalgas de Águas Continentais. Potencialidades e desafios do cultivo. **ANDRADE, Diva Souza; COLOZZI FILHO, Arnaldo. Microalgas de águas continentais**, v. 1, 2014.

SPOLAORE, Pauline *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SUH, In Soo; LEE, Choul-Gyun. Photobioreactor engineering: design and performance. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.

SUNDA, William G.; PRICE, Neil M.; MOREL, Francois MM. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. **Algal culturing techniques**, v. 4, p. 35-63, 2005.

TEIXEIRA, Flaviane Borges. Potencial de sistemas consorciados microalga-fungo para a produção de biofertilizantes. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual de Goiás, Recursos Naturais do Cerrado - UEG -CET, Anápolis, Goiás, 2024.

TJAHJONO, Agus Eko *et al.* Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. **Biotechnology letters**, v. 16, p. 133-138, 1994.

TREDICI, Mario R. *et al.* Mass production of microalgae: photobioreactors. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology**, v. 1, p. 178-214, 2004.

TRIPATHI, Ritu; SINGH, Jyoti; THAKUR, Indu Shekhar. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774-781, 2015.

VAN DEN BROEK, Lambertus AM *et al.* Microalgae as renewable raw material for bioproducts: Identification and biochemical composition of microalgae from a raceway pond in The Netherlands. In: **Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value**. Elsevier, 2018. p. 39-68.

VUPPALADADIYAM, Arun K. *et al.* Sustainability analysis of microalgae production systems: a review on resource with unexploited high-value reserves. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 24, p. 14031-14049, 2018

WANG, Tzu-Hsien *et al.* Influence of inoculum cell density and carbon dioxide concentration on fed-batch cultivation of *Nannochloropsis oculata*. **Biomass and Bioenergy**, v. 77, p. 9-15, 2015.

WEHR, John D.; SHEATH, Robert G.; KOCIOLEK, J. Patrick (Ed.). **Freshwater algae of North America: ecology and classification**. Elsevier, 2015.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., & Eppink, M. H. M. (2010). Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4, 287–295.

Material Suplementar

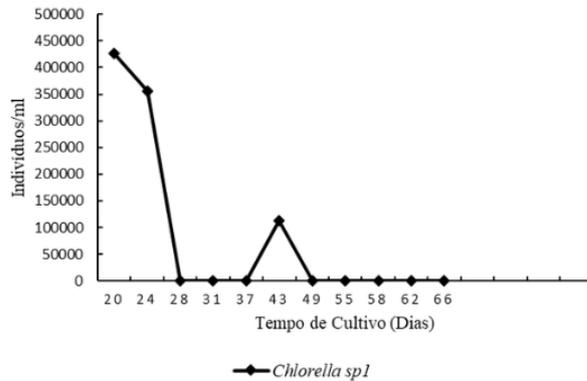


Figura S1. Desempenho de crescimento *Chlorella sp1*. Condição de cultivo: meio BG-11, iluminação 12:12h, pH 7.1 e a 25°C.

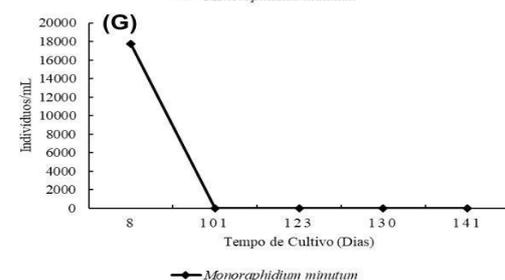
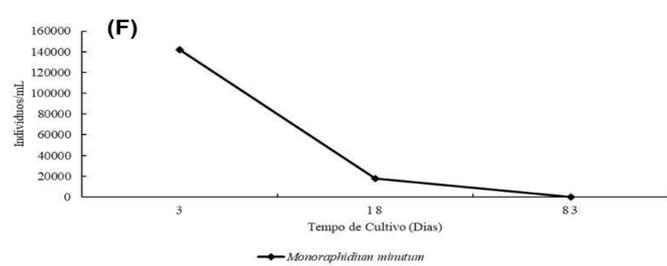
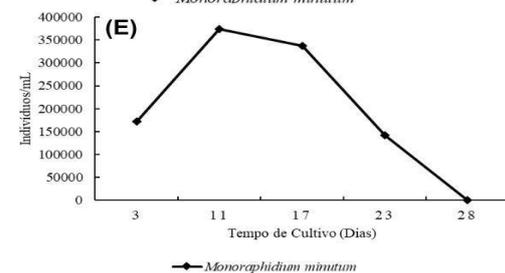
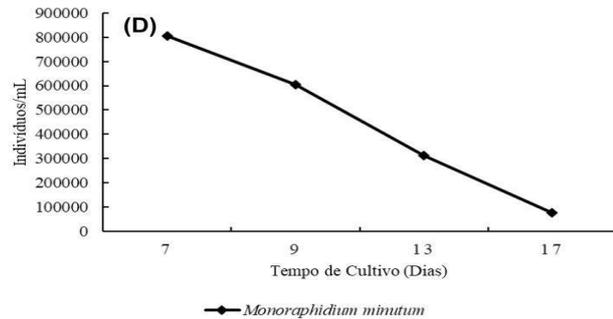
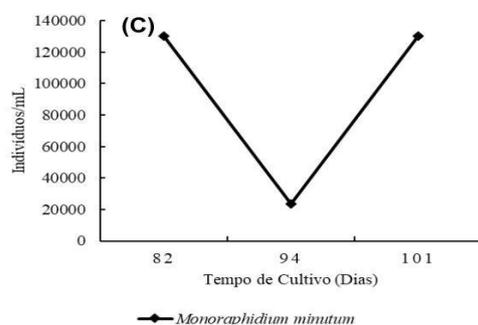
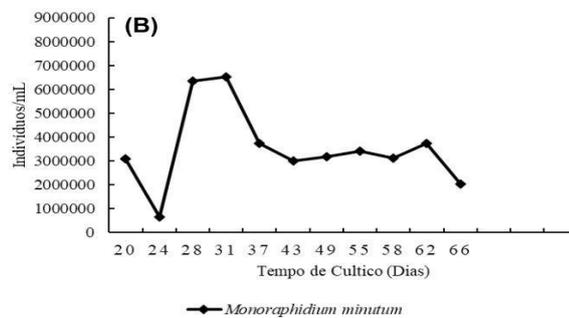
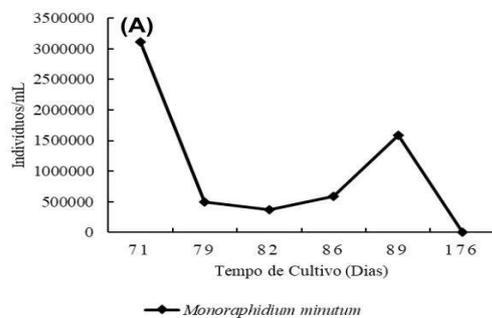


Figura S2. Desempenho de crescimento *Monoraphidium minutum*. Condição de cultivo: meio BG-11,

iluminação 12:12h, pH 7.1 e a 25°C.

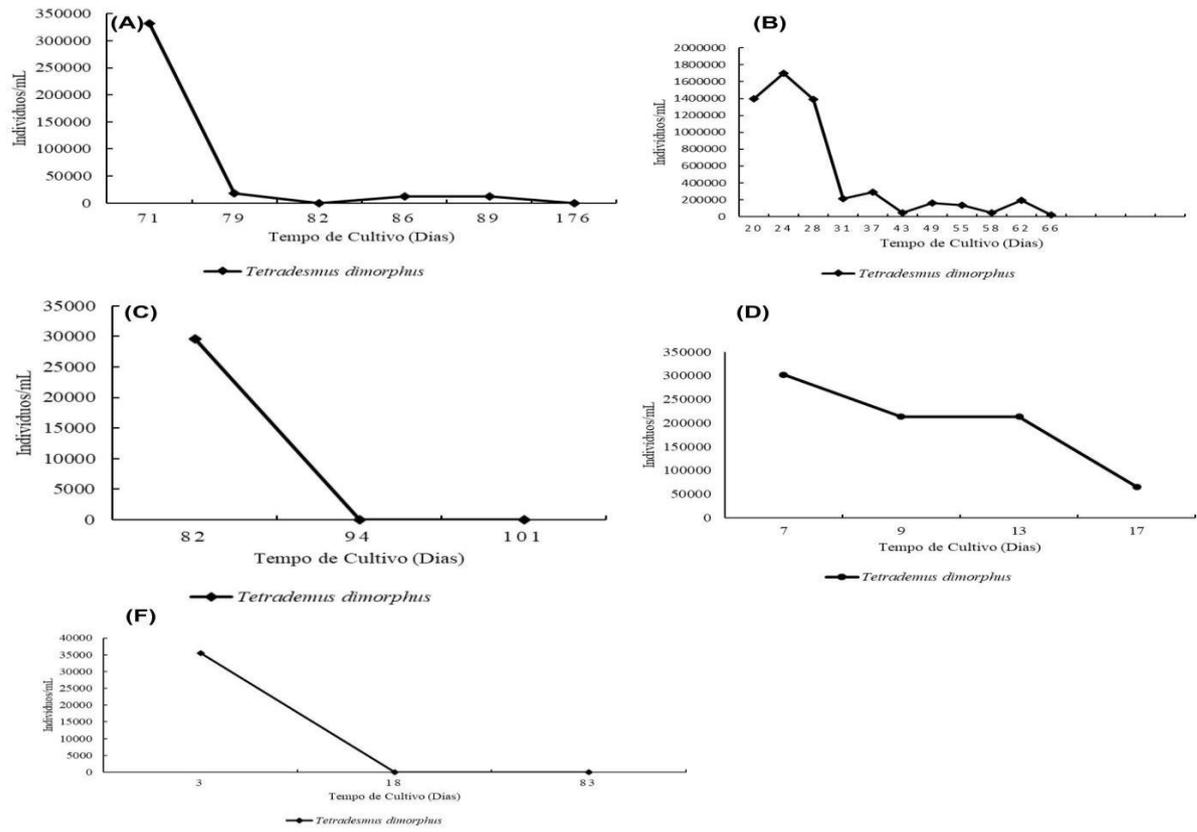
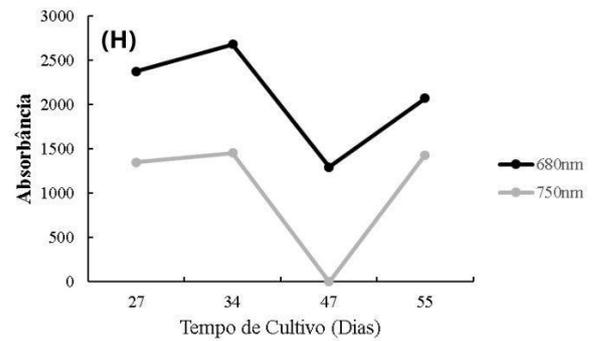
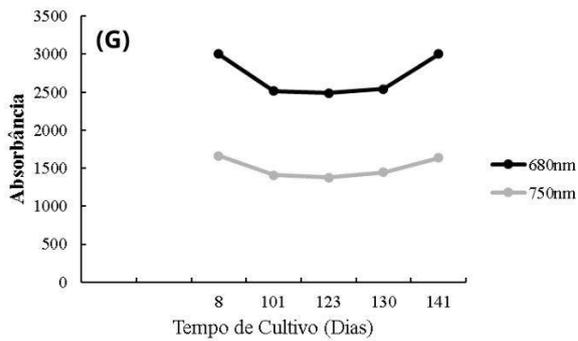
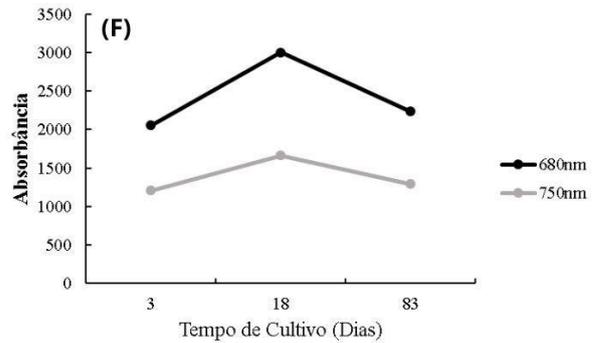
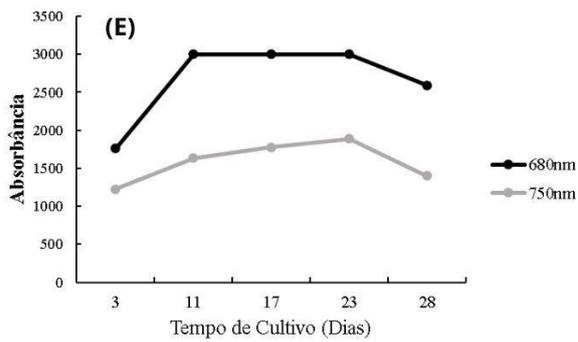
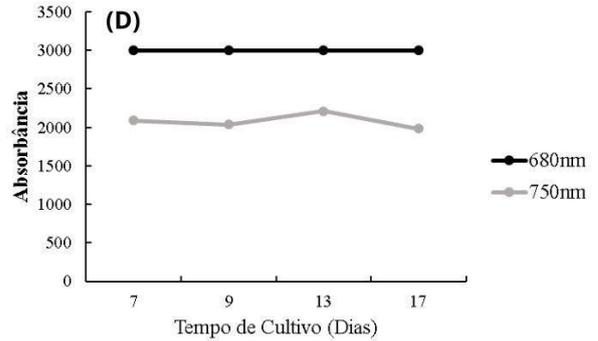
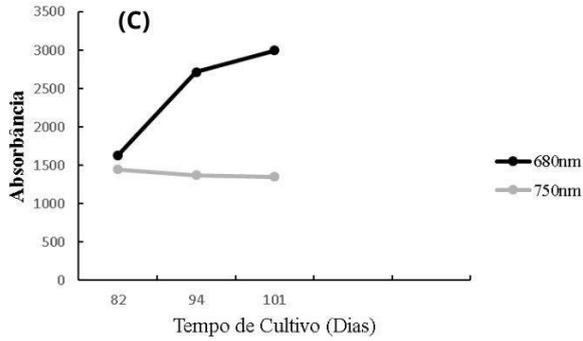
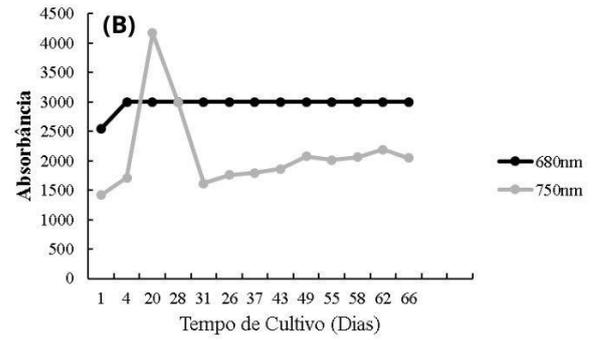
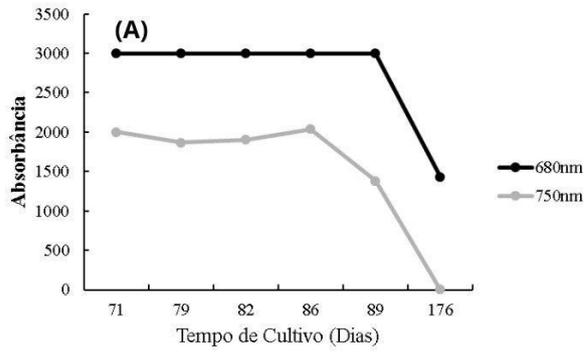


Figura S3. Desempenho de crescimento *Tetrademus dimorphus*. Condição de cultivo: meio BG-11, iluminação 12:12h, pH 7.1 e a 25°C.



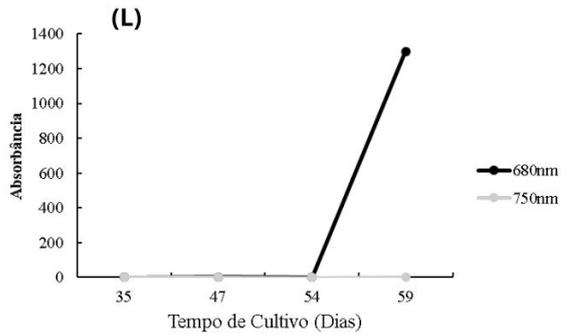
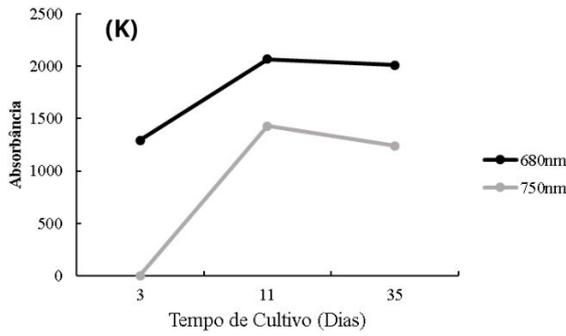
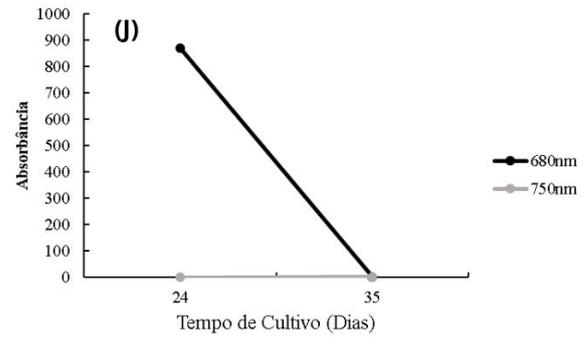
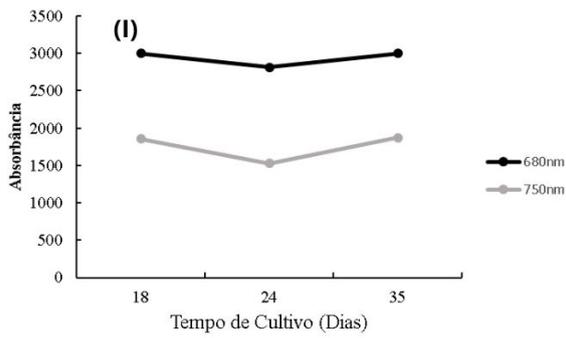
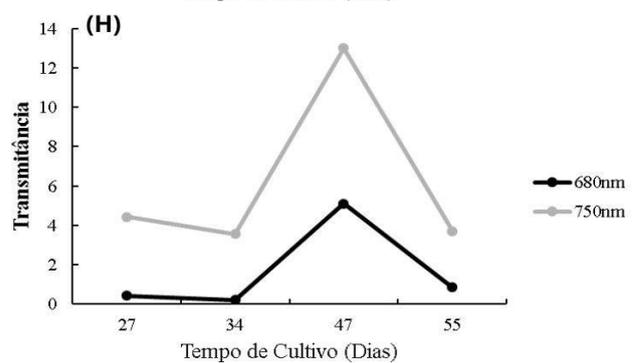
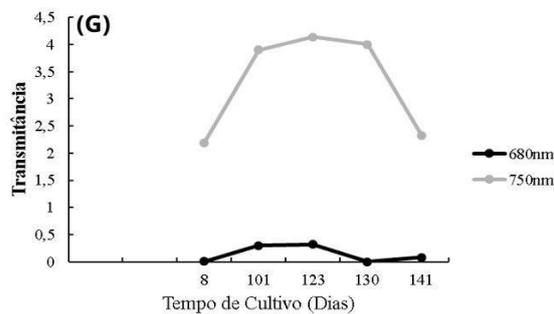
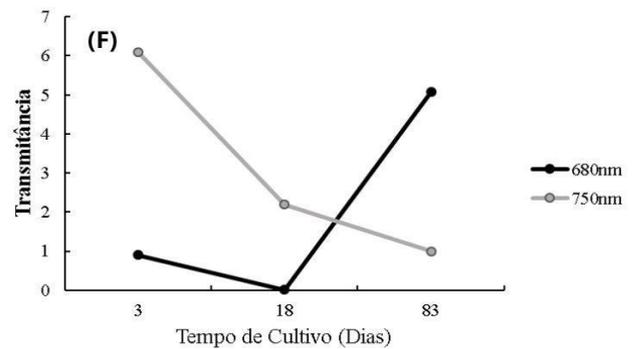
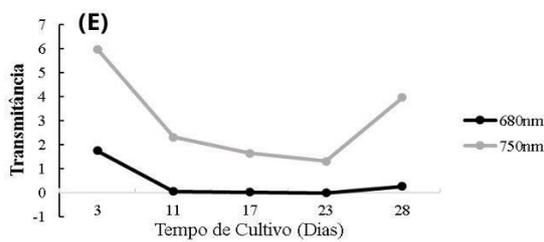
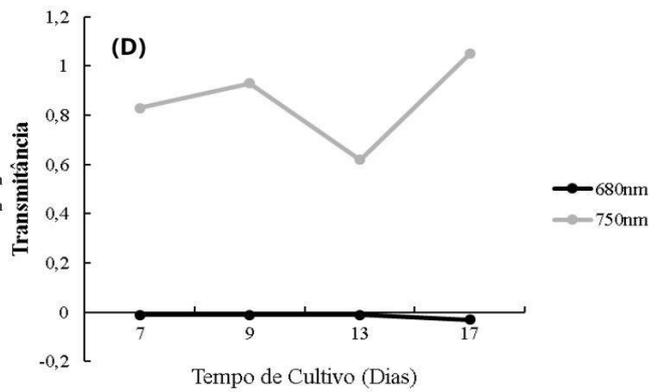
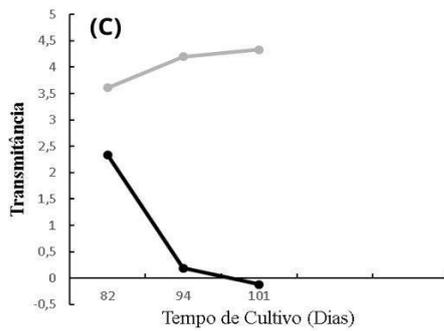
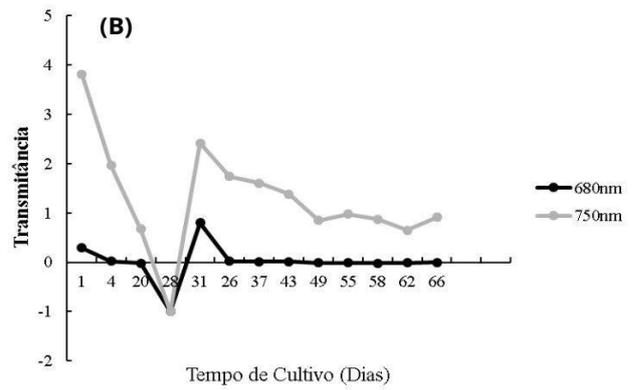
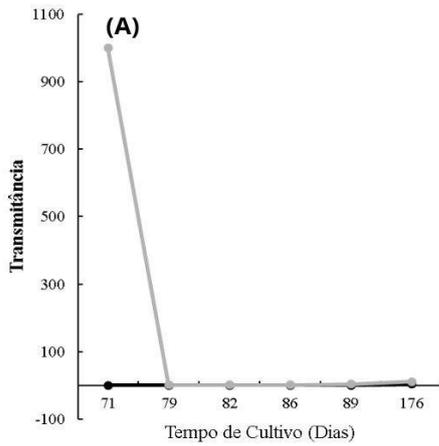


Figura S4. Registro de absorbância *Monoraphidium minutum*, *Scenedesmus cf obtusos*, *Tetrademus dimorphus* e *Chlorella spI*. Condição de cultivo: meio BG-11, iluminação 12:12h, pH 7.1 e a 25°C.



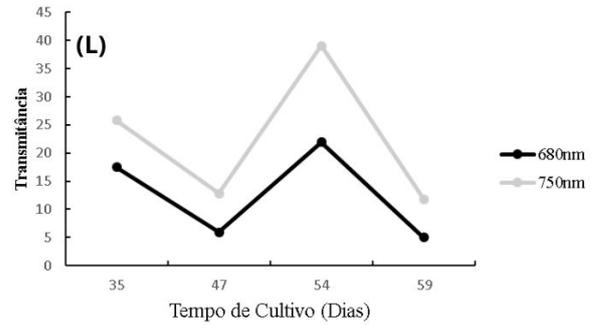
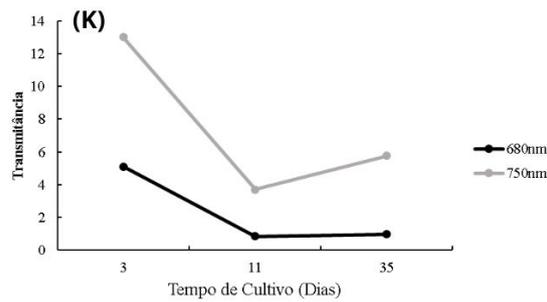
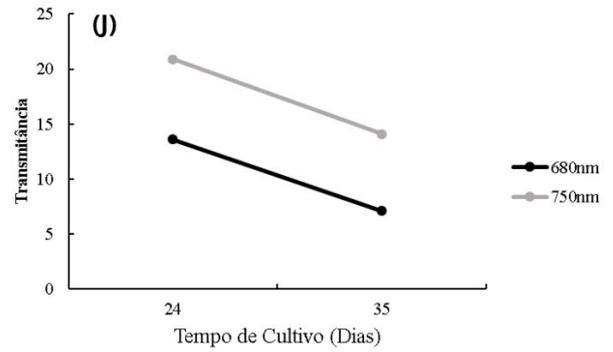
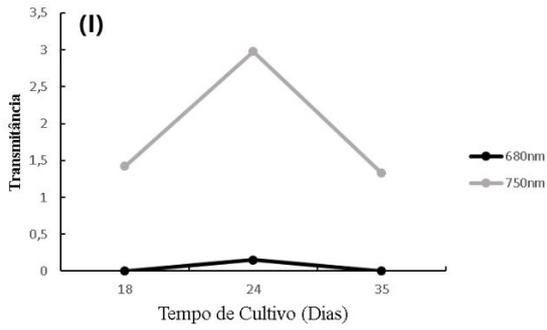


Figura S5. Registro de transmitância *Monoraphidium minutum*, *Scenedesmus cf obtusos*, *Tetrademus dimorphus* e *Chlorella spl.* Condição de cultivo: meio BG-11, iluminação 12:12h, pH 7.1 e a 25°C.



Capítulo 2 – Triagem de metabólitos fenólicos por CLAE-DAD em *Scenedesmus obtusus*

Resumo

A exploração de macro e microalgas para a produção de metabólitos biologicamente ativos tem sido extensa, abrangendo indústrias de alimentos, farmacêutica, bioenergia e cosméticos. Microalgas são fontes de carotenoides, ficobilinas, ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas e esteróis. A variação na composição química entre espécies de microalgas oferece oportunidades para bioprospecção e aplicações comerciais. Este estudo investigou qualitativamente as classes de compostos do metabolismo secundário presentes na biomassa de uma alga verde - *Scenedesmus obtusus* isolada de uma represa artificial do Cerrado brasileiro e cultivada em um sistema de cultivo do tipo *Fed-Batch* fechado com condições controladas de temperatura, luz e nutrientes. A triagem de biomassa de microalga envolveu métodos qualitativos para bioprospecção incluindo testes químicos para flavonoides, compostos fenólicos, alcaloides, cumarinas, taninos e compostos terpênicos. A biomassa foi positiva para alcaloides e compostos fenólicos. A biomassa utilizada em cromatografia a líquido de alta eficiência –CLAE –sugeriu a presença de quercetina, resveratrol e kampferol (compostos fenólicos), conhecidos por suas propriedades antioxidantes, atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e neuroprotetora e aplicações em diversas áreas. Esses resultados destacam a relevância da bioprospecção de microalgas, em particular *Scenedesmus obtusus*, para a obtenção de compostos de alto valor agregado, reforçando seu potencial como matéria-prima sustentável para setores como farmacêutico, alimentício e cosmético. Este estudo abre perspectivas para a otimização do cultivo e quantificação desses compostos, bem como investigar outros metabólitos presentes nessa espécie. Futuramente, os compostos podem ser investigados para o possível papel como marcadores químicos de bioprodutos advindos desta espécie, o que é muito útil devido o crescente interesse por trabalhos com microalgas.

Palavras-chave: biomassa; bioprospecção; microalga; quercetina; resveratrol; kampferol

Chapter 2 – Screening of Phenolic Metabolites by HPLC-DAD in *Scenedesmus obtusus*

Abstract

The exploration of macro- and microalgae for the production of biologically active metabolites has been extensive, spanning industries such as food, pharmaceuticals, bioenergy, and cosmetics. Microalgae are sources of carotenoids, phycobilins, fatty acids, polysaccharides, vitamins, and sterols. Variations in chemical composition among microalgae species present opportunities for bioprospecting and commercial applications. This study conducted a qualitative investigation of the secondary metabolite classes present in the biomass of a green alga—*Scenedesmus obtusus*—isolated from an artificial reservoir in the Brazilian Cerrado and cultivated in a closed Fed-Batch system under controlled temperature, light, and nutrient conditions. The microalgal biomass screening involved qualitative methods for bioprospecting, including chemical tests for flavonoids, phenolic compounds, alkaloids, coumarins, tannins, and terpenic compounds. The biomass tested positive for alkaloids and phenolic compounds. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis suggested the presence of quercetin, resveratrol, and kaempferol (phenolic compounds), known for their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and neuroprotective properties, with applications in various fields. These findings highlight the relevance of microalgae bioprospecting, particularly *Scenedesmus obtusus*, for obtaining high-value compounds, reinforcing its potential as a sustainable raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. This study opens avenues for optimizing cultivation and quantifying these compounds, as well as investigating other metabolites in this species. In the future, these compounds could be studied as potential chemical markers for bioproducts derived from this species, which is highly valuable given the growing interest in microalgae research.

Keywords: biomass; bioprospecting; microalgae; quercetin; resveratrol; kaempferol



1. Introdução

A capacidade de produção de metabólitos por macro e microalgas impulsionou sua exploração extensiva como fontes de compostos biologicamente ativos em diversas áreas industriais, incluindo alimentos, farmacêutica, bioenergia e cosméticos (Garcia-Perez *et al.*, 2023). A biomassa de microalgas emergiu como uma valiosa fonte natural de uma ampla gama de compostos biologicamente ativos, abrangendo desde carotenoides, ficobilinas e ácidos graxos até polissacarídeos, vitaminas e esteróis (Plaza *et al.*, 2009). Assim como ocorre em plantas, a composição química das microalgas varia entre as espécies. A capacidade de microalgas em fornecer esses compostos valiosos já são relatadas para suprir as necessidades do corpo humano em uma variedade de nutrientes importantes. As microalgas oferecem uma rica fonte de vitaminas e minerais, incluindo vitaminas A, B1, B2, C e E; nicotinato; biotina; ácido fólico; ácido pantotênico; niacina; iodo; potássio; ferro; magnésio; e cálcio (Becker, 2013).

As algas verdes apresentam proteínas como compostos prevalentes sendo superiores a 30% (Garcia-Perez *et al.*, 2023). Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS), como ácido γ -linolênico e ácido estearidônico são presentes em alto teor, aponta o mesmo autor. O β -caroteno é um importante carotenoide com aplicações nas indústrias alimentícia, de rações, farmacêutica e cosmética, presente na *Dunaliella salina*, uma microalga verde (Sathasivam *et al.*, 2019). Na espécie *Scenedesmus falcatus* (KU.B1), a otimização de estresse luminoso projetou maior conteúdo de pigmento (Songserm; Nishiyama; Sanevas, 2024). Os lipídios derivados do gênero *Nannochloropsis* já estão sendo empregados em produtos cosméticos e de cuidados com a pele, e há iniciativas em curso para expandir seu uso em aplicações nutricionais (Gellenbeck, 2012).

Diversas pesquisas têm sido conduzidas para investigar os produtos do metabolismo das microalgas, não apenas para compreender sua natureza, mas também em busca de substâncias com potencial aplicação em várias áreas de interesse humano. Uma prática comum é a triagem de extratos ou o isolamento de metabólitos de diferentes microalgas para determinar sua atividade biológica (De Moraes *et al.*, 2015).

Os metabólitos produzidos por microalgas e cianobactérias são diversos, e não há critérios universais para rastrear suas atividades biológicas. Os métodos de extração de metabólitos de microalgas podem ser divididos em abordagens químicas e biológicas (Hassan *et al.*, 2022). Os métodos químicos geralmente envolvem a utilização de solventes orgânicos, como metanol, acetona ou clorofórmio, para extrair os metabólitos das células das microalgas. Esses solventes são capazes de dissolver uma variedade de compostos, permitindo a recuperação dos metabólitos desejados (Deshmukh; Kumar; Bala, 2019; Lopresto *et al.*, 2017).

Testes de alcaloides, saponina, flavonoides e taninos compõem a triagem química (Scholz; Liebezeit, 2006).

As microalgas são uma fonte praticamente inexplorada de antioxidantes naturais, devido à sua vasta biodiversidade, que supera em diversidade as plantas superiores (Li et al., 2007). Dentro dessa perspectiva, o objetivo deste estudo é identificar qualitativamente as principais classes de compostos do metabolismo secundário extraídos do cultivo de microalgas, tendo *Scenedesmus obtusus* em dominância.

2. Material e Métodos

A análise qualitativa foi composta por testes para conhecer a(s) classe(s) de compostos presentes no cultivo de *Scenedesmus obtusus*. O produto final após o cultivo em câmara de incubação a 25°C de temperatura e 12/12h fotoperíodo, acompanhamento (densidade óptica e contagem de número de células por mL), colheita com o pico da densidade de células ($6,7 \times 10^7$ céls/mL). Com intuito de acumular o máximo volume possível para produção de biomassa usamos o sistema de cultivo Fed-Bach, e as amostras foram processadas com 55 (DP = 36,4) dias em média. O processamento consistiu em centrifugação a 4000 rpm e 15 min e secagem em estufa a 40°C da biomassa.

Na biomassa de *Scenedesmus obtusus* foram investigadas a presença dos seguintes metabólitos secundários: flavonoides, compostos fenólicos, alcaloides, cumarinas, taninos e compostos terpênicos. No preparo para caracterização de flavonoides, a extração foi realizada pesando 8 gramas da amostra seca em uma balança de precisão e adicionando 80 mL de etanol a 70% (p/p). A mistura foi fervida por 5 minutos e, em seguida, filtrada em papel de filtro previamente umedecido com etanol a 70% (p/p). A partir deste preparo, a triagem fitoquímica foi realizada utilizando as principais reações de caracterização dos metabólitos secundários mais relevantes, adaptadas de Costa (2002), Matos (2009), Simões et al.(2007) e Scholz (2006).

2.1 Teste de flavonoides

2.1.1 Reação da cianidina ou de Shinoda

A reação da cianidina ou de Shinoda foi realizada transferindo 3 mL do filtrado para um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado cerca de 1 cm de fita de magnésio fina e cuidadosamente acrescentado 1 mL de HCl concentrado. A presença de flavonoides é evidenciada pelo surgimento de uma coloração que varia de laranja a vermelho ou magenta em um período de 1 a 2 minutos.

2.1.2 Reação Oxalo-Bórica

Para realizar a Reação Oxalo-Bórica, evaporou-se 5 mL da solução extrativa em uma cápsula de porcelana. Em seguida, adicionou-se ao resíduo semi-seco 3 mL de solução de ácido bórico a 3% (p/V) e 1 mL de solução de ácido oxálico a 10% (p/V). O evaporação foi conduzido até secura e então foram adicionados 7 mL de éter etílico ao resíduo seco. Observou-se sob luz ultravioleta para verificar o aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada, reação positiva. Essa reação é específica para flavonóis, enquanto outros compostos como flavonas, flavanonas e isoflavonas podem se colorir, mas não apresentam fluorescência.

2.1.3 Reação com Ácido Sulfúrico Concentrado

Na Reação com Ácido Sulfúrico Concentrado, foram adicionados 3 mL da solução extrativa em uma cápsula de porcelana e deixou-se evaporar até a semi-secura. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e observou-se sob luz ultravioleta quanto ao aparecimento de fluorescência. Essa reação se baseia na formação de sais de oxônio, cujas soluções apresentam fluorescência variável conforme a posição do íon oxônio na molécula.

2.2 Testes para Compostos Fenólicos em geral

2.2.1 Reação com Hidróxidos Alcalinos

Na Reação com Hidróxidos Alcalinos, foram transferidos 3 mL da solução extrativa para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de NaOH a 20% (p/V), agitando-se o tubo. Compostos fenólicos em geral escureceram na presença de hidróxidos alcalinos. Caso existam heterosídeos flavônicos na amostra, observar-se-á o desenvolvimento de coloração amarela. Em meio alcalino, alguns grupos de flavonoides apresentarão cor amarela, enquanto as chalconas desenvolverão coloração vermelho-amarelada.

2.2.2 Reação com Cloreto de Alumínio

A Reação com Cloreto de Alumínio foi realizada da seguinte forma: Cerca de 5 mL da solução extrativa foram transferidos para um béquer ou cápsula de porcelana. Em seguida, a solução foi concentrada até a metade e transferida para um pedaço de papel de filtro, sendo espalhada por toda a sua superfície. Uma das regiões do papel foi umedecida com solução de cloreto de alumínio a 5% (p/V). Posteriormente, foi observado o aparecimento de fluorescência sob luz ultravioleta. Os compostos flavonoides apresentam fluorescência amarela intensa

quando observados sob essa luz.

2.2.3 Reação com Cloreto Férrico

Na Reação com Cloreto Férrico, 3 mL da solução extrativa foram transferidos para um tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de cloreto férrico a 4,5% (p/V), observando-se o aparecimento de coloração. A presença de compostos fenólicos em geral resultará em coloração negra ou escurecimento, enquanto flavonoides apresentarão coloração amarela, verde ou castanha.

2.3 Teste para Antraquinonas

Foram transferidos 10 mL do filtrado para um béquer de 40 mL, designado (I), e outros 10 mL foram transferidos para outro béquer, designado (II). Ao conteúdo do béquer (I) foi adicionado 0,5 mL de HCl a 10% (V/V) e levado à fervura por 2 minutos em chapa aquecedora, enquanto o conteúdo do béquer (II) passou pelo mesmo procedimento, exceto pela acidificação. Os líquidos foram transferidos para tubos de ensaio designados como (I) e (II) e, após o resfriamento, 10 mL de éter etílico P. A. foram adicionados a cada um, agitando-os levemente. Em seguida, foram separados 5 mL da fase etérea dos tubos (I) e (II), e 4 mL de amônia 50% (V/V) foram adicionados a cada um, deixando-os em repouso por 5 minutos. A presença de heterosídeos antraquinônicos é indicada pelo aparecimento de coloração de rosa a vermelha na fase amoniacal. O reconhecimento dos heterosídeos antraquinônicos na reação de Bornträger envolve a formação de fenatos de amônia, que adquirem uma coloração rosa, após a extração das agliconas e sua liberação por hidrólise ácida. A cor desenvolvida, alcançando seu máximo em 5 minutos, intensifica-se gradualmente devido à oxidação das formas livres reduzidas - antrona e antranol - em antraquinona.

2.4 Teste de Cumarinas

Para a caracterização de cumarinas, a extração foi realizada utilizando 2 g da amostra com 30 mL de água (aquecida). Após a filtração, foi adicionado 1 mL de HCl 1N (para atingir pH 1). Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com 10 mL de éter. O volume foi reduzido e gotejado sobre duas regiões distintas de um papel de filtro, que foram marcadas. Em seguida, adicionou-se 1 gota de NaOH 1 N em uma das regiões do papel de filtro e observou-se na luz UV. Uma reação positiva será indicada pela fluorescência verde ou azulada.



2.5 Teste de Taninos

Para a caracterização de taninos, pesou-se 2g da amostra em uma balança de precisão. Adicionou-se 50 mL de água destilada e ferveu-se durante 5 minutos. Em seguida, a mistura ainda quente foi filtrada utilizando papel de filtro. O volume do filtrado obtido foi completado para 100 mL (solução extrativa). Em seguida, foram organizados 12 tubos de ensaio em uma estante. Em 6 dos 12 tubos, adicionou-se 5 mL da solução extrativa. Nos 6 tubos restantes, adicionou-se o controle positivo [5 mL de ácido tânico 0,5% (p/V)].

2.5.1 Reação com Gelatina

Ao primeiro tubo (amostra e controle), foram adicionadas 5 gotas de solução de gelatina a 2,5% (p/V), preparada em solução de cloreto de sódio a 5% (p/V). Ambos os tubos foram comparados. A presença de taninos na amostra é evidenciada pelo aparecimento de um precipitado branco, pois eles reagem com os aminoácidos da gelatina (como prolina, por exemplo), pelo grupamento amina, formando precipitado.

2.5.2 Reação com Alcaloides

No segundo tubo (amostra e controle), foram adicionadas 5 gotas de solução de sulfato de quinino a 1% (p/V) em ácido sulfúrico a 5% (V/V). No terceiro tubo (amostra e controle), foram adicionadas 5 gotas de solução de brucina a 1% (p/V) em ácido sulfúrico a 5% (V/V). Os tubos foram comparados. A presença de precipitado indica a existência de taninos na amostra. Taninos reagem com alcaloides devido ao fato destes conterem o grupamento amina na molécula (mais especificamente o N).

2.5.3 Reação com sais metálicos

Ao quarto tubo (amostra e controle), foram adicionadas 5 gotas de acetato de cobre a 4% (p/V). No quinto tubo (amostra e controle), foram acrescentadas 2 gotas de cloreto férrico a 2% (p/V). Em seguida, comparou-se a coloração dos tubos e a ocorrência de precipitado. Os taninos têm a propriedade de reagir e precipitar com sais metálicos, como chumbo, cobre, zinco, cromo e ferro. Com sais de ferro, ocorre a formação de precipitados enegrecidos, denominados fenatos férricos e ferrosos.

2.5.4 Reação com Hidróxidos Alcalinos

Ao sexto tubo (amostra e controle), foram adicionadas 5 gotas de solução de hidróxido de sódio ou potássio a 20% (p/V). Em seguida, comparou-se a coloração de ambos os tubos. A presença de taninos na amostra foi observada pelo escurecimento da solução. Os taninos não precipitam em presença de hidróxidos alcalinos, pois os grupos fenólicos reagem formando fenatos solúveis.

2.6 Testes para Compostos Nitrogenados – Alcaloides

Foram pesados 2 g da amostra e adicionados 20 mL de ácido sulfúrico a 5% (V/V). A mistura foi levada à fervura por 3 minutos e, em seguida, filtrada em papel de filtro e resfriada. O filtrado foi transferido para um funil de separação e alcalinizado com NH_4OH a 10% (o pH foi acompanhado com uma fita de pH). Foram realizadas duas extrações com 10 mL de clorofórmio cada. As frações clorofórmicas (orgânicas) foram separadas. Na fração orgânica (clorofórmica), foram adicionados 20 mL de HCl diluído, agitados e a fração ácida foi recolhida. Em seguida, esta fração foi submetida à pesquisa de alcaloides utilizando os reagentes gerais dos alcaloides.

2.6.1 Reativo de Mayer

Para preparar o Reativo de Mayer, foram dissolvidos em água 2,71g de cloreto de mercúrio e 10g de iodeto de potássio, e então o volume foi completado para 200mL com água destilada. Em seguida, a mistura foi agitada e filtrada. Os reagentes iodados precipitarão os alcaloides das soluções ácidas, sob a forma de poli iodetos complexos.

2.6.2 Reativo de Dragendorff

O Reativo de Dragendorff foi preparado dissolvendo 8g de subnitrato de bismuto em 20mL de ácido nítrico a 30% (p/V). Em seguida, foram dissolvidos, em separado, 22,8g de iodeto de potássio em um volume mínimo de água destilada. A primeira solução foi despejada pouco a pouco sobre a segunda. Após deixar em repouso durante algumas horas, a mistura foi filtrada. O volume foi completado com água destilada para 100mL.

2.6.3 Reativo de Bouchardat

O Reativo de Bouchardat foi preparado dissolvendo 4g de iodeto de potássio e 2g de iodo em 100ml de água destilada.

2.6.4 Reativo de Bertrand

O Reativo de Bertrand foi preparado dissolvendo 1g de ácido sílico-túngstico em 100mL de água destilada.

2.6.5 Reativo de Hager

O Reativo de Hager foi preparado dissolvendo 2g de ácido pícrico em 100mL de água destilada.

2.6.6 Ácido Tânico

O Ácido Tânico foi preparado dissolvendo 1g de ácido tânico em 100mL de água destilada. A distribuição da fração ácida foi feita igualmente em 6 tubos de ensaio, e em cada um deles foram adicionadas de 3 a 6 gotas dos reativos gerais para alcaloides mencionados acima. Paralelamente, uma outra série de 6 tubos de ensaio foi preparada, contendo 3 mL de solução de sulfato de quinina a 1% (p/V) (controle positivo). Em cada um desses tubos, foram adicionadas de 3 a 6 gotas dos respectivos reativos gerais para alcaloides, e comparadas com a primeira série de tubos. A presença de alcaloides foi indicada pelo aparecimento de precipitados nos tubos: i) reativo de Mayer - precipitado branco; ii) reativo de Dragendorff - precipitado vermelho-tijolo; iii) reativo de Bouchardat - precipitado marrom-avermelhado; iv) reativo de Bertrand - precipitado branco; v) reativo de Hager - precipitado amarelo; vi) Ácido tânico - precipitado bege.

2.7 Testes para Compostos Terpênicos

A amostra foi pesada em 2,5 g e adicionada a 25 mL de etanol a 50% (V/V) e 10 mL de solução de acetato de chumbo a 10% (p/V), levada à fervura por 4 minutos. Em seguida, foi resfriada, filtrada e o volume foi completado para 25 mL com etanol a 50% (V/V). O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído duas vezes com 15 mL de clorofórmio P.A. A fração clorofórmica será utilizada nas reações de pesquisa de heterosídeos cardioativos descritas abaixo.

2.7.1 Reação de Liebermann-Burchard

A reação de Liebermann-Burchard (caracterização do núcleo esteroide) foi realizada transferindo 3 mL da fração clorofórmica para um tubo de ensaio e evaporando até a secura em banho-maria. Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente de Liebermann-Burchard recém-preparado (1 mL de clorofórmio P.A., 1 mL de anidrido acético P.A. e 3-4 gotas de ácido

sulfúrico concentrado) ao resíduo do tubo. O tubo foi deixado em repouso por 5 minutos para observação da coloração. Uma reação positiva foi indicada por uma coloração castanha (dedaleira) ou verde (cila e estrofanto).

2.7.2 Reação de Pesez

Reação de Pesez (caracterização do núcleo esteroide) foi conduzida transferindo 3 mL da fração clorofórmica para uma cápsula de porcelana e evaporando até secar em uma chapa aquecedora. Após o resfriamento, 3 a 6 gotas de H₃PO₄ P.A. foram adicionadas ao resíduo. A mistura foi então agitada com um bastão e observada sob luz UV. Uma reação positiva para terpenos será indicada pela presença de fluorescência verde-amarelada. Para confirmar a presença de heterosídeos cardioativos a reação de Kedde também deve ser positiva.

2.7.3 Reação de Keller-Kiliani

Na reação de Keller-Kiliani (detectando desoxi-açúcares), foi evaporado até a secura 5 mL da fração clorofórmica em um tubo de ensaio em banho-maria. Ao resíduo do tubo, foram adicionados 3 mL de um reagente recém-preparado contendo ácido acético glacial P.A. e cloreto férrico 9% (p/V) na proporção de 3:0,1. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e, lentamente, vertido para outro tubo de ensaio com 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Uma reação positiva será indicada pelo desenvolvimento de um anel de coloração castanho-avermelhada na zona de contato, bem como o aparecimento de coloração azul-esverdeada na camada acética.

2.7.4 Reação de Kedde

Na reação de Kedde (específica para o anel lactônico de um cardenólídeo), foram transferidos 6 mL da fração clorofórmica para um tubo de ensaio e evaporados até a secura em banho-maria. Ao resíduo do tubo, foram adicionados 2 mL de etanol a 50% (V/V), 2 mL de água destilada, 2 mL de reagente ácido 3-5 dinitrobenzólico a 1% (p/V) recentemente preparado em etanol a 96% (V/V) e 2 mL de hidróxido de potássio 1 M. Após um repouso de 5 minutos, foi observado o desenvolvimento de uma coloração castanho-avermelhada a vermelho-violeta, indicativa de reação positiva.

2.8 Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE- DAD)

Para a identificação preliminar dos compostos na biomassa de microalga *Scenedesmus obtusus*, utilizou-se o equipamento HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II, software

OpenLab CDS, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD modelo G7115A), injetor automático, coluna C-18 Agilent Infinity Lab Poroshell 120 EC (4.6 x 100 mm, 2.7 μm), temperatura da coluna em 30° C com amostras de biomassa e padrões analíticos (Sigma). Para obtenção do extrato de alga *Scenedesmus obtusus*, pesou-se 1,0 g da amostra de biomassa de microalga em um béquer de 10 mL e transferiu-se 5 mL de metanol grau HPLC e levou a ultrassom por 5 minutos sem controle de temperatura. Em seguida, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se com Metanol até o menisco. Em seguida, o balão contendo a amostra foi submetido a um banho ultrassônico (Ultronique mod. Q5.9/40A, frequência 40kHz e potência 200W) por 30 minutos, protegido da luz e à temperatura ambiente. Após o tempo descrito, a solução foi submetida a um processo de filtração simples utilizando papel filtro, posteriormente cerca de 2,5mL foi transferido para um erpendorf. Ele foi posto na centrífuga modelo (IKA® mini G) para centrifugação por 15 minutos, filtrado em seringa com membrana em PTFE (0,45 μm) e transferido para vial. Esse preparo foi mantido refrigerado até o início da análise quanto aos compostos fitoquímicos. As fases móveis utilizadas foram filtradas utilizando membrana PTFE de 0,45 μm .

Foram utilizados comprimentos de onda de detecção em 280, 306 e 340 nm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (A) e água acidificada com ácido acético a 0,2% (B). A eluição ocorreu em gradiente, conforme Tabela 1. Para triagem do material, foi utilizado padrões analíticos para possível identificação dos compostos disponíveis na amostra analisada sendo eles a rutina 0,2% (p/v), ácido cafeico 0,2% (p/v), catequina 0,2% (p/v), epicatequina 0,2% (p/v), resveratrol 0,2% (p/v), quercetina 0,2% (p/v), ácido gálico 0,2% (p/v), apigenina 0,2% (p/v) e kampferol 0,08% (p/v), SIGMA ALDRICH. O tempo de retenção dos padrões analíticos foi comparado com o do extrato da biomassa.

Tabela 1. Composição do gradiente utilizado como fase móvel durante a eluição em HPLC, visando a separação de compostos fenólicos na biomassa de *Scenedesmus obtusus*

Tempo (min)	Proporção (%)	
	A	B
0-5	2	98
5-8	5	95
8-11	20	80
11-14	25	75
14-21	40	60
21-24	80	20
24-27	90	10
27-30	5	95
30-35	2	98

Legenda: (A) acetonitrila e (B) água acidificada com ácido acético a 0,2%

3. Resultados

Os testes realizados de prospecção fitoquímica indicaram a presença das classes Flavonoides e Alcaloides na amostra avaliada (Tabela 2). As reações de Shinoda (RS) e cloreto férrico (CF) resultaram positivas para flavonoides, enquanto o reagente de Dragendorff (RD) e a reação com ácido tânico (AT) indicaram a presença de alcaloides (Tabela 2). Para a presença de terpenos, é necessário que as três reações de caracterização—Lieberman-Buchard (LB), Keller-Kiliani (KK) e Pesez—sejam positivadas. No entanto, apenas a reação de Pesez apresentou resultado positivo (Tabela 2).

Tabela 2. Classes de compostos testadas qualitativamente com indicação de presença (+) ou ausência (-) na biomassa de *Scenedesmus obtusus*

Composto	Teste	Presença
Alcaloide	Reagente de Dragendorff	+
	Ácido Tânico – AT	+
	Mayer – RMay	-
	Bouchard – RB	-
	Bertrand - RBert	-
Terpênico	Lieberman-Buchard – LB	-
	Keller-Kiliani – KK	-
	Pesez	+
Cumarinas		-
Flavonoides	Reações de Shinoda	+
	Reação de cloreto férrico	+
	Reações de oxalo-bórica	-
	Ácido sulfúrico concentrado – ASC	-
	Reação com hidróxido alcalino e cloreto de alumínio - HACA	-
Taninos	Reações com gelatina - RG alcaloides – RA	-
	Sais metálicos - RSM, hidróxidos alcalinos - RHA	-

Os achados espectrais, bem como a coincidências nos tempos de retenção sugerem a presença de quercetina, resveratrol e kampferol na amostra (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação do padrão analítico utilizado com resultado obtido da amostra de biomassa de *Scenedesmus obtusus* com uso de HPLC/DAD.

Padrões analíticos e concentração em metanol Grau CLAE(p/v)	Comprimento de onda (nm)	Tempo de Retenção dos padrões analíticos (min)	Biomassa da microalga (<i>Scenedesmus obtusus</i>)
Rutina (0,2%)	340	14,48	-
Ácido cafeico (0,2%)	306	12,86	-
Catequina (0,2%)	280	12,48	-
Epicatequina (0,2%)	280	13,47	-
Resveratrol (0,2%)	306	17,68	17,71
Quercetina (0,2%)	280	19,20	19,23
Ácido gálico (0,2%)	280	3,03	-
Apigenina (0,2%)	340	21,02	-
Kampferol (0,08%)	340	21,49	21,52

O padrão de Resveratrol apresenta um tempo de retenção de 17,68 minutos (Figura 1b), enquanto na amostra foi detectado um pico de TR = 17,71 minutos no comprimento de onda de 306 nm (Figura 2b). O tempo de retenção do padrão Quercetina é de 19,20 minutos (Figura 1a), sendo observado um pico na amostra com tempo de retenção TR de 19,23 minutos no comprimento de onda de 280nm. O tempo de retenção do padrão Kampferol foi de 21,49 min (Figura 1c,) sendo que na amostra um pico em 21,52 min no comprimento de onda de 340 nm foi exibido (Figura 2c).

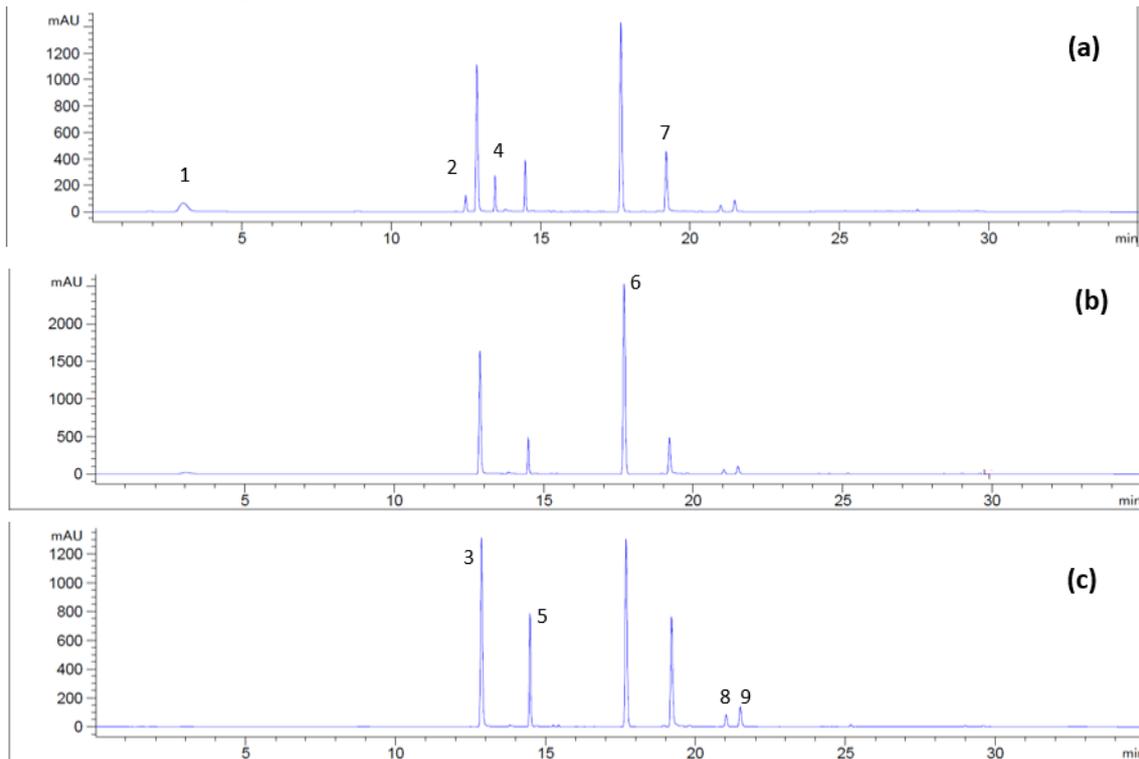


Figura 1. Perfil cromatográfico dos padrões analíticos, registrado em comprimentos de onda de 280 nm (a), 306 nm (b) e 340 nm (c). 1. Ácido gálico (TR: 3,03 min); 2. Catequina (TR: 12,48 min); 3. Ácido cafeico (TR: 12,86 min); 4. Epicatequina (TR: 13,47 min); 5. Rutina (TR: 14,48 min); 6. Resveratrol (TR: 17,68 min); 7. Quercetina (TR: 19,20 min); 8. Apigenina (TR: 21,02 min) e 9. Kampferol (TR: 21,49 min). Detector de arranjo diodos (DAD). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila e ácido acético a 0,2%, em gradiente. Volume de injeção 5 μ L, fluxo de 1 ml/min., Coluna C18, 30°C.

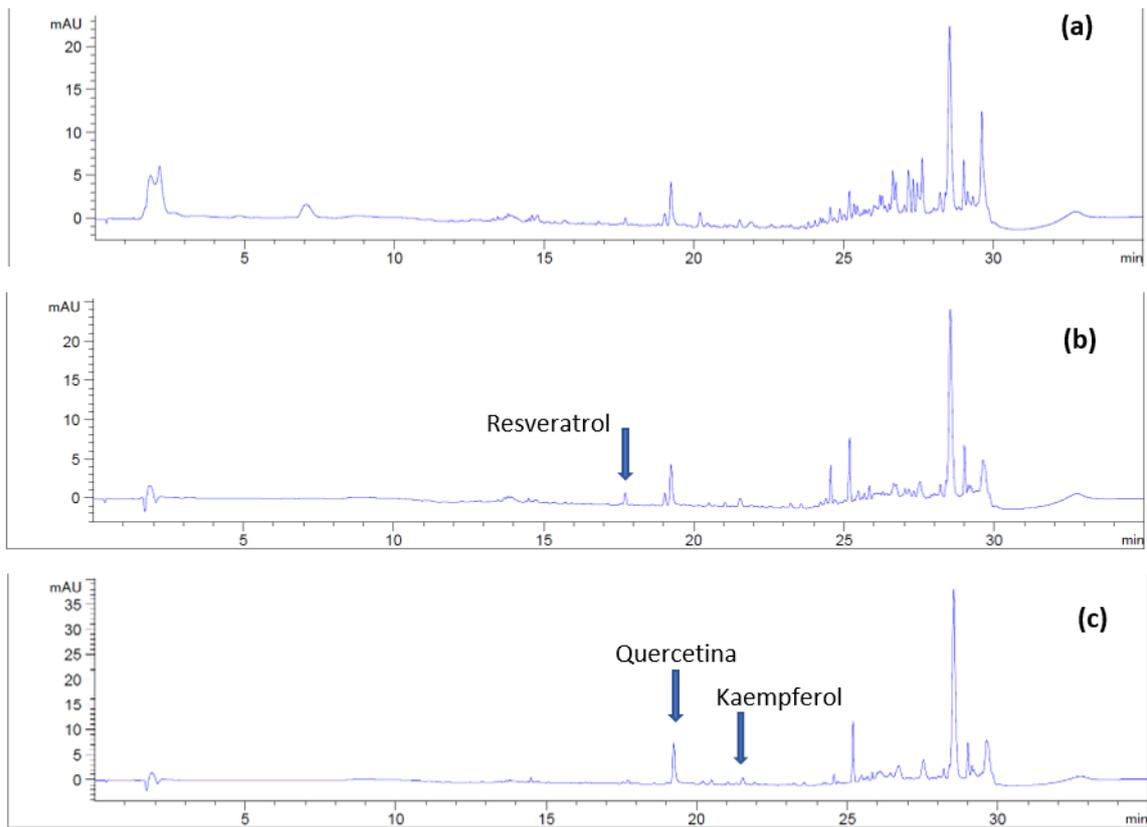


Figura 2. Perfil cromatográfico da biomassa de *Scenedesmus obtusus*, registrado em comprimentos de onda de 280 (a), 306 (b) e 340 nm (c).

O espectro de absorção na região do UV do pico da amostra em TR de 17,71 min é similar ao espectro do padrão de resveratrol a 306 nm (Figura 3).

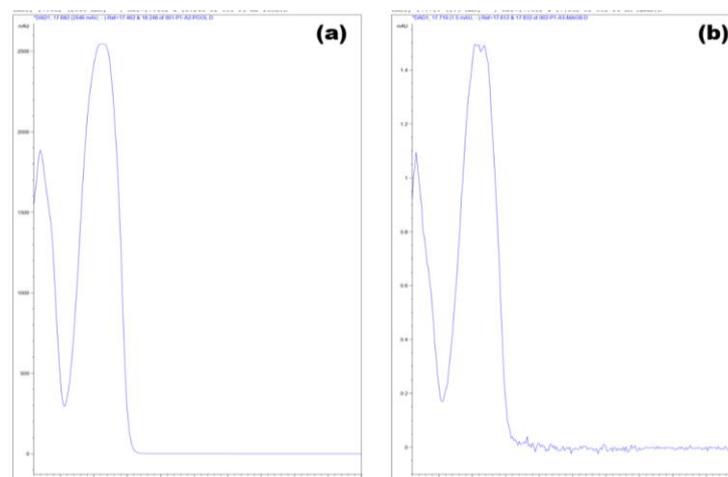


Figura 3. Espectro de absorção a 306 nm para o padrão de resveratrol com 17,68 minutos (a) e o pico da amostra de biomassa de *Scenedesmus obtusus* com 17,71 minutos (b).

O espectro de absorção na região do UV no pico da amostra em TR = 19,23 minutos é similar ao espectro do padrão de quercetina a 340 nm (Figura 4).

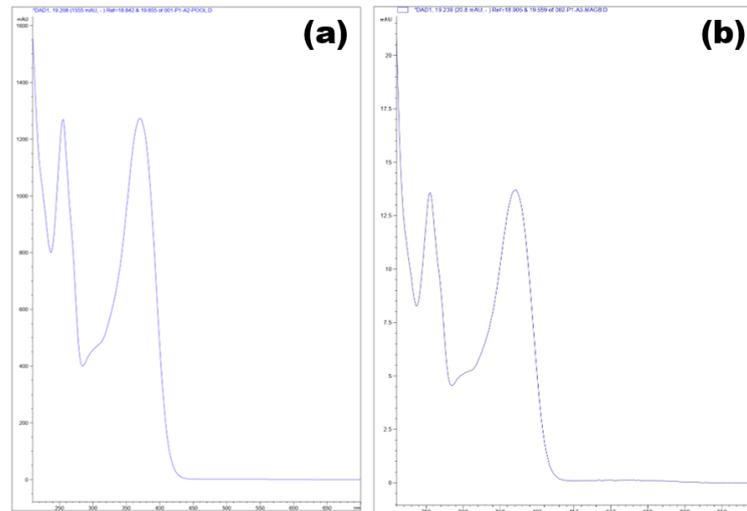


Figura 4. Espectro de absorção a 280 nm para o padrão de Quercetina com 19,20 minutos (a) e a amostra de biomassa de *Scenedesmus obtusus* com 19,23 minutos (b).

O espectro de absorção para o padrão Kampferol foi compatível ao observado na amostra de biomassa de *Scenedesmus obtusus* no comprimento de onda de 340 nm observando no padrão o pico a 21,49 minutos e na amostra a 21,52 minutos (Figura 5).

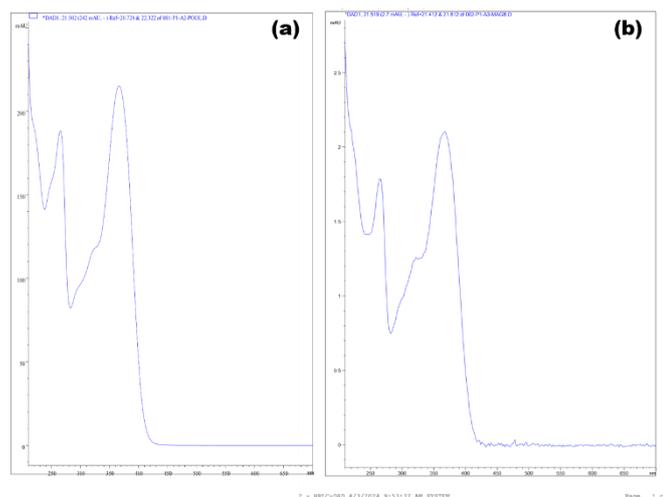


Figura 5. Espectro de absorção a 340 nm para o padrão de Kampferol com 21,49 minutos (a) e amostra de biomassa de *Scenedesmus obtusus* com 21,52 minutos (b).

4. Discussão

Os achados espectrais, bem como a coincidências nos tempos de retenção sugerem a presença de quercetina, resveratrol e kampferol na biomassa de *Scenedesmus obtusus*. Esses compostos apresentam atividades biológicas importantes para a saúde. O resveratrol possui efeito cardioprotetor (Hung *et al.*, 2000), antitumoral (Jiang *et al.*, 2022), atividade antioxidante (Lu *et al.*, 2024; Turcov *et al.*, 2022), anti-inflamatório (Donnelly *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2021), neuroprotetor (Corpas *et al.*, 2019; Fracasso *et al.*, 2021). O resveratrol é um composto de destaque para aplicações cosméticas e dermatológicas (Ratz-Lyko; Arct, 2019), além de apresentar potencial na promoção da saúde e na prevenção e tratamento de doenças (Fabjanowicz; Płotka-Wasyłka; Namieśnik, 2018; Li *et al.*, 2024; Xia *et al.*, 2010). O kampferol é um composto que exibe atividade antioxidante e antimicrobiana (Taiwo; Oyedeji; Osundahunsi, 2019), anticâncer (Azevedo *et al.*, 2015; Moradzadeh *et al.*, 2018), hepatoprotetora (Hoang *et al.*, 2019), neuroprotetora (Han *et al.*, 2021). O kampferol também se destaca por suas propriedades terapêuticas, podendo contribuir tanto para a prevenção quanto para o tratamento de certas doenças, isoladamente ou em combinação com outros fármacos (Al-Nour; Ibrahim; Elsaman, 2019; Ren *et al.*, 2019; Zhu; Xue, 2019). A quercetina é um dos flavonóis mais encontrados em frutas, vegetais e sementes. Há maiores concentrações em vegetais como cebolas e brócolis, frutas como maçãs, cerejas e frutas vermelhas, e bebidas como chá e vinho tinto. É comum o seu uso no tratamento de distúrbios metabólicos e inflamatórios (David; Arulmoli; Parasuraman, 2016). A quercetina apresenta aplicação importante na área alimentícia no desenvolvimento de alimentos funcionais (Lai; Wong, 2022) além de se uso medicinal na prevenção e no tratamento de doenças (Xu *et al.*, 2019).

A capacidade das microalgas em produzir compostos bioativos as tornam promissoras para aplicações ambientais, alimentícias, cosméticas, nutracêuticas e produtos farmacêuticos. Em um estudo de Bulut *et al.* (2019), a microalga *Scenedesmus* sp. ME02 foi preparada com quatro solventes diferentes usados para extração, obtendo no extrato de acetato de etila e no de etanol/água quantidades altas de quercetina. Foi relatado o uso positivo de resveratrol em plantas cítricas resultando em respostas fisiológicas e antioxidantes relacionadas à salinidade (Kostopoulou; Therios; Molassiotis, 2014). Estudo com kampferol aplicado contra o crescimento toxigênico da alga *Microcystis aeruginosa* FACHB-915 o indicou como algicida seguro explorando tempo e dose (Li *et al.*, 2021). Diferentes doses de kampferol ($0,5-2 \times IC_{50}$) foram avaliadas durante 14 dias de experimento. Os resultados indicaram que a taxa de inibição do crescimento (GIR) apresentou um aumento quase proporcional à elevação da dose de kampferol. Em cada concentração testada, o GIR inicialmente aumentou e, posteriormente, oscilou em torno de 17,8%–> 40%, 53,6%–65,6% e 84,8%–89,3% para as doses de 1,75, 3,5

e 7 mg/L, respectivamente, durante a fase médio-tardia do experimento. *Vitis vinifera* é aplicada em cosmetologia por possuir kampferol e *trans*-resveratrol (Sharafan *et al.*, 2023). Resultados obtidos por Nwanekezie *et al.* (2023) indicaram que folhas da planta de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) contêm resveratrol e kampferol, podendo ser aplicado contra o estresse oxidativo.

Alcaloides e flavonoides foram detectados na amostra de biomassa analisada. Isso sugere a capacidade metabólica de produzir importantes metabólitos secundários, assim como ocorre em plantas em resposta a diferentes fatores ambientais e condições de estresse (Borges; Amorim, 2020). Alcaloides são substâncias nitrogenadas de caráter alcalino, em sua maioria, encontradas em plantas e animais. Como metabólito secundário de proteção, apresentam toxicidade, amargor, regulador de crescimento e várias atividades farmacológicas. Cafeína, cocaína, atropina, escopolamina, emetina, curarina e morfina são exemplos de alcaloides (Aniszewski, 2015; Hadizadeh *et al.*, 2019). A alga verde *Caulerpa racemosa* apresenta a caulerpina como constituinte alcaloide. Seu extrato foi utilizado para atenuar o quadro clínico de doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa em camundongos. Notou-se uma potencial atividade terapêutica para o alcaloide caulerpina (Miranda, 2014).

Flavonoides são potentes sequestradores de radicais livres e, portanto, possuem propriedades antioxidantes (Cao; Sofic; Prior, 1997; Heim; Tagliaferro; Bobilya, 2002). A ocorrência de flavonoides em algas é relatada na literatura, sendo comum a existência de variação nas quantidades determinadas nas diferentes espécies e com diferentes solventes de extração. Goiris *et al.* (2014) relatam a identificação de flavonoides em diversas espécies diferentes de microalgas. Usando UHPLC-MS/MS, a clorófita *Haematococcus pluvialis* foi a microalga que apresentou alto teor de flavonoides e a maior diversidade na composição polifenólica entre as espécies estudadas. O conteúdo de kampferol e quercetina foi detectado na biomassa seca de *Haematococcus pluvialis* SAG 192.80, com 1.2 ng.g⁻¹ e 3.6 ng.g⁻¹, respectivamente. Além disso, a quercetina foi identificada em *Porphyridium purpureum* SAG 1380-1d (9.1 ng.g⁻¹), e em *Diacronema lutheri* CCAP931/1 (4.4 ng.g⁻¹). Rutina, quercetina, apigenina e quercitrina consistem nos flavonoides mais abundantes encontrados em *Scenedesmus obliquus* (El-Tablawy; Mansour; Shaaban, 2020). Compostos de isoflavonas foram encontrados em amostras de algas de água doce e cianobactérias como *Spongiochloris spongiosa*, *Scenedesmus* e *Nostoc 17*, mesmo que em concentrações muito baixas ou traços (Klejdus *et al.*, 2010).

A presença de kampferol na microalga verde em estudo reforça a possibilidade de síntese dessa molécula nesse grupo, já observada em *Nannochloris* sp., por exemplo (Haoujar

et al., 2019). Tal composto fenólico também foi encontrado na microalga verde *Ettlia pseudoalveolaris* (Vornoli *et al.*, 2023). Em *Chlorella* spp., maior teor de kampferol foi detectado em comparação com algas marinhas *Ulva intestinalis* e *Chaetomorpha linum*, e alga de água doce *Arthrospira platensis* (cultivada em biorreator) (Gentscheva *et al.*, 2022). Esses achados reafirmam a capacidade das microalgas de produzir importantes metabólitos secundários sob diferentes condições experimentais.

O resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxi-estilbeno), é um estilbeno, um metabólito secundário produzido por um número limitado de espécies de plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos (Mei *et al.*, 2015; Halls; Yu, 2008.). Uva (*Vitis* sp.), amendoim (*Arachis hypogaea*) (Soleas; Diamandis; Goldberg, 2001), erva-de-passarinho japonês (*Polygonum cuspidatum*) (Soleas; Diamandis; Goldberg, 2001), amora (*Morus* sp.) (Song *et al.*, 2009) e *Vaccinium* spp. (incluindo mirtilo, uva-do-monte e cranberry) (Rimando *et al.*, 2004) são exemplos de produtores de resveratrol. O acúmulo do polifenol resveratrol na biomassa da microalga *Scenedesmus obtusus* pode ser um mecanismo importante de autoproteção quando sob condições estressantes. Neste estudo, o fotoperíodo foi a condição estressante para as microalgas do cultivo. Essa ferramenta pode ser explorada para a produção desse metabólito valioso permitindo uma produção sustentável. Contudo, não encontramos na literatura a síntese de resveratrol por microalgas.

A comunidade científica passou a ter interesse pelo resveratrol por seu potencial cardioprotetor, neuroprotetor, antienvhecimento e anticancerígeno (Pandey; Rizvi, 2010). Esse composto existe em duas isoformas geométricas, trans e cis-resveratrol, formado por dois anéis fenólicos em ligação dupla de estireno (Takaoka (1940) apud Gambini *et al.*, 2015). Nas plantas, a concentração desse composto é baixa. Obter produção significativa para escala comercial é um desafio. Métodos alternativos biossustentáveis com abordagens tecnológicas já são estabelecidas, a saber, cultura de tecidos, cultura de plantas micropropagadas *in vitro*, plantas transgênicas superiores geneticamente modificadas e micróbios recombinantes (Nandagopal *et al.*, 2018).

A síntese microbiana de resveratrol é bastante comum com o uso de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e bactérias *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces venezuelae*, e *Corynebacterium glutamicum* (Thapa *et al.*, 2019). As rotas biossintéticas de compostos fenólicos (PCs) em microalgas ainda são pouco exploradas (Del Mondo *et al.*, 2021). A biossíntese de resveratrol ocorre a partir da fenilalanina ou tirosina através da via do ácido chiquímico (Jeandet *et al.*, 2018; Mei *et al.*, 2015; Halls; Yu, 2008). Assim, a introdução de vias ou genes específicos com a adição inicial de substratos correspondentes (fenilalanina e

tirosina) pode produzir resultados satisfatórios melhorando a produção de resveratrol nas microalgas. Como exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* com levedura recombinante e adição de tirosina como substrato foi utilizado para produzir resveratrol com rendimento de 3.3 mg/L de resveratrol para até 5,8 mg/L (Shin *et al.*, 2012). De forma semelhante, o tratamento na videira (*Vitis vinifera* L.) com metil jasmonato/sacarose levou ao acúmulo de *trans*-resveratrol e piceídeos no meio extracelular como componente das reações de defesa para o fruto (Belhadj *et al.*, 2008).

A quercetina é um flavonoide abundante conhecido por suas propriedades anti-cancerígenas (Amor *et al.*, 2018), anti-inflamatórias e cardioprotetoras (Patel *et al.*, 2018) e antioxidantes (David; Arulmoli; Parasuraman, 2016). Está presente em vegetais, frutas, chás e vinhos (Boots; Haenen; Bast, 2008). A caracterização de quercetina em espécies de microalgas foi realizada em outros estudos. Bhuvana *et al.* (2019) relatam a presença de quercetina com duas espécies de microalgas: *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meio basal f/2 por 45 dias e submetidas à caracterização por HPLC. Em *Chlorella Vulgaris*, Quercetina pentosídeo-hexosídeo e Quercetina-7-o-hexosídeo-3-o-hexosídeo foram os compostos identificados enquanto que em *Nannochloropsis oculata* há a presença de Quercetina pentosídeo-hexosídeo. O impacto da quercetina foi avaliado em aumentar biomassa celular na microalga oleaginosa *Chlorella vulgaris*. Os resultados apontaram o aumento simultâneo na biomassa e no conteúdo lipídico com significância para aplicações comerciais no campo da saúde humana (Ma *et al.*, 2018).

A investigação realizada até o momento confirma que a biomassa de algas apresenta constituição promissora de metabólitos secundários. Este estudo buscou grupos de compostos presentes na biomassa destas microalgas. A ultrasonicação, a extração por ultrassom, a extração assistida por irradiação ultrassônica (EAU), a extração de solvente assistida por ultrassom, a extração assistida por micro-ondas (MAE), ou ainda, a extração de fluidos sub e supercríticos em microalgas têm sido práticas amplamente relatadas para recuperar compostos a fim de melhorar a eficiência da extração em microalgas (Fernandes *et al.*, 2017; Hadiyanto *et al.*, 2015; Barba; Grimi; Vorobiev, 2015). O método neste trabalho foi selecionado com base em artigos científicos, e o banho ultrassônico foi escolhido por ser uma das opções mais acessíveis e de fácil execução. A ultrasonicação destaca-se por facilitar a desintegração das células (ruptura mecânica da parede celular), permitir uma maior penetração do solvente nas células, reduzir o tempo de processamento e residência, aumentar a eficiência e a reprodutibilidade dos produtos, além de minimizar o consumo de solventes e emulsificantes. Além disso, proporciona um alto rendimento produtivo, redução de ruídos, preservação de compostos sensíveis ao calor e



significativa economia em manutenção e energia. Essas vantagens tornam o processo mais sustentável e economicamente viável. Sua aplicação é ampla, abrangendo os setores alimentício, agrícola e biotecnológico, podendo ser utilizada em diversas etapas, desde a matéria-prima até o produto final, o que evidencia sua grande versatilidade (Natarajan; Chen; Lau, 2015; Roselló-Soto *et al.*, 2015). A extração assistida por ultrassom (UST) foi usada para recuperar compostos fenólicos e clorofilas de *Nannochloropsis* spp. (Parniakov *et al.*, 2015). O ultrassom foi usado para extrair carotenoides na microalga *Heterochlorella luteoviridis* (Jaeschke *et al.*, 2017). Os efeitos benéficos do tratamento ultrassônico na biomassa, lipídios e proteínas da microalga *Anabaena variabilis* foram investigados e demonstrou viabilidade no conteúdo de lipídios para a produção de biodiesel (Han *et al.*, 2016). Estratégias baseadas em ultrassom (sonda e banho) foi usado em *Microchloropsis gaditana* para extração de carotenoides e mostrou eficiência de recuperação de carotenoides comparável ao método de referência (agitação, 24 h, acetona) (Zazirna *et al.*, 2024).

Foi positiva a presença das classes alcaloide e flavonoides. No entanto, não foi possível identificar especificamente qual alcaloide está presente, pois o teste realizado foi qualitativo. Além disso, no HPLC, não havia padrões analíticos de alcaloides disponíveis para comparação. Kavisri *et al.* (2021) analisaram o perfil fitoquímico do extrato metanólico da microalga *Spirulina platensis* e relataram um conteúdo de alcaloides de $89,5 \pm 0,03$ µg/mg. Uma triagem qualitativa de compostos bioativos foi testada na microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07 quanto à presença de diferentes constituintes fitoquímicos, incluindo alcaloides. Os alcaloides estavam presentes em quantidade moderada e os flavonoides estavam máximos em todos os extratos (Patil; Kaliwal, 2019).

Os dados encontrados para as condições de cultivo com *Scenedesmus obtusus* em dominância, sugere a produção dos compostos como resveratrol, kampferol e quercetina como resposta aos parâmetros estabelecidos. Análises adicionais devem ser conduzidas para confirmar, de forma incontestável, a presença desses metabólitos e validar seu uso como marcadores químicos na padronização de futuros extratos dessa espécie. Isso permitirá um maior aprofundamento no entendimento dos mecanismos de produção, quantificação, isolamento e aplicação dos compostos produzidos pela microalga estudada.

5. Referências Bibliográficas

AL-NOUR, Mosab Yahya; IBRAHIM, Musab Mohamed; ELSAMAN, Tilal. Ellagic acid, Kaempferol, and Quercetin from *Acacia nilotica*: Promising combined drug with multiple

mechanisms of action. **Current pharmacology reports**, v. 5, n. 4, p. 255-280, 2019.

AMOR, Souheila *et al.* Polyphenol extracts from red wine and grapevine: Potential effects on cancers. **Diseases**, v. 6, n. 4, p. 106, 2018.

AZEVEDO, Cláudia *et al.* The chemopreventive effect of the dietary compound kaempferol on the MCF-7 human breast cancer cell line is dependent on inhibition of glucose cellular uptake. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 3, p. 504-513, 2015.

ANISZEWSKI, Tadeusz. **Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications**. Elsevier, 2015.

BARBA, Francisco J.; GRIMI, Nabil; VOROBIEV, Eugène. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p. 45-62, 2015.

BECKER, E. Wolfgang. Microalgae for human and animal nutrition. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**, p. 461-503, 2013.

BELHADJ, Assia *et al.* Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 493-499, 2008.

BHUVANA, P. *et al.* Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. oculata* and *C. vulgaris*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101094, 2019.

BOOTS, Agnes W.; HAENEN, Guido RMM; BAST, Aalt. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European journal of pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

BULUT, Onur *et al.* Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp.(Chlorophyta) extracted with different solvents. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 1675-1683, 2019.

CAO, Guohua; SOFIC, Emin; PRIOR, Ronald L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free radical biology and medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CHONG, Yoojin *et al.* Biosynthesis of resveratrol derivatives and evaluation of their anti-inflammatory activity. **Applied Biological Chemistry**, v. 64, p. 1-10, 2021.

CORPAS, Rubén *et al.* Resveratrol induces brain resilience against Alzheimer neurodegeneration through proteostasis enhancement. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 1502-1516, 2019.

COSTA, A. F. Farmacognosia. v.1. 6 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, p. 202-315.

DAVID, Alexander Victor Anand; ARULMOLI, Radhakrishnan; PARASURAMAN,

Subramani. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy reviews**, v. 10, n. 20, p. 84, 2016.

DE MORAIS, Michele Greque *et al.* Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DEL MONDO, Angelo *et al.* Insights into phenolic compounds from microalgae: Structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 155-171, 2021.

DESHMUKH, Suchit; KUMAR, Ritunesh; BALA, Kiran. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 191, p. 232-247, 2019.

DONNELLY, Louise E. *et al.* Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 4, p. L774-L783, 2004.

EL-TABLAZY, Neamat H.; MANSOUR, Hoda A.; SHAABAN, Abd El-Salam M. Antioxidant activities of some edaphic algae in Egypt. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 9, p. 1-11, 2020.

FABJANOWICZ, Magdalena; PŁOTKA-WASYLKA, Justyna; NAMIEŚNIK, Jacek. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, p. 21-33, 2018.

FERNANDES, Andrêssa S. *et al.* Identification of chlorophyll molecules with peroxy radical scavenger capacity in microalgae *Phormidium autumnale* using ultrasound-assisted extraction. **Food Research International**, v. 99, p. 1036-1041, 2017.

Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., ... & Borrás, C. (2015). Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015(1), 837042.

GARCIA-PEREZ, Pascual *et al.* Algal nutraceuticals: A perspective on metabolic diversity, current food applications, and prospects in the field of metabolomics. **Food Chemistry**, v. 409, p. 135295, 2023.

GELLENBECK, Kevin W. Utilization of algal materials for nutraceutical and cosmeceutical applications—what do manufacturers need to know?. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 309-313, 2012.

GENTSCHEVA, Galia *et al.* Chemical characterization of selected algae and cyanobacteria from Bulgaria as sources of compounds with antioxidant activity. **Applied Sciences**, v. 12, n. 19, p. 9935, 2022.

GOIRIS, Koen *et al.* Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. **Journal of phycology**, v. 50, n. 3, p. 483-492, 2014.

HADIYANTO, Hadiyanto *et al.* The effects of temperature and frequencies in ultrasound assisted extraction of phycocyanin from microalgae *Spirulina* sp. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing, 2015.

HALLS, Coralie; YU, Oliver. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 77-81, 2008.

HAN, Xiaojuan *et al.* Kaempferol alleviates LD-mitochondrial damage by promoting autophagy: Implications in Parkinson's disease. **Redox biology**, v. 41, p. 101911, 2021.

HAN, Fei *et al.* Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. **Bioresource technology**, v. 209, p. 16-22, 2016.

HAOUJAR, Imane *et al.* The contribution of carotenoids, phenolic compounds, and flavonoids to the antioxidative properties of marine microalgae isolated from Mediterranean Morocco. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4037, 2019.

HASSAN, Saqib *et al.* Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 999-1029, 2022.

HADIZADEH, Mahnaz *et al.* Elicitação da biossíntese de alcalóides farmacêuticos por ácido salicílico em microalgas marinhas *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 42, p. 101597, 2019.

HEIM, Kelly E.; TAGLIAFERRO, Anthony R.; BOBILYA, Dennis J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HOANG, Minh-Hien *et al.* Kaempferol reduces hepatic triglyceride accumulation by inhibiting Akt. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. e13034, 2019.

HUNG, Li-Man *et al.* Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular research**, v. 47, n. 3, p. 549-555, 2000.

JAESCHKE, Débora Pez *et al.* Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 753-757, 2017.

JEANDET, Philippe *et al.* Engineering stilbene metabolic pathways in microbial cells. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 8, p. 2264-2283, 2018.

JIANG, Lingling *et al.* The anti-cancer effects of mitochondrial-targeted triphenylphosphonium-resveratrol conjugate on breast cancer cells. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, p. 1271, 2022.

KAVISRI, M. et al. Phytochemistry, bioactive potential and chemical characterization of metabolites from marine microalgae (*Spirulina platensis*) biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-8, 2021.

KLEJDUS, B. *et al.* Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 51, p. 7956-7965, 2010.

KOSTOPOULOU, Zacharoula; THERIOS, Ioannis; MOLASSIOTIS, Athanassios. Resveratrol and its combination with α -tocopherol mediate salt adaptation in citrus seedlings. **Plant physiology and biochemistry**, v. 78, p. 1-9, 2014.

LAI, Wing-Fu; WONG, Wing-Tak. Design and optimization of quercetin-based functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 26, p. 7319-7335, 2022

LI, Hua-Bin *et al.* Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 771-776, 2007.

LI, Jieming *et al.* Time-and dose-dependent allelopathic effects and mechanisms of kaempferol on toxigenic *Microcystis* growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 222, p. 112508, 2021.

LI, Yixin *et al.* Oxidative stress of mitophagy in neurodegenerative diseases: Mechanism and potential therapeutic targets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 110283, 2024

LOPRESTO, Catia Giovanna *et al.* Application of organic solvent nanofiltration for microalgae extract concentration. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 2, p. 307-324, 2017.

LU, Liushen *et al.* Enhancing the Antioxidant Activity by the Combination use of Resveratrol and Emodin. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 1466-1475, 2024.

MA, Yuhan *et al.* Quercetin potentiates the concurrent hyper-accumulation of cellular biomass and lipids in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource technology**, v. 269, p. 434-442, 2018.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 2009.

MEI, Yan-Zhen *et al.* Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. **Biotechnology letters**, v. 37, p. 9-18, 2015.

MIRANDA, Alessandra Marinho. **Efeitos do alcalóide indólico caulerpina, obtido de alga do gênero *Caulerpa*, em modelo de colite experimental murina**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MJ, T. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Faculty Sci Hokkaido Imperial University*, 3, 1-16.

MORADZADEH, Maliheh *et al.* Kaempferol increases apoptosis in human acute promyelocytic leukemia cells and inhibits multidrug resistance genes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 2288-2297, 2018.

NANDAGOPAL, Krishnadas *et al.* Biotechnological approaches for production of anti-cancerous compounds resveratrol, podophyllotoxin and zerumbone. **Current Medicinal**

Chemistry, v. 25, n. 36, p. 4693-4717, 2018.

NATARAJAN, Ramya; CHEN, Xue; LAU, Raymond. Ultrasound Applications in Lipid Extractions from Microalgae. **Production of Biofuels and Chemicals with Ultrasound**, p. 117-139, 2015.

NWANEKEZIE, Martin Nduka *et al.* Comprehensive physicochemical profiling and characterization of neem plant leaf extracts: insights for pharmaceutical & biomedical applications. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 13, n. 4, p. 382-399, 2023.

PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 909-913, 2010.

PARNIAKOV, Oleksii *et al.* Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 262-267, 2015.

PATEL, Rahul V. *et al.* Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, p. 889-904, 2018.

PATIL, Lakkanagouda; KALIWAL, B. B. Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with in vitro pharmacological applications. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 42, n. 6, p. 979-994, 2019.

PLAZA, Merichel *et al.* Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7159-7170, 2009.

RATZ-ŁYKO, Anna; ARCT, Jacek. Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: A review. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 21, n. 2, p. 84-90, 2019

REN, J. I. E. *et al.* Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 4, p. 2759-2776, 2019.

RIMANDO, Agnes M. *et al.* Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4713-4719, 2004.

ROSELLÓ-SOTO, Elena *et al.* Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, n. 2, p. 134-149, 2015.

SATHASIVAM, Ramaraj *et al.* Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 4, p. 709-722, 2019.

SCHOLZ, Bettina; LIEBEZEIT, Gerd. Chemical screening for bioactive substances in culture media of microalgae and cyanobacteria from marine and brackish water habitats: first results. **Pharmaceutical biology**, v. 44, n. 7, p. 544-549, 2006.

SHARAFAN, Marta *et al.* *Vitis vinifera* (Vine Grape) as a valuable cosmetic raw

material. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1372, 2023.

SHIN, So-Yeon *et al.* Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 4, p. 211-216, 2012.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1102p.

SOLEAS, George J.; DIAMANDIS, Eleftherios P.; GOLDBERG, David M. The world of resveratrol. **Nutrition and cancer prevention: new insights into the role of phytochemicals**, p. 159-182, 2001.

SONG, Wei *et al.* Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9133-9140, 2009.

SONGSERM, Rattanaporn; NISHIYAMA, Yoshitaka; SANEVAS, Nuttha. Light Influences the Growth, Pigment Synthesis, Photosynthesis Capacity, and Antioxidant Activities in *Scenedesmus falcatus*. **Scientifica**, v. 2024, n. 1, p. 1898624, 2024.

TAIWO, Festus O.; OYEDEJI, Olaoluwa; OSUNDAHUNSI, Moyosore T. Antimicrobial and Antioxidant Properties of kaempferol-3-O-glucoside and 1-(4-Hydroxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one Isolated from the Leaves of *Annona muricata* (Linn.). **J. Pharm. Res. Int**, v. 26, p. 1-13, 2019.

THAPA, Samir Bahadur *et al.* Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2571, 2019.

TURCOV, Delia *et al.* Physico-chemical characterization of the antioxidant mixture resveratrol-ferulic acid for applications in dermato-cosmetic products. **Farmacia**, v. 70, n. 3, 2022.

VORNOLI, Andrea *et al.* In vitro characterization of antioxidant, antibacterial and antimutagenic activities of the green microalga *Ettlia pseudoalveolaris*. **Antioxidants**, v. 12, n. 6, p. 1308, 2023).

XIA, En-Qin *et al.* Biological activities of polyphenols from grapes. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 2, p. 622-646, 2010

XU, Dong *et al.* Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1123, 2019

ZAZIRNA, Mariia *et al.* Ultrasound-based strategies for the recovery of microalgal carotenoids: Insights from green extraction methods to UV/MS-based identification. **Food Research International**, v. 187, p. 114354, 2024.

ZHANG, Huawei *et al.* Bioactive secondary metabolites from the marine sponge genus *Agelas*. **Marine drugs**, v. 15, n. 11, p. 351, 2017.