

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

ANA CRISTINA LIMA PEREIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
ANTIOXIDANTES PRODUZIDOS POR *Chlorella vulgaris***

São Cristóvão (SE)

(2018)

ANA CRISTINA LIMA PEREIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
ANTIOXIDANTES PRODUZIDOS POR *Chlorella vulgaris***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química como requisito  
parcial à obtenção do título de  
Mestre em Engenharia Química.

Nome da orientadora: Dr<sup>a</sup> Cristina Ferraz Silva

Nome do Coorientador: Dr. Diego Freitas Coelho

São Cristóvão (SE)

(2018)

P436e Pereira, Ana Cristina Lima.  
Estudo da produção e extração de compostos antioxidantes produzidos por *Chlorella vulgaris* / Ana Cristina Lima Pereira; orientadora Cristina Ferraz Silva. – São Cristóvão, 2018.  
66 f.: il.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Engenharia química. 2. Antioxidantes. 3. Microalga. 4. Extração (Química). I. Silva, Cristina Ferraz, orient. II. Título

CDU: 66.0

ANA CRISTINA LIMA PEREIRA

ESTUDO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES  
PRODUZIDOS POR *Chlorella vulgaris*

Dissertação de mestrado aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe em 31 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Cristina Ferraz Silva- Orientadora  
Universidade Federal de Sergipe

---

Diego Freitas Coelho- Coorientador  
Universidade Federal de Sergipe

---

Jacqueline Rego da Silva Rodrigues  
Universidade Federal de Sergipe

---

Roberto Rodrigues de Souza  
Universidade Federal de Sergipe

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia socorro presente na hora da angústia. **”Tudo posso naquele que me fortalece!”**(Filipenses 4.13)”. Dedico também aos meus pais, irmãos, meu noivo que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Aos meus orientadores, por toda ajuda e orientação no decorrer deste trajeto. A todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar este objetivo na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sempre quando restar alguma dúvida em relação ao seu sucesso pratique esta frase: **''E tudo quanto pedirdes em oração, crendo, recebereis.**''(Mateus 22.21).

Aos meus pais, Maria Francisca e Jeovaldo pelo seu amor e apoio incondicional diante de todas as dificuldades enfrentadas no decorrer do caminho.

Aos meus irmãos, Jeane, Joseane, Luiz e Matheus sempre incentivando através de palavras de incentivo e alegria.

A todos familiares e amigos que verdadeiramente desejaram o meu sucesso e esta conquista na minha vida.

A meu noivo Júnior pelo seu amor e compreensão nos momentos difíceis e estressantes que com seu companheirismo nunca me fez desanimar.

A minha professora e orientadora Cristina Ferraz que desde o início acreditou na minha capacidade pessoal e sempre me indicou os melhores caminhos a ser seguido nessa trajetória. E também a Diego Freitas meu coorientador que também acreditou nesse trabalho e ajudou nesse objetivo se tornar realidade.

Aos laboratórios de Bioquímica Industrial e de Biotecnologia Ambiental pela parceria e a ajuda no desenvolvimento dos experimentos no geral. Em especial, aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica Industrial que me proporcionaram um ambiente mais descontraído no decorrer do progresso das minhas atividades.

A CAPES pela a oportunidade e a maior tranquilidade para o desenvolvimento das minhas atividades através da bolsa de estudos concedida. E a UFS pelo curso e a infraestrutura fornecida para o progresso do trabalho proposto.

“Persistência é a irmã gêmea da excelência”. Uma é a mãe da qualidade, a outra é a mãe do tempo. ”(Marabel Morgan)

## RESUMO

As microalgas têm demonstrado ser uma solução para a obtenção de compostos antioxidantes. Os antioxidantes são compostos que retardam a ação dos radicais livres presentes no organismo. Dentre os compostos de interesse, os carotenoides são os mais promissores neste combate e possui um alto valor comercial. O presente trabalho teve como objetivo a seleção de microalgas com capacidade de produção de antioxidantes, extração e quantificação dos mesmos. As cepas isoladas foram selecionadas a partir dos meios para a produção de compostos antioxidantes, onde a cepa da *Chlorella vulgaris* obteve o melhor resultado em relação à obtenção desses compostos. O cultivo da cepa de microalga *Chlorella vulgaris* foi realizado em meios de produção com diferentes composições. Após o cultivo da cepa foi realizado um Delineamento Experimental para determinar as melhores condições de produção para a *Chlorella vulgaris*. A análise dos compostos extraídos foi realizada por espectrofotometria UV. Para a extração das amostras foi utilizada como solventes a água e o Dimetilsulfóxido e isto ocorreu em conjunto com a quantificação das mesmas de acordo com método com o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Os resultados obtidos foram que a microalga *Chlorella vulgaris* foi a que apresentou um melhor potencial para a produção de carotenoides. Os valores de Massa de Carotenoides (MC) encontrados compreenderam de 3,5 a 120,92  $\mu\text{g}$ . Já os valores de Fração de Carotenoides (FC) existentes variaram de 0,58 a 37,17  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  na biomassa de *Chlorella vulgaris* obtida. A quantificação da biomassa foi realizada em relação ao Índice de inibição da água ( $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) e o Índice de inibição do Dimetilsulfóxido ( $\text{IP}_{\text{DMSO}}$ ) que variam de 15,69 a 60,22% e 13,75 a 24,96%, respectivamente. O melhor valor de extração de antioxidantes se deu com o  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  que foi de 60,22%. As melhores condições de produção desses compostos em relação às faixas ótimas das variáveis significativas do Delineamento foram à luminosidade ( $X_1$ ) quando variou de 60 a 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{Fótons} \cdot \text{s}^{-1}$  e o ferro ( $X_2$ ) quando variou de 0,191 a 0,572 g/L. Já para a MC a faixa ótima foram para a variável luminosidade ( $X_1$ ) quando variou 120 a 360  $\mu\text{mol} \cdot \text{Fótons} \cdot \text{s}^{-1}$  e carbono ( $X_3$ ) quando variou de 2,52 a 7,56 g/L. Conclui-se que a microalga *Chlorella vulgaris* isolada do efluente do reator anaeróbico da presente universidade foi a que obteve melhor produção de Carotenoides Totais. A partir dela conseguiu extrair antioxidantes e a quantificação desses compostos através do método de DPPH. O valor encontrado na quantificação da atividade antioxidante do  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  foi o mais eficiente do que com o solvente Dimetilsulfóxido.

**PALAVRAS- CHAVE:** *Chlorella vulgaris*; antioxidantes; métodos de extração

## ABSTRACT

Microalgae have been shown to be a solution for obtaining antioxidant compounds. Antioxidants are compounds that slow the action of free radicals in the body. Among the compounds of interest, carotenoids are the most promising in this fight and have a high commercial value. The present work had as objective the selection of microalgae with capacity of antioxidant production, extraction and quantification of the same. The isolated strains were selected from the media for the production of antioxidant compounds, where the *Chlorella vulgaris* strain obtained the best result in relation to obtaining these compounds. Cultivation of the microalga strain *Chlorella vulgaris* was carried out in means of production with different compositions. After the cultivation of the strain an Experimental Design was carried out to determine the best production conditions for *Chlorella vulgaris*. Analysis of the extracted compounds was performed by UV spectrophotometry. Water and Dimethyl sulfoxide were used as solvents for the extraction of the samples and this was done together with the quantification thereof according to the method with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The results obtained were that the microalga *Chlorella vulgaris* presented the best potential for the production of carotenoids. The Carotenoid Mass (MC) values found comprised from 3.5 to 120.92  $\mu\text{g}$ . In contrast, the existing Carotenoid Fraction (HR) values ranged from 0.58 to 37.17  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  in the biomass of *Chlorella vulgaris* obtained. Biomass quantification was performed in relation to the Water Inhibition Index ( $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) and the Dimethyl sulfoxide Inhibition Index ( $\text{IP}_{\text{DMSO}}$ ) ranging from 15.69 to 60.22% and 13.75 to 24.96%, respectively. The best value for extraction of antioxidants was with  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$ , which was 60.22%. The best conditions of production of these compounds in relation to the optimal ranges of the significant variables of the Design were at luminosity ( $X_1$ ) when it varied from 60 to 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{Photons} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  and iron ( $X_2$ ) when it varied from 0.191 to 0.572 g / L. For MC, the optimum range was for the luminosity variable ( $X_1$ ) when it varied from 120 to 360  $\mu\text{mol} \cdot \text{Photons} \cdot \text{s}^{-1}$  e carbon ( $X_3$ ) when it ranged from 2.52 to 7.56 g / L. It is concluded that the microalga *Chlorella vulgaris* isolated from the effluent of the present anaerobic reactor was the one that obtained the best production of Total Carotenoids. It was able to extract antioxidants and the quantification of these compounds through the DPPH method. The value found in the quantification of the antioxidant activity of  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  was more efficient than with the solvent Dimethyl sulfoxide.

**KEYWORDS:** *Chlorella vulgaris*; antioxidant; extraction method

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1-Composição dos meios de manutenção e seleção das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Navicula sp.</i> .....                          | 20 |
| Tabela 2-Composição do meio utilizado para a produção de antioxidantes da microalga <i>Chlorella vulgaris.</i> .....                                | 21 |
| Tabela 3-Matriz do Delineamento Fatorial $2^3$ com 4 pontos centrais para os meios de produção de antioxidantes da <i>Chlorella vulgaris</i> .....  | 26 |
| Tabela 4- Valores reais das variáveis do Delineamento fatorial $2^3$ para os meios de produção de antioxidantes da <i>Chlorella vulgaris.</i> ..... | 26 |
| Tabela 5-Valores de produção de Carotenoides Totais (mg /mL) obtidos para as microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Navicula sp.</i> .....       | 27 |
| Tabela 6- Valores de carotenoides produzidos e a quantificação dos antioxidantes obtidos pela <i>Chlorella vulgaris.</i> .....                      | 28 |
| Tabela 7- Coeficientes de regressão para a variável resposta do $IP_{H_2O}$ . .....   | 32 |
| Tabela 8- ANOVA da resposta do $IP_{H_2O}$ a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes.....                           | 32 |
| Tabela 9-Valores preditos do $IP_{H_2O}$ calculados em função dos coeficientes de regressão e o erro relativo dos ensaios. ....                     | 34 |
| Tabela 10- Coeficientes de regressão para a variável resposta da MC. ....   | 37 |
| Tabela 11 - ANOVA da resposta da massa de carotenoides a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes.....               | 38 |
| Tabela 12 - Valores preditos da MC calculados em função dos coeficientes de regressão e o erro relativo dos ensaios. ....                           | 38 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1-Microscopia ótica da microalga isolada <i>Chlorella vulgaris</i> (A) e <i>Navicula</i> sp. (B) ....   | 19 |
| Figura 2 - Esquema das etapas do método de determinação de pigmentos.....  | 22 |
| Figura 3 - Esquema das etapas do método de extração com os solventes DMSO e a água e quantificação das amostras.....   | 25 |
| Figura 4 - Gráfico de Pareto do $IP_{H_2O}$ demonstrando a representatividade estatística das interações das variáveis utilizadas no Delineamento Fatorial $2^3$ ..... | 31 |
| Figura 5 - Superfície de resposta da interação ferro e luminosidade em relação ao $IP_{H_2O}$ .....  | 35 |
| Figura 6 - Curvas de contorno em função da interação de ferro e luminosidade do $IP_{H_2O}$ .....  | 35 |
| Figura 7 - Gráfico de Pareto da MC demonstrando a representatividade estatística das interações das variáveis utilizadas no Delineamento fatorial $2^3$ .....          | 37 |
| Figura 8 - Superfície de resposta da interação carbono e luminosidade em relação a Massa de Carotenoides.....  | 40 |
| Figura 9 - Curvas de contorno em função da interação de carbono e luminosidade da Massa de .....   | 40 |

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 2. OBJETIVOS.....   | 2  |
| 2.1. OBJETIVO GERAL.....  | 2  |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 2  |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 2  |
| 3.1. MICROALGAS.....  | 2  |
| 3.1.1. Aplicações das microalgas.....   | 5  |
| 3.1.2. Compostos antioxidantes produzidos por microalgas.....   | 9  |
| 3.2. ANTIOXIDANTES.....   | 10 |
| 3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES<br>POR MICROALGAS.....   | 12 |
| 3.4. EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS<br>ANTIOXIDANTES.....   | 14 |
| 3.5. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....   | 16 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 18 |
| 4.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS MICROALGAS.....   | 18 |
| 4.2. SELEÇÃO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE<br>ANTIOXIDANTES.....   | 19 |
| 4.3. ENSAIOS COM A MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i> .....  | 20 |
| 4.4. MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES NA <i>Chlorella vulgaris</i> .....  | 21 |
| 4.5. MÉTODO DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES COM<br>OS SOLVENTES DMSO E ÁGUA.....                                       | 23 |
| 4.6. ESTUDO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE<br>ANTIOXIDANTES.....  | 25 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....   | 27 |
| 5.1. SELEÇÃO DA MICROALGA COM MELHOR POTENCIAL ANTIOXIDANTE<br>.....  | 27 |
| 5.2. ESTUDO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NO PROCESSO DE<br>PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES por <i>Chlorella vulgaris</i> ..... | 27 |
| 5.2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA VARIÁVEL RESPOSTA IP <sub>H2O</sub> .....   | 29 |
| 5.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA VARIÁVEL RESPOSTA MC.....   | 36 |
| 6. CONCLUSÃO.....   | 41 |
| 7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....  | 42 |
| REFERÊNCIAS.....  | 42 |

# 1. INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são compostos que evitam a formação de radicais livres prevenindo assim de várias doenças. Dentre esses compostos, os mais conhecidos e usados para os diversos setores mercadológicos como o carotenoide, betacaroteno, astaxantina, fucoxantina, luteína, licopeno, alfa caroteno entre outros.

A ação dos antioxidantes impede as reações de oxidação radicais livres presentes no organismo que causam uma série de problemas de saúde. Desta forma, o estudo relacionado a estes compostos de interesse é bastante promissor e benéfico para os diversos setores da sociedade incluindo para a saúde humana. Muitas pesquisas científicas têm mostrado a importância do uso de antioxidantes para o melhoramento de várias doenças.

De acordo com D’ORAZIO *et al* (2012) relatam que a obtenção de produtos como carotenoides na forma sintética possui custos mais altos do que produzidos por métodos biológicos. Segundo dados mercadológicos de Li *et al* (2011), o preço de mercado para venda por kg de astaxantina é cerca de US \$ 2.000 para a obtida através da síntese química, US \$ 2.500 para a oriunda da fermentação de levedura, e US \$ 7.000 a astaxantina produzida por microalgas. Diante desse mercado promissor muitos buscam a existência de várias fontes alternativas de produção de antioxidantes nos mais variados habitats.

Muitas pesquisas têm conduzindo a novas alternativas propostas ao uso de carotenoides provenientes de fontes alternativas, como por exemplo, as microalgas. O estudo relacionado às microalgas e carotenoides tem se tornado cada vez mais constante e usado para pesquisas. As microalgas têm mostrado um caminho alternativo para a produção de antioxidantes e com isso mostra a sua importância para a sociedade e para as pesquisas em torno delas. Dentre as suas aplicações destaca-se a produção de biocombustíveis, suplemento animal, tratamento de efluente, na prevenção de doenças, no caso do uso de carotenoides.

Este estudo foi importante porque a microalga foi isolada de um reator anaeróbico de tratamento de efluentes de onde aparentemente não teria mais utilidade para a sociedade. Além do que a mesma não precisou de altos custos para a sua manutenção e os meios de seleção usados não geraram muitas despesas. Estes meios de seleção ajudaram para indicar um melhor caminho a ser seguido em relação às melhores variáveis significativas. E com isso, foi possível focar na produção de antioxidantes da

microalga *Chlorella vulgaris* mesmo sem ter a ideia do quanto poderia ser significativa para os estudos e para a sociedade. Já que a mesma até então não foi utilizada para nenhuma outra pesquisa anterior relacionada à produção de antioxidantes.

Mesmo com alguns indícios na literatura de possível produção de compostos a partir do gênero da *Chlorella* cada microalga pode se comportar de formas diferentes. E a mesma surpreendeu de forma positiva com a produção de antioxidantes e carotenoides contribuindo para o presente trabalho e outras pesquisas. Diante de estudos não exclusivamente voltadas para as microalgas, mas também para meios de seleção de produção de compostos bioativos nas mesmas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Selecionar e estudar as cepas de microalgas com melhor capacidade para a produção de antioxidantes utilizando a estratégia de restrição dos nutrientes do meio.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Selecionar os meios de produção de compostos antioxidantes;
- ✓ Estudar as variáveis que influenciam no processo de produção dos antioxidantes pela cepa de microalga selecionada;
- ✓ Obter e extrair os compostos antioxidantes presentes no meio;
- ✓ Quantificar os carotenoides produzidos pela biomassa da microalga.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. MICROALGAS**

A biotecnologia microalgal emergiu devido à grande diversidade de produtos que podem ser desenvolvidos a partir da biomassa. Diante de um futuro incerto, com a escassez de alimentos e energia e o aumento das mudanças climáticas, a biotecnologia microalgal tornou-se uma das alternativas para os problemas emergentes que são encontrados a cada dia (STEPHENS *et al*, 2013; SAIFULLAH *et al*, 2014). As microalgas são bem conhecidas por sua composição química única e seus efeitos específicos (DUONG *et al*, 2015). As microalgas são organismos microscópicos capazes de converter a energia solar em energia química através da fotossíntese (SHALABY *et al*, 2010). O sequestro de carbono por microalgas está sendo considerada uma alternativa promissora na mitigação dos gases causadores do efeito estufa, pois estes organismos possuem uma alta eficiência fotossintética, estima-se que para produzir 1 Kg de biomassas, as microalgas fixam cerca de 1,83 Kg de CO<sub>2</sub>. Por

esta alta eficiência a biomassa de microalgas vem sendo reconhecida como uma fonte promissora na produção de biocombustíveis (JIANG *et al*, 2013., CHEAH *et al*, 2015).

Diante de mudanças ambientais muitas espécies diferentes de microalgas surgiram de possíveis adaptações tais como as algas verdes que obtêm sua pigmentação a partir da clorofila a e b, bem como outros pigmentos, incluindo o  $\beta$ -caroteno e xantofilas. Já as algas vermelhas são um grande grupo de macroalgas principalmente multicelulares com aproximadamente 6000 espécies (KADAM *et al*, 2013). A partir de meados do século XX, o cultivo de microalgas em grande escala foi realizado em regiões com condições climáticas severas onde outras culturas não podem ser cultivadas, como áreas desertas e costeiras e a biomassa obtida para aplicações biotecnológicas (FORJÁN *et al*, 2015).

As microalgas, em sua diversidade, são organismos muito flexíveis quanto ao habitat, sendo encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres, quanto em ambientes aquáticos de água doce, salobra e salgada (MOAZAMI *et al*, 2011). O alto potencial das microalgas é devido à sua alta imagem fotossintética eficiência, alta taxa de crescimento e consumo de CO<sub>2</sub> com a produção concomitante de O<sub>2</sub>. Elas não possuem nenhuma necessidade de terras aráveis ou água potável (GOUVEIA, 2011). A compreensão da ecofisiologia microalgal é importante para a compreensão do destino do fito plâncton nos ecossistemas naturais, mas também para aperfeiçoar a produção de biomassa microalgal em grandes escalas com aplicações na indústria de aquicultura, bioenergia e cosmética, dentre outras (MILLEDGE, 2011). Nas últimas décadas o uso de microalgas fotossintetizantes tem sido investigado no tratamento de efluentes devido à alta capacidade de remoção dos compostos orgânicos com vantagens econômicas, pelo potencial de produção de biomassa com elevado valor agregado e interesse comercial (MATOS *et al*, 2015).

As microalgas do gênero *Chlorella*, foram identificadas pela primeira vez pelo pesquisador holandês Martinus Willem Beijerinck em 1890 como sendo a primeira microalga com um núcleo definido em um lago nos arredores da cidade de Delft na Holanda. Em seu artigo, ele descreve que as águas do lago estavam tomadas por microalgas de um verde intenso ao qual ele comparou com o verde da grama que crescia nas margens. O nome *Chlorella* vem da palavra grega *chloros* que significa verde, e o sufixo latino *ella* que se refere ao seu tamanho microscópico (SAFI *et al*, 2014). Fernandes *et al* (2014), ao avaliarem o efeito de extratos de diversas plantas, ricos em

compostos fenólicos, no crescimento de *Chlorella vulgaris*, verificaram que em função da concentração testada ocorria inibição ou estímulo do crescimento desta microalga.

Muitas algas como *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* são cultivadas para a produção de proteínas, astaxantina,  $\beta$ -caroteno, glicerol, combustíveis líquidos, formulações farmacêuticas, bem como produtos de química fina (SHALABY, 2011). Entre estas, as do gênero *Dunaliella*, especialmente *Dunaliella salina* e *D. tertiolecta*, são as microalgas mais estudadas para a obtenção de biomassa (FRANCAVILLA *et al*, 2010). De acordo com El-Sheekhet *al*(2011), observaram a degradação de alguns compostos fenólicos pela *C. vulgaris*, confirmando a capacidade que algumas algas apresentam de oxidar compostos fenólicos. Alguns microrganismos fotossintéticos como microalgas foram consideradas como estirpes robustas e reprodutíveis para diferentes meios de produção de antioxidantes e fenólicos. Graças aos seus ácidos graxos poli saturados altos, ficosteróis, poli sacarídeos, pigmentos e compostos fenólicos (CUELLAR-BERMUDEZ *et al*, 2015; GHASEMI *et al*, 2011).

As microalgas contêm numerosos compostos bioativos que podem ser aproveitados para uso comercial. Componentes com atividades antioxidantes podem ser encontrados em apenas algumas espécies de algas. Muitos produtos químicos têm uma ampla gama de atividades biológicas e estruturas químicas, que afetam muitos processos bioquímicos dentro da célula. Tais produtos químicos estão presumivelmente relacionados à regulação e sucessão de populações de algas e bactérias (SHALABY *et al*, 2010). A pesquisa biotecnológica de remediação de efluentes propõe que consórcios microbianos formados por microrganismos heterótrofos degradadores da matéria orgânica do efluente e liberadores de CO<sub>2</sub> e elementos minerais, atuam sinergicamente com as microalgas fotossintéticas para favorecer o crescimento microalgal, que por sua vez produzem oxigênio para os microrganismos (KOUZUMA & WATANABE, 2015).

As microalgas contêm múltiplas vias metabólicas para diferentes condições de crescimento tais como fototrófico, mixotrófico e heterotrófico. A via metabólica da condição heterotrófica envolve três passos principais, a absorção, assimilação, a ativação e transformação, e armazenamento ou utilização de metabólitos (MORALES-SÁNCHEZ *et al*, 2015). Os organismos fotossintetizantes têm a capacidade de separar, capturar e liberar elétrons durante o fluxo das reações em cadeia, por isto é possível utilizar o metabolismo fotossintético para capturar a luz solar e transformar em bioeletricidade (EL MEKAWYA *et al* 2014).

Diante disso, algumas microalgas como a *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Diatronema vlkianum* e *Isochrysis galbana* são algumas das algas mais interessantes com potenciais propriedades bioativas (BATISTA *et al*, 2013). As espécies do gênero *Chlorella* são tipicamente esféricas, pequenas com diâmetro que varia de 2 a 10 µm e esféricas, não móveis, unicelulares com um único cloroplasto e parede celular hemicelulósica rígida (SAFI *et al*, 2014). Segundo Shalaby *et al* (2011), existem mais de 40 espécies diferentes de *Nostocales*, e a maioria das quais são *Anabaenae Nostoc spp.* Desta forma, será necessária uma caracterização físico-química detalhada das microalgas, isto é um estágio essencial que permitirá determinar quais algas são mais adequadas para diferentes aplicações e propósitos (BATISTA *et al*, 2013).

As espécies *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são usadas como fonte de pigmentos e antioxidantes, como os carotenoides astaxantina, cantaxantina e betacaroteno, cujo valor de mercado pode atingir US\$ 8 mil por quilo. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6, tais como EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosaenoico), também são produzidos a partir de microalgas e compõem formulações nutricionais infantis, bebidas e suplementos dietéticos. O mercado atual para esses produtos é avaliado em cerca de US\$ 6,25 bilhões. Em um horizonte de médio e longo prazo, modelo semelhante poderia ser estabelecido para a produção em larga escala de microalgas, como *Chlorella*, visando à obtenção simultânea de produtos como betacaroteno, ração animal e biocombustível (EMBRAPA, 2016). Como do ponto de vista econômico é inviável empregar sílica gel para despigmentar biodiesel de microalgas, soluções alternativas devem ser implementadas, como a adsorção dos pigmentos em carvão ativo que já tem demonstrado bons resultados (CAVALCANTI, 2014).

### 3.1.1. Aplicações das microalgas

Dentre as microalgas mais amplamente conhecidas encontram-se as fontes significativas de biocombustíveis sustentáveis, as quais no futuro podem servir de energias renováveis (QUEIROZ *et al*, 2013). O ponto de partida para a seleção de algas e de produção de biodiesel de algas é considerado fundamentalmente importante. Devido ao rápido crescimento, facilidade de cultivo, alto conteúdo lipídico e excelente produtividade lipídica. A *Chlorella* foi considerada o gênero mais promissor dentre os precursores de biodiesel (LIU e CHEN, 2014; SUN *et al*, 2015). As microalgas marinhas também estão despertando interesse em outros campos, como a produção de biodiesel que poderia reduzir vários custos com as microalgas simbióticas, como

*Symbiodinium spp.* que são usados (BEETUL *et al*, 2014). Tendo em vista a redução do custo de produção de algas marinhas, os subprodutos da produção de biomassa de microalgas, como proteínas, alginatos e os compostos fenólicos devem ser considerados parte integrante da comercialização para aumentar o valor econômico do processo de produção de biocombustíveis de algas marinhas (WANG, 2015).

A escolha do máximo de estirpe de algas marinhas apropriada é uma opção que pode ser acoplada à engenharia genética e comercialização de subprodutos para aumentar o valor econômico da produção de algas marinhas nos processos de indução (CHISTI, 2013). Entretanto, apenas algumas espécies algas marinhas conseguiram chegar ao nível demercado industrial e comercial. Enquanto muitas outras ainda permanecem largamente inexploradas com uma aparente falta de utilidade como ingrediente ativo primário (WANG, 2015). Além disso, o estudo de compostos bioativos naturais obtidos de organismos marinhos é um campo relativamente novo de pesquisa com enorme potencial científico (MEHADI *et al*, 2015; CAKMAK *et al*, 2014).

Diante das várias aplicabilidades das microalgas, elas também podem ser usadas nas águas residuais de tratamento e mitigação de CO<sub>2</sub>. Este tratamento nessas águas visa reduzir o impacto ambiental e os custos em uma indústria poluente (GOUVEIA, 2012). Segundo Sydney *et al* (2010), relataram que a microalga *Botryococcus braunii* de água doce apresentou a maior taxa de fixação de CO<sub>2</sub> do que a *Dunaliella tertiolecta*. Além de elas produzirem compostos de diferente natureza química (MENETREZ, 2012). As microalgas são microrganismos metabolicamente versáteis, uma vez que podem utilizar até três metabolismos paralelos para a obtenção de energia. Esses metabolismos compreendem a fotossíntese, a respiração e a fixação de nitrogênio, o que determina vantagens para uso no tratamento secundário e terciário de águas residuárias (QUEIROZ *et al*, 2013). As microalgas além do tratamento de águas residuárias, elas conseguem elevadas eficiências de remoção de fósforo, que atingem valores na ordem de 100% (QUEIROZ *et al*, 2013; VIEIRA *et al*, 2012b). E também se deve considerar a possibilidade da remoção simultânea de material orgânico e nitrogênio das águas residuárias, em uma única etapa (JACOB-LOPES *et al*, 2013). As microalgas têm sido utilizadas há milhares de anos pelas populações indígenas (BLACKBURN e VOLKMAN, 2012).

Alguns esforços estão agora sendo focados na identificação dos compostos diretamente responsáveis pela capacidade antimicrobiana de macro e microalgas,

levando em conta que este é um campo de estudo relativamente inexplorado (SANMUKH *et al*, 2014). O ácido gálico apresenta atividade antibacteriana, antiviral, bem como atividade analgésica e anti-apoptótica (BELUR, 2011). Tanto o neofitadieno como o fitol é composto que já foram identificados em *Scenedesmus sp.* utilizando a mesma técnica cromatográfica. O composto fitol apresenta atividade antimicrobiana (KIM *et al*, 2014; MORAIS *et al*, 2015). Sendo considerado um potente inibidor enzimático da carbamato quinase (SHAIKH *et al*, 2015). O fitol é um de terpeno encontrado nas clorofilas, que apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana (MORAES *et al*, 2014).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2012), entre os vários campos de pesquisa em que aparecem macro e microalgas, a gastronomia e a tecnologia alimentar são duas das áreas mais importantes. Novas tendências em culinária são enfatizando o uso de algas como ingredientes saudáveis, saborosos e coloridos para acompanhar o máximo de pratos inovadores. A adição de biomassa de microalgas a produtos alimentares é uma ferramenta interessante para fornecer suplementos nutricionais com compostos biologicamente ativos tais exemplos, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados. Além dos altos teores de proteínas e carboidratos. Consequentemente, a seleção de espécies de microalgas com perfis nutricionais equilibrados é fundamental para o sucesso do desenvolvimento de novos alimentos. O uso de algas para a produção de proteínas tem vários benefícios sobre o uso tradicional de culturas de proteínas elevadas em termos de produtividade e valor nutricional. As algas e as microalgas têm maior rendimento de proteína por unidade de área (2,5-7,5 toneladas / hectare/ ano e 4-15 toneladas / hectare / ano, respectivamente) em comparação com culturas terrestres, como soja, legumes de pulso e trigo (0,6-1,2 toneladas / hectare / ano, 1-2 toneladas / hectare / ano, e 1,1 toneladas / hectare / ano, respectivamente) (KRIMPEN *et al*, 2013).

Uma das primeiras aplicações da biomassa de microalgas foi na aquicultura (MILLEDGE, 2011). Na aquicultura de alimentos, suplementos de algas também estão sendo usados, com boas perspectivas (YAAKOB *et al*, 2014). A introdução de microalgas na alimentação animal tem sido uma realidade desde os anos 70, e é uma boa maneira para melhorar a saúde animal e a subsequente dos produtos derivados da carne. (YAAKOB *et al*, 2014). A composição da biomassa de *C. onubensis* sugere que possui propriedades nutricionais que podem ser mais benéficas do que outras microalgas utilizadas em alimentos para animais, onde os teores de proteínas variam de

1 a 65%, carboidratos de 15 a 50% e gordura de 3 a 48% (BISHOP E ZUBECK, 2012; TIBETTS *et al*, 2015). As microalgas primárias dos gêneros utilizados como alimentos são as algas verdes *Chlorella* e *Dunaliella* (TANG e SUTER, 2011). Uma dessas alternativas pode substituir o milho e a farinha de soja em dietas de animais com microalgas que parecem ser mais ecologicamente corretos (CHRISTAKI *et al*, 2011). As microalgas utilizadas pela All Tech são de dois gêneros: *Chlorella* e *Schizochytrium*. O cultivo delas é do tipo heterotrófico, ou seja, não realizam fotossíntese, mas recebem alimento para crescer, em fotobiorreatores, com condições controladas. No Brasil, o produto foi introduzido há quase dois anos pela All Tech, primeiramente no mercado pet. Rica em Ômega 3, a ração atrai pessoas que buscam para animais de estimação os mesmos benefícios que o composto proporciona à saúde humana. O produto também já está sendo inserido na criação comercial de animais, começando pela piscicultura. Estudos mostram que introduzir rações à base de microalgas na dieta dos animais promove o fortalecimento dos ossos e do sistema imunológico (EMBRAPA, 2016).

Há preocupações crescentes com a segurança do uso de astaxantina para aquicultura ou consumo humano direto e, portanto, a astaxantina natural representa uma escolha preferida e Premium para consumo humano (Li *et al*, 2011). Uma grande variedade de algas foi introduzida em formulações de alimentos para vários fins. Produtos de carne, lácteos e panificação são alguns dos exemplos mais conhecidos de produtos inovadores que incluem esses ingredientes biologicamente sustentáveis. Na Europa, durante muito tempo o interesse pelas algas tem focado na extração de *phycocolloides* com propriedades de gelificação, espessamento e estabilização para uso em muitas aplicações na indústria de alimentos (ENZING *et al*, 2014). De acordo com Zahroojian *et al* (2011), observaram que a utilização de microalgas existe em uma variedade de alimentos inclusive que a suplementação dietética de 2,5% com base na alimentação. A inclusão dietética de *Chlorella* isto é 1 a 2% na base alimentada aumentou os carotenoides e a cor amarela total conforme determinado pelo Roche Yolk Colour Fan, um instrumento para medir a cor da gema (KOTRBÁČEK *et al*, 2013). Embora as microalgas comestíveis tenham sido obtidas de espécies mesofílicas marinhas ou de água doce, algumas tentativas foram feitas para introduzir a produção de microalgas extremofílicas, incluindo espécies de *Dunaliella* e *Galdieria* (VARSHNEY *et al*, 2015; GRAZIANI *et al*, 2013).

### 3.1.2. Compostos antioxidantes produzidos por microalgas

A biodiversidade e adequação de microalgas para o cultivo de biomassa em fotobiorreatores de sistemas fechados tem promovido o desenvolvimento de sua biorrefinaria para produção de compostos de alto valor como carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes e produtos farmacêuticos (ZHU 2015; CUELLAR-BERMUDEZ *et al*, 2015). Os antioxidantes agem para proteger o corpo humano contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem levar a distúrbios de saúde como câncer, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias com lesões graves nos tecidos (RANI *et al*, 2013). Segundo Gouveia (2012), as microalgas conseguem produzir compostos como ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, proteínas, antioxidantes e bioativos em geral, para aplicação nas indústrias alimentícias, cosméticas e médicas. Estes possíveis produtos são bem citados e, conseqüentemente, poderia transformar o processo economicamente factível. As microalgas são fontes interessantes de carotenoides e lipídios devido às suas características de cultivo, como boa adaptação a mudanças nas condições ambientais e o fato de seu cultivo não compete com a produção de alimentos (AHMED *et al*, 2014).

A substância principal encontrada em *Chlorella* que é benéfica para a saúde humana é o  $\beta$ -1,3-glucano, que é um imunossimilante ativo, eliminador de radicais livres e redutores de lipídios no sangue (YAAKOB *et al*, 2014). Pelo menos três classes de pigmentos ocorrem em microalgas: ficobilinas, clorofilas e carotenoides (D'ALESSANDRO *et al*, 2016). Os carotenoides constituem uma classe de pigmentos terpenoides de grande importância, com alto valor comercial e funções fisiológicas importantes, devido a suas propriedades antioxidantes, corante e provitaminica (MINHAS *et al*, 2016). Os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados recebem o nome de metabólitos. Nesses compostos encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específico, características únicas, funcionando como elementos de diferenciação e especialização. A todo este conjunto metabólico descrito costuma-se definir como metabolismo secundário (SIMÕES *et al*, 2010). As microalgas *Anabaena* e *Nostoc sp.* produzem mais de 120 produtos naturais como metabólitos secundários com atividades como anti-HIV, anticancerígenos, antifúngicos, antimaláricos e antimicrobianos (SHALABY *et al*, 2011).

Microalgas verdes, como *Chlorellas*, são consideradas uma boa fonte de luteína, alfa-caroteno, zeaxantina e violaxantina (AHMED *et al*, 2014). As algas são

ricas em polissacarídeos, vitaminas, minerais e substâncias bioativos como poli fenóis, proteínas, lipídios e carotenoides que possuem antioxidante, antibacteriano, antiviral e outras funções benéficas (NGO *et al*, 2011). A biomassa de *Chlorella vulgaris*, uma das espécies mais utilizadas de microalgas, empregada como suplemento alimentar contém 28,0% de proteína, 49,5% de carboidrato, 17,5% de lipídios e 4,5% de ácidos nucleicos (COLLET *et al*, 2011). Várias espécies de *Chlorellas* foram propostas para produzir outros componentes que os lipídios, incluindo, mas não restrito as proteínas, a luteína e astaxantina (LIU e CHEN, 2014; LIU *et al*, 2014a). No entanto, a proteína e a luteína, são carotenoides de metabólitos primários, estes se correlacionam inversamente com a acumulação de lipídios de armazenamento (GUCCIONE *et al*, 2014; SUN *et al*, 2015) impedindo assim a produção integrada em grande medida. Em contraste, a astaxantina é um carotenoide secundário e tende a se acumular em *Chlorella zofingiensis* sob condições de estresse como irradiância de luz elevada e privação de nitrogênio (LIU *et al*, 2010a, 2014b). Essas condições de estresse também são os gatilhos típicos do armazenamento de lipídios, especialmente triacilglicerol, um precursor ideal para fazer biodiesel (LIU *et al*, 2012a; SUN *et al*, 2015).

Já o gênero *Dunaliella* é conhecido por ter grandes quantidades de carotenos pró-vitamina A (TANG e SUTER, 2011). No entanto, *D. tertiolecta* demonstrou ser mais rica em xantofilas, principalmente luteína (JAYARAMAN *et al*, 2011; KIM *et al*, 2014). A *Haematococcus pluvialis* é conhecido por biossintetizar astaxantina até 3% de peso seco sob alta luz e sob condições de estresse de nutrientes (HAN *et al*, 2013). A *Dunaliella salina* pode produzir até 14 % de  $\beta$ -caroteno em relação ao seu peso seco em condições de elevada salinidade, luz, temperatura e poucos nutrientes (FRANCAVILLA *et al*, 2010). Já em relação aos compostos antimicrobianos nas algas são principalmente poli fenóis e polissacarídeos que atuam inibindo o crescimento microbiano ou diretamente destruindo as estruturas vivas dos microrganismos (BAJPAI, 2016). A biomassa das microalgas como *Coccomyxa onubensis* se pode notar que é rica em proteínas (44,60% de peso seco) e fibra dietética (15,73%) e possui um teor moderado de carboidratos (24,8%) e um baixo teor de lipídios (5,4%) em que os ácidos graxos poli-insaturados representam 65% do ácido gordo total. E os ácidos nucleicos estão presentes em 4,8% (NAVARRO *et al*, 2016).

### 3.2. ANTIOXIDANTES

Uma grande variedade de compostos antioxidantes, endógenos ou provenientes da dieta, compõe um sistema eficiente e complexo na defesa do organismo à ação dos

radicais livres. Este sistema antioxidante constitui-se de uma grande variedade de compostos bioativos tais como vitaminas (A, C, E, K), glutamina, sais minerais, metaloproteínas, enzimas (SOD-superóxido Dismutase) e polifenóis. Este sistema é composto por macromoléculas e moléculas de baixo peso molecular, elementos enzimáticos e não enzimáticos que atuam simultaneamente em prol da homeostase do balanço oxidativo (SHA LI *et al*, 2013). O termo polifenólico tem um significado amplo, composto por 8000 compostos diferentes com diferentes estruturas moleculares (SAFAFAR *et al*, 2015), devido à sua capacidade de transferir um átomo de átomos ou um átomo de hidrogênio para produzir um metabolito mais estável, eles servem como importantes elementos nas células de microalgas (MANIVANNAN *et al*, 2012).

Dentre os antioxidantes existem 3 grupos principais de pigmentos, as clorofilas lipofílicas, os carotenoides e as ficobilinas hidrofílicas. Os carotenoides podem ser encontrados na sua forma livre ou esterificados com uma variedade de ácidos graxos orgânicos como palmítico, linoleico, esteárico, etc. Estes são as formas mais estáveis, uma vez não são sujeitas a oxidação. Contudo, eles também são menos biodisponíveis, pois não são absorvidos de forma eficiente através do epitélio intestinal, a menos que tenham sido previamente convertidos na sua forma livre nos intestinos (BITTENCOURT, *et al*, 2013). Os carotenoides podem ser divididos em dois grupos sendo os carotenos e oxicototenoides ou xantofilas. Os carotenos são exclusivamente constituídos de hidrocarbonetos, enquanto as xantofilas são derivadas de carotenos contendo vários átomos de oxigênio (AMAYA *et al*, 2014). Também conhecido como oxicototenoides, esse grupo é essencialmente derivado da estrutura dos países de hidrocarboneto de caroteno, onde 1 a 4 contendo oxigênio grupos funcionais tais como hidroxilos (-OH), cetonas (= O), ou carbóxilos (-COOH). Esses grupos funcionais são adicionados a uma ou a ambas as extremidades da molécula. No geral a fórmula química da xantofilina é  $C_{40}H_{56}O_{14}$  (AMAYA *et al*, 2014).

A presença dos grupos oxigenados torna estes carotenoides mais solúveis em água do que caroteno. Alguns dos carotenoides neste grupo são: luteína, astaxantina, cantaxantina, capsantina, citranaxantina e éster etílico do ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico. Sua estrutura molecular é composta exclusivamente de carbono e hidrogênio formando uma cadeia poli-insaturada com a fórmula química  $C_{40}H_{56}$ . Há uma variedade de carotenos que ocorrem na natureza, embora aqueles relevantes para a alimentação animal sejam principalmente  $\beta$ -caroteno e licopeno. O  $\beta$ -caroteno exibe a atividade de referência pró-vitamina A entre carotenoides (AMAYA *et al*, 2014). A biomassa de C.

*onubensis* é particularmente rica em luteína e  $\beta$ -caroteno, que possuem altas atividades antioxidantes e são consideradas muito úteis como fonte de nutracêuticos (VAQUERO *et al*, 2014).

### 3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES POR MICROALGAS

Os microrganismos requerem condições de cultivo adequadas para crescer, com melhores condições de cultivo maior é a taxa de crescimento e produtividade (FERNANDEZ *et al*, 2013). As microalgas de uma mesma espécie possuem diferentes quantidades de proteínas, carboidratos e lipídeos, quando cultivadas em meios com diferentes quantidades de nutrientes (PROCHÁZKOVÁ *et al*, 2014). Ramirez *et al* (2014) investigaram o crescimento de microalgas em vinhaça e concluiu que o aumento da intensidade da luz contribuiu positivamente para a produção de biomassa, mas com o aumento da concentração de vinhaça a produção de biomassa diminuiu. De acordo com Wahidin *et al* (2013) dizem que não somente as questões de intensidade de luz para o crescimento de microalgas, mas qualidade/fonte de luz também podem ser importantes. As lâmpadas fluorescentes podem obscurecer as bandas de absorção de pigmentos de clorofila, contudo esse efeito não ocorre com iluminação LED (YOSHIOKA *et al*, 2012; ATTA, 2013).

Às vezes é necessário um fator de estresse para aumentar a produção de compostos como lipídios ou carotenoides, no entanto, esse estresse pode afetar o crescimento da cepa. Para contornar esse problema, cultivo em dois estágios tem sido realizado como estratégia para obtenção de maiores teores de lipídios e carotenoides, onde em um primeiro momento é priorizado a produção de biomassa utilizando meio de cultivo com nitrogênio. Em um segundo momento é reduzido ou retirado o nitrogênio do meio de cultura para estimular a produção de lipídios e /ou carotenoides (MARKOU *et al*, 2013; MINHAS *et al*, 2016). A deficiência do nitrogênio no meio de cultura faz com que ocorra maior acúmulo de substâncias de reserva como lipídios, carotenoides ou carboidratos dependendo da espécie ou cepa. Um crescimento balanceado e acelerado de biomassa não favorece o armazenamento de lipídios e carotenoides, que tendem a se acumular mais em condição de carência de alguns nutrientes (MINHAS *et al*, 2016). Diante da exposição das microalgas sob estresse é necessário prevenir ou reduzir a mortalidade celular causada por alta luz e a privação de nutrientes, e a concentração inicial da célula na cultura deve ser otimizado (WANG *et al*, 2013).

Estudos têm demonstrado diversas estratégias para aumentar o teor de lipídios em microalgas, particularmente sob condições de estresse ou de privação de nutrientes. A redução ou privação total da fonte de nitrogênio no meio de cultura tem sido uma estratégia bastante utilizada, entretanto, dependendo da espécie pode ocorrer o aumento de carboidratos em vez de lipídios (LI *et al*, 2015). De acordo com Abreu *et al* (2012), falam que a *Chlorella* acumula mais carboidratos em condições metabólicas mixotróficas. A presença da glicose no meio de cultivo promove alterações na composição enzimática e na fisiologia celular de microalgas isto porque a glicose pode atuar como estimulante ou supressora de alguns genes (ANGELO *et al*, 2014). Espera-se que estes produtos químicos sejam sintetizados sob condições de estresse, baixa taxa de crescimento e liberados em concentrações suficientemente grandes para serem eficazes. (SHALABY *et al*, 2010). Prandini *et al* (2016), aplicaram *Scenedemus sp* em efluente de suinocultura, obtiveram resultados de produtividade de biomassa de  $141,8 \pm 3,5 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  em cultivo autotrófico e de  $89,4 \pm 2,9 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , em cultivo mixotrófico.

As microalgas têm uma diversidade taxonômica e a possibilidade de crescer e colhê-los sob diferentes padrões ambientais. Esses organismos fotossintéticos aquáticos são particularmente atraentes como biorreatores. Além que podem ser enriquecidos em alguns compostos bioativos específicos após a exposição a estresses abióticos (COESEL *et al*, 2008). Os compostos bioativos das microalgas, como lipídios, amido, proteínas ou carotenoides, dependendo da espécie, são acumulados sob condições de estresse. Além disso, incluindo a privação de nutrientes, pH, intensidade da luz, temperatura e salinidade (DUONG *et al*, 2015). Muitos genes responsáveis para produção de carotenoides, particularmente biossíntese de astaxantina foram clonados e caracterizados em *Haematococcus pluvialis* e *Chlorellas zofingiensis*. As microalgas proporcionaram as oportunidades para estudar as vias e a regulação da biossíntese de carotenoides. Esta revisão resume a biologia celular, características fisiológicas e bioquímicas de *Haematococcus pluvialis* e *Chlorellas zofingiensis*, com ênfase em recentes progressos nos caminhos. Além do importante papel fisiológico de síntese de astaxantina sob estresse (HAN *et al*, 2013). A maior produtividade de astaxantina de  $17,5 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  foi obtida no estágio vermelho onde uma densidade de biomassa inicial ideal de  $0,8 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dwt}$  foi aplicado a uma coluna de vidro ao ar livre do Foto biorreator (WANG *et al*, 2013).

Kristoffersen *et al* (2012), em seu estudo sobre *Haematococcus pluvialis* criaram condições estressantes usando a excitação de dois fótons fornecida pelo laser

gerado pulsos na faixa de segundos e uma configuração de microscópio Leica. Alguns trabalhos buscam fornecer a primeira evidência do uso de H<sub>2</sub> para a produção com microalgas verdes sob a luz solar e demonstrou que a produção de H<sub>2</sub> com *C. reinhardtii* sob a luz natural é possível desde que as culturas sejam anteriormente aclimatadas (SCOMA *et al*, 2012). Estudo comprova que a substância O<sub>2</sub> é convertida em biomassa de microalgas, que pode ser usado para produzir produtos comercialmente valiosos. A mitigação de CO<sub>2</sub> por microalgas é considerada mais ecológica e sustentável do que a remoção química /física de CO<sub>2</sub> (ZHANG, 2015).

Em condições de estresse o teor de lipídios aumenta bastante sob a inanição de nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre e silício), mudança de temperatura, salinidade, pH, estresse em metais pesados (cádmio, ferro, cobre e zinco) e irradiação leve para algumas espécies, como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* e *Euglenia gracilis* (SHARMA *et al*, 2012). Quanto ao efeito de metais pesados em pigmentos, uma redução na composição de carotenoides foi relatada quando a concentração de ferro diminuiu (JUNEJA *et al*, 2013). De acordo com Krimpen *et al* (2013), em condições extremas as algas marinhas não exigem que a terra seja doce ou cultivável para que cresça, maximizando recursos que podem ser usados para produção de alimentos adicionais ou outros cultivos comerciais. No caso da *C. onubensis* como o habitat natural suporta alta irradiação e condições oxidativas, parâmetros físico-químicos e nutricionais podem ser adequadamente fixados para produzir biomassa com alto teor de carotenoide principalmente luteína e ácidos graxos poli-insaturados (RUÍZ-DOMÍNGUEZ *et al*, 2015).

### 3.4. EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

O pré-tratamento é necessário para modificar a estrutura da biomassa celulósica, e tornar mais acessíveis as enzimas, o carboidrato que será transformado em açúcares fermentáveis (BENSAH; MENSAH, 2013). Quando a matriz submetida à bioprospecção é completamente desconhecida, todos os extratos poderiam ser de potencial interesse químico ou biológico. Com base nesta afirmação, técnicas convencionais de extração líquida sólida compreendendo a extração aquosa seguida por mais extrações com solventes de polaridade crescente (como n-hexano, metanol, acetato de etilo e diclorometano) poderia representar a solução (BRUSOTTI *et al*, 2014). Existem os chamados métodos "isentos de solventes", no entanto, geralmente são

usados em combinação com um solvente para aumentar a eficiência de extração. Em particular, observou-se a sonicação para permitir uma maior penetração de solvente em biomassa direcionada, produzindo cavitações acústicas no solvente pela passagem de ondas ultrassônicas (KONG *et al*, 2014).

Uma grande parte dos estudos focados em prospecção de algas tratadas é relacionada à investigação de composição de lipídios. Vários desses estudos focaram principalmente na utilização de lipídios como fonte de produção de biocombustíveis (RATHA e PRASANNA, 2012). Neste caso, os autores geralmente não estavam interessados no conhecimento detalhado sobre a composição lipídica, mas apenas a extração quantitativa seguida de determinação gravimétrica (ARAUJO *et al*, 2011). Além da extração dos lipídios, as proteínas de algas são convencionalmente extraídas por meio de métodos aquosos, ácidos e alcalinos, seguidos por várias rodadas de centrifugação e recuperação usando técnicas como ultrafiltração, precipitação, ou cromatografia (KADAM *et al*, 2016).

De acordo com Araújo *et al* (2013), compararam diferentes métodos de extração de solvente com a assistência de ondas de ultrassom. A maior extração de lipídios de *C. vulgaris* foi alcançada quando o método de Bligh e Dyer (clorofórmio / metanol) foi aplicado em conjunto com 29,7 W/L intensidade ultrassônica. Em relação o efeito do pH na extração de proteína de *Nannochloropsis sp.* a microalga foi mais notável, um aumento no pH de 8,5 para 11 resultou em o dobro da quantidade de proteínas extraídas quando assistido por ultrassom (PARNIAKOV *et al*, 2015b). Os métodos convencionais de extração de proteínas são demorados e requer grande quantidade de solventes e a eficiência da extração é limitada. Um dos fatores mais importantes que influenciam o isolamento e a extração de proteínas de algas marinhas é a matriz de algas complexas que supõe uma barreira física (HARNEDY e FITZGERALD, 2013).

Algumas técnicas são usadas na extração de proteínas, dentre elas as tecnologias de membrana podem atuar como um método alternativo para enriquecer proteínas de algas quando usado em conjunto com uma técnica de interrupção celular, como a hidrólise de polissacaridase, UAE ou PEF. A ruptura da parede celular resistente é um passo crítico necessário para aumentar a disponibilidade de extração de proteínas de algas (BARBA *et al*, 2015). De acordo com estudos de Keris-Senet *al* (2014), relataram que o ultrassom com uma intensidade de potência de 0,4 kWh/L produziu as melhores concentrações de proteínas a partir de microalgas de tratamento de águas

residuais da ordem *Chlorococcales* da classe *Chlorophyceae* como por exemplo, a *Scenedesmus sp.* Segundo Custódio *et al* (2014), o extrato de acetona foi o que teve maior atividade antioxidante nos resultados obtidos neste estudo, devido os compostos com atividade antioxidante presentes em *Scenedesmus sp.* parecem ser essencialmente de polaridade média.

Além da extração, existe uma preocupação em recuperar estes antioxidantes, por isso vários métodos foram utilizados para recuperar compostos bioativos de microalgas. Um exemplo é o Pressionar Expeller ou pressionar o óleo é um dos métodos mais simples e mais antigos utilizados para extrair o óleo das sementes e a recuperação do mesmo. Este método também foi aplicado para biomassa de algas. Esta técnica consiste em aplicar alta pressão mecânica para quebrar as células e espremer o óleo da biomassa. No entanto, esta técnica possui várias desvantagens, incluindo geração de calor e problemas de engasgamento que irão diminuir a recuperação de lipídios (RAMESH, 2013).

Outro método mecânico interessante é o chamado bead-beating que também foi aplicado. Esta abordagem consiste em danos diretos às células causadas pela rotação de alta velocidade da pasta de biomassa com grânulos finos. Várias pontas são usadas para diferentes tipos de células. O diâmetro da ponta ideal para células de microalgas é de 0,5 mm. A desidratação de biomassa de algas é desnecessária, contrariamente ao método de pressão expelível, o que reduz os custos de processamento. Contudo, o uso de bead-beating pode ser difícil de dimensionar e requer o uso de um revestimento de refrigeração para evitar a degradação do produto final devido à geração de calor pelo agitador rotativo dentro do recipiente de cultura (RANJITH KUMARAND *et al*, 2015).

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. Um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH\* de coloração púrpura que absorve a 515 nm (ROGINSKY e LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ( $R^*$ ), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (MOLYNEUX, 2004; RAMADAN, 2010).

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS *et al*,1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al*, 1998).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS MICROALGAS

As fontes naturais para o isolamento foram coletadas de uma amostra de efluentes sanitários do reator anaeróbio da Estação de Tratamento Sanitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS). O experimento do isolamento descrito será segundo a metodologia descrita por Lee *et al* (2014). Para o isolamento, a amostra foi enriquecida em meio de WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972) contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NaNO}_3$ .

A amostra enriquecida foi purificada por diluição em série de 1 mL do efluente (fator de diluição de 1/10) para cada solução diluída que foi preparada, pegou 1 mL e foi inoculada numa placa Petri (SOUZA *et al*, 2017). As colônias de microalgas foram selecionadas e inoculadas nas placas. Posteriormente as microalgas isoladas foram cultivadas no meio WC a partir daí foi mantida em alimentação a microalga com o meio em questão (SOUZA *et al*, 2017).

Foram identificados dois tipos de microalgas uma *Chlorella sp.* no caso *Chlorella vulgaris* e uma diatomácea *Navicula sp.*, dessa só foi identificada o gênero. O método de identificação foi baseado na observação da morfologia através da microscópica óptica das células utilizando o Método de Chaves (Souza, 2017). O método de chaves consegue identificar gêneros e espécies dos diversos tipos de microalgas existentes. Para o crescimento e a manutenção das microalgas *Chlorella vulgaris* e da *Navicula sp.* foi utilizado o meio WC. As microalgas identificadas *Chlorella vulgaris* e a *Navicula sp.* de acordo com Método de Chaves vistas através do microscópico na Figura 1(A) e 1(B) respectivamente.

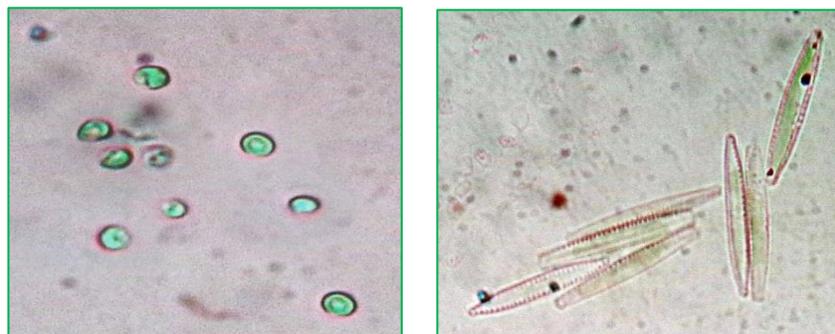


Figura 1-Microscopia ótica da microalga isolada *Chlorella vulgaris* (A) e *Navicula* sp. (B)  
Fonte: Souza *et al* (2017)

#### 4.2. SELEÇÃO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES

Depois de realizados os testes com as microalgas, a *Chlorella vulgaris* e a diatomácea *Navicula* sp. foi selecionado a microalga com melhor potencial através da extração de carotenoides propostos de acordo com a metodologia adaptada de Lichtenthaler e wellburn (1983) pelo método de caracterização da biomassa em termos de determinação de pigmentos.

Foram testados quatro meios através do estresse oxidativo das microalgas selecionadas no isolamento para a produção de carotenoides. Os meios foram denominados como: Meio 1(meio WC enriquecido com NaCl) adaptada da metodologia de Kobayashi *et al* (1997), Meio 2 (meio WC enriquecido com a adição de ferro) de acordo com Kobayashi *et al* (1993), Meio 3 (meio WC com aumento da intensidade luminosa) adaptada de Wang *et al* (2003); Torzillo *et al* (2005) e Meio 4 (meio WC enriquecido com NaCl e ferro) adaptada da metodologia de Kobayashi *et al*(1997). Estes meios foram testados com a finalidade de obtenção da maior quantidade de Carotenoides Totais a serem extraídos proporcionados pelo melhor meio estudado. A Tabela 1 apresenta a composição dos meios utilizados para a manutenção (meio WC), e crescimento das cepas para as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Navicula* sp.

Tabela 1-Composição dos meios de manutenção e seleção das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Navicula sp.*

|  | Composição             | Meio WC | Meio 1 | Meio 2 | Meio 3 | Meio 4 |
|--|------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| NaHCO <sub>3</sub>                                 | 2ml.L <sup>-1</sup>    | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| MgSO <sub>4</sub>                                  | 2ml.L <sup>-1</sup>    | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| CaCl <sub>2</sub>                                  | 2ml.L <sup>-1</sup>    | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 2ml.L <sup>-1</sup>    | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> NaNO <sub>3</sub> | 2ml.L <sup>-1</sup>    | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| Solução de metais                                  | 2ml.L <sup>-1</sup>    | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| Massa de Tris                                      | 2 ml. L <sup>-1</sup>  | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| NaCl   | 0,230g.L <sup>-1</sup> | Sim     | Sim    | Sim    | Sim    | Sim    |
| NaCl   | 0,263g.L <sup>-1</sup> | Não     | Sim    | Não    | Não    | Sim    |
| FeSO <sub>4</sub>                                  | 0,125g.L <sup>-1</sup> | Não     | Não    | Sim    | Não    | Sim    |

#### 4.3. ENSAIOS COM A MICROALGA *Chlorella vulgaris*

O ensaio consistiu na preparação de 12 ensaios com diferentes proporções de concentrações de ferro e carbono que variaram de 0,48 a 1,43g.L<sup>-1</sup> e 6,30 a 18,90g.L<sup>-1</sup> respectivamente. A Tabela 2 mostra os valores das concentrações para cada componente do meio usado para os 12 ensaios com a *Chlorella vulgaris*. A combinação e o valor para cada variável significativa, no caso a luminosidade, o ferro e o carbono seguiram o Delineamento nas Tabelas 3 e 4 respectivamente.

Além dos valores diferentes de quantidades de luzes estabelecidas de acordo com o Delineamento Experimental Fracionário junto das variáveis mais significativas. Cada meio continha 200 mL de meio WC modificado e 50 mL de inoculo da microalga que foi cultivada no meio WC com uma concentração de 0,008 g.mL<sup>-1</sup>. A modificação do meio WC foi à adição de diferentes proporções de ferro e bicarbonato de sódio nos ensaios de acordo com o Delineamento Fatorial Fracionário na Tabela 2.

As fontes de carbono e ferro utilizadas foram NAHCO<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>, respectivamente e a quantidade de luz variou de 100 a 300 μmol fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Sendo que o restante da composição do meio WC não houve modificação para todos 12 ensaios do experimento. Todos os ensaios foram incubados a temperatura ambiente até atingirem a estabilidade no crescimento da biomassa. O aumento da biomassa e/ou densidade celular nos cultivos foi monitorado pela concentração celular, utilizando-se

uma correlação pré-determinada (curva-padrão) entre a massa da biomassa seca e a absorvância a 570 nm (BECKER, 1994; LOURENÇO, 2006). Esta correlação foi utilizada para encontrar o valor da produtividade em termos de biomassa para os 12 ensaios realizados. A curva padrão que foi realizada da microalga *Chlorella vulgaris* através da Equação 1. A Tabela 2 mostra a composição e os componentes dos meios utilizados para produção de antioxidantes.

$$Y=27,463x \quad (1)$$

Tabela 2-Composição do meio utilizado para a produção de antioxidantes da microalga *Chlorella vulgaris*.

| Componentes                                    | Composição                       |
|--|----------------------------------|
| NaHCO <sub>3</sub>                             | 6,30 -<br>18,90g.L <sup>-1</sup> |
| MgSO <sub>4</sub>                              | 2ml.L <sup>-1</sup>              |
| CaCl <sub>2</sub>                              | 2ml.L <sup>-1</sup>              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 2ml.L <sup>-1</sup>              |
| Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>               | 2ml.L <sup>-1</sup>              |
| NaNO <sub>3</sub>                              | 2ml.L <sup>-1</sup>              |
| Solução de metais                              | 2ml.L <sup>-1</sup>              |
| Tris   | 0,230g.L <sup>-1</sup>           |
| C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> | 0,48-1,43g.L <sup>-1</sup>       |

#### 4.4. MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES NA *Chlorella vulgaris*

A etapa de extração dos carotenoides seguiu a metodologia de acordo com Lichtenthaler e wellburn (1983), o qual compreende a determinação de pigmentos no meio. Antes das etapas do ensaio, a biomassa foi previamente preparada. Após o processo de produção de antioxidantes foram retirados os 12 ensaios e centrifugado para a obtenção da sua biomassa. Em seguida foram colocadas para secar em uma estufa a 40°C e depois das biomassas secas foram maceradas até a obtenção de um aspecto uniforme.

A Figura 2 mostra um esquema das etapas do método de determinação de pigmentos do ensaio realizado para a extração de antioxidantes com a microalga *Chlorella vulgaris*. A Biomassa da microalga foi pesada 3mg para cada ensaio e foi

adicionado no tubo de falcon de 15 mL. Em seguida o tubo foi revestido com papel alumínio e adicionado 5 mL de metanol. Logo em seguida foram colocadas as amostras no vortex por 30 seg e intercalava com 10 min de pausa. Este procedimento durou 1 h de extração no total depois foi centrifugado para obter o líquido sobrenadante e assim realizou as leituras das absorvâncias no espectrofotômetro UV da marca Biospectro nos comprimentos de onda necessários para o cálculo dos valores de Carotenoides Totais. A Figura 2 mostra um esquema das etapas do método de determinação de pigmentos.

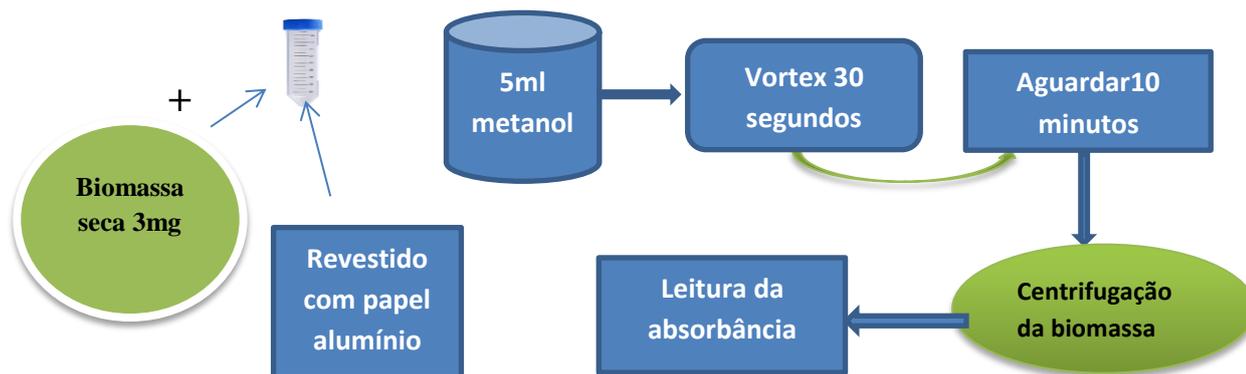


Figura 2 - Esquema das etapas do método de determinação de pigmentos

A análise das amostras foi feita com a leitura em absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 470 nm, 653 nm, 666 nm e 750 nm. Com esses comprimentos de onda foram feitos os cálculos dos carotenoides totais de cada amostra com base a metodologia de Lichtenthaler e wellburn (1983) as seguintes Equações (2), (3) e (4).

$$\text{Chl a} = 15,65 (A_{666} - A_{750}) - 7,34 (A_{653} - A_{750}) \quad (2)$$

$$\text{Chl b} = 27,05 (A_{653} - A_{750}) - 11,21 (A_{666} - A_{750}) \quad (3)$$

$$\text{Carotenoides Totais (xant.+carot.)} = \frac{1.000(A_{470} - A_{750}) - 2,86(\text{Chla}) - 129,2(\text{Chlb})}{245} \quad (4)$$

A Massa de Carotenoides calculada representa a biomassa que foi produzida pela microalga *Chlorella vulgaris* e com isso foi feita uma correlação pré-determinada (curva-padrão) entre a massa da biomassa seca e a absorvância a 570 nm. Esta correlação foi utilizada para encontrar o valor da produtividade em termos de biomassa para os 12 ensaios realizados. A curva padrão que foi realizada da microalga *Chlorella vulgaris* através da Equação 1. No caso, a Massa Total de Carotenoides (MC) é o valor da biomassa pela multiplicação do seu volume do meio utilizado dividido pela sua Fração de Carotenoides.

A MC obtida no ensaio foi calculada a partir da Equação 5. O valor da biomassa representado pela letra (b) é multiplicado pelo volume total ( $V_t$ ), no caso o volume do meio utilizado mais o inoculo da microalga de cada ensaio.

$$MC = b \times V_t \quad (5)$$

A expressão da Fração de Carotenoides (FC) foi encontrada em relação ao cálculo de Carotenoides Totais encontrados para cada amostra através da Equação 4 dividido pela sua biomassa obtida dos ensaios. A partir disso, se pode calcular a Equação 6. Foi realizado este cálculo relacionado à FC para verificar se a produção de biomassa tinha relação direta com a produção de carotenoides.

A FC foi calculada em termos da Equação 6. Sendo que [C] é a concentração de Carotenoides Totais (mg /mL) encontrada em cada ensaio e [B] representa a concentração de biomassa ( $g.mL^{-1}$ ) no mesmo ensaio.

$$FC = [C] / [B] \quad (6)$$

De acordo com as Equações 5 e 6 foram obtidos os valores de MC ( $\mu g$ ) e da FC ( $\mu g.g^{-1}$ ), os quais são apresentados na Tabela 4.

#### 4.5. MÉTODO DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES COM OS SOLVENTES DMSO E ÁGUA

O método de extração com DMSO (dimetil sulfóxido) foi realizado segundo a metodologia adaptada de Dantas *et al* (2015). A quantificação dos ensaios foi realizada em conjunto com a metodologia de extração dos carotenoides através do método do DMSO. Para a parte de quantificação dos ensaios foi seguido a metodologia de acordo com Brand-Willians *et al* (1995), utilizando a atividade antirradical que é definida como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração inicial de DPPH nas amostras em 50%. Foi realizada também a extração com outro solvente nas amostras, no caso a água.

A massa utilizada para extração com os solventes DMSO e água foi adaptada utilizando 3mg em vez de 1 g como fez Dantas *et al* (2015). Desta forma, a quantidade de solvente utilizada também foi alterada para proporções da massa pesada. A análise das amostras foi feita no espectrofotômetro UV da marca Biospectro no comprimento de onda de 515nm. As amostras foram previamente preparadas antes da extração das mesmas. As amostras dos 12 ensaios foram centrifugadas e depois colocadas para secar

a na estufa a 40°C. E depois foram maceradas para deixar as amostras mais biodisponíveis para a extração dos antioxidantes.

O ensaio consistiu na pesagem de 3mg de biomassa seca da *Chlorella vulgaris* em seguida foi colocada no eppendorf de 5 mL e foi adicionado 1mL de DMSO/ água nas amostras. Logo após foi realizada a extração das mesmas de forma simples através do ultrassom por 30 min de sonicação e depois foi deixado na câmara de agitação por 2 h. Em seguida foi realizada a centrifugação para a obtenção do líquido sobrenadante e adicionado em cada amostra um 1 mL da solução de DPPH mais metanol de 30 mg.mL<sup>-1</sup> para a quantificação dos mesmos.

Este método com DPPH é muito utilizado para indicar a atividade antioxidante em diversos tipos de amostras. Em seguida foi feito a leitura no espectrofotômetro UV das amostras no tempo zero (amostra controle- solução de DPPH com metanol) e após 20 min com as amostras extraídas e que foram adicionadas a solução de DPPH com metanol.

Antioxidantes primários, quando presentes em quantidades vestigiais, podem atrasar ou inibir a etapa de iniciação, reagindo com um radical lipídico ou inibindo a etapa de propagação por reagindo com radicais peroxila ou alcoila (JADHAV *et al*, 1996).Vários procedimentos químicos e físico-químicos são usados para monitorar processos de oxidação. Uma abordagem é examinar diretamente a produção de radicais livres e sua inibição por antioxidantes. Na abordagem mais comum, várias medições indiretas são usadas para avaliar a eficácia de um antioxidante na prevenção de danos oxidativos. Estes são baseados na medição do índice de inibição dos vários intermediários ou produtos finais da reação de oxidação (CANO *et al*, 1998).

O índice de inibição (IP) tem relação direta com a atividade antioxidante presente na amostra. Quanto maior é este índice isto quer dizer que sua amostra conseguiu inibir o processo de oxidação e há a presença de antioxidantes na mesma. A oxidação é inibida pela adição de um antioxidante e, portanto, uma redução na absorbância é observada (DU e BRAMLAGE, 1992). A atividade antioxidante pode ser calculada como percentagem de inibição de um ou mais dos produtos de oxidação secundários em relação a uma amostra de controle (FRANKEL *et al*, 1995).

O esquema da Figura 3 mostra as etapas do ensaio realizado para a extração e quantificação de antioxidantes com a microalga *Chlorella vulgaris* com método DMSO/água. Os valores obtidos foram utilizados para calcular o índice de inibição da

H<sub>2</sub>O (IP<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) e o índice de inibição do DMSO (IP<sub>DMSO</sub>) das amostras, segundo a Equação 7 (MOURE *et al.*, 2001).

$$IP = ((Absorbância_{t=0} - Absorbância_{t=20}) / Absorbância_{t=0}) \times 100 \quad (7)$$

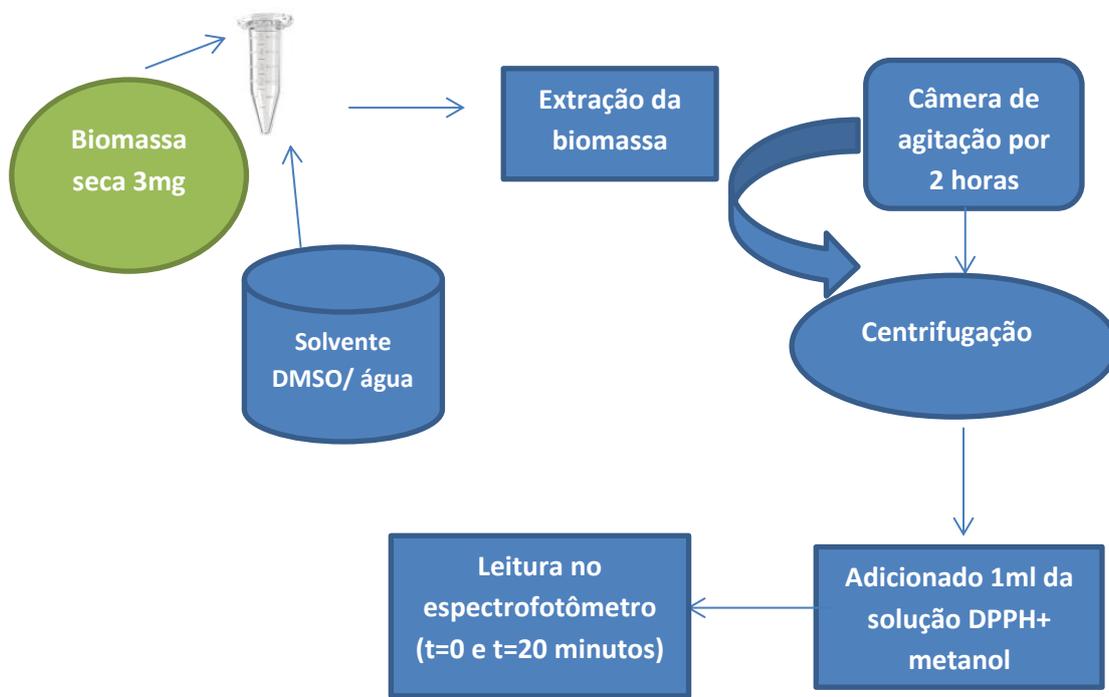


Figura 3 - Esquema das etapas do método de extração com os solventes DMSO e a água e quantificação das amostras

#### 4.6. ESTUDO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES

Com base nos resultados obtidos na seleção de microalgas com melhor potencial para a produção de antioxidantes, o meio selecionado foi avaliado quanto as variáveis que possivelmente influenciaram na produção dos antioxidantes. Desta forma, foi proposto um estudo das mesmas através de Delineamento Experimental. Foi realizado um Delineamento Fatorial 2<sup>3</sup> para a determinação das variáveis com influência estatística significativa e a determinação das faixas ótimas de produção dos antioxidantes pela cepa de microalga selecionada. A tabela 3 exemplifica matriz do Delineamento Fatorial utilizado na preparação dos meios de produção de antioxidantes da microalga selecionada.

Tabela 3-Matriz do Delineamento Fatorial  $2^3$  com 4 pontos centrais para os meios de produção de antioxidantes da *Chlorella vulgaris*.

| Ensaio | Luz ( $X_1$ ) | Ferro ( $X_2$ ) | Carbono ( $X_3$ ) |
|--------|---------------|-----------------|-------------------|
| 1      | -1            | -1              | -1                |
| 2      | +1            | -1              | -1                |
| 3      | -1            | +1              | -1                |
| 4      | +1            | +1              | -1                |
| 5      | -1            | -1              | +1                |
| 6      | +1            | -1              | +1                |
| 7      | -1            | +1              | +1                |
| 8      | +1            | +1              | +1                |
| 9      | 0             | 0               | 0                 |
| 10     | 0             | 0               | 0                 |
| 11     | 0             | 0               | 0                 |
| 12     | 0             | 0               | 0                 |

A Tabela 3 mostra os valores codificados da matriz do Delineamento fatorial estabelecido com bases nas concentrações utilizadas para as variáveis propostas. No caso o valor negativo representa a concentração de menor valor, o valor positivo indica a maior concentração da variável e o zero exemplifica o ponto central das amostras. A Tabela 4 mostra os valores reais de cada variável para correspondente com o valor codificado.

Tabela 4- Valores reais das variáveis do Delineamento fatorial  $2^3$  para os meios de produção de antioxidantes da *Chlorella vulgaris*.

| Valor codificado   | -1    | 0     | +1    |
|--|-------|-------|-------|
| Luz ( $\mu\text{mol.Fótons.}^2\text{s}^{-1}$ ) ( $X_1$ ) | 100   | 200   | 300   |
| Ferro (g/L) ( $X_2$ )                                    | 0,474 | 0,954 | 1,431 |
| Carbono (g/L) ( $X_3$ )                                  | 6,3   | 12,6  | 18,9  |

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. SELEÇÃO DA MICROALGA COM MELHOR POTENCIAL ANTIOXIDANTE

NaCl, ferro, ferro com NaCl e o com aumento de luminosidade para a seleção da microalga com melhor potencial para a produção de antioxidantes. Avaliando os resultados apresentados na Tabela 5, é possível constatar que a *Chlorella vulgaris* foi a que apresentou um maior potencial para a produção de compostos antioxidantes em relação à *Navicula sp.*

Com isso, a cepa selecionada foi utilizada para os estudos subsequentes. O melhor comportamento apresentado pela *Chlorella vulgaris* nos Meios 2 (Ferro) e Meio 3 (Meio WC com aumento de luminosidade), foi considerado para a determinação das variáveis do Delineamento Experimental. A Tabela 5 mostra também que a influência do meio contendo NaCl, Meio 1, foi pouco significativa na produção dos Carotenoides Totais, por isso o componente foi substituído pela variável carbono no estudo da produção de compostos antioxidantes.

Tabela 5-Valores de produção de Carotenoides Totais (mg /mL) obtidos para as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Navicula sp.*

| Microalga                 | Carotenoides Totais (mg /mL) |           |           |           |
|---------------------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                           | Meio 1                       | Meio2     | Meio 3    | Meio 4    |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 0,17±0,05                    | 0,74±0,19 | 0,87±0,25 | 0,08±0,02 |
| <i>Navicula sp.</i>       | 0,02±0,01                    | 0,19±0,19 | 0,59±0,16 | 0,04±0,02 |

### 5.2. ESTUDO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES por *Chlorella vulgaris*

Diante dos três diferentes meios utilizados para o processo de produção de antioxidantes, os Meios 2 e 3 apresentaram valores que foram considerados como melhores produtores de carotenoides em relação a suas variáveis estatisticamente significativas. Na Tabela 6 são apresentados os valores de MC, os quais compreendem valores de 3,5 a 120,92 µg. Os valores de FC existentes variaram de 0,58 a 37,17 µg.g<sup>-1</sup> na biomassa de *C. vulgaris* obtida. Já os valores de IP<sub>H2O</sub> e o IP<sub>DMSO</sub> variam de 15,69 a 60,22% e 13,75 a 24,06%, respectivamente.

Com isso, os valores encontrados nas amostras para o  $IP_{H_2O}$  foram maiores do que o  $IP_{DMSO}$ . Em comparação com os valores encontrados de IP (índice de inibição) para a extração dos compostos antioxidantes a água foi o solvente mais eficiente. Segundo Moure *et al* (2000), o valor de IP está diretamente relacionado com o poder antirradical (ARP) das amostras analisadas. Quanto maior este poder antirradical mais eficiente é o poder do antioxidante encontrado nas amostras. Segundo Dantas *et al* (2015), como solvente água apresentou um percentual de inibição do DPPH de 68,5% na microalga *Chlorella vulgaris*, este foi superior aos padrões utilizados para a Catequina (49,6%) e o ácido Gálico (28,7%), mostrando que a água é um potencial inibidor da oxidação celular de radicais livres.

Em comparação com o valor encontrado por este trabalho, se pode dizer que está dentro do esperado já que o valor foi de 60,22%. O valor encontrado ficou bem próximo do encontrado em Dantas *et al* (2015), como pode observar em relação ao mesmo. O resultado encontrado usando extrato aquoso se mostrou satisfatório, pois além de reduzir os custos de processamento, resulta em um produto sem os resíduos potencialmente tóxicos encontrados em outros solventes (DANTAS *et al*, 2015).

Tabela 6- Valores de carotenoides produzidos e a quantificação dos antioxidantes obtidos pela *Chlorella vulgaris*.

| Ensaio | MC<br>( $\mu\text{g}$ ) | FC<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | $IP_{DMSO}(\%)$ | $IP_{H_2O}$<br>(%) |
|--------|-------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|
| 1      | *                       | *                         | 19,49           | 60,22              |
| 2      | 120,92                  | 21,99                     | 16,08           | 18,54              |
| 3      | 55,75                   | 37,17                     | 24,96           | 15,69              |
| 4      | 78,00                   | 17,33                     | 14,06           | 18,54              |
| 5      | 4,07                    | 1,63                      | 21,71           | 29,91              |
| 6      | 6,12                    | 3,06                      | 20,56           | 29,36              |
| 7      | 16,75                   | 3,53                      | 21,39           | 29,59              |
| 8      | *                       | *                         | 15,69           | 29,56              |
| 9      | 3,50                    | 0,58                      | 17,04           | 35,06              |
| 10     | 17,25                   | 2,09                      | 17,55           | 27,42              |
| 11     | 29,35                   | 6,18                      | 23,02           | 28,29              |
| 12     | 16,25                   | 2,50                      | 13,75           | 32,80              |

\*valores não detectados

Com relação à Tabela 6, o menor valor de MC de 3.5  $\mu\text{g}$  encontrado foi no ensaio 9, um dos pontos centrais do Delineamento Fatorial mostrado. Já para o maior

valor MC de 120,92  $\mu\text{g}$  encontrado no caso no ensaio 2 ocorreu para os valores mínimos das variáveis ferro e carbono e o valor máximo para variável luminosidade. O segundo maior valor de MC encontrado foi no ensaio 4 quando as variáveis luminosidade e ferro tiveram os valores máximos e a variável carbono teve o valor mínimo do Delineamento Experimental da Tabela 3. O terceiro maior valor de MC encontrado foi no ensaio 3 nas condições em que as variáveis luminosidade e carbono foram os valores mínimos e o ferro teve o valor máximo encontrado.

Em relação à FC, o menor valor encontrado na Tabela 6 foi ao ensaio 9 de 0,58  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  que corresponde as mesmas condições do ensaio da MC. Já o maior valor de FC encontrado foi no ensaio 3 de 37,17  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  quando luminosidade e carbono foram valores mínimos e a variável ferro foi o valor máximo do Delineamento. O segundo maior valor de FC encontrado correspondente ao ensaio 2 para os valores mínimos das variáveis ferro e carbono e o valor máximo para variável luminosidade. Foi realizado um Delineamento para as variáveis respostas mais significativas que foram o  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  e para a MC.

Os valores não detectados da Tabela 6 que foi no ensaio 1 se pode perceber que não houve valor significativo possivelmente porque a variável luminosidade foi o menor valor do Delineamento. Já nos ensaios 2 e 4 em que os valores que deram altos o valor de MC foram quando o valor da variável luminosidade foi o maior valor do Delineamento.

No ensaio 8, também não houve detecção do valor possivelmente porque uma das variáveis que contribui, no caso a variável carbono de forma estaticamente significativa para a produção de MC o valor do Delineamento teve o maior valor do Delineamento. Isto é explicado na Tabela 3 quando a variável carbono obteve os melhores valores de MC encontrada foi quando o seu valor do foi o menor do Delineamento exemplificado nos ensaios 2, 3, 4 da Tabela 6.

#### 5.2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA VARIÁVEL RESPOSTA $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$

Em relação ao Software *Statistica*® uma das melhores respostas foi considerando os valores de  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$ . Por essa razão, o  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  foi escolhido para a análise dos efeitos no Delineamento Experimental na Figura 4. Segundo os dados de Dantas *et al* (2015), os extratos de água demonstram as propriedades antioxidantes mais altas. Isso pode ocorrer porque as moléculas que possuem propriedades antioxidantes nesses extratos

apresentam um caráter hidrofílico. O sistema de teste de eliminação de radicais livres DPPH é um mecanismo reconhecido pelo qual os antioxidantes atuam para inibir os produtos de oxidação. Assim, o ensaio de DPPH tem sido amplamente aplicado como um dos indicadores da atividade antioxidante (DANTAS *et al*, 2015).

A Figura 4 mostra o gráfico de Pareto com as interações em relação às variáveis utilizadas no Delineamento fatorial e sua significância. Pode-se perceber que todas as variáveis e as interações entre elas tiveram um nível de significância de 95% exceto o variável independente carbono. A variável luminosidade ( $X_1$ ) quando em excesso possui um valor negativo em relação à variável resposta do  $IP_{H_2O}$  para o gráfico de Pareto. Como ocorrem nos ensaios 2 e 4 em que o valor do  $IP_{H_2O}$  encontrado correspondeu o mesmo valor para ambos os ensaios que foi de 18,54%. Este valor foi um dos menores do Delineamento Fatorial Fracionário isto ocorreu quando a luz teve o maior valor.

Isto é explicado de acordo com Danesi *et al* (2004), a alta intensidade de luminosidade favorece os parâmetros de crescimento de biomassa, entretanto baixa luminosidade pode favorecer a obtenção de biomassa rica em clorofila. A microalga *Haematococcus pluvialis* foi estimulada para a produção de carotenoides em uma intensidade de luz relativamente alta até 4 dias de cultura sob iluminação contínua, contudo o teor de carotenoides diminuiu no período de cultivo sob a mais alta intensidade luminosa (Kobayashi *et al*, 1992).

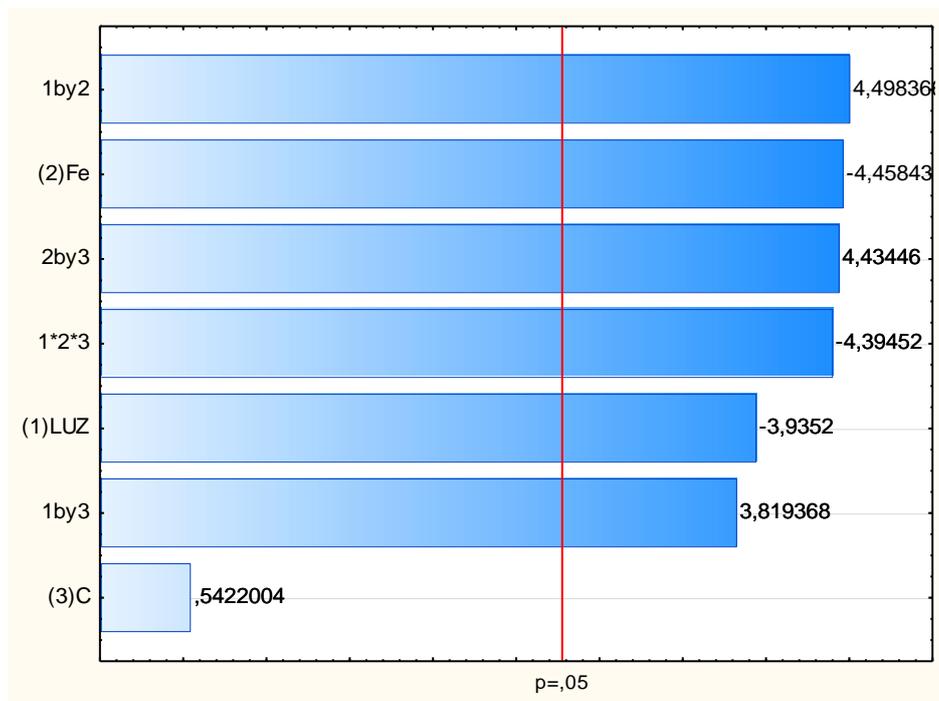


Figura 4 - Gráfico de Pareto do  $IP_{H_2O}$  demonstrando a representatividade estatística das interações das variáveis utilizadas no Delineamento Fatorial  $2^3$

De acordo com o gráfico de Pareto na Figura 4 a variável ferro apresentou um comportamento parecido com a variável luminosidade em relação ao efeito da interação da variável com o  $IP_{H_2O}$ . Este comportamento fica mais evidente nos ensaio 4 quando as variáveis luminosidade e ferro tiveram os valores máximos no Delineamento e a variável carbono teve valor mínimo o valor do  $IP_{H_2O}$  foi o segundo menor valor no caso 18,54%. Em relação à interação de luminosidade e ferro foi positiva quando tem o excesso de ambas variáveis isso fica evidente no ensaio 8 que o valor foi de 29,56%.

O comportamento parecido da variável luminosidade e ferro é importante, pois exemplifica uma tendência em relação a possível combinação de variáveis significativas a serem usadas para a produção de antioxidantes. O variável carbono quando sozinha foi à única que não apresentou significância estatística. Já a interação da variável luminosidade e carbono apresentou um valor de significância positiva como pode ser notado no ensaio 6 e 8 exemplificados com os valores de  $IP_{H_2O}$  29,36% e 29,56% respectivamente. Em relação à interação de  $X_2$  e  $X_3$  também apresentaram significância para os maiores valores do Delineamento realizado, no caso os ensaios 7 e 8 mostra isto em relação ao  $IP_{H_2O}$ . Os valores encontrados em relação à interação ferro e carbono foram 29,59% e 29,56% respectivamente.

O gráfico de Pareto na Figura 4 ainda mostra a interação das três variáveis juntas mostrando que elas possuem valor significativo quando elas apresentavam o menor valor real do Delineamento Experimental. Este comportamento pode ser observado no ensaio 1 com relação ao valor de  $IP_{H_2O}$  que foi o maior valor encontrado nos ensaios no caso 60,22%.

O modelo dos coeficientes de regressão foi feito com os valores das variáveis significativas em relação ao  $IP_{H_2O}$  que se encontra na Tabela 7. A partir desses coeficientes se podem calcular o F calculado e assim foi feita a comparação do F tabelado em relação a p-valor encontrado dos mesmos e foi avaliado o quanto os valores são significativos.

Tabela 7- Coeficientes de regressão para a variável resposta do  $IP_{H_2O}$ .

| Fator<br>Variável/interação | Coefficiente<br>de regressão | Std. Erro | t (4)    | p-valor  | -95,0%<br>Limite<br>de conf. | 95,0%<br>Limite<br>de conf. |
|-----------------------------|------------------------------|-----------|----------|----------|------------------------------|-----------------------------|
| Média                       | 29,58167                     | 1,02213   | 28,94132 | 0,00008  | 26,74379                     | 32,41954                    |
| Luz ( $X_1$ )               | -4,92625                     | 1,25184   | -3,93520 | 0,017028 | -8,40192                     | -1,45058                    |
| Ferro ( $X_2$ )             | -5,58125                     | 1,25184   | -4,45843 | 0,011174 | -9,05692                     | -2,10558                    |
| $X_1$ com $X_2$             | 5,63125                      | 1,25184   | 4,49837  | 0,010836 | 2,15558                      | 9,10692                     |
| $X_1$ com $X_3$             | 4,78125                      | 1,25184   | 3,81937  | 0,018788 | 1,30558                      | 8,25692                     |
| $X_2$ com $X_3$             | 5,55125                      | 1,25184   | 4,43446  | 0,011383 | 2,07558                      | 9,02692                     |
| $X_1 X_2 X_3$               | -5,50125                     | 1,25184   | -4,39452 | 0,011741 | -8,97692                     | -2,02558                    |

Para o estudo das variáveis que mais influenciaram no processo de produção de antioxidantes foi realizado uma análise através da ANOVA considerando os parâmetros significativos para as respostas do  $IP_{H_2O}$ , conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8- ANOVA da resposta do  $IP_{H_2O}$  a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes.

| Fonte de variação | Soma<br>dos quadrados | Graus de<br>Liberdade | Quadrado<br>Médio | F calculado | p-valor |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------|---------|
| Regressão         | 1372,24               | 6                     | 228,70            |             |         |
| Resíduos          | 50,15                 | 5                     | 10,03             | 136,81      | 0,0008  |
| Total             | 1422,39               | 11                    | -                 |             |         |

% Variação explicada ( $R^2$ ) = 96,74 F tabelado 0,05,6;5= 4,95

Com base no modelo feito na Equação 9 em relação aos coeficientes de regressão obtidos, indicam as variáveis que afetaram a resposta  $IP_{H_2O}$  foram as variáveis luminosidade, ferro e as interações das três variáveis entre si. Isto pode ser confirmado com os gráficos de Pareto na Figura 4, e a superfície de resposta na Figura 5 e a curva de contorno em relação ao  $IP_{H_2O}$  na Figura 6. Como também se pode observar na Tabela 8 o valor do F calculado  $>$  F tabelado isto indica que o F calculado é altamente significativo ( $p < 0,0008$ ) ao nível de confiança de 95%.

Os valores da variável luminosidade, ferro e carbono usados no cálculo referem-se aos valores codificados do Delineamento Fatorial da Tabela 3 para cada uma das combinações dos 12 ensaios do MC. O cálculo dos valores preditos do  $IP_{H_2O}$  também foram realizados com base nos coeficientes de regressão da ANOVA das variáveis mais significativas ao nível de confiança de 95% com mesmo Software a partir da Equação 8.

$$29,5817 - 4,9262 X_1 - 5,5812 X_2 + 5,6312 X_1 X_2 + 4,7812 X_1 X_3 + 5,5512 X_2 X_3 - 5,5012 X_1 X_2 X_3 \quad (8)$$

Já em relação os valores para o MC e para o  $IP_{H_2O}$  do cálculo do erro relativo foram obtidos de acordo com a Equação 9.

$$X = ((\text{valor predito} - \text{valor encontrado}) / \text{valor encontrado}) \times 100 \quad (9)$$

A tabela 9 se encontram os valores preditos do  $IP_{H_2O}$  e o cálculo do erro relativo. O modelo feito com os coeficientes de regressão das variáveis codificadas incluindo os parâmetros estatisticamente mais significativos em relação o  $IP_{H_2O}$  com  $p < 0,05$  estão na Equação 8. Os valores encontrados dos ensaios em comparação com os valores preditos são significativos, pois demonstram o quanto foram próximos os valores encontrados dos teóricos. Em relação aos valores do  $IP_{H_2O}$  encontrados a maioria deram maiores do que os valores preditos calculados pelos coeficientes de regressão. Isto exemplifica que os valores encontrados nos ensaios mostra uma boa concordância entre os valores preditos. O erro relativo nos ensaios não superou o valor de 8,48% para o  $IP_{H_2O}$ .

Tabela 9-Valores preditos do  $IP_{H_2O}$  calculados em função dos coeficientes de regressão e o erro relativo dos ensaios.

| Ensaio | Valor predito $IP_{H_2O}$ (%) | Erro relativo $IP_{H_2O}$ (%) |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1      | 61,55                         | 2,22                          |
| 2      | 19,87                         | 7,17                          |
| 3      | 17,02                         | 8,48                          |
| 4      | 19,87                         | 7,17                          |
| 5      | 29,89                         | 0,00                          |
| 6      | 29,34                         | 0,00                          |
| 7      | 29,57                         | 0,00                          |
| 8      | 29,54                         | 0,00                          |
| 9      | 29,58                         | 0,00                          |
| 10     | 29,58                         | 7,87                          |
| 11     | 29,58                         | 4,56                          |
| 12     | 29,58                         | 0,00                          |

A Figura 5 mostra a superfície de resposta estabelecida com a variável luminosidade e ferro em relação a variável resposta ( $IP_{H_2O}$ ). Ela também exemplifica que a interação de luminosidade e ferro teve uma significância dos valores em relação ao grau de confiança de 95%. Esta interação se pode observar que foi significativo tanto para o gráfico da superfície de resposta como o do gráfico de Pareto mostra isso de forma bastante evidente. A Figura 6 apresenta a curva de contorno com grau de significância de 95% de confiança em relação também a interação da variável luminosidade e ferro em relação ao  $IP_{H_2O}$ . Esta superfície exemplifica também as áreas mais significativamente favoráveis para a produção de antioxidantes, no caso as áreas onde as variáveis  $X_1$  e  $X_2$  apresentam menores valores do Delineamento Fatorial.

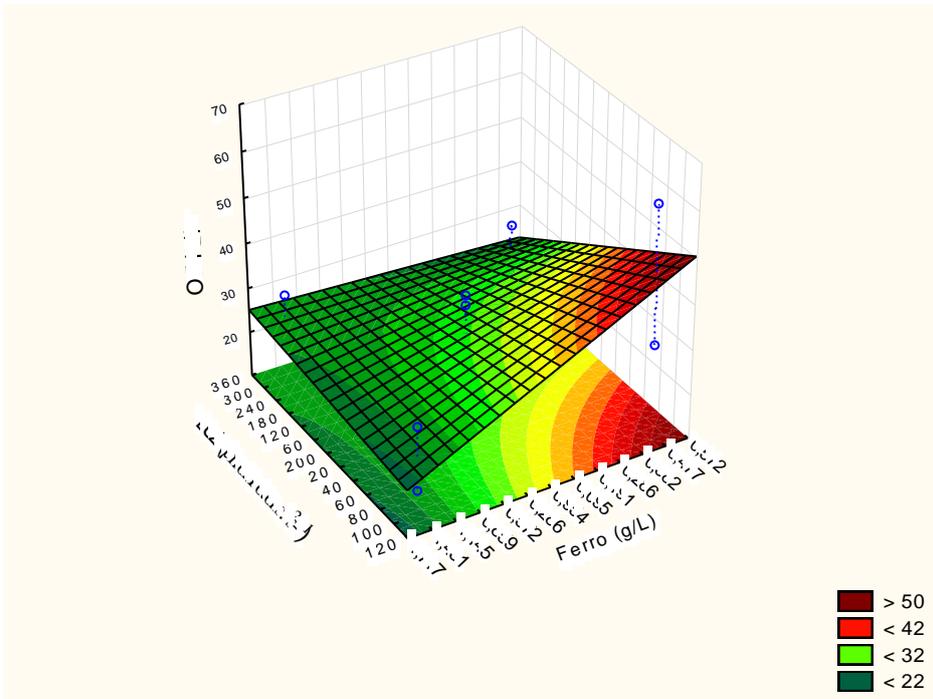


Figura 5 - Superfície de resposta da interação ferro e luminosidade em relação ao  $IP_{H_2O}$

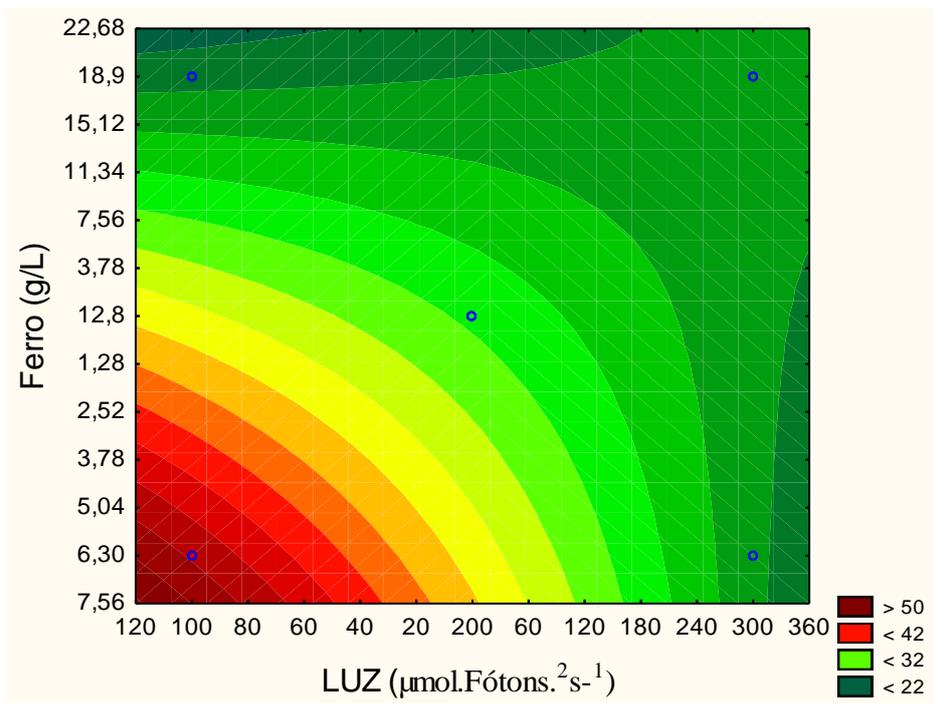


Figura 6 - Curvas de contorno em função da interação de ferro e luminosidade do  $IP_{H_2O}$

A interação de luminosidade e ferro teve uma significância dos valores em relação ao grau de confiança de 95%. Essa interação demonstra uma tendência de maior produção de compostos antioxidantes com a diminuição na concentração de ferro e a diminuição na intensidade da luz. Esta combinação de variáveis mostrou ser um fator

estatístico significativo a ser usada como meio de produção de antioxidantes na microalga *Chlorella vulgaris*. Com base nessas variáveis foi gerado os gráficos da superfície de resposta e curvas de contorno nas Figuras 5 e 6 respectivamente que evidenciam estas áreas mais significativas dentro dessa interação. As melhores condições de produção desses compostos em relação às faixas ótimas das variáveis significativas do Delineamento foram à luminosidade ( $X_1$ ) quando variou de 60 a 120  $\mu\text{mol. F\acute{o}tons. }^2\text{s}^{-1}$  e o ferro ( $X_2$ ) quando variou de 0,191 a 0,572 g/ L.

Com base no modelo dos coeficientes de regressão do  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  na Equação 8 se podem calcular os valores preditos dos ensaios e perceber que o F calculado  $>$   $F_{\text{tabelado}}$  indicando uma boa concordância entre os valores encontrados nas amostras e os valores teóricos. Além disso, demonstrou que os valores calculados foram bastante significativos para as amostras analisadas.

#### 5.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA VARIÁVEL RESPOSTA MC

Além da variável resposta  $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$  que foi bastante estatisticamente significativa para o estudo da produção de antioxidantes se podem destacar também a variável resposta MC. A variável dependente MC ela apresentou um efeito significativo na produção de Massa de Carotenoides principalmente quando os valores de concentração de Carbono ( $X_3$ ) foram os menores valores e quando luminosidade ( $X_1$ ) foram os máximos em relação o Delineamento Experimental.

Em relação ao comportamento aos efeitos das variáveis no Gráfico de Pareto da Figura 7 se podem dizer que a variável luminosidade ela apresentou um valor de significância positiva para os valores maiores do Delineamento como pode ser notado nos ensaios 2 e 4 com os dois maiores valores encontrados da MC de 120,92 $\mu\text{g}$  e 78 $\mu\text{g}$  respectivamente. O variável ferro quando sozinho foi a único que não apresentou significância estatística. O variável carbono apresentou efeito negativo indicando que ele é significativo para os valores menores do Delineamento Experimental isto pode ser observada nos 2, 3 e 4 com os valores três maiores valores da MC de 120,92  $\mu\text{g}$ , 55,75 $\mu\text{g}$  e 78 $\mu\text{g}$  respectivamente. A interação das variáveis luminosidade e carbono apresentou efeito significativo negativo para os menores valores como pode ser analisado no ensaio 3 com o valor de 55,75 $\mu\text{g}$ . Já a interação da variável luminosidade e ferro apresentou um valor de significância negativa como pode ser notado no ensaio 5 exemplificados com o valor da MC de 4,07  $\mu\text{g}$ . Em relação à interação de ferro e carbono não apresentou significância para os maiores valores do Delineamento

realizado em relação a MC. E a interação das três variáveis juntas também não foi estatisticamente significativa.

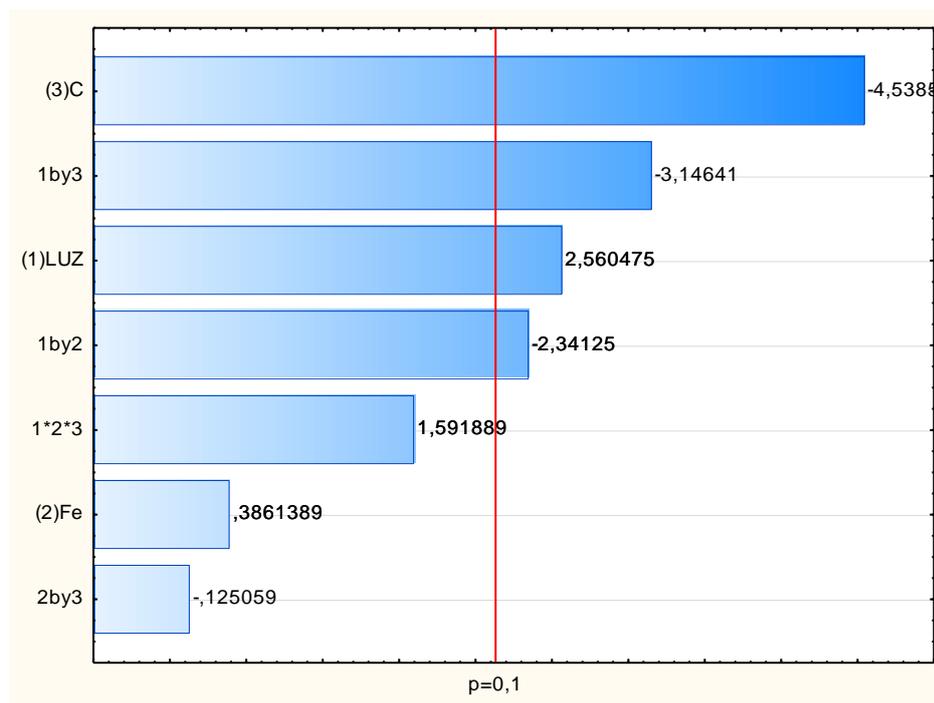


Figura 7 - Gráfico de Pareto da MC demonstrando a representatividade estatística das interações das variáveis utilizadas no Delineamento fatorial  $2^3$

Os coeficientes de regressão foram feito com relação aos valores das variáveis mais significativas em relação a MC se encontra na Tabela 10.

Tabela 10- Coeficientes de regressão para a variável resposta da MC.

| Fator             | Coefficiente | Std. Erro | t (4)    | p-valor | -95,0%<br>Limite<br>de conf. | 95,0%<br>Limite<br>de conf. |
|-------------------|--------------|-----------|----------|---------|------------------------------|-----------------------------|
| Média             | 28,9979      | 5,12109   | 5,66245  | 0,00479 | 18,0805                      | 39,9153                     |
| Luz ( $X_1$ )     | 16,0594      | 6,27203   | 2,56047  | 0,06260 | 2,68840                      | 29,4304                     |
| Carbono ( $X_3$ ) | -28,4656     | 6,27203   | -4,53850 | 0,01050 | -41,8366                     | -15,0946                    |
| $X_1$ com $X_2$   | -14,6844     | 6,27203   | -2,34125 | 0,07927 | -28,0554                     | -1,3134                     |
| $X_1$ com $X_3$   | -19,7344     | 6,27203   | -3,14641 | 0,03463 | -33,1054                     | -6,3634                     |

Em relação à Tabela 11 o modelo foi realizado em relação à Equação 10 com base nos valores dos coeficientes de regressão da Tabela 10 que mostram as variáveis

que afetaram a resposta MC que foram luminosidade, carbono e as interações de luminosidade com ferro e luminosidade com carbono. Exemplificando este comportamento estatístico significativo com o gráfico da superfície de resposta da MC na Figura 7 e a curva de contorno da mesma na Figura 8. E também se pode dizer que o  $F$  calculado  $>$   $F$  tabelado, pois o  $F$  calculado é muito significativo ( $p < 0,0047$ ) ao nível de confiança de 90%.

Tabela 11 - ANOVA da resposta da massa de carotenoides a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes.

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F calculado | p-valor |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------|---------|
| Regressão         | 14235,52           | 4                  | 3558,9         |             |         |
| Resíduos          | 1258,83            | 7                  | 179,83         | 79,16       | 0,0047  |
| Total             | 15494,35           | 11                 | -              |             |         |

% Variação explicada ( $R^2$ ) = 91,87       $F_{\text{tabelado}} 0,1,4;7 = 2,96$

O cálculo dos valores preditos da MC foi calculado com base no modelo da Equação 10 dos coeficientes de regressão da análise de variância (ANOVA) com as variáveis mais significativas ao nível de confiança de 90% Software *Statistica*® para a MC. Os valores das três variáveis usados no cálculo referem-se aos valores codificados do Delineamento Fatorial da Tabela 3 para cada uma das combinações dos 12 ensaios do MC. O cálculo dos valores do erro relativo entre os valores preditos e os encontrados se encontra na Equação 9. A tabela 12 apresentam os valores preditos da MC calculados em função do modelo dos coeficientes de regressão e o erro relativo dos ensaios.

$$28,9979 + 16,0594 X_1 - 28,4666 X_3 - 14,6844 X_1 X_2 - 19,7344 X_1 X_3 \quad (10)$$

Os valores da MC encontrados de alguns foram bem próximos do esperado e tiveram alguns que o valor encontrado ainda foi maior do que o valor predito superando o valor predito como o caso dos ensaios 2,3, 5 e 11. E o erro relativo da maioria foi menor 12,78%.

Tabela 12 - Valores preditos da MC calculados em função dos coeficientes de regressão e o erro relativo dos ensaios.

| Ensaio | Valor<br>predito<br>(MC) | Erro<br>relativo<br>MC (%) |
|--------|--------------------------|----------------------------|
| 1      | 6,98                     | *                          |
| 2      | 107,94                   | 0,00                       |
| 3      | 36,36                    | 0,00                       |
| 4      | 78,57                    | 0,73                       |
| 5      | 0,00                     | 0,00                       |
| 6      | 11,54                    | 88,40                      |
| 7      | 18,89                    | 12,78                      |
| 8      | 0,00                     | 0,00                       |
| 9      | 28,99                    | *                          |
| 10     | 28,99                    | 68,06                      |
| 11     | 28,99                    | 0,00                       |
| 12     | 28,99                    | 78,40                      |

\*valores não detectados

A variável dependente MC ela apresentou um efeito significativo na produção de Massa de Carotenoides. Esta superfície de resposta na Figura 7 exemplifica também as áreas mais significativamente favoráveis para a produção de Massa de Carotenoides. Quando os valores de concentração de carbono foram os menores valores e quando luminosidade foram os máximos valores em relação o Delineamento Experimental foi favorável à produção de MC. Essa tendência fica mostrada na sua superfície de resposta na Figura 7 e as curvas de contorno da MC na Figura 8 em relação às variáveis  $X_1$  e  $X_3$  que foram as mais significativas para a produção de MC. Os gráficos da superfície de resposta do MC e a curva de contorno da mesma tiveram um nível de significância dos valores em relação ao grau de confiança de 90%.

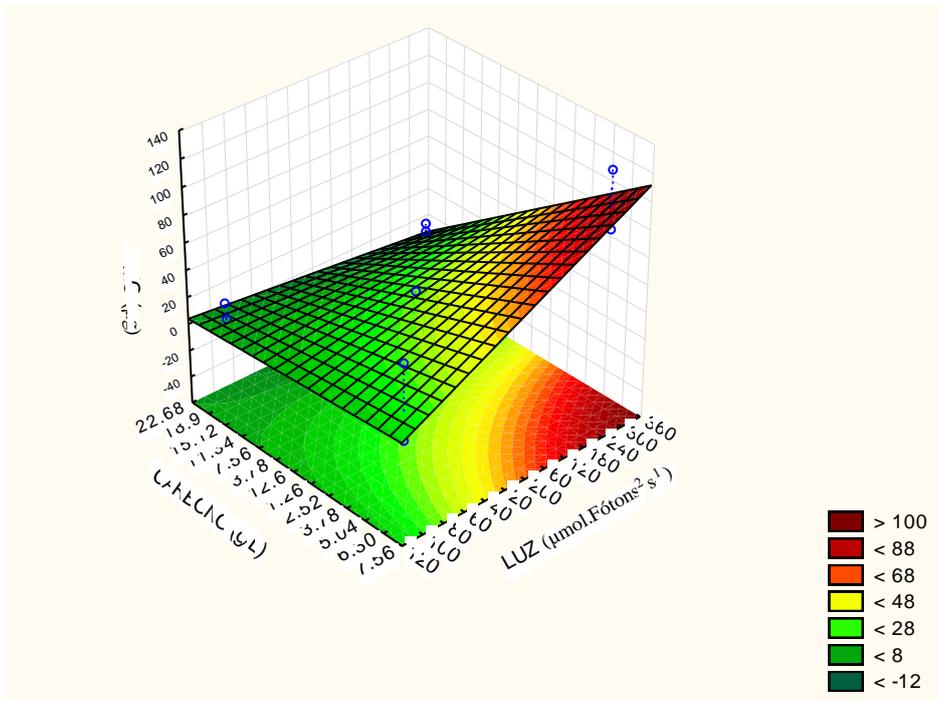


Figura 8 - Superfície de resposta da interação carbono e luminosidade em relação a Massa de Carotenoides

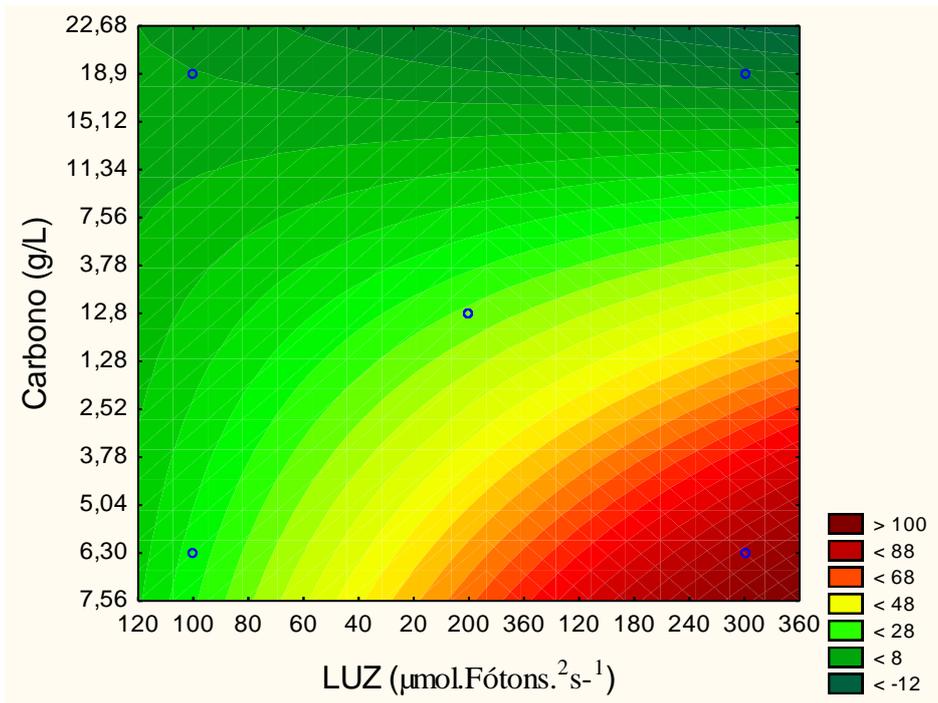


Figura 9 - Curvas de contorno em função da interação de carbono e luminosidade da Massa de Carotenoides

A interação de luminosidade e carbono teve uma significância dos valores em relação ao grau de confiança de 90%. Essa interação demonstra uma tendência de maior produção de Massa de carotenoides com a diminuição na concentração de carbono e a aumento na intensidade da luz. Esta combinação de variáveis mostrou ser um fator estatístico significativo a ser usada como meio de produção de Massa de Carotenoides na microalga *Chlorella vulgaris*. Com base nessas variáveis foram gerados os gráficos da superfície de resposta e curvas de contorno nas Figuras 8 e 9 respectivamente que evidenciam estas áreas mais significativas dentro dessa interação. As melhores condições de produção de Massa de Carotenoides (MC) em relação às faixas ótimas das variáveis significativas do Delineamento foram à luminosidade ( $X_1$ ) quando variou de 120 a 360  $\mu\text{mol. F\acute{o}tons.}^{-2}\text{s}^{-1}$  e o carbono ( $X_3$ ) quando variou de 2,52 a 7,56 g/ L.

Com base no modelo dos coeficientes de regressão da MC na Equação 8 se podem calcular os valores preditos dos ensaios e perceber que o F calculado > F tabelado indicando uma boa concordância entre os valores encontrados nas amostras e os valores teóricos. Além disso, demonstrou que os valores calculados foram significativos para as amostras analisadas.

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ A microalga *Chlorella vulgaris* foi capaz de produzir compostos antioxidantes;
- ✓ A partir dos melhores meios de produção, Meio 2 e Meio 3 foram obtidos carotenoides em relação a suas variáveis estatisticamente significativas;
- ✓ Os métodos de extração de determinação de pigmentos e a extração com solventes DMSO/água utilizados conseguiram extrair antioxidantes e carotenoides das amostras;
- ✓ A biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* produziu antioxidantes que foi possível à quantificação dos mesmos;
- ✓ A quantificação da atividade antioxidante se deu através do método de DPPH que utiliza o poder antirradical para verificar o índice de inibição das amostras;
- ✓ O solvente mais eficiente utilizado neste estudo foi à água, pois ela conseguiu quantificar uma melhor atividade antioxidante nos ensaios.

## 7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Poderia ser realizada a identificação dos possíveis carotenoides e antioxidantes encontrados nos ensaios com a biomassa da *Chlorella vulgaris*;
- ✓ Propor sugestões de aplicações práticas para a sociedade desses compostos após a identificação dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairywaste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 6166, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.055.
- AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, K.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P.M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters, **Food Chemistry**, v. 165, p. 300–306, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.107.
- ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Cultivo não fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, p.125-136, 2014. DOI: 10.5433/1679-0367.2014v35n2p125.
- AYAMA, E., B. PHILIPPE, C. SERGIE, P. SILVIA and M. PILAR. "Carotenoids in animal nutrition." **Fefana Publication. Fefana**, 2014. ISSN: 2442-9805.
- ARAUJO, G.S.; MATOS, L.J.B.L.; FERNANDES, J.O.; CARTAXO, S.J.M.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDES, F.A.N.; FARIAS, W.R.L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p. 95–98, 2013. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.027.
- ARAUJO, G.S.; MATOS, L.J.; GONCALVES, L.R.; FERNANDES, F.A.; FARIAS, W.R. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. **Bioresource Technology**. v.102, p. 5248 – 5250, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.01.089.
- ATTA, M., IDRIS, A., BUKHARI, A., WAHIDIN, S. Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v.148, p.373–378, 2013. DOI:10.1016/j.biortech.2013.08.162.
- BAJPAI, V.K. Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: **A mini review. Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v.45, p. 1076–1085, 2016. DOI: 6fd5/694fe6146f4b938421ccd5c0a7a80d0825fd.pdf.
- BARBA, F.J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Review**, v. 7, p.45–62, 2015. DOI: 10.1007/s12393-014-9095-6.

BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, M. N.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, p. 164-173, 2013. DOI: 10.1016/j.algal.2013.01.004.

BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. New York: Cambridge University Press, p.293, 1994. ISBN: 9780521061131.

BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol: Technologies and Innovations. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, p. 21, 2013. DOI: 10.1155/2013/719607.

BISHOP, W.M.; ZUBECK, H.M. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. **Journal Nutrition Food Science**, v. 2, p. 147–52, 2012. DOI: 10.4172/2155-9600.1000147.

BITTENCOURT, S. E.; NOVAK A.C.; DE CARVALHO, C.; SOCCOL, J. C.R. Respirometric balance and carbon fixation of industrially important algae. **Biofuels from algae**, p. 67–84, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-444-59558-4.00004-8.

BEETUL, K.; SADALLY, S.B.; TALEB-HOSSENKHAN, N.; BHAGOOI, R.; PUCHOOA, D. An investigation of biodiesel production from microalgae found in Mauritian waters. **Biofuel Research Journal**, v. 1 p. 58–64, 2014. DOI: 10.18331/BRJ2015.1.2.5.

BELUR, P.D. and PALLABHANVI, B. Investigation on production of gallic acid from Terminalia chebula extract using cell-associated tannase of *Bacillus massiliensi*. **In International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences** (ICABPS'2011), p. 222-225, 2011. DOI: 88.1201211587.pdf

BLACKBURN SI, VOLKMAN JK. Microalgae: a renewable source of bioproducts. In: TurgutDunford N, editor. **Food and industrial bioproducts and bioprocessing**, p 221–37, 2012. DOI: 10.1002/9781119946083.ch9.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethno pharmacological approach. **Journal Pharmacology Biomedical Anal**, v.87, p. 218-228, 2014. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.03.007.

CAKMAK, Y.S., KAYA, M., & ASAN-OZUSAGLAM, M. Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. **EXCLI Journal**, v.13, p. 679– 690, 2014. PMC4464408.

CANO, A.; HERNANDEZ-RUIZ, J.; GARCIA-CANOVAS, F.; ACOSTA, M.; and ARNAO, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in

plant material. *Phytochemical. 1 Anal.*, v. 9, p.196,1998. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(199807/08)9:4<196::aid-pcA395>3.0.co;2-w.

CAVALCANTI, V. F., LEAL, B. E. S.; PRADO, M. R.; SAKUMA, A. C.; PEGORARO, L.A.; RAMOS, L.P. Cultivo da Microalga *Chlorella Vulgaris* em Fotobiorreator de Placas Planas e Produção de Ésteres por Transesterificação In Situ. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**,v. 3, p. 244- 254, 2014. DOI: 38616-143399-1-PB.pdf.

CHEAH, W. Y.; SHOW, P.L.; CHANG, J-S; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. **Bioresource Technology**, v.184. p.190–201, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.026.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**,v. 167, p. 201–214, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.020.

CHRISTAKI, E., FLOROU-PANERI, P.; BONOS, E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. **International Journal Food Science Nutricion** v. 62, p.794-799, 2011.DOI: 10.3109/09637486.2011.582460.

COESEL, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. R., Henriques, N. M., Cancela, L., *et al.* Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. **Marine Biotechnology**, v. 10, 601–611, 2008. DOI: 10.1007/s10126-008-9100-2.

COLLET, P; ARNAUD, H.; LARDON, L. STEYER, J.P. Dynamic Life Cycle Assessment of biogas production from micro-algae.**Biouresource Technology**, v. 102, p. 207-214, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.154.

CUSTÓDIO L, SOARES F, PEREIRA H, BARREIRA L, VIZETTO-DUARTE C, RODRIGUES MJ, RAUTER AP, ALBERÍCIO F & VARELA J. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis sp.* and *Scenedesmus sp.*: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. **Journal of Applied Phycology**. v. 26, p. 151-156, 2014. DOI: 10.1007/s10811-013-0098-0.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P., I. AGUILAR-HERNANDEZ, D. L. CARDENAS-CHAVEZ, N. ORNELAS-SOTO, M. A. ROMERO-OGAWA AND R. PARRA-SALDIVAR. "Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins." **Microbial biotechnology**, v.8, p. 190-209,2015. DOI: 10.1111/1751-7915.12167.

DANESI, E.D.G.; DE CARVALHO, J. C. M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**,v. 26, p.329-335, 2004. DOI: 10.1016/S0961-9534(03)00127-2.

DANTAS, D. M.M., COSTA, R. M.P.B., DA CUNHA M. G. C., GALVEZ A. O., DRUMMOND A. R., BEZERRA R. S. Bio production, Antimicrobial and Antioxidant

Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Botanical Sciences**, v.4, p.12-18, 2015. ISSN: 2320-0189.

D'ALESSANDRO E. B; FILHO N. E. A Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832-841, 2016.DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.162.

D'ORAZIO, N. *et al.* Fucoxantina: a treasure from the sea. **Mar Drugs**, 10: 604-616, 2012. DOI: 10.3390/md10030604.

DU, Z. E BRAMLAGE, J. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, 1566, 1992. DOI: 10.1021/jf00021a018.

DUONG, V.T.; THOMAS-HALL, S.R.; SCHENK, P.M. Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and sea water locations in South East Queensland-Australia. **Frontied Plant Sci**, v. 6, p. 359, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00359.

ENZING, C., PLOEG, M., BARBOSA, M., & SIJTSMA, L. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. **JRC Scientific and Policy reports**, p. 1–82, 2014. DOI: 10.2791/3339.

EL MEKAWYA, A.; HEGAB, H.M.; VANBROEKHOVEN, K.; PANT, D. Technoproduktive potential of photosynthetic microbial fuel cells through different configurations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 39, p. 617–627, 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.07.116.

EI-SHEEKH, M.M.; GHAREIB, M.M. AND EL-SOUOD G.W.A. Biodegradation of Phenolic and Polycyclic Aromatic Compounds by Some Algae and Cyanobacteria. **Journal Bioremediation Biodegradation.**, v.3, p133, 2011. ISSN: 2155-6199.

FAO. Seaweeds used as human food in a guide to the seaweed industry. **FAO (Food and Agriculture Organization of the United States)**, 2012. Corporate Repository <http://www.FAO.org>. Accessed 11.07.2018.

FERNANDES, C. BARROS, S. GALHANO, V.; and GERALDES, A.M. Searching for Algaecide or Algae static Effects of Several Plant Extracts on Phytoplankton: Preliminary Results. **British Biotechnology Journal**, v.4: p.1077-1087, 2014.

FERNÁNDEZ, A. F. G.; FERNÁNDEZ S. J. M.; MOLINAG.E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.12, p. 131–15, 2013. ISSN: 2231-2927.

FORJÁN, E.; NAVARRO, F.; CUARESMA, M.; VAQUERO, I., DOMÍNGUEZ, R. M.C.; GOJKOVIC, Z. Microalgae: fast-growth sustainable green factories. **Crit Rev Environoly Science Technology**.v.45, p.1705–55, 2015.DOI: 10.1080/10643389.2014.966426.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application.

**Bioresource Technology**, v. 101, p. 4144-4150, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.023.

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L. e TEISSEDE, P.L. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p.890, 1995. DOI: 10.1021/jf00052a008.

GEE, D.M.; ARCHER, L.; PASKULIAKOVA, A.; GARY, R.; M. C.; FLEMING, G.T.A.; GILLESPIE, E.; TOUZET, N. Rapid chemotaxonomic profiling for the identification of high-value carotenoids in microalgae. **Journal Apply Phycology**, v.6 p.1-15, 2017. DOI: 10.1007/s10811-017-1247-7.

GHASEMI, Y., RASOUL-AMINI, S., MOROVVAT, M.H. Algae for the production of SCP. in: Liong, M.T. (Ed.), *Bioprocess Sciences and Technology*. **Nova Science Publishers Inc.**, p. 163-184, 2011. ISBN 978-1-61122-950-9.

GOUVEIA L. *Microalgae as a feedstock for biofuels*. **Springer Berlin Heidelberg Publisher**, Berlin, 2011. ISBN 978-3-642-17996-9.

GOUVEIA, L.; AIRES-BARROS, PALAVRA, A.M. F.; M.R.; OLIVEIRA, A. C.; NOBRE, B.P.; CAMPENNI, L. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. **Apply Microbiol Biotechnology**, V. 1, 1049-001, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4570-6.

GRAZIANI, G.; SCHIAVO, S.; NICOLAI, M.A.; BUONO, S.; FOGLIANO, V.; PINTO, G. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermoacidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. **Food Function**. V.4, p. 144-52, 2013. DOI: 10.1039/C2FO30198A.

GUCCIONE, A., BIONDI, N., SAMPIETRO, G., RODOLFI, L., BASSI, N., TREDICI, M. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology Biofuels**, v.7, p.84, 2014. DOI: 10.1186/1754-6834-7-84.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x.

HAN, D.; LI, Y.; HU, Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. **Review Algae**, v. 28, p. 131-147, 2013. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131.

HARNEDY, P.A., FITZGERALD, R.J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 375-382, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.09.023.

JACOB-LOPES, E.; SANTOS, A. M.; RODRIGUES, D. B.; LUI, M. C. Y.; SOUZA, C.; PRUDENTE, D.; ZEPKA, L. Q. Bioprocessos de conversão de efluentes híbridos, biorreator heterotrófico, bioprodutos e seus usos e biorreator heterotrófico. BR n. PI1020130204714 A2, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.08.034.

JAYARAMAN S, KNUTH ML, CANTWELL M AND SANTOS A. High performance liquid chromatographic analysis of phytoplankton pigments using a C<sub>16</sub>-Amide column. **Journal Chromatografy A**, v.1218, p. 3432-3438, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.03.058.

JADHAV,S.J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A.D. AND MADHAVI, D. L. **in Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives**, ed. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe, Marcel Dekker, New York, p. 5–64, 1996.

JIANG, Y. L.; ZHANG, W.; WANG, J. F.; CHEN, Y.; SHEN, S. H.; LIU, T. Z. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*, **Bioresource Technology**, v.128, p. 359–364, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.119.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.M.; MURTHY, G.S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: **a review. Energies**, v.6, p.4607–4638, 2013. DOI:10.3390/en6094607.

KADAM, S.U.; ÁLVAREZ, C.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P. Extraction and characterization of protein from irish brown seaweed ascophyl lumnodosum. **Food Res. International** v. 99, p. 1021-1027, 2016. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.07.018.

KADAM, S.U.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. **Journal Agric. Food Chemistry.**, v.61, 4667–4675, 2013. DOI: 10.1021/jf400819p.

KERIS-SEN, U.D.; SEN, U.; SOYDEMIR, G.; GUROL, M.D. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v.152, p.407–413, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.018.

KIM, S.W.; KOO, B.S. & LEE, D.H. A comparative study of bio-oils from pyrolysis of microalgae and oil seed waste in a fluidized bed. **Bioresource Technology**. v.162, p. 96-102, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.136.

KIM, S.H.; LIU, K.H.; LEE, S.Y.; HONG, S.J.; CHO, B.K.; LEE, H.; LEE, C.G. AND CHOI, H.K. Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. **PLoS ONE**, v. 8, p. e72415, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072415.

KOBAYASHI, M. KAKIZONO, T.; NISHIO, N. NAGAI,S.; KURIMURA,Y.; TSUJI, V. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.351-356, 1997. DOI:10.1007/s002530051061.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.867-87, 1993.PMC202201.

KOBAYASHI, M., T. KAKIZONO, N. NISHIO, AND S. NAGAI. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. **Journal Ferment. bioengineering**, v. 74, p.61-63, 1992. DOI: 10.1016/0922-338X(92)90271-U.

KONG, W.; LIU, N.; ZHANG, J.; YANG, Q.; H.U.A., S.; SONG, H.; XIA, C. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. **Journal Food Science Technology**, p.1–8, 2014. DOI: 10.1007/s13197-012-0706-z.

KOTRBÁČEK, V., M. SKŘIVAN, J. KOPECKÝ, O. PĚNKAVA, P. HUDEČKOVÁ, I. UHRÍKOVÁ; DOUBEK, J. Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic chlorella. **Czech Journal Animal Science**. v. 58, p.193-200, 2013. DOI: 10.17221/6747-CJAS.

KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v.33, p.125–129, 2015. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.02.007.

KRISTOFFERSEN, A.S., SVENSEN, Ø., SSEBIYONGA, N., ERGA, S.R., STAMNES, J.J., FRETTE, Ø. Chlorophyll a and NADPH fluorescence lifetimes in the microalgae *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) under normal and astaxanthin accumulating conditions. **ApplySpectrosc**, v. 66, p. 1216–1225, 2012. DOI: 10.1366/12-06634.

KRIMPEN, V.M.; BIKKER, P.; DER MEER, V.I.; DER SCHWERING, V.P.C.; VEREIJKEN, J. Cultivation, Processing and Nutritional Aspects for Pigs and Poultry of European Protein Sources as Alternatives for Imported Soybean Products; **Wageningen UR Livestock Research: Lelystad**, p. 48, 2013. ISSN 1570 – 8616.

JAYARAMAN S, KNUTH ML, CANTWELL M AND SANTOS A. High performance liquid chromatographic analysis of phytoplankton pigments using a C<sub>16</sub>-Amide column. **Journal ChromatogrA**, v.1218, p. 3432-3438, 2011. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.058.

LEE, C.; PAIK, K.; YOO, D. G.; KIM, J. H. Efficient method for optimal placing of water quality monitoring stations for an ungauged basin. **Journal of Environmental Management**, USA, v.132, pag. 24-31, 2014. DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.10.012.

LI, J., ZHU, D., NIU, J., SHEN, S. & WANG, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Advance**, v. 29, p.568-574, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.001.

LICHTENTHALER, H.K. AND WELLBURN, A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, p. 591-592, 1983. DOI: 10.1042/bst0110591.

LIU, J., CHEN, F. Biology and industrial applications of chlorella: advances and prospects. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Springer, Berlin Heidelberg, p. 1–35, 2014. DOI:10.1007/10\_2014\_286.

- LIU, J.; SUN, Z.; CHEN, F. Biofuels from algae. **Ed Elsevier**, v.6, p. 111-153, 2014.
- LIU, J., SUN, Z., GERKEN, H., HUANG, J., JIANG, Y., CHEN, F. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 98, p. 5069–5079, 2014a. DOI: 10.1007/s00253-014-5593-y.
- LIU, J., SUN, Z., GERKEN, H., LIU, Z., JIANG, Y., CHEN, F. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential. Review. **Marine Drugs**, v. 12, p. 3487–3515, 2014b. DOI: 10.3390/md12063487.
- LIU, J., SUN, Z., ZHONG, Y., HUANG, J., HU, Q., CHEN, F. Stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from the oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*: cloning, characterization and transcriptional analysis. **Planta**, v. 236, p. 1665–1676, 2012 a. DOI: 10.1007/s00425-012-1718-7.
- LIU, J., ZHONG, Y., SUN, Z., HUANG, J., SANDMANN, G., CHEN, F. 2010a. One amino acid substitution in phytoene desaturase makes *Chlorella zofingiensis* resistant to norflurazon and enhances the biosynthesis of astaxanthin. **Planta**, v. 232, p. 61–67, 2010a. DOI: 10.1007/s00425-010-1132-y.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** - Princípios e Aplicações. São Carlos: Editora RiMa, p. 606, 2006.
- MANIVANNAN, K., ANANTHARAMAN, P., BALASUBRAMANIAN, T. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella* marinha (Butcher, 1952). **Asian Pacific Journal Trop. Biomed.** v.2(1), p.342-346, 2012. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60185-3.
- MARKOU, G; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: are view with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advance** v. 8, p.1532- 1542, 2013. DOI:10.1016/j.biotechadv.2013. 07.011.
- MATOS, A.P.; MORIOKA, L.R.I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K.B. Protein and lipid contents from *Chlorella* sp. Cultivated in residual concentrated desalination. **Ciência Rural**, Santa Maria.45:364-370, 2015. DOI: 10.1590/0103-8478cr20121104.
- MEHADI, M., CHOWDHURY, H., KUBRA, K., HOSSAIN, M.B., MUSTAFA, M.G., JAINAB, T., KARIM, M.R. & MEHEDY, M.E. Screening of Antibacterial and Antifungal Activity of Freshwater and Marine Algae as a Prominent Natural Antibiotic. **Bangladesh International Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 828–833, 2015. DOI: =ijp.2015.828.833.
- MENETREZ, M.Y. .An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environmental Science Technology**, v. 46:7073–7085, 2012. DOI: abs/10.1021/es300917r.
- MICROALGAS: Alternativas promissoras para a indústria. **Embrapa agroenergia**. Brasília, v.10, 2016.

MILLEDGE, J.J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.10, p. 31-41, 2011. DOI: 10.1007/s11157-010-9214-7.

MINHAS, A. K; HODGSON, P; BARROW, C. J; ADHOLEYA, A. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. p. 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00546

MOAZAMI, N.; RANJBAR, R.; ASHORI, A.; TANGESTANI, M.; SHEYKHI N. A. **Biomass Bioenerg**, v. 35, p. 1935, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004. DOI: 10462423.pdf.

MORAES, J.; OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L.G.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALLEGRETTI, S.M. & PINTO, P.L.S. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease *Schistosomiasis Mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 8, p. 1-12, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002617.

MORAIS, M.G.; VAZ, B.S.; MORAIS, E.G. & COSTA, J.A.V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMedical Research International**, p.1-15, 2015. DOI: 10.1155/2015/835761.

MORALES-SANCHEZ, D.; OSCAR, A.; MARTINEZ-RODRIGUEZ; KYNDT, J.; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.31, p. 1-9, 2015. DOI: 10.1007/s11274-014-1773-2.

MOURE, A.; FRANCO, D., SINEIRO J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., LEMA, J.M. Evaluation of extracts from *Gevuinaavellana androsa rubiginosa* defatted seeds. **Food Research International**, v.34, p.2-3, p.103-109, 2001. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00136-8.

NAVARRO, F.; FORJÁN, E. ; VÁZQUEZ, M. ; MONTERO, Z.; BERMEJO, E.; CASTAÑO, M. A.; TOIMIL, A.; CHAGÜACEDA, E.; GARCÍA-SEVILLANO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; DOMÍNGUEZ, M.J.; PÁSARO, R.; GARBAYO, I.; VÍLCHEZ, C.; VEGA, J.M. **Food Nutrition Res**, v.60, 2016. DOI: 10.3402/fnr.v60.30472.

NGO, D.-H., WIJESEKARA, I.; VO, T.-S.; VAN TA, Q.; & KIM, S.-K. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. **Food Research International**, v.44, p. 523-529, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.030.

NUNES DA SILVA A.S.; GERALDES A. M.; AIRES A. & FERNANDES C. Crescimento de *Chlorella Vulgaris* (chlorophyta unicelular) na presença de compostos fenólicos. **Gaia Scientia**, v. 10, p.26-34, 2016. ISSN 1981-1268.

PARNIAKOV, O.; APICELLA, E.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; LBOVKA, N.; VOROBIEV, E. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-

- added value compounds from microalgae *Nannochloropsis spp.* **Bioresource technology**, v.198, p.262-267, 2015a. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.020.
- PRANDINI, J. M.; MEZZARI, P.M.; Da SILVA, M.L.B.; PIROLI, M. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus sp.* **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67-75, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.082.
- PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I.; ZACHLEDER, V.; BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 1359–1377, 2014. DOI: 10.1007/s10811-013-0154-9.
- QUEIROZ, M. I.; HORNES, M.; MANETTI, A. G. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems Engineering**, v. 115, p. 195-202, 2013. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2012.12.013
- RAMADAN, M. F. Rapid antiradical method for screening deep fried oils. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 5, p. 47-50, 2010. DOI: 10.1007/s00003-009-0509-y.
- RAMESH, D. Lipid identification and extraction techniques. Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products. **Boca Raton, Fla.: CRC Press**. p 89–97, 2013. ISBN: 978-1- 4665-1529-1.
- RAMIREZ, N.N.V., FARENZENA, M., TRIERWEILER, J.O. Growth of microalgae *Scenedesmus sp* in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v.57, p.630-635, 2014. DOI: 10.1590/S1516-8913201401791.
- RANI B., SINGH U. & MAHESHWARI R.K. Natural Antioxidants and their Intrinsic Worth for Wellbeing. **Global Journal of Medical research Pharma, Drug Discovery, Toxicology and Medicine**, v.13, p. 55–69, 2013. ISSN: 2249-4618.
- RANJITH, K. R.; HANUMANTHA, R. P.; ARUMUGAM, M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. **Frontier Energy Res**, v. 2, p.61, 2015. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00061/full.
- RATHA, S.K.; PRASANNA, R. Bioprospecting microalgae as potential sources of “green energy” - Challenges and perspectives (review). **Applied Biochemistry Microbiology**.v. 48, p.133 – 149, 2012. DOI: 10.1134/S000368381202010X.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**.v.92,p.235, 2005. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.004.
- RUIZ-DOMÍNGUEZ, M.C.; VAQUERO, I.; OBREGÓN, V. MORENA, B. DE LA, VÍLCHEZ, C. VEGA, J.M. Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa sp.* (strain onubensis) under nutrient starvation. **Journal of Applied Phycology**,v.27, p.1099-1108, 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0403-6.

- SAIFULLAH, A.Z.A.; ABDUL, K.MD; AHMAD-YAZID, A. Microalgae: an alternative source of renewable energy. **Am J Eng Res (AJER)**, v.3, p.330-338, 2014. ISSN: 2320-0847.
- SAFAFAR, H., WAGENEN, J.V., MØLLER, P., JACOBSEN, C. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Mar Drugs**, v.13, p.7339- 7356, 2015. DOI: 10.3390/md13127069.
- SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P-Y.; GARCIA, C.V. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.35, p.265-278, 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F.A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO%3B2-9.
- SANMUKH S., BRUNO B., RAMAKRISHNAN U., KHAIRNAR K., SWAMINATHAN S. AND PAUNIKAR W. Bioactive Compounds Derived from Microalgae Showing Antimicrobial Activities. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v.5, p. 1–4, 2014. ISSN: 2155-9546.
- SCOMA, A.; GIANNELLI, L.; FARALONI, C. & TORZILLO, G. Outdoor H<sub>2</sub> production in a 50-L tubular photobioreactor by means of a sulphur-deprived culture of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal.Biotechnology** v. 157, p. 620–627, 2012. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.040.
- SHAIKH, S.; AAQIL, H.; MOHD, S.; RIZVI, D., SHAKIL, S., ABUZENADAH, A.M.; GUPTA, P.; SAXENA, S.; TIWARI, R.K. & KUMAR, A. Comparative Inhibition Study of Compounds Identified in the Methanolic Extract of *Apamarga Kshara* Against *Trichomonas vaginalis* Carbamate Kinase (TvCK): An Enzoinformatics Approach. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**. p.1-9, 2015. DOI: 10.1007/s12539-015-0120-0.
- SHALABY, E.A.; SHANAB, S.M.M.; SINGH, V. Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. **Journal Med Plants Res**. V.4, p. 2622–2632, 2010. DOI: 10.5897/JMPR09.300.
- SHALABY, E. A.Algae as promising organisms for environment and health. **Plant Signaling and Behavior**, v.6p.1338–1350, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.9.16779
- SHA, LI.; SHU-KE, LI.; REN-YOU, GAN.; FENG-LIN, SONG.; LEI, KUANG.; HUA-BIN, LI. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. **Industrial Crops and Products**,v.51, p.289-298,2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.09.017.
- SHARMA, K.K.; SCHUHMANN, H.;SCHENK, P.M.High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies** v.5, p.1532–1553, 2012. DOI:10.3390/en5051532.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. p. 1102, 2010.

SOUZA, L.M.S., SANTOS, R.P.P.C., BISPO, D.F., FRANCO, C.R.P., SILVA C.F. Isolation, identification and selection of microalgae for wastewater treatment. In: XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2017, Aracaju. *Anais...* Aracaju, SE: **SINAFERM**, 2017. ISSN: 2447-2816.

SYDNEY, E.B.; STURM, W.; DE CARVALHO, C. J.; SOCCOL, T. V., LARROCHE, C.; PANDEY, A. Potential carbondioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892–5896, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.088.

SUN, Z.; ZHOU, Z.-G.; GERKEN, H.; CHEN, F.; LIU, J. Screening and characterization of oleaginous *Chlorella* strains and exploration of photoautotrophic *Chlorella* protothecoides for oil production. **Bioresource Technology** v.184, p.53–62, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.054.

STEPHENS E, ROSS IL, HANKAMER B. Expanding the microalgal industry—continuing controversy or compelling case. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 17, p.444-452, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.03.030.

TANG G.; SUTER P.M. Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. **Journal Pharmacology Nutrition Science**, v.1,p. 111-118, 2011. ISSN: 2223-3806.

TIBETTS S.M.; MILLEY, J.E.; LALL, S.P. Chemical composition and nutritional properties of fresh water and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal Applied Phycology**, v. 27, p.1109–1119, 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0428-x.

TORZILLO, G.; GOKSAN, T.; ISIK O.; GOKPINAR. S. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **European Journal of Phycology**, v.40, p.233-240, 2005. DOI: 10.1080/09670260500123609.

WAHIDIN, S., IDRIS, A., SHALEH, S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* **Bioresource Technology**.v.129, p. 7–11, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.032.

WANG, H.M.D.; CHEN, C.C.; HUYNH, P.; CHANG, J.S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 355–362, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.001.

WANG, J., HAN, D., SOMMERFELD, M. R., LU, C. & HU, Q. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v.25 p.253-260, 2013. DOI: 10.1007/s10811-012-9859-4.

WANG, B.; ZARKA, A.; TREBST, A.; BOUSSIBA, S. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) as active photoprotective process under high irradiance. **Journal of Phycology**, v.39, p.1116-1124, 2003. DOI: 10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x.

VAQUERO, I.; MOGEDAS, B.; RUIZ-DOMÍNGUEZ, M.C.; VEGA, J. M.; VÍLCHEZ, C. Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga. **Algal Research**, v. 6, p. 70–77, 2014. DOI: 10.1016/j.algal.2014.09.005.

VARSHNEY, P.; MIKULIC, P.; VONSHAK, A.; BEARDALL, J.; WANGIKAR, P.P. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. **Bioresource Technology**. v.184, p. 363–372, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.040.

VIEIRA, J. G.; MANETTI, A. G. S.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v.40, p. 1-3, 2012a. DOI: 10.1080/19443994.2012.671249.

YAAKOB, Z., ALI, E., ZAINAL, A., MOHAMAD, M., & TAKRIFF, M.S. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. **Journal of Biological Research (Thessalon)**, v. 21, p. 1–10, 2014. DOI: 10.1186/2241-5793-21-6.

YOSHIOKA, M., YAGO, T., YOSHIE-STARK, Y., ARAKAWA, H., MORINAGA, T. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, p.338–341, p.111–117, 2012. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.01.005.

ZAHROOJIAN, N., H. MORAVEJ; SHIVAZAD, M. Comparison of marine algae (*Spirulina platensis*) and synthetic pigment in enhancing egg yolk color of laying hens. **British Poultry Science**, v.52, p.584-588, 2011. DOI: 10.1080/00071668.2011.610779.

ZHANG X. Microalgae removal of CO<sub>2</sub> from flue gas. London: UK: **IEA Clean Coal Centre**. p 1–95, 2015. DOI: 10.1.1.696.2024&rep=rep1&type=pdf.

ZHU L. Bio refinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 41 p.1376–1384, 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2014.09.040.