



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
NÍVEL DOUTORADO

ROBERTA CONCEIÇÃO RIBEIRO VARANDAS

**CULTIVO DE MICROALGAS EM MEIOS ALTERNATIVOS:
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE À
INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

JOÃO PESSOA-PB

2022

ROBERTA CONCEIÇÃO RIBEIRO VARANDAS

**CULTIVO DE MICROALGAS EM MEIOS ALTERNATIVOS:
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE À
INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Marta Maria da Conceição

Co-orientador (a): Prof. Dr^a. Cristiane Francisca da Costa Sassi

JOÃO PESSOA-PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

V288c Varandas, Roberta Conceição Ribeiro.

Cultivo de microalgas em meios alternativos :
extração de compostos bioativos de interesse à
indústria de alimentos / Roberta Conceição Ribeiro
Varandas. - João Pessoa, 2022.

138 f.

Orientação: Marta Maria da Conceição.

Coorientação: Cristiane Francisca da Costa Sassi.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Microalgas. 2. Microrganismos fotossintetizantes.
3. Resíduos. 4. Bioativos. I. da Conceição, Marta
Maria. II. Sassi, Cristiane Francisca da Costa. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 582.26/.27(043)



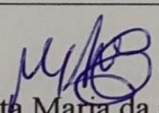
ATA DE DEFESA DE TESE

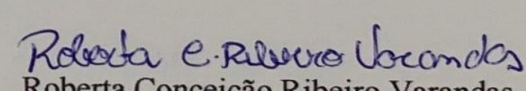
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

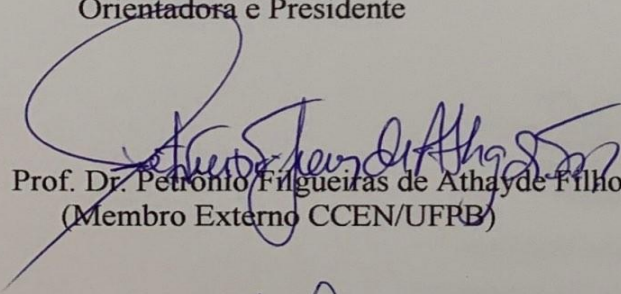
Aos dezesseis dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e dois, no LACOM/UFFB e Google Meet, às 09h00, reuniu-se a Banca Examinadora composta pela Profa. Dra. Marta Maria da Conceição, orientadora do trabalho e presidente da Banca, Prof. Dr. Rennan Pereira de Gusmão (Membro Externo/UFCG), Prof. Dr. Petronio Filgueiras de Athayde Filho (Membro Externo CCEN/UFFB), Profa. Dra. Marta Célia Dantas Silva (Membro Externa CEAR/UFFB) e Profa. Dra. Juliana Kessia Barbosa Soares (Membro Interna/UFFB). A reunião teve por objetivo julgar o trabalho da estudante **Roberta Conceição Ribeiro Varandas**, matrícula nº 20171016328, sob o Título **“Cultivo de microalgas em meios alternativos: extração de compostos bioativos de interesse à indústria de alimentos”**. Os trabalhos foram abertos pela Profa. Dra. Marta Maria da Conceição. A seguir foi dada a palavra a estudante para apresentação do trabalho. Cada Examinador(a) arguiu a doutoranda, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se o julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua APROVAÇÃO. Atendidas as exigências da Resolução nº 15/2019/CONSEPE que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela doutoranda.

João Pessoa, 16 de dezembro de 2022.

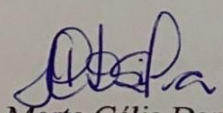
Se houver alteração no título do trabalho, informar o no título abaixo:


Prof. Dra. Marta Maria da Conceição
Orientadora e Presidente



Roberta Conceição Ribeiro Varandas



Prof. Dr. Petronio Filgueiras de Athayde Filho
(Membro Externo CCEN/UFFB)

Prof. Dr. Rennan Pereira de Gusmão
(Membro Externo/UFCG)


Prof. Dra. Marta Célia Dantas Silva
(Membro Externa CEAR/UFFB)

Prof. Dra. Juliana Kessia Barbosa Soares
(Membro Interna/UFFB)

Documento assinado digitalmente
 RENNAN PEREIRA DE GUSMAO
Data: 19/12/2022 08:25:59-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Documento assinado digitalmente
 JULIANA KESSIA BARBOSA SOARES MOREI
Data: 17/12/2022 08:31:19-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

"Não tenho nada que me prove a existência de Deus,
Mas mesmo assim ele continua sendo
O absoluto dos meus dias.
Nunca choveu maná no quintal de minha casa
E a imagem que tenho da Virgem Maria
Nunca derramou uma lágrima.
O que tenho aqui é esta mão machucada,
Este dedo sangrando,
Este nó na garganta,
Este humano desconsolo,
Esta dor,
Esta cor,
E este olhar desconcertante de Deus,
Deixando-me sem jeito,
Ao dizer que me ama."

Pe Fábio de Melo

Dedico esta tese a Jesus e a Nossa Senhora, pela presença constante, socorro presente na hora da angústia, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades. A Nossa Senhora por me apoiar em todos os momentos.

A minha mãe Rosângela Malta, a minha irmã Claudia Varandas e ao meu pai Claudio Varandas pelo carinho, paciência, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dra. Marta Maria da Conceição, por ter me orientado nesta etapa tão importante da minha vida, compartilhando seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Roberto Sassi e a Prof^a. Cristiane Sassi por conceder a utilização do laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIMN/UFPB), por ceder as cepas das microalgas e os reagentes e principalmente pela sua confiança, atenção, paciência.

A co-orientadora Dr^a Cristiane Sassi pelo seu apoio, cuidado e paciência.

Aos meus colegas do LARBIM/UFPB, Maria Helana, Nyelson, Patrícia, Viviane Tibúrcio, Evandro, Vilma, Luis, Jordana pela compreensão, apoio nos momentos mais difíceis e pela torcida.

A minha amiga Viviane Barros pela força e incentivo em todos os momentos.

A minha amiga e colega de laboratório Andressa bolsista de Iniciação Científica que participou diretamente deste trabalho e me apoiou em todos os momentos.

Ao CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos membros da banca examinadora por terem se disponibilizado a agregar valor ao meu trabalho, prestando participação na defesa deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso.

A todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Microalgas são microorganismos fotossintetizantes, de grande interesse para aplicações biotecnológicas e em especial na indústria de alimentos. Já que produzem compostos bioativos como proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos, polissacarídeos, dentre outros. O presente estudo teve como objetivo a extração de compostos bioativos de biomassa de microalgas, buscando a redução de custos do cultivo de microalgas através da utilização de resíduos agroindustriais como meios alternativos como também o cultivo em larga escala de uma microalga para assim aumentar a produção de compostos de interesse. Foram cultivadas 8 espécies de microalgas: *Xanthonema sp.*; *Ankistrodesmus falcatus*; *Actinastrum hantzschii*; *Monoraphidium arcuatun*; *Spirulina máxima*; *Spirulina platensis*; *Scenedesmus ecornis*; e *Kirchneriella concorta* em meios alternativos preparados a partir de: biocomposto de hortifruti (BH), resíduo de malte (RM), fécula de mandioca (FE) e uma mistura de biocomposto de hortifruti e resíduo de malte (MIX). E ainda resíduo de malte de cevada e/ou biocomposto de hortifruti substituindo em diferentes concentrações o meio sintético. Após a investigação inicial da relação meio alternativo mais adequado para cada microalga realizada com balões de 250 mL e observando o melhor crescimento através da curva de crescimento comparando com o meio sintético. Foi realizado o cultivo das microalgas com os meios pré-definidos em escala laboratorial para obtenção de biomassa com balões de 6L contendo 5L de meio em condições controladas para se obter biomassa para realização das análises. As 8 espécies estudadas demonstraram diferentes respostas de crescimento em cada um dos meios testados. As melhores respostas foram observadas para *Scenedesmus ecornis*, com maior resultado para o cultivo no meio alternativo com biocomposto de hortifruti na concentração de 1%. A *Scenedesmus ecornis* (D545BH), apresentou maior rendimento em biomassa (583 mg.L^{-1}) e maior produtividade ($41,6 \text{ mg.L}^{-1}$) dentre todas as espécies. O Teor mais significativo de proteínas foi observado para a *Spirulina platensis* cultivada em meio com resíduo de malte de cevada com $56,5 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. Os níveis mais altos de carboidratos foram encontrados na *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em meio MIX ($38,8 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$). As maiores concentrações lipídicas foram observadas nos cultivos de *Actinastrum hantzschii* (D467WC-BH) com $24 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e na *Monoraphidium arcuatun* (D459WC-RM) $25 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. Variações nas composições de ésteres foram observadas em todas as espécies quando cultivadas em diferentes meios, embora, em geral ocorreram maiores concentrações de ésteres polinsaturados e monoinsaturados. A espécie *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em meio mix foi a que obteve o maior teor de polissacarídeo (15%). Seguida da espécie *Scenedesmus ecornis* (D545WC), cultivada em meio BH obteve 13,1%. Os teores de ficocianina foram mais elevados independente do método de extração para *Spirulina platensis* e não houve diferença significativa entre o meio alternativo e controle. A *Scenedesmus ecornis* foi cultivada em fotobiorreator com 2.000L de capacidade com o meio de biocomposto de hortifruti e o cultivo se mostrou eficiente durante as diferentes fases de crescimento. Pois permitiu crescimento celular satisfatório durante as fases. Os maiores teores proteicos foram encontrados durante a fase estacionária. Diferente dos teores de carboidratos e lipídios que foram superiores na fase de declínio, quando também houve uma diminuição do teor de nitrato e fosfato da cultura. Durante a fase de declínio também houve uma maior produção de ácidos graxos mono e polinsaturados e também um maior acúmulo de polissacarídeo independente do tipo de extração. Ainda ocorreu, um maior acúmulo de EPS durante a mesma fase. Os resultados destas produções científicas indicam que as microalgas podem ser consideradas fontes de compostos com propriedades bioativas importantes que possuem potencial para serem utilizados pela indústria de alimentos. E ainda a *Scenedesmus ecornis* possui potencial para ser cultivada com biocomposto de hortifruti em larga escala e produzir compostos de interesse.

Palavras-chave: microrganismos fotossintetizantes; resíduos; bioativos.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms of great interest for biotechnological applications and especially in the food industry. Since they produce bioactive compounds such as proteins, carbohydrates, lipids, pigments, polysaccharides, among others. The present study aimed to extract bioactive compounds from microalgae biomass, seeking to reduce the costs of microalgae cultivation through the use of agro-industrial residues as alternative means as well as the large-scale cultivation of a microalgae to increase the production of compounds of interest. Eight species of microalgae were cultivated: *Xanthonema sp.*; *Ankistrodesmus falcatus*; *Actinastrum hantzschii*; *Monoraphidium arcuatun*; *Spirulina maximum*; *Spirulina platensis*; *Scenedesmus ecornis*; and *Kirchneriella concorta* in alternative media prepared from: hortifruti biocompost (BH), malt residue (RM), cassava starch (FE) and a mixture of hortifruti biocompost and malt residue (MIX). And still barley malt residue and/or hortifruti biocompost substituting in different concentrations the synthetic médium. After the initial investigation of the most suitable alternative medium ratio for each microalgae performed with 250 mL flasks and observing the best growth through the growth curve comparing with the synthetic medium. Microalgae culture was carried out with pre-defined media on a laboratory scale to obtain biomass with 6L flasks containing 5 L of medium under controlled conditions to obtain biomass for analysis. The 8 species studied showed different growth responses in each of the tested media. The best responses were observed for *Scenedesmus ecornis*, with greater results for cultivation in the alternative medium with vegetable biocomposite at a concentration of 1%. *Scenedesmus ecornis* (D545BH) showed the highest biomass yield (583 mg.L⁻¹) and highest productivity (41.6 mg.L⁻¹) among all species. The most significant protein content was observed for *Spirulina platensis* grown in a medium with barley malt residue with 56.5 g 100g⁻¹. The highest levels of carbohydrates were found in *Xanthonema sp.* (D464WC) grown in MIX medium (38.8 g 100g⁻¹). The highest lipid concentrations were observed in cultures of *Actinastrum hantzschii* (D467WC-BH) with 24 g 100g⁻¹ and in *Monoraphidium arcuatun* (D459WC-RM) 25 g 100g⁻¹. Variations in ester compositions were observed in all species when cultivated in different media, although, in general, there were higher concentrations of polyunsaturated and monounsaturated esters. The species *Xanthonema sp.* (D464WC) grown in mix medium had the highest polysaccharide content (15%). Followed by the species *Scenedesmus ecornis* (D545WC), cultivated in BH medium, obtained 13.1% Phycocyanin levels were higher regardless of the extraction method for *Spirulina platensis* and there was no significant difference between the alternative and control medium. A *Scenedesmus ecornis* was cultivated in a photobioreactor with a capacity of 2,000L with the vegetable biocomposite medium and the cultivation proved to be efficient during the different growth phases. It allowed satisfactory cell growth during the phases. The highest protein contents were found during the stationary phase. The highest protein contents were found during the stationary phase. Different from the levels of carbohydrates and lipids, which were higher in the decline phase, when there was also a decrease in the nitrate and phosphate levels of culture. During the decline phase, there was also a greater production of mono- and polyunsaturated fatty acids and a greater accumulation of polysaccharide regardless of the type of extraction. There was still a greater accumulation of EPS during the same phase. The results of these scientific productions indicate that microalgae can be sources of compounds with important bioactive properties that have the potential to be used by the food industry. And yet *Scenedesmus ecornis* has the potential to be cultivated with hortifruti biocompost on a large scale and produced of interest.

Keywords: photosynthetic microorganisms; residue; bioactive.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO E METODOLOGIA

Figura 1. Sistemas abertos para produção de microalgas.....	18
Figura 2. Fotobiorreatores para produção de biomassa de microalgas.....	19
Figura 3. Classificação de produtos proteicos à base de microalgas relacionado ao seu conteúdo proteico.....	24
Figura 4. Fluxograma	34
Figura 5. Cultivos de microalgas em balões de 250 mL	39
Figura 6. Cultivo de microalgas em balões de 6L	40
Figura 7. Cultivo de microalga em mariotes no LARBIM/UFPB.....	41
Figura 8. Cultivo de microalgas em fotobiorreator LARBIM/UFPB.....	42
Figura 9. Esteira de decantação para colheita de biomassa LARBIM/UFPB	43
Figura 10. Antes (A) e após (B) a centrifugação das amostras da <i>Spirulina platensis</i> e da <i>Spirulina máxima</i> para extração de ficocianina.....	48
Figura 11. Ficocinantina extraída após diálise	49

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1. Curvas de crescimento das espécies estudadas	69
Figura 2- Curvas de TG de biomassas de microalgas cultivadas em meios alternativos	79

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1. Curva de crescimento obtida do cultivo da microalga estudadas	92
Figura 2. Teor de nitrato e fosfato no cultivo da <i>Scenedesmus ecornis</i>	94
Figura 3. Perfil de ácidos graxos da <i>Scenedesmus ecornis</i>	97
Figura 4. % Ésteres metílicos de ácidos graxos encontrados	98

FIGURAS DO ARTIGO 3

Figura 1. Curvas de crescimento obtidas para os cultivos das microalgas.....	115
Figura 2. Perfil de ácidos graxos da <i>Spirulina platensis</i> e da <i>Spirulina máxima</i>	121
Figura 3. Composição química dos polissacarídeos.....	124
Figura 4. Teor de Exopolissacarídeos nas biomassas.....	125

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO REFERENCIAL TEÓRICO E METODOLOGIA

Tabela 1. Compostos e propriedades das Proteínas de espécies de microalgas	25
Tabela 2. Compostos de carboidratos de espécies de microalgas.....	26
Tabela 3. Análises de antioxidantes extraídos de espécies de microalgas.....	27
Tabela 4. Lipídios produzidos a partir de espécies de microalgas.....	28
Tabela 5. Pigmentos produzidos por espécies de microalgas	30
Tabela 6. Ingredientes adicionados de biomassa de diferentes espécies de microalgas	30
Tabela 7. Microalgas estudadas nesta pesquisa	35

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1. Espécies de microalgas selecionadas do banco de microalgas	65
Tabela 2. Parâmetros de rendimento, produtividade de biomassa das microalgas, K e duração da fase Log em microalgas cultivadas	70
Tabela 3. Composição química das microalgas estudadas	72
Tabela 4. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos de microalgas	74
Tabela 5. Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos extrações.....	76
Tabela 6. Temperaturas iniciais e finais de cada evento térmico e a respectiva perda de massa em amostras de microalgas	77
Tabela 7. Temperaturas iniciais e finais de cada evento térmico e a respectiva perda de massa em amostras de microalgas	80

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1. Parâmetros de crescimento e produtividade das biomassas.....	92
Tabela 2. Composição proximal no cultivo da <i>Scenedesmus ecornis</i>	95
Tabela 3. Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos de extrações	99
Tabela 4. Composição química dos polissacarídeos.....	100
Tabela 5. Perfil de monossacarídeos na fase de declínio do cultivo da <i>Scenedesmus ecornis</i> .100	
Tabela 6. Composição do EPS nas diferentes fases de crescimento	101

TABELAS DO ARTIGO 3

Tabela 1. Parâmetros de crescimento e produtividade das microalgas	115
Tabela 2. Clorofila a, b e total e Carotenóides na <i>Spirulina platensis</i> e na <i>Spirulina máxima</i>	116
Tabela 3. Rendimento das Ficobiliproteínas na <i>Spirulina platensis</i> e na <i>Spirulina máxima</i>	117
Tabela 4. Composição química da <i>Spirulina platensis</i> e da <i>Spirulina máxima</i>	119
Tabela 5. Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos extrações.....	123

LISTA DE QUADROS

QUADROS DO REFERENCIAL TEÓRICO E METODOLOGIA

Quadro 1. Composição do meio Zarrouk	36
Quadro 2. Composição do meio WC	37
Quadro 3. Composição do meio Erd-Schreiber Plymouth (THOMPCKINS, 1995).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Alofocianina
BH	Biocomposto de frutas e hortaliças
CPC	Concentração de ficocianina
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPS	Exopolissacarídeo
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Ficobiliproteína
PE	Ficoeritrina
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
RM	Resíduo de Malte
UE	União Européia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 MICROALGAS.....	17
2.2 SISTEMAS DE CULTIVO	18
2.3 MEIOS DE CULTIVO	19
2.4 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS.....	20
2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	22
2.5.1 Proteínas	23
2.5.2 Carboidratos	23
2.5.3 Antioxidantes	26
2.5.4 Lipídios	27
2.5.5 Pigmentos.	28
2.6 UTILIZAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS COMO INGREDIENTE EM PRODUTOS ALIMENTARES	30
3. METODOLOGIA.....	34
3.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS: COLETAS, ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS CULTIVOS	34
3.1.1 Seleção das espécies	35
3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS ALTERNATIVOS	36
3.2.1 Preparo dos meios de cultivo	36
3.2.2 Cultivo das microalgas nos meios sintético e alternativo	39
3.2.3 Produção de biomassa em escala laboratorial	40
3.2.4 Cultivo em fotobiorreator	41
3.3 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS DO FOTOBIORREATOR.	42
3.4 ANÁLISES QUÍMICAS DAS BIOMASSAS	43
3.4.1 Clorofila a, b, total e carotenoides.....	44
3.4.2 Proteínas	44
3.4.3 Carboidratos totais	44
3.4.4 Lipídios totais	44
3.4.5 Umidade e cinzas	45

3.4.6 Ácidos graxos	45
3.4.7 Extração de polissacarídeos	45
3.4.8 Extração de exopolissacarídeos.....	46
3.4.9 Perfil de monossacarídeos	47
3.4.10 Extração e purificação de ficocianina	47
3.5 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS	49
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
REFERÊNCIAS	50
4.RESULTADOS.....	62
4.1 ARTIGO 1- Microalgas cultivadas em resíduos agroindustriais: extração de compostos bioativos de interesse a indústria de alimentos.....	62
4.2 ARTIGO 2 - Cultivos de <i>Scenedesmus ecornis</i> em larga escala utilizando composto de frutas e hortaliças:extração de compostos bioativos.....	87
4.3 ARTIGO 3 - Utilização do residuo de malte da industria cervejeira como meio alternativo para o cultivo da <i>spirulina platensis</i> e <i>spirulina</i> máxima.....	110
4.4 PEDIDO DE PATENTE (PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS E/OU CIANOBACTÉRIAS UTILIZANDO RESIDUO DE MALTE DA INDUSTRIA CERVEJEIRA COMO MEIO ALTERNATIVO)	135

1 INTRODUÇÃO

À medida que a população cresce, a demanda por alimentos cada vez mais nutritivos e produtos relacionados à saúde humana, aumenta. Esta tendência está relacionada a evidências científicas que apoiam uma ligação entre dieta e saúde. Com o desenvolvimento de alimentos e ingredientes funcionais é evidenciado um novo momento tornando o alimento um promotor de saúde na medida em que auxilia na prevenção das doenças como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, obesidade e osteoporose, da longevidade e da qualidade de vida (MATOS *et al.*, 2017; RAMIREZ, 2015).

Portanto, os consumidores tendem a consumir produtos naturais produzidos a partir de recursos naturais considerados não tóxicos, e uma das alternativas são as microalgas. Já existem produtos emergentes baseados em microalgas, derivados de *Chlorella sp.* e *Spirulina sp.* no mercado de diferentes setores da indústria, como alimentos e bebidas, nutracêuticos farmacêuticos e ainda suplementos alimentares (YING *et al.*, 2020; POOJARY *et al.*, 2016).

A produção de biomassa de microalgas não requer terras aráveis, e ainda possuem alta produtividade de biomassa em curto período de tempo. Muitas espécies podem ser cultivadas em águas salinas, reduzindo o impacto sobre a utilização da água potável ou ainda podem ser cultivadas em águas residuais ricas em nutrientes (BEACHMAN *et al.*, 2017). A formulação de meios de cultivo baseados em resíduos diversos se mostra uma saída eficiente para diminuir os custos de produção de microalgas. Com a utilização de efluentes o custo com a formulação de meios de cultivo é mínimo, reduzindo assim o grande entrave do cultivo desses microrganismos (MIYAWAKI, 2014; CALIXTO *et al.*, 2016).

Desse modo, diversos estudos tem empregado substratos alternativos para elaboração de meios para o crescimento microalgal, como: água residual de processamento de mandioca (CARVALHO; BORGHETTI; CARTAS, 2018), esgoto doméstico (CALIXTO *et al.*, 2016), vinhaça (CHOIX *et al.*, 2018), águas residuais provenientes da indústria de processamento de alimentos (LI *et al.*, 2019), biocomposto de frutas e verduras (MEDEIROS *et al.*, 2020; CALIXTO *et al.*, 2016), água residual do soro de tofu (WANG *et al.*, 2018).

Assim, as características químicas das microalgas são fundamentais para a seleção das mais adequadas para aplicações específicas na tecnologia de alimentos (BATISTA *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2017). Sendo uma potencial fonte de uma vasta gama de compostos de alto valor biológico tais como ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos como clorofilas,

carotenóides e ficobiliproteínas, polissacáridos, proteínas, entre outros (FRANCES; ONATE, 2018; SINGH *et al.*, 2020).

A seleção de espécies de microalgas ainda pouco exploradas com perfis nutricionais equilibrados é fundamental para o desenvolvimento de novos alimentos. Uma caracterização físico-química detalhada das microalgas e de seus compostos bioativos é uma etapa essencial que permitirá determinar quais espécies serão mais adequadas para diferentes aplicações e finalidades. E ainda a utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo de microalgas contribuindo para uma tecnologia eficiente e sustentável.

Por esta razão, vale ressaltar a necessidade de mais estudos a respeito de compostos bioativos produzidos por microalgas e sua possível aplicação biotecnológica como fonte de ingredientes para produtos funcionais aumentando assim o interesse da indústria de alimentos por esses microrganismos. Nesse sentido, a presente pesquisa tem como objetivo a extração de compostos bioativos de biomassa de microalgas, buscando a redução de custos do cultivo em meios alternativos através de resíduos agroindustriais como também o cultivo em larga escala de uma microalga para assim aumentar a produção de compostos de interesse.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MICROALGAS

As microalgas são tipicamente organismos microscópicos autotróficos fotossintéticos unicelulares, encontrados naturalmente em água e ambiente marinho. Eles produzem compostos complexos, como lipídios, carboidratos e proteínas. A maioria das microalgas são microrganismos fotossintéticos sem os tipos distintos de células e órgãos que as plantas terrestres possuem. Eles usam o carbono do ar para a produção de energia (MOBIM; ALAM, 2017).

As microalgas podem ser classificadas de acordo com a sua cor: classe Chlorophyceae - algas verdes, classe Rhodophyceae - algas vermelhas, classe Cyanophyceae - algas azuis e classe Phaeophyceae - algas castanhas (BEGUN *et al.*, 2016). Sabe-se que existem entre 200 a 800 mil espécies de microalgas (PÓJO, 2016).

Em relação ao metabolismo as microalgas podem ser autotrófica, heterotrófica ou mixotrófica. A maioria é autotrófica e utiliza compostos inorgânicos (dióxido de carbono) como fonte de carbono. Estes microrganismos realizam fotossíntese, utilizam a energia solar como fonte de energia e o dióxido de carbono como fonte de carbono, formando a adenosina trifosfato (ATP) e oxigênio. As heterotróficas utilizam o carbono orgânico, sob a forma de glucose como fonte de energia. Já as mixotróficas, utilizam fontes de carbono orgânico ou inorgânico e também realizam a fotossíntese (GHASEMI *et al.*, 2012; ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014).

O uso da biomassa de microalgas como alimento é uma prática tradicional, especialmente na Ásia e na América do Norte. Por volta de 1950, as microalgas foram consideradas promissoras candidatas ao suprimento de proteínas nas cadeias alimentares humanas. Culturas comerciais de microalgas foram iniciadas no início de 1960 (*Chlorella sp.*), seguido pela *Arthrospira sp.* em 1970. Neste período, a proteína foi o principal produto direcionado à indústria, com aplicações ligadas aos alimentos. Já na década de 1980, a produção de pigmentos surgiu através do cultivo de *Dunaliella* e *Haematococcus* voltada para β -caroteno e astaxantina como aditivo alimentar e alimentação animal. No início dos anos 90, iniciou a produção de ácidos graxos poliinsaturados com foco no ácido docosahexaenóico (DHA) e no ácido eicosapentaenóico (EPA) para uso em rações para aquicultura e enriquecimento de produtos nutricionais. Instalações comerciais para a produção de microalgas estão em todo o mundo. Taiwan, Japão, EUA, China, Brasil, Espanha, Israel, Alemanha e Mianmar são os principais produtores da biomassa de microalgas e produtos derivados (RAMIREZ *et al.*, 2018).

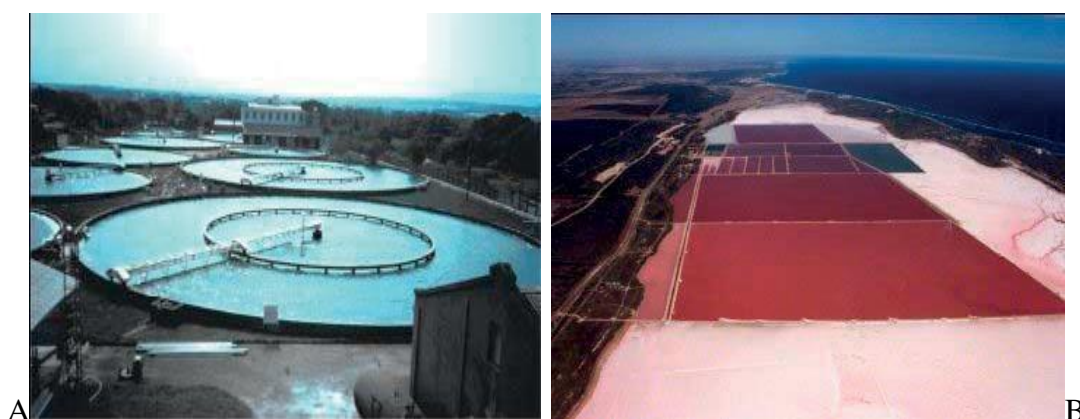
A composição bioquímica das microalgas pode ser manipulada modificando as condições de cultura e o estresse ambiental para induzir os microrganismos a produzir altas

concentrações de biocompostos de interesse. Além disso, as microalgas não exigem terras aráveis podendo ser cultivadas em regiões onde a mudança no uso da terra não é uma preocupação (VAZ *et al.*, 2016).

2.2 SISTEMAS DE CULTIVO

A produção de biomassa de microalgas geralmente ocorre em lagoas abertas ou fotobiorreatores fechados. Os sistemas abertos (Figura 1) (pistas e lagoas circulares) são mais baratos e fáceis de construir e operar; por isso são escolhidos principalmente para cultivo em larga escala. Porém, muitas vezes dependem das condições climáticas, têm um controle ruim dos parâmetros de cultura (temperatura, pH, dentre outros), e são propensos à contaminação com outros microrganismos (PINTO *et al.*, 2021).

Figura 1. Sistemas abertos para produção de biomassa de microalgas



A-lagoas CentrePivot para a cultura de *Chlorella* em Yaiwan; B-Lagoas de *Dunaliella salina* de Cognis, Austrália Ocidental. Fonte: Wageningen UR.

Os sistemas fechados, comumente chamado de fotobiorreatores (Figura 2) geralmente apresentam altos custos de implementação, operação e manutenção, porém podem ser otimizados para atingir maiores taxas de produção, já que através deste tipo de sistema, é possível ter um maior controle dos parâmetros de cultivo, além da redução do risco de contaminações (GROSS *et al.*, 2013). Ainda possuem menores perdas de água por evaporação, a maior facilidade para coleta de biomassa, pois se concentra em menores volumes de meio de cultura; a menor necessidade de espaço e ainda maior facilidade de aproveitar o meio de cultura (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Os diferentes formatos dos fotobiorreatores têm características próprias e são apropriados para diferentes locais de cultura, condições, espécies de microalgas, requisitos e

propósitos econômicos (TING et al., 2017). Esses formatos vão desde tanques abertos ou fechados, colunas de bolhas, airlift, tubular (vertical, horizontal, inclinado ou espiral), combinações de mais de um fotobiorreator ou até ligado a projetos arquitetônicos (AMARAL et al., 2018).

Figura 2. Fotobiorreatores para produção de biomassa de microalgas



A- Fotobiorreator em painel; B-Sistema tubular horizontal baseado em tubos plásticos flexíveis no sul da Espanha. Fonte: Wageningen UR.

2.3 MEIOS DE CULTIVO

Os meios para o cultivo de microalgas são constituídos por macronutrientes (carbono, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, nitrogênio, silicato, enxofre e potássio) e pelos micronutrientes (ferro, cobre, molibdênio, zinco, manganês). Os macronutrientes são essenciais já que constituem as estruturas das biomoléculas, de membranas e do meio intracelular. Os micronutrientes participam de atividade das enzimas, que participam das vias metabólicas e organelas celulares (LOURENÇO, 2006).

Quantidades de nitrogênio disponíveis na cultura alteram diretamente o crescimento celular. A limitação de nitrogênio na cultura de microalgas pode reduzir o crescimento e a produtividade de biomassa, embora aumentem a produção de carboidratos e lipídios (DALIRY et al., 2015).

A formulação de meios de cultivo baseados em resíduos diversos se mostra uma saída eficiente para diminuir os custos de produção de microalgas. Com a utilização de resíduos o custo com a formulação de meios de cultivo é mínimo, reduzindo assim, o grande entrave do cultivo desses microrganismos (ALI et al., 2021). Assim, surge a necessidade de se utilizar

meios alternativos como fertilizantes químicos, esgotos domésticos e resíduos de efluente agroindustriais que possuem potencial para serem reutilizados em cultivo de microalgas, onde alguns desses resíduos são ricos em matéria orgânica podendo ser usados como fonte de nutrientes (ORTENZO *et al.*, 2015) como o nitrogênio, fósforo, potássio, dentre outros (MONFET; UNC, 2017).

A eficiência das microalgas com a utilização de resíduos depende da composição do resíduo e o resultado pode variar devido à sua natureza espécie-dependente (ANDREOTTI *et al.*, 2017; APANDI *et al.*, 2018). Já que para o crescimento de microalgas precisa de carbono, nitrogênio e fósforo em uma proporção ideal. A Injeção de gases ricos em CO², a diluição de águas residuais e suplementação de nutrientes em resíduos deficientes são necessários para preparar um meio de cultura baseado em águas residuais com uma relação C/N/P (Carbono/Nitrogênio/Fósforo). No entanto, como a relação C/N/P de um efluente específico pode não ser facilmente ajustada, uma cepa de microalga específica pode ser aclimatada ao efluente (WANG;ZHANG *et al.*, 2022)

Diante disso, diversos estudos tem relatado a utilização de substratos alternativos para elaboração de meios para o crescimento microalgal, como: como estrume de frango cru (CALIXTO *et al.*, 2016), água residual de processamento de mandioca (CARVALHO; BORGHETTI; CARTAS, 2018), esgoto doméstico (KLIGERMAN; BOUWER, 2015; CALIXTO *et al.*, 2016), vinhaça (CHOIX *et al.*, 2018), resíduos de agricultura (AHMAD *et al.*, 2021) águas residuais provenientes da indústria de processamento de alimentos (LI *et al.*, 2019), biocomposto de frutas e hortaliças (MEDEIROS *et al.*, 2020; CALIXTO *et al.*, 2016).

Assim, a produção de biomassa de microalgas a partir de efluentes industriais oferece a possibilidade de reciclar resíduos industriais para criar novas fontes de matérias-primas para uso de energia e ainda produtos de alto valor agregado (WOLLMAN *et al.*, 2019; ALI *et al.*, 2021). Contribuindo para uma tecnologia eficiente e sustentável. Espera-se que o valor de mercado das commodities à base de microalgas se expanda em um futuro próximo e desenvolvimento contínuo dos processos relacionados ao cultivo de microalgas serão essenciais (ALI *et al.*, 2021).

2.4 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS

As microalgas são consideradas uma fonte promissora e viável de diversos produtos para aplicação nas indústrias nutracêutica, farmacêutica, cosmecêutica e química (SALAZAR *et al.*, 2019; RANDHIR *et al.*, 2020).

Podem ser usadas como ingredientes funcionais para aumentar o valor nutricional dos alimentos e, portanto, afetar favoravelmente a saúde humana, melhorando o bem-estar e a qualidade de vida, mas também reduzir os riscos de doenças (MATOS *et al.*, 2017). A aplicação desses microrganismos se estende ainda em formulações para rações por conter principalmente proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e antioxidantes. Assim, as microalgas possuem características para suplementação animal, podendo substituir componentes de origem animal ou atender as crescentes demandas de tais ingredientes (DINESHBABU *et al.*, 2019).

Plantas superiores como milho, batata e trigo são usadas para produção de biocombustível. No entanto, existem questões ambientais e econômicas relacionadas ao uso de terras férteis e plantas comestíveis para esses tipos de produções. As microalgas podem resolver essas questões éticas e sociais já que podem crescer em terras não agricultáveis (CAPRIO *et al.*, 2016). Devido às limitações dos biocombustíveis de segunda geração, as microalgas receberam uma grande atenção entre os pesquisadores nas últimas décadas para produção de bioenergia sustentável (ALLY *et al.*, 2017). Esses microrganismos podem ser incorporadas com a produção de outros bioprodutos como bioetanol através da digestão anaeróbica. Além disso, a biorrefinaria é uma possibilidade de melhorar o tratamento de águas residuais e gerar produtos com valor agregado a partir de fluxos de resíduos (JANKOWSKA *et al.*, 2017).

É amplamente reconhecido que os metabólitos de microalgas exibem uma ampla gama de atividades biológicas, como absorção de ultravioleta (UV), propriedades antioxidantes, antienvelhecimento, anti-manchas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (SARTORI *et al.*, 2021). Alguns produtos derivados de microalgas estão disponíveis no mercado de cosméticos, e a biotecnologia de microalgas está atraindo mais atenção. Rótulos usam extrato de *Nannochloropsis oculata* e *Dunaliella salina* em alguns de seus produtos, como PEPHA® -TIGHT CB ou PEPHA® -CTIVE CB, para fornecer efeitos de firmeza da pele e estimular a proliferação celular (YARKENT *et al.*, 2020). Ariede *et al.* (2017), propuseram que as microalgas *Nannochloropsis sp.*, *Chlorogloeopsis sp.*, *P. tricornutum*, *Chlamydocapsa sp.* e *Chlorococcum sp.* possuem propriedades cosmeceúticas, que previnem a foto-oxidação, hidratam a pele e os cabelos, podem funcionar como protetor solar, aumentam a estimulação de colágeno, clareiam a pele e a perda de cabelo e ainda podem reduzir a formação de rugas.

Esses microrganismos também podem ser utilizados na agricultura por sua capacidade de enriquecer os nutrientes do solo e melhorar a utilização de macro e micronutrientes. Além de melhorar a fertilidade e a qualidade do solo, as microalgas também podem favorecer crescimento de plantas, polissacarídeos, compostos antimicrobianos e outros metabólitos para promover o crescimento das plantas (ALAM *et al.*, 2020).

As águas residuais contêm grandes quantidades de Nitrogênio e Fósforo que podem ser utilizadas na produção em larga escala de biomassa de microalgas como meio alternativo podendo ser uma ferramenta eficaz como biorremediação natural e de baixo custo (KAMYAB *et al.*, 2019; ODJADJARE *et al.*, 2017).

Já os fitoesteróis são compostos com benefícios biológicos conhecidos, como redução do colesterol, atividade antiinflamatória e até propriedades anticâncer. O mercado global de fitoesteróis deve atingir US \$ 935 milhões até 2022. As fontes atuais de fitoesteróis advêm principalmente de fontes vegetais terrestres. No entanto, prevê-se que essas fontes não sejam capazes de atender ao aumento da demanda até 2030. Sabe-se que as microalgas possuem potencial de obter fitoesteróis ambientalmente sustentáveis. O conteúdo de esterol de microalgas variam dentre as espécies e há poucos estudos sobre como manipular a cultura e condições para melhorar a produção de esterol em microalgas (RANDHIR *et al.*, 2020).

Por estas razões, as microalgas representam um recurso importante para o desenvolvimento de abordagens sustentáveis e ambientalmente amigáveis à agricultura, além de formar a base das redes alimentares, existe uma necessidade definida de criar maior conscientização e facilitar pesquisas aprofundadas para diversificar e intensificar suas aplicações nos próximos anos (RENUKA *et al.*, 2018; VENKATESAN *et al.*, 2015).

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

O desenvolvimento de alimentos funcionais como objetivo para melhorar e manter a saúde representa um campo de pesquisa que vem sendo bastante explorado. Lípidos, proteínas, polissacarídeos, compostos fenólicos, carotenóides, entre outros bioprodutos obtidos a partir de microalgas podem ser usados como fonte de ingredientes para novos produtos funcionais (RAMIREZ-MÉRIDA *et al.*, 2015; VAZ *et al.*, 2016).

Os extratos e/ou compostos isolados obtidos a partir de microalgas e algas marinhas podem ser utilizados como: i) conservantes e pigmentos (corantes, antimicrobianos); ii) melhorar o perfil nutricional e de saúde dos alimentos (compostos bioativos antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas e aminoácidos essenciais, etc.); iii) melhorar as características tecnológicas dos produtos (emulsionantes, hidrocolóides, etc.). Além disso, o uso desses produtos também pode ter um grande interesse do ponto de vista farmacêutico (nutracêuticos), na biorefinaria, para o desenvolvimento de novos sistemas de embalagens plásticas biodegradáveis, etc (BARBA *et al.*, 2015).

2.5.1 Proteínas

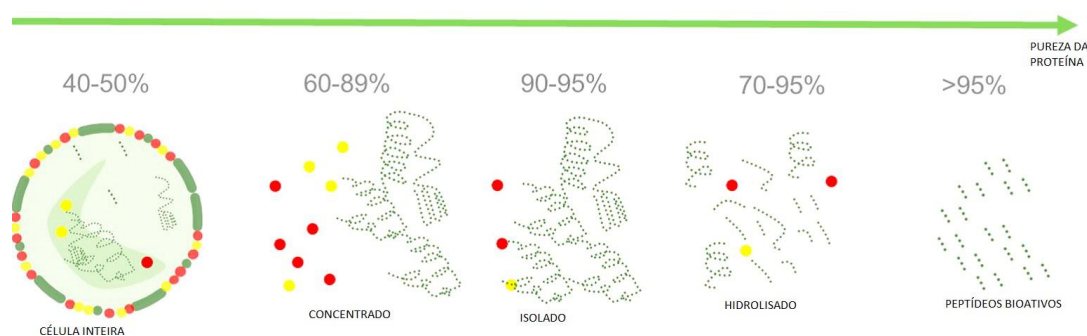
A população mundial está em constante crescimento, o que significa aumento da demanda por proteínas. Até 2050, a população mundial deverá ser 9,7 bilhões de pessoas, 30% a mais do que o cenário atual, que já é o dobro do número de pessoas que o planeta consegue suprir de forma sustentável (NADATHUR *et al.*, 2017).

Diante disso, se faz necessário a busca por fontes alternativas proteicas para atender às necessidades alimentares. As fontes alternativas propostas são diversas e incluem bactérias, insetos e microalgas. Estes possuem alto teor de proteínas (>50%), propriedades nutricionais favoráveis e baixa alergenicidade (RITALA *et al.*, 2017). A microalga *Spirulina sp.* é uma das mais ricas fontes de proteína de origem microbiana (55-70%) (LAFARGA *et al.*, 2020).

Em termos de conteúdo de aminoácidos, o valor nutricional de proteínas de várias microalgas, comparam-se favoráveis proteína de ovo, soja e trigo, bem como à OMS (Organização Mundial de Saúde) / requisitos da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (SCHWENZEEIER *et al.*, 2011; HAYES *et al.*, 2017). A *Spirulina sp.* contém aminoácidos essenciais como isoleucina, leucina e valina, que apresentam alta digestibilidade (VAZ *et al.*, 2016).

Os produtos proteicos essenciais obtidos a partir de microalgas podem ser classificados com base no seu conteúdo protéico e no grau de refino, proteína de células integrais, concentrados de proteínas, isolados, hidrolisados e peptídeos bioativos. A proteína de célula inteira possui uma estrutura celular e de tecido intacta, é densa em proteínas e geralmente é consumida diretamente (por exemplo, sementes de plantas, células de microalgas inteiras). A proteína de células inteiras de microalgas contém aproximadamente 40-50% de proteína, mas as porcentagens variam de espécies e condições de crescimento. Em relação à aplicação-alvo, os ingredientes proteicos também são categorizados com base em suas propriedades nutricionais e funcionais. Essas últimas propriedades são desejadas na maioria das aplicações de alimentos, especialmente quando se trata de alimentos fortificados, batidos nutricionais e bebidas esportivas (SIERRA *et al.*, 2018).

Figura 3. Classificação de produtos proteicos à base de microalgas relacionado ao seu conteúdo proteico.



Isolados comerciais de proteína (> 90% de concentração de proteína) e concentrados (> 60%, <90% de pureza da proteína) Fonte: Sierra *et al.*, 2018

As propriedades funcionais das proteínas, por outro lado, contribuem para as propriedades físicas do produto alimentar. As propriedades mais comuns são emulsificação, estabilidade e capacidade de formação de espuma. Essas propriedades são determinadas pela interação proteína-proteína, bem como interação proteica com outras moléculas na solução. A emulsificação refere-se à capacidade de retenção de proteína do óleo e à estabilidade de emulsões óleo-em-proteína. A alta capacidade de emulsificação e estabilidade são desejadas em formulações de alimentos, como sopas e molhos. A formação de espuma refere-se à flexibilidade da proteína que permite a redução da tensão superficial para manter as bolhas de ar em suspensão. A capacidade de formação de espuma é uma propriedade desejada em cremes, pastas, entre outros. Os métodos utilizados para o processamento de proteínas conferem propriedades diferentes relacionados a digestibilidade, bioatividade, emulsificação e capacidade de formação de espuma do produto proteico (SIERRA *et al.*, 2018).

As ficobiliproteínas encontradas em cianobactérias, como *Spirulina sp.*, *Anabaena sp.* e *Oscillatoria sp.*, são proteínas coloridas, reconhecidas pelo seu grande número de aplicações de saúde e têm sido intensivamente investigado para esse fim. Essas proteínas incluem aloficocianina, ficocianina e fitoeritrina (BARKA; BLECKER *et al.*, 2016). Além de desempenhar um papel importante no metabolismo de pigmentação das microalgas, as ficobiliproteínas também exibem algumas funções biológicas, como antioxidantes, anticarcinogênicos, antiinflamatórios, antiangiogênico e neuro e hepatoprotetor (CUELLAR-BERMUDEZ *et al.*, 2015). As ficobiliproteínas têm alto valor comercial como corantes naturais voltada para indústria nutracêutica, cosmética e farmacêutica, bem como aplicações em

pesquisa clínica e biologia molecular (CHIONG *et al.*, 2016) e como corantes naturais nas indústrias têxteis (OKOLIE *et al.*, 2019).

Tabela 1. Compostos e propriedades das Proteínas de espécies de microalgas

Espécie	Composto	Propriedades	Referências
<i>Chlorella vulgaris</i>	Peptídeo	Nutricionais	Xie <i>et al.</i> , 2018
<i>Nostoc sp.</i> , <i>Arthrospira platensis</i> , <i>Porphyridium purpureum</i>	Filicoproteínas	Extração do produto com alto valor agregado	Arashiro <i>et al.</i> , 2020
<i>Porphyridium purpureum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Hidrolisado	Nutricionais	Stack <i>et al.</i> , 2018
<i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Nannochloropsis sp</i>	Hidrolisado	Nutricionais	Valenzuela <i>et al.</i> , 2017
<i>Vischeria helvética</i>	Oligopeptídeo	Nutricionais	Aburai <i>et al.</i> , 2019
<i>Spirulina sp.</i>	Hidrolisado	Tecnológicas	Pereira <i>et al.</i> , 2019
<i>Spirulina sp.</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	Peptídeo	Antioxidante	Ahmed <i>et al.</i> , 2018

2.5.2 Carboidratos

Polissacarídeos de microalgas são macromoléculas complexas e heterogêneas, constituídas de diferentes monossacarídeos e, em alguns casos, de grupos de ácido glucurônico e sulfato (SATHASIVAM *et al.*, 2017). Os polissacarídeos produzidos por microrganismos podem ainda ser classificados segundo a sua localização na célula pelo que são usualmente divididos em três grupos, polissacarídeos que fazem parte da parede celular, polissacarídeos intracelulares, os quais são uma fonte de carbono e de energia para a célula, e polissacarídeos extracelulares (DONOT *et al.*, 2012; BERNAERTS *et al.*, 2019).

Algumas microalgas possuem quantidade significativas de polímeros estruturais incluindo polissacarídeos, que podem atuar como texturizantes, estabilizantes ou emulsificantes na indústria de alimentos. Essas aplicações ainda são pouco exploradas devido à grande diversidade de microalgas (BERNAERTS *et al.*, 2019). Esses polissacarídeos são extraídos principalmente de plantas, como amido, pectinas e galactomananos, ou de algas, incluindo alginatos, ágar e carrageninas. Considerando que os polissacarídeos macroalgais são comercializados com sucesso como agentes espessantes e gelificantes em produtos

alimentícios, os polissacarídeos microalgais também vem recebendo atenção nesse contexto (BUONO *et al.*, 2014).

E ainda, vários estudos explicitam que o polissacarídeo possui função antioxidante, antimicrobiana e até antitumoral (HAFSA *et al.*, 2017; OLIVARRIA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2016; FENG *et al.*, 2017). Além do mais, atividades hipolipidêmicas, hipoglicêmicas estão relacionadas a essas estruturas (SATHASIVAM *et al.*, 2017).

Tabela 2. Compostos extraídos de carboidratos de espécies de microalgas

Microalga	Composto	Propriedade	Referência
<i>Chlorella</i>	EPS	Tecnológica	Ferreira <i>et al.</i> , 2020
<i>Spirulina sp.</i>	Polissacarídeo	Bioestimulante do crescimento de plantas	Elarrousse <i>et al.</i> , 2016
<i>Phormidium versicolor</i>	Polissacarídeo	Antioxidante e antimicrobiano	Belhag <i>et al.</i> , 2017
Microalgas vermelhas	Polissacarídeo	Hidrogel antimicrobiano	Lieberman <i>et al.</i> , 2021
<i>Navicula sp.</i>	Polissacarídeo	Antioxidante	Olivarria <i>et al.</i> , 2018
<i>Porphyridium sp.</i>	EPS	Tecnológica	Bernaerts <i>et al.</i> , 2018

2.5.3 Antioxidantes

Antioxidantes são moléculas biológicas que protegem organismos ou compostos biológicos contra radicais oxidativos. As vantagens de consumir antioxidantes têm sido divulgados ao público em geral e estão relacionados à melhoria da qualidade de vida e prevenção de mortalidade e morbidade. Essas moléculas podem prevenir ou minimizar o dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Assim, antioxidantes podem atrasar o envelhecimento e várias condições crônicas, como doença cardíaca, aterosclerose e câncer (POPRAC *et al.*, 2017).

As microalgas representam uma fonte pouco explorada de antioxidantes naturais (Tabela 3) devido à sua enorme biodiversidade, considerada superior a algumas plantas. Vários compostos podem ser potencialmente usados como fontes antioxidantes, como pigmentos (incluindo carotenóides), compostos fenólicos, polissacarídeos sulfatados e ainda ácidos graxos de cadeia longa (MAADANE *et al.*, 2015).

Desse modo, as microalgas são cada vez mais consideradas como uma fonte potencial de compostos antioxidantes naturais pelas indústrias alimentícia, cosmética e nutracêutica, pois podem trazer benefícios aos seus produtos (COULOMBIER *et al.*, 2021).

Tabela 3. Análises de atividades antioxidantes de espécies de microalgas

Espécie	Análise	Referências
<i>Tetrademus obliquus</i> -peptídeo	ABTS, DPPH	Montone <i>et al.</i> , 2018
<i>Spirulina platensis</i> - peptídeo	DPPH, ABTS	Yu <i>et al.</i> , 2016
<i>Scenedesmus sp.</i>	DPPH, ORAC	Banskota <i>et al.</i> , 2019
<i>Euglena cantábrica</i>	DPPH, fenólicos	Martel <i>et al.</i> , 2017
<i>Spirogyra sp.</i>		
<i>Ankistrodesmus sp.</i>		
<i>Nostoc commune</i>		
<i>Scenedesmus sp.</i>	DPPH, FRAP	Bulut <i>et al.</i> , 2019
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	DPPH	Dantas <i>et al.</i> , 2018

2.5.4 Lipídios

As microalgas podem produzir diferentes tipos de lipídios (Tabela 4), como glicolípidos, fosfolípidos (lípidos polares), glicerolípidos com lipídios neutros de armazenamento e ácidos graxos livres. O conteúdo lipídico nas microalgas varia entre 20% e 50%. Esses lipídios podem ser usados como armazenamento de energia ou como substratos de energia, como componentes estruturais da membrana celular e para processos metabólicos (BELLOU *et al.*, 2014).

As microalgas são fontes relevantes de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e são empregadas na indústria de alimentos como suplementos. As microalgas são realmente capazes de sintetizar membros da família ômega 6, que incluem ácido linoleico, ácido linolênico (GLA), e ácido araquidônico (ARA), bem como da família ômega 3, que incluem ácido linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). DHA e EPA estão associados a redução de complicações nas doenças cardiovasculares, artrite e hipertensão; eles também exibem atividade hipolipidêmica relevante, para reduzir triglicerídeos e aumentar a lipoproteína de alta densidade colesterol (JACOB-LOPES *et al.*, 2018).

A agência fiscalizadora americana Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de óleo de algas DHA (Ácido docosahexaenóico) como aditivo para fórmula infantil pela Martek Biosciences. Este óleo de algas com altos teores de DHA é produzido a partir da microalga *Schizochytrium sp.* e *Cryptocodinium cohnii*. Os dois principais tipos de microalgal

PUFA, DHA e EPA, são a principal fonte de ácidos graxos ômega-3 com preço de mercado em torno de US \$ 80 - 160 / kg e têm mercado estimado de US \$ 898,7 milhões em 2025 (HU, 2019) Nos últimos anos, espécies de peixes de águas profundas foram a principal fonte de DHA e EPA, no entanto, alguns dos problemas surgiram, como não adequados para o consumo pelo vegano e o cheiro desagradável produzido a partir de óleo de peixe não é adequado para ser usado como um ingrediente alimentar. Além disso, o vazamento de óleo combustível dos navios e a descarga de resíduos de produtos químicos compostos por mercúrio, dioxinas, pesticidas clorados e bifenilos policlorados (PCB) da fábrica resultaram no esgotamento do estoque mundial de peixes (TIANG *et al.*, 2020).

Tabela 4. Lipídios produzidos a partir de espécies de microalgas

Espécie	Lipídios	Referências
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Omega 3,6 e 9	Abdo <i>et al.</i> , 2015
<i>N. oculata</i>	EPA	Topuz <i>et al.</i> , 2016
<i>Scenedesmus sp.</i>	Ácidos graxos	Banskota <i>et al.</i> , 2019
<i>N. oculata</i> ; <i>P. Tricornutum</i>	PUFA	Matos <i>et al.</i> , 2016
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Porphyridium cruentum</i>	PUFA	Feller <i>et al.</i> , 2018
<i>Isochrysis</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Porphyridium</i> , <i>Schizochytrium</i>	Omega 3	Gheisen <i>et al.</i> , 2018

2.5.5 Pigmentos

Os alimentos são coloridos principalmente por quatro grandes grupos de pigmentos: clorofilas, carotenóides, antocianinas e betanina. Eles são responsáveis pelo verde, amarelo / laranja / vermelho, vermelho / cor azul e vermelha dos alimentos. Apesar dos esforços feitos pelos pesquisadores na área de alimentos para encontrar novas fontes naturais de pigmentos e corantes e para aumentar os rendimentos de recuperação, apenas alguns aditivos naturais para corantes alimentares atingiram a mercado. Os principais motivos incluem baixa estabilidade, custos de produção mais altos e limitações na gama de tons (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Os pigmentos naturais para alimentos estão sendo estudados ativamente não apenas por causa da cor que conferem aos alimentos, mas também por suas propriedades potenciais de promoção da saúde. A incorporação de pigmentos naturais nas formulações de alimentos agrega valor ao produto e potencialmente promove a saúde, permitindo assim a diferenciação da concorrência (LAFARGA, 2019).

Dentre os pigmentos naturais, as microalgas (Tabela 5) possuem clorofilas, ficobiliproteínas e carotenóides como β -caroteno, astaxantina e outras xantofilas (BEGUM *et al.*, 2016). O papel dos carotenóides nas algas e plantas é absorver a luz usada na fotossíntese e proteger as clorofilas do dano por foto. Os carotenóides, como derivados dos tetraterpenos, contêm 40 átomos de carbono na molécula. Eles formam duas classes: carotenos como o β -caroteno que não contêm oxigênio e xantofilas como astaxantina, que contêm oxigênio. Sua cor amarela, laranja ou vermelha se deve à longa cadeia de ligações duplas conjugadas que interagem com a luz. Os carotenóides têm muitos efeitos medicinais, incluindo proteção contra danos oxidativos, e são populares como suplementos alimentares (SONOVÁ; STATEVA *et al.*, 2019).

A astaxantina é um cetocarotenoide, molécula super antioxidante. Possui maior atividade antioxidante do que uma variedade de carotenóides, portanto, tem aplicações em cosméticos, aquicultura, nutracêuticos, terapêuticos e farmacêuticos. Geralmente, é derivada da microalga *Haematococcus pluvialis* (KUMAR *et al.*, 2021). Outras microalgas, como *Chlorella zofingiensis*, têm potencial para serem usados também como fontes de astaxantina. As diferenças entre a astaxantina sintética e a derivada de microalgas são notórias: não apenas sua produção e preço, mas também seus usos e ainda na sua bioatividade. A astaxantina derivada de microalgas está sendo usada como pigmento na produção de alimentos e rações ou ração aquática (VILLARÓ *et al.*, 2021).

Prevê-se que o valor de mercado dos carotenóides evolua, a uma taxa de crescimento anual (composto) de 3,5%, alcançando uma receita esperada de US \$ 1,52 bilhão em 2021. Devido aos seus níveis intrinsecamente altos de acúmulo endocelular de carotenóides junto com o demanda de mercado projetada, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são geralmente considerados promissoras fontes de microalgas para o bioprocessamento industrial (CAMACHO *et al.*, 2019).

Outro pigmento fotossintético extraído de microalgas é a ficocianina que possui potencial biotecnológico devido às suas cores intensas, propriedades fluorescentes e potenciais benefícios à saúde (HISIE-O *et al.*, 2019) A ficocianina é o único corante azul natural disponível para uso e aprovado pelo FDA (CHEW *et al.*, 2017; FDA, 2014). A principal microalga da qual se extrai este pigmento é a *Spirulina sp.* que pode acumular ficocianina em um nível significativo (7-20% de seu teor de proteína). A ficocianina extraída pode ser adicionada como ingrediente em doces, gomas de mascar, geleias, picolés e refrigerantes. Além disso, podem possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (PAN-UTAI *et al.*, 2018).

Tabela 5. Pigmentos produzidos por diferentes espécies de microalgas

Espécie	Pigmentos	Referências
<i>Porphyridium sp.</i>	zeaxantina, fucoxantina, violaxantina, diadinoxantina	Banskota <i>et al.</i> , 2018
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Luteína	Chen <i>et al.</i> , 2017
<i>Isochrysis galbana</i>	β -caroteno	Ryckebosch <i>et al.</i> , 2014
<i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> sp., <i>Rhodospirillum rubrum</i> sp.	Zeaxantina	Bourdon <i>et al.</i> , 2021
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Molino <i>et al.</i> , 2018
<i>Tetraselmis sp.</i>	Luteína e β -caroteno	Schülera <i>et al.</i> , 2020
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianina	Bocker <i>et al.</i> , 2018; Chaiklahan <i>et al.</i> , 2022

2.6 UTILIZAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS COMO INGREDIENTE EM PRODUTOS ALIMENTARES

Os produtos alimentícios e nutracêuticos derivados de microalgas (Tabela 6) possuem um grande potencial para desacelerar a taxa de desnutrição nos países em desenvolvimento. A abundância de proteínas e outros nutrientes essenciais nas microalgas pode desenvolver uma indústria de alimentos massiva à base de microalgas, dedicada à comercialização de alimentos saudáveis e funcionais (KOYAINDEA *et al.*, 2019). Os suplementos de microalgas são particularmente populares entre vegetarianos e veganos, que destacam seus efeitos benéficos relacionados a vitalidade e imunidade (RZYMSKI; JAŚKIEWICZ, 2017).

Além de todos atrativos nutricionais, as microalgas possuem ainda propriedades tecnológicas podendo ser utilizada como um texturizador ou estabilizador em produtos alimentícios (BERNAERTS *et al.*, 2019). Como Atitallah *et al.* (2019), avaliaram diferentes microalgas como ingredientes naturais em hambúrgueres de peixe e constataram que não só melhoraram o conteúdo nutricional do produto, mas também suas propriedades tecnológicas.

A produção de uma variedade de produtos com biomassa de microalgas voltadas para nutrição humana é comercializada sob diferentes formas, como comprimidos, cápsulas de géis e líquidos. Eles também podem ser usados como complemento para barras de chocolate, bebidas e outros alimentos comuns como aditivo alimentar para melhorar a saúde e a nutrição (SUGANYA *et al.*, 2016). E ainda em massas, salgadinhos, macarrão, biscoitos (MAHATA *et al.*, 2022).

Tabela 6. Biomassa de microalgas utilizadas como ingredientes em produtos alimentares

Espécie	Ingrediente	Propriedades	Referencia
<i>Spirulina platensis</i>	Biscoito	Nutricionais	Garcia; Vicente, 2017
<i>H. pluvialis</i>	Cookies	Tecno-funcional e nutricional	Hani <i>et al.</i> , 2018
<i>Spirulina platensis</i>	Iogurte	Nutricionais	Sengupta <i>et al.</i> , 2018
<i>D. Salina</i>	Massa	Tecno-funcional e nutricional	El-Baz <i>et al.</i> , 2017
<i>Spirulina</i>	Snack	Tecno-funcional e nutricional	Lucas <i>et al.</i> , 2018
<i>I. galbana</i> , <i>T. suecica</i> , <i>S. almeriensis</i> , and <i>N. gaditana</i>	Pão	Tecno-funcional	Garcia-Segovia <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella vulgaris</i> Allma, <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Spirulina platensis</i>	Bolacha	Nutricionais	Batista <i>et al.</i> , 2019
<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Picochlorum</i>	Hambúrguer de peixe	Tecnológicas	Atitallah <i>et al.</i> , 2019
<i>Scenedesmus sp.</i>	Chocolate funcional	Tecnológicas	Hlang <i>et al.</i> , 2019
<i>Tetraselmis chuii</i>	Pão	Nutricionais	Qazi <i>et al.</i> , 2021
<i>Nannochloropsis gaditana</i> L2 e <i>Chlamydomonas sp</i>	Pão sem glúten	Nutricionais e tecnológicas	Khemiri <i>et al.</i> , 2020
<i>Chlorella e Spirulina</i>	Produtos cárenos	Nutricionais	Zamuz <i>et al.</i> , 2019
<i>Tetraselmis sp. e Nannochloropsis sp</i>	Crackers	Nutricional	Lafarga, Mayre <i>et al.</i> , 2019

Existem algumas microalgas que possuem status GRAS (Generally Recognized As Safe), conforme reconhecido pelo FDA, o que garante seu consumo sem riscos à saúde. Estas algas incluem: *Spirulina*, *Chlorella sp.*, *Haematococcus sp.*, *Dunaliella sp.* e *Chlamydomonas reinhardtii* (FDA, 2021).

No entanto, a designação GRAS (Generally Recognized As Safe) só se aplica aos Estados Unidos. Na Europa, a União Europeia (UE), a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) supervisiona regulamentos relativos à alimentação humana e animal na

UE. Adotando um “princípio da precaução”, os alimentos que foram significativamente consumidos no território da UE antes de maio de 1997 são considerados seguros a ser consumido, e qualquer outro alimento, exceto Organismos Geneticamente Modificado (OGM), são rotulados como “novos alimentos” e devem passar por uma avaliação de segurança pela EFSA antes de ser comercializado (EFSA, 2020).

Na Austrália e os novos alimentos da Nova Zelândia são definidos como alimentos não tradicionais que exigem uma avaliação das considerações de saúde e segurança pública afim de estabelecer sua segurança antes de serem adicionados ao suprimento de alimentos e são regulamentados (FSANZ, 2021).

O óleo de algas da espécie de microalga *Ulkenia* é aprovado pela UE e FSANZ com o FDA geralmente reconhecendo como seguro; no entanto, eles diferem em suas especificações de uso. O óleo da microalga *Schizochytrium sp.* rico em DHA e EPA também possui diferentes especificações de acordo com o órgão em que as regulam. A UE tem dois outros ingredientes de microalgas aprovados, incluindo um óleo proveniente da astaxantina extraída da *Haematococcus pluvialis* e a biomassa da *Tetraselmis chuii* seca (HOSSEINKHANI *et al.*, 2022).

Um entrave dos consumidores a respeito da utilização de microalgas em novos alimentos seria aceitação sensorial de alimentos. Isso pode ocorrer devido ao sabor e aroma de peixe. Assim, faz-se necessário estudos que estabeleçam uma quantidade máxima de introdução de biomassa no alimento que através de análise sensorial seja constatado que não altere negativamente essa aceitação pelo consumidor. Inclusive através da cor já que as microalgas podem alterar a coloração dos alimentos, e isso pode afetar a aceitação dos consumidores. A utilização de microalgas como ingrediente em pães e laticínios pode não ter boa aceitação. Já, alguns outros produtos como massas (El-Baz *et al.*, 2017) por já possuírem cor verde no mercado, chocolate (Hlang *et al.*, 2019) por conseguir mascarar o sabor, snacks (Lucas *et al.*, 2018), podem ter boa aceitação. Alguns fatores podem influenciar nessa aceitação como: a escolha das microalgas, como a biomassa é preparada, junção dos demais ingredientes do produto e a formação do produto final terão um papel importante no avanço da indústria de alimentos à base de microalgas (HOSSEINKHANI *et al.*, 2022).

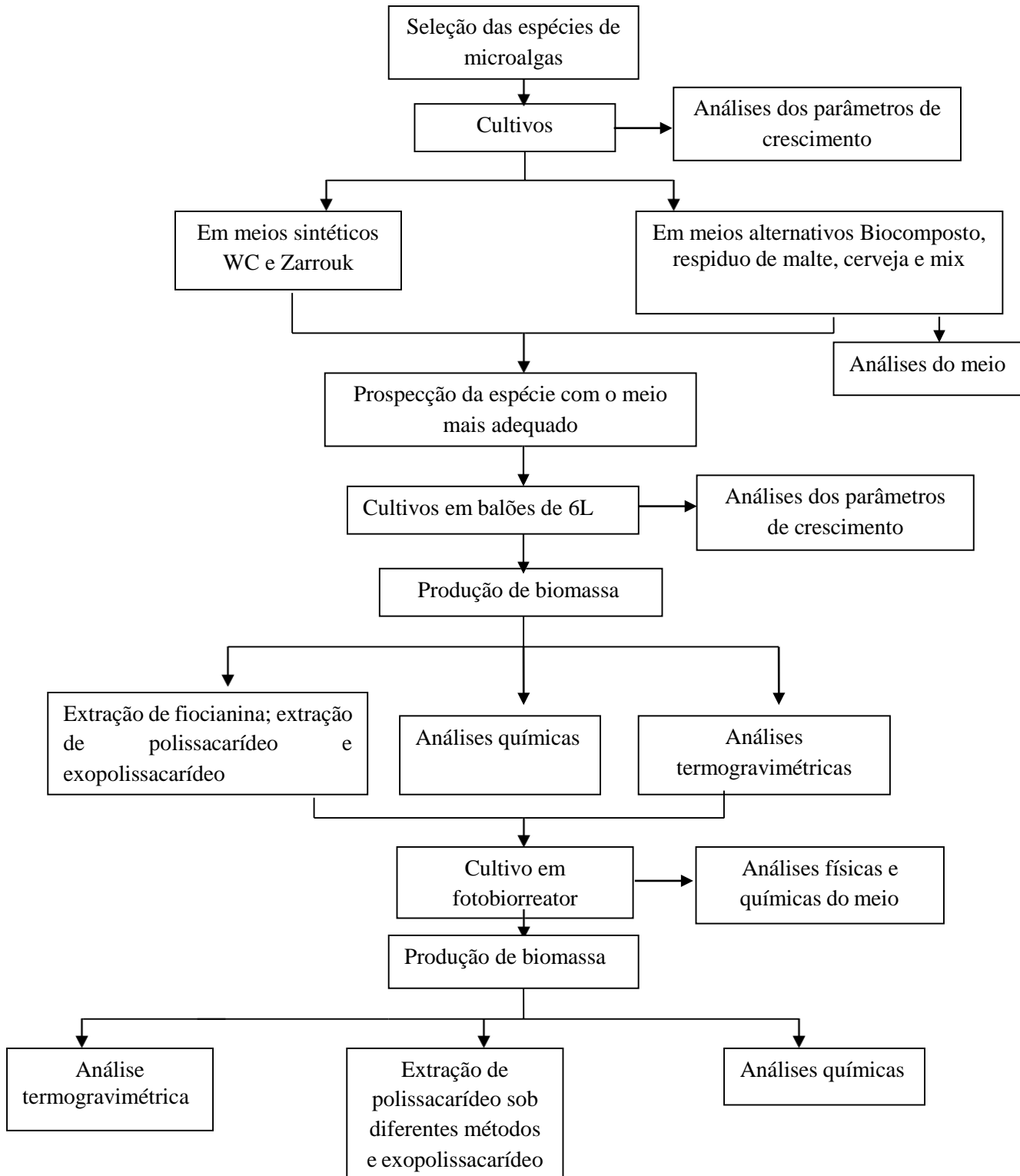
Porém, Bich *et al.* (2019), investigaram os principais impulsionadores ou barreiras do consumo de algas marinhas. E foram relatados que as principais razões para o consumo de algas marinhas estavam relacionadas à saúde e as propriedades nutricionais, como as algas marinhas são saudáveis (64%), são nutritivas (61%), uma fonte natural de ômega-3 (59%), baixo em calorias (54%) e ainda uma boa fonte de proteína (54%).

As microalgas são consideradas promissoras para uso na indústria alimentícia devido ao seu amplo espectro de compostos nutricionais. Considerando as crescentes preocupações com o ônus do crescimento populacional em fontes alimentares convencionais, as microalgas são consideradas como uma fonte sustentável de nutrientes. Os compostos bioativos desses microrganismos fotossintéticos apresentam diversos benefícios para a saúde humana como anticancerígenos, antioxidantes e anti-inflamatórios (HOSSEINKHANI *et al.*, 2022).

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS: COLETAS, ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS CULTIVOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM), da Universidade Federal da Paraíba, Campus I em João Pessoa. De acordo com o fluxograma abaixo (Figura 4):



3.1.1 Seleção de Espécies

Foram selecionadas 8 espécies provenientes do banco de cultura de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB) (Tabela 7).

Tabela 7. Microalgas estudadas nesta pesquisa

Linhagens	Espécie/gênero	Procedência
D464WC	<i>Xanthonema sp.</i>	Viveiro de carcinicultura pós-despesca, Aldeia Tramataia, PB
D245WC	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Riacho das Folhas, Cruz do Espírito Santo, PB
D467WC	<i>Actinastrum hantzschii</i>	Fonte dos milagres-parque nacional, PI
D459WC	<i>Monoraphidium arcuatun</i>	Açude Jardim do Seridó, PB
D8Z	<i>Spirulina máxima</i>	UFF, RJ
D9Z	<i>Spirulina platensis</i>	UFF, RJ
D545WC	<i>Scenedesmus ecornis</i>	Parque Nacional de Jericoacara, CE
D498WC	<i>Kirchneriella concorta</i>	Açude fazenda Panati, Taperoá, PB

As espécies de microalgas foram primeiramente coletadas dos mananciais com garrafas pet e transportadas até o laboratório. Depois foram inoculadas em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), sendo mantidas em câmara de cultura climatizada a $24^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C com sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, e fotoperíodo ajustado para 12 horas.

Após o crescimento, as microalgas foram isoladas com auxílio de micro capilares e um microscópio bionocular LEICA até que os cultivos ficassem monoespecíficos. As cepas isoladas foram codificadas e adicionadas ao banco de microalgas do LARBIM/UFPB. A identificação das espécies foi realizada através o uso de bibliografias especializadas, usando critérios morfológicos.

3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS ALTERNATIVOS

3.2.1 Preparo dos meios de cultivo

a) Meios sintéticos

Já para o cultivo das espécies *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis* foi utilizado o meio sintético Zarrouk (Zarrouk, 1966) (Quadro 1). Já para os cultivos das demais espécies foi utilizado o meio sintético WC (GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, 1972) (Quadro 2). Os meios foram preparados com água destilada autoclavada e após 24 h em repouso em temperatura ambiente foram adicionados todos os macronutrientes e micronutrientes necessários para meio de cultura.

Quadro 1. Composição do meio sintético Zarrouk

Soluções estoque	Quantidades
1-Nitrato de Potássio (KNO ₃)	15,0 g em 200 ml
2-Cloreto de Sódio (NaCl)	33,0 g em 200 mL
3-Sulfato de Magnésio hepta-hidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1,5 g em 200 mL
4-Fosfato de Potássio (K ₂ HPO ₄)	1,5 g em 200 mL
5-Cloreto de Cálcio di-hidratado (CaCl ₂ .H ₂ O)	0,58 g em 200 ml
6-Solução dissódica (Na ₂ EDTA)	6,4 g em 100 mL
7-Sulfato Ferrosohepta-hidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,5 g em 100 mL
8-Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	1,14 g em 100 mL
9. Solução mista*	*
*Solução mista	Quantidades
Nitrato Cobaltoso hexa-hidratado[Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O]	0,049g
Cloreto de Manganês tetra-hidratado (MnCl ₂ .4H ₂ O)	0,144g
Sulfato de Zinco hepta-hidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,882g
Sulfato de Cobre penta-hidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,0157g
Oxido de Molibdênio (MoO ₃)	0,071g
Água destilada	100 mL
Preparação de 1,0 L de meio de cultura (água destilada)	
<ul style="list-style-type: none"> • Dissolver em 600 mL de água 15,0 g de NaHCO₃ • Na solução anterior, dissolver 2 g de Na₂CO₃ • Acrescentar 10 mL das soluções 1,2,3,4 e 5 • Acrescentar 1,0 mL das soluções 6,7,8 e 9 • Completar o volume a 1.000 mL e autoclavar 	

Fonte: (ZARROUK, 1966)

Quadro 2. Composição do meio sintético WC

Solução estoque	Fórmula	Quantidade
Cloreto de cálcio 2.H ₂ O	CaCl ₂ . 2H ₂ O	36,8 g
Sulfato de magnésio 7.H ₂ O	MgSO ₄ . 7H ₂ O	37,0 g
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	12,6 g
Fosfato de potássio 3.H ₂ O	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,4 g
Nitrato de sódio	NaNO ₃	85,0g
Água destilada	H ₂ O	1.000 mL
Solução de silicato	Fórmula	Quantidade
Metasilicato de sódio 9.H ₂ O	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	21.2 g
Água destilada	H ₂ O	1.000 mL
Solução de micronutrientes	Fórmula	Quantidade
Sal dissódico	Na ₂ EDTA	4,36 g
Cloreto férrico 6.H ₂ O	FeCl ₃ . 6H ₂ O	3,15 g
Sulfato de cobre 5.H ₂ O	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,01 g
Sulfato de zinco 7.H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 g
Cloreto de cobalto 6.H ₂ O	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,01 g
Cloreto de manganês 4.H ₂ O	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,18 g
Molibdato de sódio 2.H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006 g
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	1 g
Água destilada	H ₂ O	1.000 mL
Solução de vitaminas	Fórmula	Quantidade
Tiamina HCl		0,1 g
Biotina		0,0005 g
Água destilada	H ₂ O	1.000 mL
Constituição de 1 Litro de meio de cultura		
Água destilada e autoclavada		1.000 mL
Solução estoque		1 MI
Solução de silicato		1 mL
Solução de micronutrientes		1 MI
Solução de vitaminas		1 MI
Tri(hidroximetil)-amino metano		0.115 g
Fonte: (GUILLARD e LORENZEN, 1972)		

b) meios alternativos

Foram realizados ensaios com quatro meios alternativos:

- **Biocomposto de frutas e hortaliças**

O resíduo da biocompostagem de frutas e verduras foi cedido pela Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas - EMPASA, localizada na cidade de João Pessoa – PB. O material foi transportado em sacos de 50 kg para o LARBIM/UFPB. Onde a cada 1 kg do biocomposto foi adicionado 1L de água destilada, seguido de aquecimento por 30 minutos em autoclave e filtrado em filtro de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro. Os extratos

foram mantidos em refrigeração. Posteriormente, o extrato foi esterilizado para utilização na composição do meio Erd-Schreiber modificado (GROSS, 1937) (Quadro 3), modificado por Calixto *et al.*, (2016).

Quando 3. Composição do meio Erd-Schreiber Plymouth (THOMPCKINS, 1995)

Solução estoque	Fórmula	Quantidade
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40 g/L
Fosfato de sódio	Na_2HPO_4	4,0 g/L
Extrato de solo	- - -	1 kg/L
Água – 1000 ml		
Preparação de 1,0 L de meio de cultura (água destilada)		
Extrato de solo – 10 mL/L	Solução Estoque Nitrato-1mL /L Solução Estoque Fosfato-1mL/L	

Fonte: THOMPCKINS, 1995.

- **Fécula de mandioca**

O soro da fécula de mandioca foi cedido pela indústria alimentícia Da Terra, localizada na cidade de Santa Rita-PB. O efluente foi transportado em galão de 10L até o LARBIM/UFPB e seguiu a metodologia proposta por Pereira (2019), onde foi filtrado em filtro de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro e posteriormente autoclavado por 30 minutos. O material filtrado em filtro de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro foi conservado a temperatura de 4°C.

- **Resíduo do malte de cevada**

O resíduo do malte de cevada foi cedido pela cervejaria artesanal Turmalina, localizada na cidade de João Pessoa-PB. O resíduo foi transportado em sacos de 20 Kg até o LARBIM/UFPB onde foi inicialmente realizado uma compostagem que durou 90 dias. Após a obtenção do biocomposto, o mesmo foi diluído em água, autoclavado e filtrado em filtro de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro. Após a obtenção do extrato, foram adicionadas substâncias nas quais fazem parte da composição do meio Erd-Schreiber modificado (GROSS, 1937) (Quadro 3), com modificações.

3.2.2 Cultivo das microalgas nos meios sintético e alternativo

As microalgas selecionadas foram cultivadas inicialmente em balões de vidro de 250 mL (Figura 5) com 150 mL dos meios alternativos para os diferentes meios alternativos e o meio controle:

- Efluente de fécula de mandioca (FE) nas concentrações de 100%, 50% e 25% substituindo pelo respectivo meio controle (C); Com adição de nitrato e fosfato.
- Extrato biocomposto de hortifruti (BH), foram realizados experimentos adicionando 1,5%, 1% e 0,5% do extrato para cada litro de água destilada. Com e sem adição de nitrato e fosfato;
- Extrato biocomposto do resíduo de malte (RM), foram realizados experimentos adicionando 1,5%, 1% e 0,5% do extrato para cada litro de água destilada. Com e sem adição de nitrato e fosfato;
- Para o MIX (mistura extrato de biocomposto de hortifruti e/ou biocomposto do resíduo de malte (RM) com 0,5% de cada extrato para cada litro de água destilada) substituindo pelo meio controle nas concentrações de 100%, 50% e 25%.

Figura 5. Cultivos de microalgas em balões de 250 mL



Fonte: autoria própria, 2022

Os ensaios foram realizados em triplicatas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia ($150 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12h. A concentração inicial para o cultivo das microalgas foi 2×10^4 células mL^{-1} . Os cultivos foram analisados a cada dois dias através de medidas da fluorescência “in vivo” em um fluorômetro Turner Design 10005R.

3.2.3 Produção de biomassa em escala laboratorial

Após a investigação da relação meio alternativo mais adequado para cada microalga. Foi realizado o cultivo das microalgas com os meios pré-definidos em escala laboratorial para obtenção de biomassa.

Os cultivos foram realizados em bancada, em balões de 6 L (Figura 6) contendo 5 L dos meios de cultura, no LARBIM/UFPB, em câmara de cultivo climatizada (fotoperíodo de 12 horas, temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), com aeração fornecida por um minicompressor de membrana Resun AOC3, sendo os inóculos iniciais da ordem de 5000 a 20000 células.mL⁻¹. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Figura 6. Cultivo de microalgas em balões de 6 L



Fonte: autoria própria, 2022

Os cultivos foram acompanhados através de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rosenthal ou em câmaras de Sedgewick-Rafter (para células filamentosas), em microscópio binocular Leica. Também foi acompanhado através das análises da fluorescência “in vivo” em um Fluorômetro Turner Design, modelo 1005R em triplicata. As curvas de crescimento de cada espécie foi traçada utilizando o parâmetro de crescimento acima referido, a partir da qual foi possível determinar o tempo de cultivo, a duração da fase exponencial, a velocidade de crescimento (k), e o rendimento final em biomassa. A velocidade de crescimento (k), a qual representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada através da Equação 1, citada em Stein (1973):

$$\text{Eq.1 } K = \frac{3,322 \cdot X \cdot \log \frac{N_2}{N_1}}{T_1 - T_2}$$

Em que: 3,322 corresponde ao fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10; T1 e T2 compreendem o início e o final da fase exponencial de crescimento; e N1 e N2 referem-se à densidade celular inicial e final dessa fase, respectivamente.

Os ensaios foram interrompidos na fase estacionária e a partir daí a biomassa foi concentrada em centrífuga refrigerada (18 °C), congelada a -30 °C num ultrafreezer (Terroni 90LT) e liofilizadas num liofilizador Terroni (modelo LD1500) depois foram pesadas em balança analítica e armazenada em recipiente hermético.

3.2.4 Cultivo em fotobiorreator

A *Scenedesmus ecornis* foi cultivada no meio alternativo com biocomposto de hortifrut. Inicialmente foi inoculada em balões de 250 mL. Após 15 dias a cultura foi colocada em balões de 6L de capacidade contendo 5L do mesmo meio de cultura e após 15 dias foram colocados em mariotes (Figura 7) com capacidade de 20 litros. Todos os ensaios foram mantidos a 25° C ± 1° C em câmara de cultivo climatizada com sistema de iluminação [150 μmols.fótons.m².s⁻¹] e fotoperíodo de 12 horas e aeração fornecida por um mini compressor de membrana RESUN AOC2. Após 15 dias de cultivo a cultura foi transferida para o fotobiorreator (Figura 8).

Figura 7. Cultivo de microalga em mariotes no LARBIM/UFPB



Fonte: autoria própria, 2022

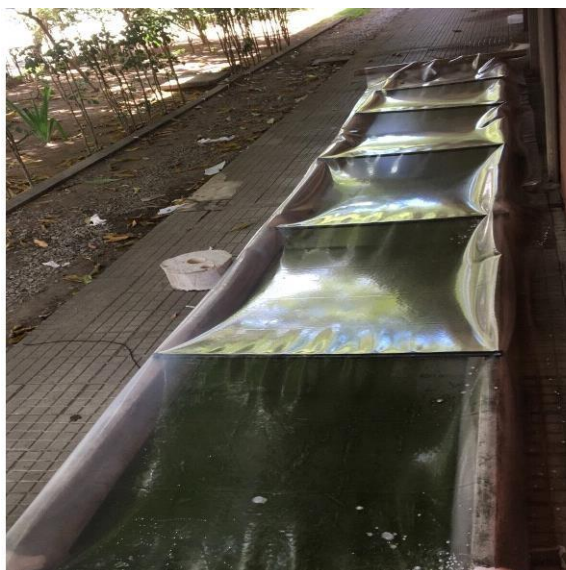
Inicialmente o fotobiorreator foi higienizado lavando os tubos de acrílico e os containers com detergente neutro. Depois foram feitas lavagens com água sanitária (água com baixa concentração de hipoclorito) deixando-a circular entre os tubos e os containers por dois dias com o auxílio de uma bomba centrífuga. Procedeu-se uma lavagem com água salina por um dia e por ultimo a lavagem com água corrente. O meio alternativo (1.940 L) foi então colocado no fotobiorreator juntamente com os 60 L de inóculo otimizado. E o cultivo foi aerado através de um soprador. O cultivo ocorreu durante 21 dias até a fase de declínio. Para colheita, o meio de cultivo foi transferido para uma esteira de decantação (Figura 9). Após 24 horas a biomassa decantou e foi seca ao sol até ficar completamente sem alto teor de umidade e depois foi pesada em balança analítica e armazenada em sacos herméticos sob refrigeração.

Figura 8. Cultivo de microalgas em fotobiorreator LARBIM/UFPB



Fonte: autoria própria

Figura 9. Esteira de decantação para colheita de biomassa de microalgas no LARBIM/UFPB



Fonte: autoria própria, 2022

3.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DO CULTIVO DO FOTOBIORREATOR

- **O pH**

O pH do cultivo foi verificado a cada dois dias através do pHmetro digital (KASVI).

- **Luminosidade e temperatura**

Foram analisadas durante todo o cultivo do fotobiorreator através do Hobo Pendant temperature/Light Data Logger (UA-0020XX).

- **Nitrato e fosfato**

Foram analisados a cada dois dias durante o cultivo do fotobiorreator, através das determinações de nitrato (método do ácido fenoldissulfônico) e fosfato (método do ácido ascórbico), segundo a metodologia de Standard Methods (APHA, 1998).

3.4 ANÁLISES QUÍMICAS DAS BIOMASSAS

As análises químicas foram realizadas na biomassa nos cultivos dos balões de 6L e no cultivo do fotobiorreator. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.4.1 Clorofila a, b e total e carotenoides

A biomassa das microalgas liofilizada (0,5 g) foi extraída com metanol (10 mL) no tubo de ensaio, agitando a 100 rpm e 25 ± 2 C por 3 h. Após a homogeneização, a biomassa foi submetida a centrifugação (10.000 rpm, 10 min a 4 ± 1 C). O sobrenadante (0,5 mL) foi separado e misturado com metanol (4,5mL) e posteriormente analisado o teor total de clorofila e carotenóide (SUMANTA *et al.* 2014; HLAING *et al.*, 2019).

3.4.2 Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry *et al.* (1951), adaptado por Derner *et al.* (2006). Amostras de 5 mg da biomassa de microalgas foram utilizadas. Foi adicionado 4 mL de hidróxido de sódio 1,0 N e aquecido em banho-maria por uma hora à 100 °C, foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a $3.000 \times g$ por 30 min. Foi retirado 0,5 mL do extrato alcalino e adicionou-se 1,0 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 1,0 N e 5 mL de Fenol 4%. Foi agitado em vortex e deixado em repouso por 30 min. e foram adicionados 2,5 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado e novamente agitado. As amostras foram resfriadas e lidas em espectrofotômetro UV-vis (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S) no comprimento de onda de 485 nm. Uma curva padrão com albumina foi previamente preparada com gradiente de concentração de 0 - 400 µg/mL.

3.4.3 Carboidratos totais

Foram analisados através da metodologia adaptada de Kochert (1978). Utilizou-se 0,01 g de cada amostra. Adicionou-se 4,0 mL de NaOH 1,0 N, e aqueceu-se a amostra em banho-maria por 1h a 100 ± 10 °C. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm por 10min. Retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino e adicionou-se 1,0 mL de NaOH 1,0 N mais 0,5 mL de fenol 4,0% e agitou-se em vortex. Após 30 minutos, acrescentou-se 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e agitou-se novamente em vortex. Após as amostras esfriarem estas foram lidas em espectrofotômetro a 485nm.

3.4.4 Lipídios totais

Foi realizado pela metodologia descrita por Bligh Dyer, foram pesados 50 mg de amostra, adicionados 3 mL de clorofórmio:metanol (1:2) e 2 mL de água, foram sonicadas (Unique, modelo USC-1400A) em banho de gelo por 40 min. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1 mL de uma solução de sulfato de sódio a 1,5%, sendo sonicadas por mais 20 min. O sistema foi

centrifugado a $4.000 \times g$ por 10 min. As amostras ficaram em repouso, e logo após foi realizada uma separação e remoção da fase superior por aspiração. As amostras foram filtradas com papel de filtro. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi tomada em frascos de vidros pré-pesados em balança analítica para determinação dos lipídios totais por gravimetria após a evaporação total do solvente em estufa à 80°C .

3.4.5 Umidade e cinzas

A umidade das amostras foi quantificada pelo método da AOAC (2016) por secagem a 105°C em estufa com circulação de ar até peso constante; as cinzas, por incineração a 550°C em mufla, de acordo com o método da AOAC (2016).

3.4.6 Ácidos graxos

O rendimento e a análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das espécies avaliadas foram através do procedimento de transesterificação direta da biomassa de microalgas adaptado para microescala, de acordo com Menezes *et al.*, (2013).

Para determinação do perfil de ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo gasoso (*Thermo Scientific - CG/FID – FOCUS*) com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP2560 (100m x 0,25mm x 0,2 μm). O gás de arraste empregado foi o nitrogênio (1,2 mL/min). As temperaturas do injetor e detector foram 230°C e 270°C , respectivamente. A programação da temperatura da coluna foi: 40°C por 3 min, em seguida foi aquecida a 180°C por 5 min com uma taxa de $10^\circ \text{C}/\text{min}$, sendo novamente aquecida a 220°C por 3 min com taxa de $10^\circ \text{C}/\text{min}$ e por fim a temperatura chegou a 240°C , sendo mantida por 25 min com taxa de $20^\circ \text{C}/\text{min}$. O nitrogênio foi usado como gás de arraste a 0,9 mL/min. O volume de amostra injetada foi de 1 μL com razão Split de 10:1. Os picos foram integrados e comparados com um padrão de ácidos graxos SupelcoTM37 componente FAME MIX.

3.4.7 Extração de polissacarídeos

Foram realizadas quatro diferentes ensaios de extração para obter o melhor rendimento dos polissacarídeos:

Extração alcalina- 10 g de biomassa liofilizada foi suspensa em 300 mL de solução de NaOH a 3% (p/v) e, em seguida, foi agitado por 3 h no banho-maria a 50°C . O pH da amostra foi ajustado para 7 com ácido clorídrico e depois centrifugado a 8000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com etanol a 95% (1:4, v/v) durante a noite a 4°C e depois centrifugado a 5000 rpm por 15 min (YU *et al.*, 2019).

Água - 10 g de biomassa liofilizada foi suspensa em 300 mL de água desionizada e agitado por 2 h no banho-maria a 80°C. O pH da amostra foi ajustado para 7 com ácido clorídrico e depois centrifugado a 8000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com etanol a 95% (1: 4, v / v) durante a noite a 4°C e depois centrifugado a 5000 rpm por 15 min. (YU et al., 2019).

Ultrassom- 10 g de biomassa liofilizada foi suspensa em 300 mL de água desionizada e utilizou-se a ultrassom a 70Hz por 30 minutos. O pH da amostra foi ajustado com ácido clorídrico e depois centrifugado a 8000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com etanol a 95% (1: 4 v / v) durante a noite a 4°C e depois centrifugado a 5000 rpm por 15 min. (YU et al., 2019).

Água quente /ultrassom - 10 g de biomassa liofilizada foi suspensa em 300 mL de água desionizada e agitado por 2 h no banho-maria a 80°C e depois foi utilizado ultrassom a 70Hz por 30 minutos. O pH da amostra foi ajustado para 7 com ácido clorídrico e depois centrifugado a 8000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com etanol a 95% (1: 4, v / v) durante a noite a 4°C e depois centrifugado a 5000 rpm por 15 min (YU et al., 2019) e adaptado.

A extração da proteína residual do polissacarídeo foi realizada pelo método SEVAGE (WU et al., 2017). O sobrenadante foi centrifugado com álcool butílico normal e clorofórmio (1:5, v/v). O procedimento descrito acima foi repetido 5 vezes, depois a solução foi exaustivamente dialisada em meio aquático por 48 h depois o polissacarídeo foi liofilizado e armazenado a -20°C.

3.4.8 Extração de exopolissacarídeos

A cultura coletada foi centrifugada (10.000 rpm por 30 minutos) para separar as células dos detritos. O sobrenadante foi então filtrado usando papel de filtro Whatman e aquecido a 50-70 °C em uma placa quente até o volume final reduzido para 1/6 do volume original. O sobrenadante concentrado foi então submetido à precipitação alcoólica, onde um volume igual de etanol resfriado foi adicionado para precipitar substâncias poliméricas extracelulares (GOYAL et al., 2019). A mistura foi mantida em condições de refrigeração (4°C) por 16-18 h antes da centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos). O etanol sobrenadante foi descartado enquanto o pellet obtido foi dissolvido em água Milli-Q após lavagem três vezes com etanol absoluto.

O pellet dissolvido foi dialisado contra água destilada por 48 horas para remover os sais e impurezas. A precipitação com ácido tricloroacético (TCA) foi realizada para remover proteínas por incubação da solução dialisada com TCA a 20% por 1 h (GOYAL *et al.*, 2019). A solução obtida foi centrifugada (14.000 rpm por 10 minutos) e o pellet de proteína foi descartado. O sobrenadante foi dialisado novamente para remover o TCA restante e submetido à liofilização para obter o pó de EPS bruto (PATWAL; BARANWAL, 2021).

3.4.9 Perfil de monossacarídeos

Para extração de monossacarídeos, foi utilizada 25 mg de biomassa, foi adicionado 250 µL de ácido sulfúrico a 72% (p /p) a um frasco de vidro de 10 mL; Foi levado ao banho maria a 30°C por 1 hora; Em seguida, foi adicionado 7 mL de água de 18,2 MΩ ao tubo e foi autoclavado durante 121°C por 1 hora. Após ter esfriado, foi retirado uma alíquota da amostra e neutralizá-la com carbonato de cálcio pH 7; A amostra foi filtrada com um filtro de membrana de nylon de 0,2 µm para análise por HPLC (TEMPLETON *et al.*, 2012). O perfil de monossacarídeos foi realizado através da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PATEL *et al.*, 2013).

3.4.10 Extração e purificação de ficocianina

A ficocianina foi extraída da biomassa da *Spirulina platensis* (Figura 8A) e da *Spirulina máxima* (Figura 8B) cultivadas em meio alternativo e sintéticos através de 2 metodologias diferentes para obter o melhor rendimento:

Turrac- Pesou-se 1,71g de biomassa e misturou-se 1,5% CaCl₂ (m/v). Utilizou-se o Turrac a 7000 rpm a 25^o C por 15 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas em Centrifuga 4000 rpm por 10 min a 20^o C metodologia descrita por Litter *et al.*, (2018).

Ultrassom- Pesou-se 1g de biomassa e misturou-se 1,5% CaCl₂ (m/v). As amostras foram sonicadas durante 15 minutos. E depois foram centrifugadas em Centrifuga 4000 rpm por 10 min a 20^o C metodologia descrita por Litter *et al.*, (2018).

A absorbância do sobrenadante azul foi determinada por um espectrofotômetro a 615 e 652 nm. A concentração de C-ficocianina, aloficocianina, ficoertina (p / v) foi calculada pela Eq. (BENNETT; BOGORAD, 1973; PAN-UTAI *et al.* 2018).

$$C-PC = \frac{A_{615} - 0,474 \times A_{652}}{5,34}$$

$$APC \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{652} - 0,208 A_{615}}{5,09}$$

-

$$PE \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{562} - 2,41 C - PC - 0,849 APC}{9,62}$$

Figura 10. Antes (A) e após (B) a centrifugação das amostras da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* para extração de ficocianina



Fonte: autoria própria, 2022

Após a extração, as amostras foram purificadas sendo então dialisadas (Figura 11) contra água destilada usando membrana de diálise de corte de 3,5 kDa a 4 °C durante 48 h para remover a maioria das proteínas e sais. O extrato dialisado foi recuperado e filtrado através de filtro de 0,45 µm (CHENTIR et al., 2018). A absorbância foi determinada por um espectrofotômetro a 620 e 280 nm.

A pureza da ficocianina (PC) foi determinada usando o seguinte taxa de absorção:

$$\text{Pureza} = OD_{620} / OD_{280}$$

Em que: OD₆₂₀ e OD₂₈₀ são absorbâncias de PC e proteínas, respectivamente.

O rendimento de PC foi calculado pela equação descrita por Silveira *et al.*, (2007) como se segue:

$$\text{PCrendimento} = \text{CPC} \times V / \text{DWB}$$

Em que: PCrendimento é expresso em mg g⁻¹, CPC é a concentração de ficocianina em mg mL⁻¹, V é o volume de solvente de extração (mL) e DWB é o peso seco da biomassa (g).

Figura 11. Ficocinanina extraída após diálise



Fonte: autoria própria, 2022

3.5 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS BIOMASSAS

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em Analisador Térmico Shimadzu, massa de 10 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL de temperatura ambiente até 700 °C.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), seguida de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$) e o teste t foi realizado quando foi necessário comparar duas amostras. Os dados foram analisados no Statística 2010 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

REFERÊNCIAS

ABDO, S.M.; ALI, G.H.; EL-BAZ, F.K. Potential production of omega fatty acids from microalgae, **International J Pharma Sci Rev & Res**, v.34, n.2, 2015.

ABURAI, N.; MARUYAMA, S.; SHIMIZU, K.; ABE, K. Production of bioactive oligopeptide hydrolyzed by protease derived from aerial microalga *Vischeria helvética*, **Journal of Biotechnology**, v. 294, n.20, 2019.

AHMAD, A.; ABDULLAH, S.R.S.; HASAN, H.A.; OTHMAN, A.R.; ISMAIL, N.I. Plant-based versus metal-based coagulants in aquaculture wastewater treatment: effect of mass ratio and settling time. **J. Water Proc. Eng.**, v.4, 2021.

AHMED, J. M.; ALZHRANI, C. O. PERERA, O.;HEMAR, Y. Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.53, 2018.

ALAM, M. A.; YUAN, T.; WENLONG, X.; ZHANG, B.; LV, Y.; XU, J. Process Optimization for the Production of High-Concentration Ethanol with *Scenedesmus raciborskii* Biomass. **Bioresource Technology**, 2019.

ALAM, M. A., XU, J.-L., & WANG, Z. **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products**. 2020.

ALI, S.; PAUL PETER, A.; CHEW, K. W.; MUNAWAROH, H. S. H.; SHOW, P. L. Resource recovery from industrial effluents through the cultivation of microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v.337, 2021.

AMARAL, M.S. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel**, tese de doutorado, Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa, Lorena, 2018.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais produção de biomassa e coprodutos**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná - Iapar, 2014b. v. 2. 443 p.

ANDREOTTI, V.; CHINDRIS, A.; BRUNDU, G.; VALLAINC, D.; FRANCAVILLA, M.; GARCIA.; JOAN ‘Bioremediation of aquaculture wastewater from *Mugil cephalus* (Linnaeus,1758) with different microalgae species’, **Chemistry and Ecology**, v. 33, no. 8, 2017.

ANDRULEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V; GUMBYTE, M. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloopsis* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 83-90, 2014.

APANDI, N.; RADIN-MOHAMED, R.M.S.; AL-GHEETHI, A.; LATIFFI, A.; ARIFIN, S.N.H.; GHANI, P. ‘Phycoremediation of heavy metals in wet market wastewater’, IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, v. 140, 2018.

APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American public health Association. American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, 1998.

ATITALLAH, B.A.; BARKALLAH, M.; HENTATI, F.; DAMMAK, M.; HLIMA, B.H.; FENDRI, I.; ABDELKAFI, S. Physicochemical, textural, antioxidant and sensory characteristics of microalgae-fortified canned fish burgers prepared from minced flesh of common barbel (*Barbus barbus*). **Food Bioscience**, v.30, 2019.

ATITALLAH, A. B.; HENTATI, F.; DAMMAK, M.; HADRICH, B.; FENDRI, I. Effect of microalgae incorporation on quality characteristics and functional and antioxidant capacities of ready-to-eat fish burgers made from common carp (*Cyprinus carpio*). **Applied Science**, v.9, n.9, 2019.

ARASHIRO, L.T.; BOTO-ORDÓÑEZ, M.; STIJN W.H. Van Hulle, Ivet Ferrer, Marianna Garfí, Diederik P.L. Rousseau. Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. **Bioresource Technology**, 2020.

ARIEDE, M.B.; CANDIDO, T.M.; JACOME, A.L.M.; VELASCO, M.V.R.; DE CARVALHO, J.C.M.; BABY, A.R. Cosmetic attributes of algae- a review. **Algal Res**, v.25, 2017.

BANSKOTA, S. S.; ROUMIANA, S.; PATRICK, J.; MCGINN; STEPHEN J. B. O'LEARY. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae Arjun H.. **Journal of Applied Phycology**, v.31, 2019.

BANSKOTA, A.H., SPERKER, S., STEFANOVA, R., MCGINN, P.J., O'LEARY, S.J.B. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. **J. Appl. Phycol**, v.31, 2018.

BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review Abakoura Barka, Christophe Blecker. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, v.20, n.3, 2016.

BATISTA, L. A.P.; GOUVEIA, BANDARRA, N.M.; FRANCO, J.M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products, **Algal Res**, v.2, 2013.

BATISTA, A.P.; NICOLAI, A.; BURSIC, I.; SOUSA, I. RAYMUNDO, A.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M.R. Microalgae as Functional Ingredients in Savory Food Products: Application to Wheat Crackers. **Foods**, v.8, n.611, 2019.

BELLOU, S.; BAESHEN, M.; ELAZZAZY, A.M.; AGGELI, D.; SAYEGH F.; AGGELIS, G. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnol. Adv.**, v.32, 2014.

BERNAERTS, M.M. T.; KYOMUGASHOA, C.; LOOVERENA, N.V.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; MARC, E. HENDRICKXA, A.M. LOEYA, V. Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate Polymers**, v.195, 2018.

BEGUM.; YUSOFF, F. M.D. ; BANERJEE, S. ; KHATOON, H. ; SHARIFF, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v.56, n.13, p.2209-2223, 2016.

BELHAJ, D.; FRIKHA, D.; ATHMOUNI, K.; JERBI, B.; AHMED, M. B.; BOUALLAGUI, Z.; AYADI, H. Box-Behnken design for extraction optimization of crude polysaccharides from Tunisian *Phormidium versicolor* cyanobacteria (NCC 466): Partial characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.105, 2017.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous bluegreen alga, **J. Cell Biol**, v.58, 1973.

BIRCH, D.; SKALLERUD, K.; PAUL, N. Who eats seaweed? An australian perspective, **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, v.31, n.4, 2019.

BÖCKER, L., ORTMANN, S., SURBER, J., LEEB, E., REINEKE, K., & MATHYS, A. Biphase short time heat degradation of the blue microalgae protein phycocyanin from *Arthrospira platensis*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2018.

BOURDON, L.; JENSEN, A.A.; KAVANAGH, J.M.; MCCLURE, D.D. Microalgal production of zeaxanthin. **Algal Research**, v.55, 2021.

BULUT, O.; AKIN, D.; SÖNMEZ, C.; ÖKTEM, A.; YÜCEL, M.; AVNI, H.; ÖKTEM Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents **Journal of Applied Phycology**, 2019.

BUONO, S.; LANGELLOTTI, A. L.; MARTELLO, A.; RINNA, F.; FOGLIANO. Functional ingredients from microalgae. **Food & Function**, v.5, 2014.

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

CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. **Mar. Drugs**, v.17, 2019.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; SRINORASING T.; ATTASAT, S.; NOPHARATANA, A.; BUNNAG, B. Enhanced biomass and phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by a cultivation management strategy: Light intensity and cell concentration, **Bioresource Technology** v.343, 2022.

CHEN, Y.X.; LIUA, X.Y.; XIAOB, Z.; HUANGC, Y.F. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations Bin Liua. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.91, 2016.

CHEN, J.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. Lutein production with wild-type and mutant strains of *Chlorella sorokiniana* MB-1 under mixotrophic growth. **J. Taiwan Inst.Chem**, 2017.

CHENTIR, I.; HAMDI, M.; LIC, S.; DOUMANDJIA, A.; MARKOUD, G. Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain Moncef Nasrib. **Algal Research**, v.35,2018.

CHEW, K.W.; YAP, J.Y.; SHOW, P.L.; SUAN, N.H.; JUAN, J.C.; LING, T.C.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresour Technol**, v.229, 2017.

CHIONG, T.; ACQUAH, C.; LAU, S.Y.; KHOR, E.H.; DANQUAH, M.K. CHAPTER 12 - Microalgal-Based Protein By-Products: Extraction, Purification, and Applications. Dhillon, Gurpreet Singh BT - Protein Byproducts. **Academic Press**, 2016.

CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; TRIVEDI, K.; GEORGE, B.; MAURYA, R.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresour Technol**, v.180, 2015.

CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for Biofuels**, v.10, n.1, 2017.

COULOMBIER, N.; JAUFFRAIS, T.; LÉBOUVIER, N. Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. **Mar. Drugs**, v.19,n.10, 2021.

CUELLAR-BERMUDEZ, S.P.; AGUILAR-HERNANDEZ, I.; CARDENAS-CHAVEZ, D.L.; ORNELASSOTO, N.; ROMERO-OGAWA, M.A.; LEON, N. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. 2015.

DALIRY, S.; HALLAJISANI, A.; MOHAMMADI ROSHANDEH, J.; NOURI, H.; GOLZARY A. Investigação da condição ideal para o crescimento de microalgas de *Chlorella vulgaris*. **Global J Environ Sci Manage**, 2017.

DANTAS, D.M.M.; OLIVEIRA, C.Y.B.; COSTA, R.M.P.; CUNHA, M.G.C.; GALVEZ, A.O.; BEZERRA, R.S. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. **Food Science and Technology International**, v.25, n.4, 2019.

DINESHBABU, G.; GOSWAMI, G.; KUMAR, R.; SINHA, A.; DAS, D. Microalgae—nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. **Journal of Functional Foods**, v.62,2019.

DONOT, F., FONTANA, A., BACCOU, J. C., & SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v.87, n.2, 2012.

EL-BAZ, F.K.; ABDO, S.M.; HUSSEIN, A.M.S. Microalgae *Dunaliella salina* for use as food supplement to improve pasta quality. **Int J Pharm Sci Rev**, v.46, 2017.

ENZING, C.; PLOEG, M.; SIJTISMA, L. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. **Jrc. Scientific and policy reports**, 2014.

FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS). U.S. **Food and Drug Administration**, 2(February), 81536, 2014.

FSANZ, Australia New Zealand Food Standards Code – Standard 1.5.1 – **Novel foods**, F2015L00403, <https://www.legislation.gov.au/Details/F2015L00403>, 2021.

FELLER, R., MATOS, Â. P.; MAZZUTTI, S.; MOECKE, E. H. S.; TRES, M. V.; DERNER, R. B.; JUNIOR, A. F. Polyunsaturated ω -3 and ω -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2018.

FERREIRA, A. S.; FERREIRA, S. S.; CORREIA, A.; VILANOVA, M.; SILVA, T. H.; COIMBRA, M. A.; NUNES, C. Reserve, structural and extracellular polysaccharides of *Chlorella vulgaris*: A holistic approach. **Algal Research**, v.45, 2020.

FRANCÉS, E.M.M; OÑATE, C.E. Cyanobacteria and Microalgae in the Production of Valuable Bioactive Compounds. **Microalgal Biotechnology**, 2018.

GARCIA, J.L.; VICENTE, M.; GALAN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Biotechnology**, v.10, 2017.

GARCIA-SEGOVIA, P.; PAGAN-MORENO, M.J.; LARA, I.F.; Martinez-Monzo, J. Effect of microalgae incorporation on physicochemical and textural properties in wheat bread formulation. **Food Sci Technol Int.**, 2017.

GROSS, M., HENRY, W., MICHAEL, C., WEN, Z. Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. **Bioresource Technology**, v.150, p.195-201, 2013.

GHEYSEN, L., BERNAERTS, T., BRUNEEL, C., GOIRIS, K., VAN DURME, J., VAN LOEY, A., FOUBERT, I. Impact of processing on n-3 LC-PUFA in model systems enriched with microalgae. **Food Chemistry**, v.268, 2018.

GUIHÉNEUF, F.; STENGEL, D.B. Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. **Algal Research**, v.10, 2015.

HAFSA, M.B.; ISMAIL, M.B.; GARRAB, M.; ALY, R.; GAGNON, J.; NAGHMOUCHI, K. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. **J. Serb. Chem. Soc.**, v.82, n.5, 2017.

HAYES M., SKOMEDAL H., SKJÅNES K., MAZUR-MARZEC H., TORUŃSKA-SITARZ A., CATALA M., ISLETEN HOSOGLU M. AND GARCÍA-VAQUERO M. Microalgal

proteins for feed, food and health. In: Gonzalez-Fernandez C. and Muñoz R. (Ed.). *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. **Woodhead Publishing**, 2017.

HLAING, S.A.A.; SADIQ, M.B.; KUMAR, A. Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate, **Food Sci Technol**, 2019.

HSIEH-LO, M., CASTILLO, G., OCHOA-BECERRA, M. A., MOJICA, L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. **Algal Research**, v.42, 2019.

HU, I.C. Production of potential coproducts from microalgae. in: *Biofuels from Algae*, **Elsevier**, 2019.

JACOB-LOPES, E.; MARONEZE, M.M.; DEPRÁ, M.C.; SARTORI, R.B.; DIAS, R.R.; ZEPKA, L.Q. Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. **Curr. Opin. Food Sci**, v.25, 2018.

JANKOWSKA, E. ; SAHU, A. K. ; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.75, pp.692-709, 2017

KAMYABA, H.; CHEW TIN LEEB, C.T.; CHELLIAPANA, S.; KHADEMIC,T.; TALAIEKHOZANID, A.; S REZANIAE, S. Role of Microalgal Biotechnology in Environmental Sustainability-A Mini Review. **Chemical engineering transactions**, v.72, 2019.

KANG, Q.; CHEN, S.; LI, S.; WANG, B.; LIU, X.; HAO, L.; LU, J.; Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.124, 2019.

KHEMIRI, S.; KHEIFI, N.; NUNES, M.C.; FERREIRA, A.; GOUVEIA, L.; SMAALI, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. **Algal Research**, v.50, 2020.

KOCHERT,G. **Carbohydrate determination by the phenol- sulfuric.** in: HELLEMBUST,J.A,GRAIGIE,J.S.(eds). *Handbook of Phycological Methods.Physiological and Biochemical methods*.Cambridge: Cambridge: Cambridge University 1978.p.95-97.

KOYANDEA, K.; CHEWA, W.; RAMBABUB, K.; TAOC, Y.; CHUD, D.; SHOWA, P.L. Microalgae: A potential alternative to health supplementationfor humansApurav Krishna **Food Science and Human Wellness**, v.8, 2019.

KUMAR, B. R.; DEVIRAM, G.; MATHIMANI, T.; DUC, P. A.; PUGAZHENDHI, A. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019.

LAFARGA, T.; MAYRE, E.; ECHEVERRIA, G.; VIÑAS, I.; VILLARÓ, S.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F.G.; CASTELLARI, M.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Potential of the microalgae

Nannochloropsis and Tetraselmis for being used as innovative ingredients in baked goods, **LWT**, Volume 115, 2019.

LAFARGA, T.J.M. FERNÁNDEZ-SEVILLA, C. GONZÁLEZ-LOPEZ, F.G. ACÍEN-FERNÁNDEZ. Spirulina for the food and functional food industries, **Food Res. Int.**, 2020.

LAFARGA, T. Cultured Microalgae and Compounds Derived Thereof for Food Applications: Strain Selection and Cultivation, Drying, and Processing Strategies. **Food reviews international**, 2019.

LIBERMAN, N.G., OCHBAUM, G., BITTON, R., ARAD, M.S. Antimicrobial hydrogels composed of chitosan and sulfated polysaccharides of red microalgae. **Polymer**, v.215, 2021.

LI, S.; ZHAO, S.; YAN, S.; QIU, Y.; SONG, C.; LI, Y.; KITAMURA, Y. Food processing wastewater purification by microalgae cultivation associated with high value-added compounds production -A review. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.27. 2019.

LIU, T.D.; OLADOJA, N.A. Nutrient recovery from wastewater and reuse in agriculture: a review. **Environ. Chem. Lett.**, v.19, 2021.

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

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951.

LUCAS, B.F.; DE MORAIS, M.G.; SANTOS T.D.; COSTA, J.A.V. *Spirulina* for snack enrichment: nutritional, physical and sensory evaluations. **Food Sci Technol**, v.90, 2018.

KUMAR S.; KUMAR, R.; ANJU, D.; KUMARI, A. P. Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. **Journal of basic microbiology**, 2021.

MAADANE, A., MERGHOUB, N., AINANE, T., EL ARROUSSI, H., BENHIMA, R., AMZAZI, S., BAKRI, Y., WAHBY, I Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **J. Biotechnol**, v.215, 2015.

MAHATA, C.; DAS, P.; KHAN, S.; THAHER, M.I.A.; ABDUL QUADIR, M.; ANNAMALAI, S.N.; AL JABRI, H. The Potential of Marine Microalgae for the Production of Food, Feed, and Fuel (3F). **Fermentation**, v.8, n.31, 2022.

MARTEL, I.J.; POZA, S.G.; MARTEL, G.R.; RICO, M.; OLIVARES, C.A.; PINCHETTI, J.L.G. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains. **Journal of Food Quality**, 2017.

MATOS, P.A.; FELLER, R.; SIEGEL, E.H.; OLIVEIRA, M.J.V.; JUNIOR, A.F. DERNER, R.B.; ERNANI SANT'ANNA, E.S. Chemical Characterization of Six Microalgae with Potential Utility for Food Application. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.93, n.7, 2016.

MATOS, J.; CARDOSO, C.; BANDARRA, N.M.; AFONSO, C. Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. **Food & Function**, v.8, p. 2672–2685, 2017.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v.13, n.1, 2013

MOLINO, A.; RIMAURO, J.; CASELLA, P.; CERBONE, A.; LAROCCA, V.; CHIANESE, S.; KARATZA, D.; MEHARIYAA, S.; FERRAROD, S.; HRISTO, S. FOROUD. Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using *generally recognized as safe* solvents and accelerated extraction. **Journal of Biotechnology**, v.283, 2018.

MONFET, E.; UNC, A. Defining wastewaters used for cultivation of algae. **Algal Res**, v.24, 2017.

MONTONE, C. M.; CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; LA BARBERA, G.; PIOVESANA, S.; ZENEZINI CHIOZZI, R.; LAGANÀ, A. Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae. **Anal. Bioanal. Chem**, v.410, n.15, 2018.

NADATHUR, S.R.; WANASUNDARA, J.P.; SCANLIN, L. Proteins in the diet: Challenges in feeding the global population, **Sustainable protein sources**, 2017.

NILOOFAR HOSSEINKHANI, N.; MCCAULEY, J.I.; RALPH, P.J. Key challenges for the commercial expansion of ingredients from algae into human food products. **Algal research**, v.64, 2022.

ODJADJARE, T.; MUTANDA.; OLANIRAN, A.O. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review Ejo v w o k o g h e n e C. **Crit Rev Biotechnol**, v.37, n.1, 2017.

OKOLIE, C.L.; MASON, B.; CRITCHLEY, A.T. Seaweeds as a Source of Proteins for Use in Pharmaceuticals and High-Value Applications, in: Hayes, M. (Ed.), **Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture: Sources, Applications and Advances**. Wiley-Blackwell, Hoboken, 2019.

OLIVARRIA, F.D.; MILLAN, C.E.; ELIAS, A.L.; ROBINSON, K.G.M.; BAEZA, A.M.; CORDOVA, L.F.M.; OCANA, F.E.; HOLGUIM, J.E.V. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. **Food Hydrocolloids**, v.75, 2018.

PADILHA, C. V. S. *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106–115, 2017.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. *CCNM 1077*. **Bioresource Technology**, v.156, 2014.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MISHRA, S. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v.179, 2015

PAN-UTAI, W.W.; KAHAPANA, S. Iamtham, Extraction of C-phycoerythrin from *Arthrospira* (Spirulina) and its thermal stability with citric acid, **J. Appl. Phycol**, v.30, n.1, 2018.

PEREIRA, A.M.; LISBOA, C.R.; SANTOS, T.D.; COSTA, J.A.V. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions, **J Food Sci Technol**, v.56, n.10, 2019.

PINTO, L.F.R.; FERREIRA, G.F.; TASIC, M. **Microalgae** Editor(s): Charis M. Galanakis, Academic Press, 2021.

POOJARY, F.J.; BARBA, B.; ALIAKBARIAN, F.; DONSI, G.; PATARO, D.A.; DIAS, P.J. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds, **Marine Drugs**, v.14, n.11, 2016.

PÔJO, V. I. N. C. **Seleção de microalgas com potencial de produção de biocombustíveis**. Tese de doutorado. 2016.

POPRAC, P., JOMOVA, K., SIMUNKOVA, M., KOLLAR, V., RHODES, C.J., VALKO, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trend Pharmacol**, v.38, n.7, 2017.

RAMÍREZ, M.; LUIS GUILLERMO, L.; RAGAGNIN DE MENEZES, C.R.; ZEPKA, L.Q. LOPES, E.J. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 7-17, 2015.

RAMÍREZ-MÉRIDA, L.G.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. **Current production of microalgae at industrial scale**. In Recent Advances in Renewable Energy. Edited by Pires JCM. Betham science Publishers, 2018.

RANDHIR, A.; LAIRD, D. W.; MAKER, G.; TRENGOVE, R.; MOHEIMANI, N. R. Microalgae: A potential sustainable commercial source of sterols. **Algal Research**, v.46, 2020.

RAWAT, R.; RANITH KUMAR, T.; MUTANDA, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, 2013.

REGULATION (EU), 2015/2283 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 25 November 2015 on Novel Foods, Amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and Repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001, 2015.

RENUKA, A.; BHISHEK, G.; PRASANNAB, R.; FAIZAL, P.S. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges Nirmal **Bux Biotchnology advances**, n.36, 2018.

RITALA, A.; HAKKINEN, S.T.; TOIVARI, M.; WIEBE, M.G. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. **Front. Microbiol**, v.8, 2017.

RZYMSKI, P.; JAŚKIEWICZ, M. Microalgal food supplements from the perspective of Polish consumers: patterns of use, adverse events, and beneficial effects. **J. Appl. Phycol**, v.29, 2017.

RYCKEBOSCH, E.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species **Algal Research**, 2014.

SARTORI, R.B.; SIQUEIRA, S.F.; MARONEZE, M.M.; FAGUNDES, M.B.; WAGNER, R.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. Microalgal secondary metabolites: Effect of climatic variables, seasons, and photocycles on the biogenesis of volatile organic compounds (VOCs). **J. Appl. Phycol**, v.33, 2021.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, A.; HASHEM, E.F.A.; ALLAH, A. Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine, **Saudi J. Biol. Sci.**, 2017.

SCAGLIONI, P. T. *et al.* Inhibition of enzymatic and oxidative processes by phenolic extracts from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, 2018.

SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P.A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. **Bioresour Technol**, v.102, 2011.

SCHÜLLER, L.M.; SANTOSA, T.; PEREIRA, H.; DUARTE, P.; KATKAM, N.; GANGADHARA, C.F.; SCHULZEC, P.S.C.; BARREIRA, L.; VARELA, J.C.S. Improved production of lutein and β -carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis* sp. CTP4. **Algal research**, v.45, 2020.

SENGUPTA, S.; KOLEYB, H.; DUTTAB, S.; BHOWALA, J. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina platensis* (SP) fortified functional soy yogurts on diet-induced hypercholesterolemia. **Journal of Functional Foods**, v.48, 2018.

SIERRA, L.S.; STOYKOVAB, P.; NIKOLOV, Z.L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products, **Algal research**, v.36, 2018.

SILVEIRA, J.F.M.; BURKERT, J.A.V.; COSTA, C.A.V.; BURKERT, S.J.; KALIL. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design, **Bioresour. Technol**, v.98, 2007.

SINGH, S.K.; KAUR, R.; BANSAL, A.; KAPUR, S.; SUNDARAM, S. Sundaram. Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds, **Biotechnological Production of Bioactive Compounds**, 2020.

SOVOVÁ, H.; STATEVA, R.P. New developments in the modelling of carotenoids extraction from microalgae with supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.148, 2019.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MH MASJUKI, MH.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.55, 2016.

STACK, J.; AURÉLIEN, V. GOUICA , P.R.; TOBINA , F.G.; DAGMAR, B.; STENGELB; RICHARD, G.G.J. Protein extraction and bioactive hydrolysate generation from two microalgae, *Porphyridium purpureum* and *Phaeodactylum tricornutum* **J. Food Bioact**, v.1, 2018.

TING, H.; HAIFENG, L.; SHANSHAN, M.; ZHANG, Y.; ZHIDAN, L.; NA, D. Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. **Int J Agric & Biol Eng**, v.1, n.1, 2017.

TOPUZ, O.K.; KAYA, A.; ALP, A.C. Effect of extraction variables on the omega-3 eicosapentaenoic acid (epa) content of (*nannochloropsis oculata*) microalga oil, Scientific Bulletin. **Series F. Biotech**, 2016.

VAZ, S.B.; MOREIRA, J.B.; DE MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Curr. Opin. Food Sci**, v.7, 2016.

VALENZUELA, C.D.N.; ORTIZ, A.V.; SHELTON, L.M.; EDEZA. M.J.; LOPEZ, J.R.; FLORES, M.V. BAEZ, L.J.G. Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalgae species exhibit antioxidant and anti-aging activity, **J Appl Phycol**, v.29, 2017.

VENKATESAN, J.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. **Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances**, Chapter In: SK Kim (Ed.), Handbook of marine microalgae: biotechnology advances, Academic Press, Elsevier Science, Massachusetts, United States, 1 – 9, 2015.

United States Food & Drug Administration (US FDA), GRAS Notices. <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>, 2021.

VILLARÓ, S.; CIARDI, M.; -ESPAÑA, A.M.; ZURANO, A.S.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, G.; LAFARGA, T. Microalgae Derived Astaxanthin: Research and Consumer Trends and Industrial Use as Food. **Foods**, v.10, n.10, 2021.

WANG, L.; ZHANG, B. **Integrated Wastewater Management and Valorization Using Algal Cultures**, Editor(s): Goksel N. Demirer, Sibel Uludag-Demirer, Elsevier, 2022.

WANG, S.K.; WANG, X.; MIAO, J.; TIAN, Y.T. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v.253, 2018.

WOLLMANN, F.; DIETZE, F.; ACKERMANN, J.U.; THOMAS BLEY, T. WALTHER, T.; STEINGROEWER, J.; KRUIJATZ, F. Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. **Eng Life Sci**, v.19, 2019.

XIE, J.; CHEN, X.; WU, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; ZHANG, L.; TANG, Y. J.; WEI, D. Antihypertensive Effects, Molecular Docking Study, and Isothermal Titration Calorimetry Assay of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from *Chlorella vulgaris*. **J. Agric. Food Chem**, v.66, n.6, 2018.

YARKENT, Ç.; GÜRLEK, C.; ONCEL, S.S. Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. **Sustain. Chem. Pharm**, v.17, 2020.

YU, M.; CHEN, M.; GUI, J.; HUANG, S.; LIU, Y.; SHENTU, H.; ... ZHANG, Y. Preparation of Chlorella vulgaris polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

YU, J.; HU, Y.; XUE, M.; DUN, Y.; LI, S.; PENG, N.; LIANG, Y.; ZHAO, S. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.26, n.7, 2016.

YING, D.; TANG, Y.; SHIONG, K.; KIT, K.; CHEW, W.; TAO, Y.; HO, S.; SHOW, P.L. Potential Utilization of Bioproducts from Microalgae for the Quality Enhancement of Natural Products. **Bioresource Technology**, 2020.

ZAMUZ, S.; PURRIÑOS, L.; GALVEZ, F.; ZDOLEC, N.; MUCHENJE, V.; BARBA, F. J.; LORENZO, J. M. Influence of the addition of different origin sources of protein on meat products sensory acceptance. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2019.

ZHU, L.D.; HILTUNEN, E. Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, v.54, 2016.

MICROALGAS CULTIVADAS EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Roberta Conceição Ribeiro Varandas

Cristiane Francisca da Costa Sasi

Marta Maria da Conceição

RESUMO

A preocupação com as questões ambientais tem se tornado cada vez mais evidente. Em vista disso, uma forma de reduzir essa preocupação é a utilização de meios alternativos como fonte nutriente para o cultivo de microalgas. O presente estudo teve como objetivo cultivar microalgas em meios alternativos para produção de biomassa como fonte de compostos bioativos de interesse à indústria de alimentos. Foram cultivadas 8 espécies de microalgas em meios alternativos preparados a partir de: biocomposto de hortifruti (BH), resíduo de malte (RM), fécula de mandioca (FE) e uma mistura de biocomposto de hortifruti e resíduo de malte (MIX). E ainda resíduo de malte substituindo em diferentes concentrações o meio sintético. As 8 espécies estudadas demonstraram diferentes respostas de crescimento em cada um dos meios testados. As melhores respostas foram observadas para *Scenedesmus ecornis*, com maior resultado para o cultivo no meio alternativo com biocomposto de hortifruti na concentração de 1%. A *Scenedesmus ecornis* (D545BH), apresentou maior rendimento em biomassa (583 mg.L⁻¹) e maior produtividade (41,6 mg.L⁻¹) dentre todas as espécies. O Teor mais significativo de proteínas foi observado para a *Spirulina platensis* cultivada em meio com resíduo de malte de cevada com 56,5 g 100g⁻¹. Os níveis mais altos de carboidratos foram encontrados na *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em meio MIX (38,8 g 100g⁻¹). As maiores concentrações lipídicas foram observadas nos cultivos de *Actinastrum hantzschii* (D467WC-BH) com 24 g 100g⁻¹ e na *Monoraphidium arcuatun* (D459WC-RM) 25 g 100g⁻¹. Variações nas composições de ésteres foram observadas em todas as espécies quando cultivadas em diferentes meios, embora, em geral ocorreram maiores concentrações de ésteres polinsaturados e monoinsaturados. A espécie *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em meio mix foi a que obteve o maior teor de polissacarídeo (15%). Seguida da espécie *Scenedesmus ecornis* (D545WC), cultivada em meio BH obteve 13,1%. Os meios alternativos estudados demonstraram potencial para cultivo de microalgas e ainda seus compostos bioativos possuem potencial para serem utilizados na indústria de alimentos.

Palavras-chave: resíduo; cultivo; bioativos

ABSTRACT

Concern about environmental issues has become increasingly evident. In view of this, a way to reduce this concern is the use of alternative means as a nutrient source. The present study aimed to cultivate microalgae in alternative media for biomass production as a source of bioactive compounds of interest to the food industry. Eight species of microalgae were cultivated in alternative media prepared from: hortifruti biocompost (BH), malt residue (RM), cassava starch (FE) and a mixture of hortifruti biocompost and malt residue (MIX). And still malt residue replacing in different concentrations the synthetic medium. The 8 species grew in each of the media responses tested. The best responses were observed for *Scenedesmus ecornis*, with greater results for cultivation in the alternative medium with vegetable biocomposite at a concentration of 1%. A *Scenedesmus ecornis* (D545BH) showed the highest biomass yield (583 mg.L⁻¹) and highest productivity (41.6 mg.L⁻¹) among all species. The most significant protein content was observed for *Spirulina platensis* grown in a medium with barley malt residue with 56.5 g 100g⁻¹. The highest levels of carbohydrates were found in *Xanthonema sp.* (D464WC) grown in MIX medium (38.8 g 100g⁻¹). The highest lipid concentrations were observed in

cultures of *Actinastrum hantzschii* (D467WC-BH) with 24 g 100g⁻¹ and in *Monoraphidium arcuatun* (D459WC-RM) 25 g 100g⁻¹. Variations in ester compositions were observed in all species when cultivated in different media, although, in general, there were higher concentrations of polyunsaturated and monounsaturated esters. The species *Xanthonema* sp. (D464WC) grown in mix medium had the highest polysaccharide content (15%). Followed by the species *Scenedesmus ecornis* (D545WC), cultivated in BH medium, obtained 13.1%. The alternative media studied showed potential for microalgae cultivation and their bioactive compounds have the potential to be used in the food industry.

Key words: residue; cultivation; bioactive

INTRODUÇÃO

A crescente mudança no estilo de vida e a rápida urbanização da população global promoveram o aumento na produção de alimentos e, como consequência negativa, a elevação da geração de resíduos de várias fontes industriais, agrícolas e domésticas (SHARMA *et al.*, 2020), como também os danos ambientais provocados pelo descarte inadequado destes resíduos, que muitas vezes acabam por se tornar potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (GAO *et al.*, 2017).

Com vistas a reduzir estes impactos, métodos biológicos para o tratamento de resíduos emergem como uma abordagem de valorização promissora. Neste contexto, o cultivo de microalgas tem sido amplamente empregado como recurso importante para o desenvolvimento de abordagens sustentáveis e ambientalmente amigáveis à agricultura (RENUKA *et al.*, 2018). As microalgas constituem um grupo diversificado de microrganismos unicelulares, fotossintetizantes que podem facilmente ser cultivadas em ambientes dulcícolas, marinho e salobra (MOBIM; ALAM, 2017). Esses microrganismos podem crescer em condições de cultura fotoautotrófica e heterotrófica ou mixotrófica mediante a adição de compostos orgânicos como fonte de carbono no meio de cultura (KOYANDE *et al.*, 2019).

O cultivo e produção de biomassa microalgal apresenta diversas vantagens quando comparadas ao cultivo vegetal: podem ser cultivadas em pequenos espaços e em áreas inadequadas à agricultura tradicional; não necessitam do uso de agrotóxicos para controle de pragas; apresentam produção contínua durante o ano; possuem importância social, especialmente na geração de empregos e renda; requerem pequena quantidade de nutrientes, e não competem com o uso do solo para agricultura (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Por meio da eficiente conversão de substâncias como carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, ferro e oligoelementos em matéria orgânica, estes microrganismos se nutrem em uma

velocidade muito superior à das plantas terrestres e produzem inúmeros compostos bioativos, de interesse para a indústria alimentícia (MIMOUNI *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2017).

Apesar destas vantagens, estudos reportam a necessidade de otimizar os sistemas de cultivo convencionais com propósito de produzir biomassa em larga escala e aumentar a lucratividade comercial, e também apontam que a estratégia mais adequada para aumentar a relação custo-benefício é o emprego de recursos alternativos, sustentáveis e de baixo custo, como a biotransformação de resíduos (BARONE *et al.*, 2019).

Para tanto, diversas pesquisas tem empregado substratos alternativos para elaboração de meios para o crescimento microalgal, como: como estrume de frango cru (CALIXTO *et al.*, 2016), água residual de processamento de mandioca (CARVALHO; BORGHETTI; CARTAS, 2018), esgoto doméstico (KLIGERMAN; BOUWER, 2015; CALIXTO *et al.*, 2016), vinhaça (CHOIX *et al.*, 2018), hidrolisados de palha de arroz (JOE *et al.*, 2015), águas residuais de processamento de alimentos (LI *et al.*, 2019), biocomposto de frutas e verduras (MEDEIROS *et al.*, 2020; CALIXTO *et al.*, 2016).

A utilização destes recursos, combinado à grande diversidade de cepas microalgais existentes permitem que biomoléculas valiosas, como proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos, sejam produzidas em altos rendimentos (LEVASSEUR; PERRÉ; POZZOBON, 2020). Diante disso, o presente estudo objetivou-se investigar o cultivo de microalgas em meios alternativos associado a produção de biomassa fonte de compostos bioativos de interesse à indústria de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e cultivo de espécies em condições controladas

As espécies de microalgas *Xanthonema sp.* (D464WC), *Ankistrodesmus falcatus* (D245WC), *Monoraphidium arcuatun* (D459WC), *Spirulina máxima* (D8Z), *Spirulina platensis* (D9Z), *Scenedesmus ecornis* (D545WC), *Actinastrum hantzschii* (D467WC) e a *Kirchneriella concorta* (D498WC) da coleção do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas na Universidade Federal da Paraíba (LARBIM / UFPB) (Tabela 1) e foram cultivadas em meios alternativos preparados a partir de: biocomposto de hortifruti (BH), resíduo de malte (RM), fécula de mandioca (FE) e uma mistura de biocomposto de hortifruti e resíduo de malte (MIX). O meio Zarrouk (Zarrouk, 1966) e o meio WC (Guillard e Lorenzen, 1972) foram utilizados como controle (C).

Tabela 1. Espécies de microalgas selecionadas do banco de microalgas do LARBIM/UFPB para cultivo em meios alternativos derivados de resíduos agroindustriais.

Lineages	Espécie/gênero	Procedência
D464WC	<i>Xanthonema sp.</i>	Viveiro de carcinicultura pós-despesca, Aldeia Tramataia, PB
D245WC	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Riacho das Folhas, Cruz do Espírito Santo, PB
D467WC	<i>Actinastrum hantzschii</i>	Fonte dos milagres-parque nacional, PI
D459WC	<i>Monoraphidium arcuatun</i>	Açude Jardim do Seridó, PB
D8Z	<i>Spirulina máxima</i>	UFF, RJ
D9Z	<i>Spirulina platensis</i>	UFF, RJ
D545WC	<i>Scenedesmus ecornis</i>	Parque Nacional de Jericoacara, CE
D498WC	<i>Kirchneriella concorta</i>	Açude fazenda Panati, Taperoá, PB

As microalgas selecionadas foram cultivadas inicialmente em balões de vidro de 250 mL com 150 mL dos meios alternativos para os diferentes meios alternativos e o meio controle:

- Efluente de fécula de mandioca (FE) nas concentrações de 100%, 50% e 25% substituindo pelo respectivo meio controle (C); Com adição de nitrato e fosfato.
- Extrato biocomposto de hortifruti (BH), foram realizados experimentos adicionando 1,5%, 1% e 0,5% do extrato para cada litro de água destilada. Com e sem adição de nitrato e fosfato;
- Extrato biocomposto do resíduo de malte (RM), foram realizados experimentos adicionando 1,5%, 1% e 0,5% do extrato para cada litro de água destilada. Com e sem adição de nitrato e fosfato;
- Para o MIX (mistura extrato de biocomposto de hortifruti e/ou biocomposto do resíduo de malte de cevada (RM) com 0,5% de cada extrato para cada litro de água destilada) substituindo pelo meio controle nas concentrações de 100%, 50% e 25%.

Para obtenção de biomassa, os cultivos foram realizados em bancada em balões de 6L contendo 5L de meio. O crescimento das culturas foi acompanhado através da fluorescência "in vivo" (Turner Design Fluorometer). Os seguintes parâmetros de crescimento foram determinados: velocidade de crescimento (k), expressa como o número de divisões celulares

por dia (STEIN,1973), duração do cultivo (em dias), rendimento final de biomassa e a produtividade de biomassa. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

Os cultivos foram realizados em triplicatas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia ($150 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas. A concentração de partida para o cultivo das microalgas selecionadas foi de 2×10^4 células mL^{-1} .

Preparação dos meios de cultura

O biocomposto de frutas e hortaliças (BH) foi preparado a partir de compostagem resíduos de frutas e vegetais que sobraram da distribuição central adquiridos da EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas) localizado no município de João Pessoa – PB.

O biocomposto do resíduo de malte de cevada (RM) foi preparado a partir do resíduo de malte fornecido por uma cervejaria artesanal (Turmalina), localizada no município de Cabedelo. No laboratório foi realizado a compostagem do malte por 90 dias e posteriormente a preparação do extrato.

O soro da fécula de mandioca (SFM) foi cedido pela indústria alimentícia Da terra, localizada no município de Santa Rita-PB. O resíduo foi filtrado em filtros de fibra de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro, seguido de esterilização em autoclave e ajuste do pH para 7 com solução de Hidróxido de Sódio a 0,1 N.

Na preparação final dos meios foram adicionados 1,5%, 1% e 0,5% do extrato do biocomposto de hortifrúti (BH) e do biocomposto de malte (RM) para cada litro de água destilada estéril, com e sem a adição de soluções de nitrato e fosfato (1 mL. L^{-1}). Para fécula de mandioca (FE) as espécies foram testadas nas concentrações de 100%, 50% e 25% desse meio, sendo as diluições efetuadas com os respectivo meios controle (C). Para o mix (biocomposto hortifruti + biocomposto do resíduo de malte – 0,5% de cada para cada litro de água destilada) espécies foram testadas nas concentrações de 100%, 50% e 25% sendo as diluições efetuadas com os respectivo meios controle (C).

Análises físicas e químicas

Foram realizadas determinações (em triplicata) de: proteínas, com leituras espectrofotométricas a 485nm segundo a metodologia de Lowry et al. (1951); carboidratos, de acordo com o método de Kochert (1978); lipídios totais, segundo a metodologia de Bligh Dyer (1959); Umidade e cinzas, de acordo com o método AOAC (2019). O perfil de ácidos graxos

das espécies cultivadas nos meios alternativos testados foi determinado por cromatografia a gás, usando os procedimentos adaptados pra microescala descritos por Menezes et al. (2013), e os ésteres metílicos foram e expressos em percentuais (%). Hlaing et al. (2019). Análises de nitrato (método do ácido fenoldissulfônico) e fosfato (método do ácido ascórbico) também foram realizadas em cada uma das condições testadas, empregando-se a metodologia do Standard Methods (APHA, 1998) dos meios alternativos.

A extração de polissacarídeo foi obtida utilizando quatro metodologias com extrações diferentes: alcalina, água quente, ultrassom e água quente com ultrassom descritas por Yu *et al.*, (2019). A extração da proteína residual do polissacarídeo foi realizada pelo método SEVAGE (WU *et al.*, 2017). O perfil de monossacarídeos foi determinado por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PATEL *et al.*, 2013). Após o extrato ser obtido através da metodologia de Dong *et al.*, (2016).

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em Analisador Térmico Shimadzu, massa de 10 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL/min, da temperatura ambiente até 700 °C.

Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo teste HSD Tukey ($p < 0,05$) pelo software Statistica 10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento dos cultivos

Os resultados relativos às análises do teor de nitrato foi de $60 \pm 0,1$ mg L⁻¹ para o meio BH, já para o meio com FE o teor foi de $40 \pm 0,17$ mg L⁻¹ o meio RM teve como resultado $45 \pm 0,14$ mg L⁻¹. Calixto *et al.* (2016), encontraram valores similares de nitrato em meio de cultivo preparado com biocomposto hortifrúti. Os teores de fosfato, por sua vez, foram de 29,5 mg L⁻¹ no meio BH, 3 mg L⁻¹ para o meio FE e 20 mg L⁻¹ para o meio RM.

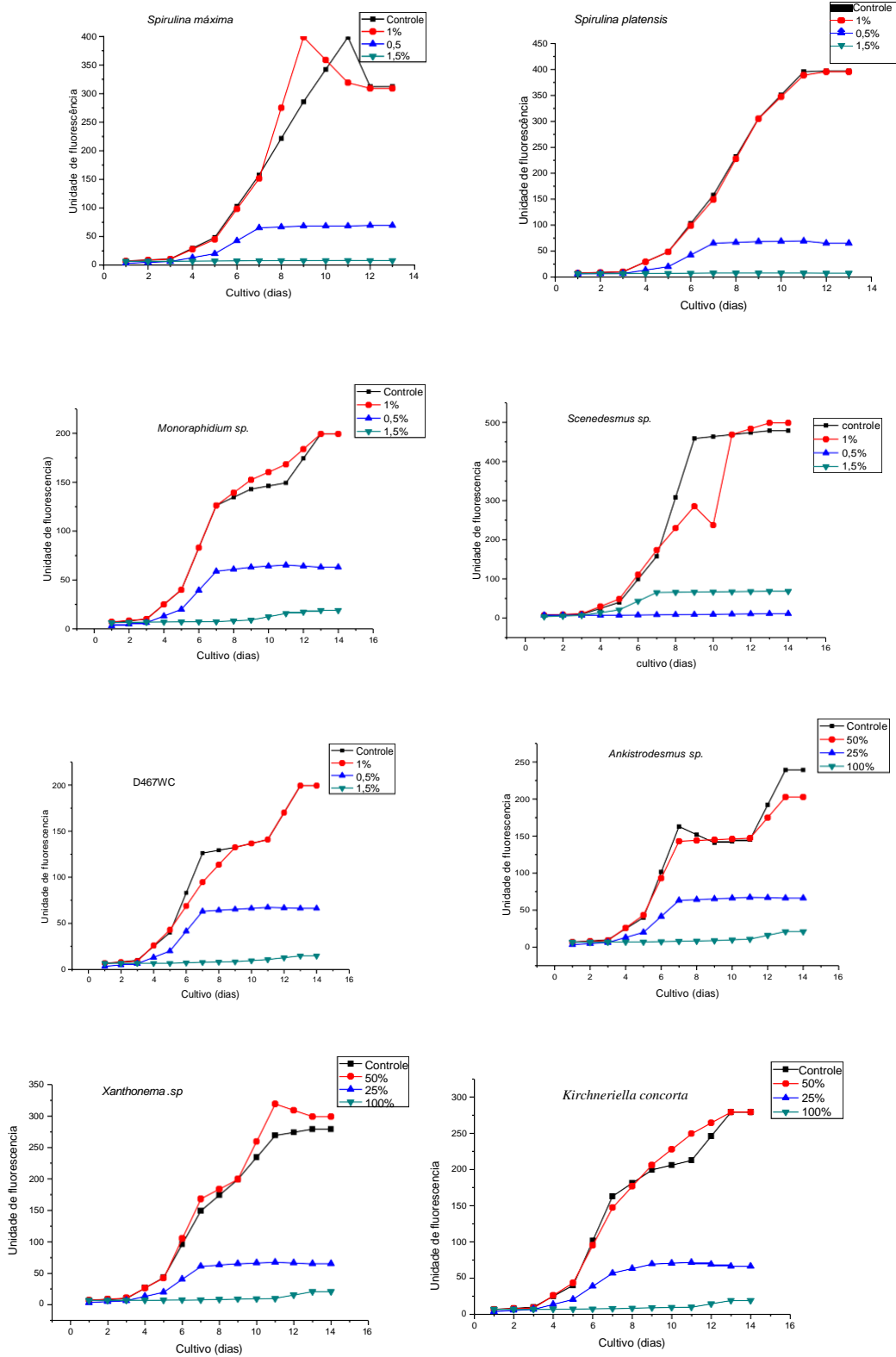
Os nutrientes desempenham um papel importante nos meios de cultura para produção de biomassa a partir de microalgas (KLIGERMAN; BOUWER, 2015; KHAN *et al.*, 2018), sendo o nitrato e o fosfato os principais nutrientes. Esses compostos são responsáveis por 10 a 20% da biomassa das microalgas (KHAN *et al.*, 2018), porém, quantidades consideráveis de

micronutrientes também se constituem requisitos nutricionais importantes nos cultivos desses organismos.

A formulação de meios de cultivo baseados em resíduos diversos se mostra uma saída eficiente para diminuir os custos de produção de biomassa de microalgas. O uso de resíduos orgânicos como fonte de nutrientes para a produção microalgas tem sido investigado em vários estudos com diferentes resíduos que vão desde resíduos alimentares (KWAN *et al.*, 2015); Hidrolisado de palha de arroz (SIBI, 2015); Hidrolisado de sorgo doce (SIBI, 2015); Biocomposto de hortifruti (CALIXTO *et al.*, 2016); água residual de processamento de mandioca (CARVALHO; BORGHETTI; CARTAS, 2018);; vinhaça (CHOIX *et al.*, 2018), resíduos de fazendas leiteiras (HENA *et al.*, 2015); resíduos de bovinocultura (ZHU *et al.*, 2016); soro de leite (BENATAHAR *et al.*, 2019).

Os experimentos efetuados (Figura 1) com meios preparados a partir dos diferentes resíduos utilizados tiveram duração de 13 dias para as espécies *Spirulina platensis* (D9Z) e *Spirulina máxima* (D8Z) e para as demais espécies a duração foi de 14 dias. As 8 espécies estudadas demonstraram diferentes respostas de crescimento em cada um dos meios testados. As melhores respostas foram observadas para *Scenedesmus ecornis*, com maior resultado para o cultivo no meio alternativo com BH na concentração de 1%. Para a *Spirulina platensis* a melhor resposta foi obtida para concentração de 1%. Já para a *Spirulina máxima* os melhores resultados foram para o meio controle e o meio 1% não ocorrendo diferença significativa entre eles.

Figura 1. Curvas de crescimento das espécies estudadas nas diferentes concentrações de RM, FE, MIX e BH e em meio WC e Zarrouk (Controle).



As espécies testadas mostraram variações na cinética de crescimento (Tabela 2), os melhores desempenhos foram para os cultivos da D545WCBH (*Scenedesmus ecornis*), D9ZRM (*Spirulina platensis*) e D8ZRM (*Spirulina máxima*) com valores iguais ou superiores ao controle. Eles ainda apresentaram altos valores de k (0,84-0,54).

Em todas as espécies o crescimento em uma determinada concentração de meio alternativo foi igual ao superior ao controle, corroborando com diversos autores que também observaram influência positiva utilizando diversos meios alternativos em cultivos de microalgas (MEDEIROS, *et al.*, 2020; Dos SANTOS *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2018; SALLA *et al.*, 2016).

Tabela 2. Parâmetros de rendimento, produtividade de biomassa das microalgas, K e duração da fase Log em microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo.

Espécies	Biomassa mg.L ⁻¹	PB (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	K (média e desvio padrão)	Duração da fase Log (dias)
<i>Scenedesmus ecornis</i> D545WC- C	463 ^d ±0,5	33	0,70±0,47	5
<i>Scenedesmus ecornis</i> D545WC- BH	583 ^a ±1,5	41,6	0,84± 0,30	8
<i>Spirulina platensis</i> D9Z-C	504 ^b ±1	38,7	0,54±0,30	7
<i>Spirulina platensis</i> D9Z- RM	503 ^{bc} ±1	38,6	0,49±0,50	7
<i>Spirulina máxima</i> D8Z-C	501 ^c ±1	38,5	0,59±0,40	6
<i>Spirulina máxima</i> D8Z –RM	500 ^c ±1	38,4	0,61±0,04	6
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> D245WC- C	202 ^h ±1,5	14,4	0,32±0,5	8
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> D245WC- FE	159 ^k ±0,5	11,3	0,34±0,47	8
<i>Xanthonema sp.</i> D464WC- C	251 ^f ±1	17,9	0,47±0,37	8
<i>Xanthonema sp.</i> D464WC- MIX	301 ^e ±1,5	21,5	0,47±0,28	8
<i>Kirchneriella concorta</i> D498WC-C	231 ^g ±1,5	16,5	0,35±0,45	8
<i>Kirchneriella concorta</i> D498WC-MIX50%	229 ^g ±0,5	16,3	0,34±0,38	8
<i>Actinastrum hantzschii</i> D467WC-C	182 ⁱ ±1,5	13	0,33±0,37	9
<i>Actinastrum hantzschii</i> D467WC-BH	172 ^j ±1,1	12,2	0,33±0,27	9
<i>Monoraphidium arcuatun</i> D459WC-C	122 ^l ±1,5	8,7	0,37±0,50	8

<i>Monoraphidium arcuatun</i>	122 ¹ ±0	8,7	0,36±0,40	8
D459WC-RM				
Nas colunas, letras iguais não tem diferença significativa (p>0,05) Teste de Tukey				

O rendimento e a produtividade de biomassa mostraram variações dentre as espécies e os meios alternativos utilizados (Tabela 2). Os valores em biomassa seca obtida para D545WC *Scenedesmus ecornis* (D545WC), *Spirulina platensis* (D9Z), *Spirulina máxima* (D8Z) foram superiores as outras espécies. *Scenedesmus ecornis* (D545BH), apresentou maior rendimento em biomassa (583 mg.L⁻¹) e maior produtividade (41,6 mg.L⁻¹) dentre todas as espécies, inclusive entre o meio controle. Esse resultado evidencia a viabilidade para utilização desse meio para o cultivo em massa dessa microalga. Outros autores também obtiveram êxito no cultivo com esse mesmo resíduo agroindustrial (MEDEIROS *et al.*, 2020; CALIXTO *et al.*, 2016).

Não houve diferença significativa em relação aos valores de biomassa obtidos para a espécie *Spirulina platensis* (D9Z) nos cultivos efetuados em meio controle (504 mg.L⁻¹) e em meio alternativo (503 mg.L⁻¹), e também na *Spirulina máxima* (D8Z) no meio controle (501 mg.L⁻¹) e no meio alternativo preparado a partir de Resíduo de Malte de cerveja (RM) (500 mg.L⁻¹) sendo a produtividade dessas duas espécies similar em todos os meios testados, evidenciando esses dados que cultivos em massa dessas duas espécies de microalgas podem ser desenvolvidos com sucesso usando esses tipos de meios alternativos.

O valor de k foi superior para a *Scenedesmus ecornis* (D545BH), cultivada em meio com biocomposto de hortifruti (0,84 ± 0,30) junto com a maior produtividade (41,6 mg.L⁻¹) e ainda maior rendimento em biomassa (583 mg.L⁻¹) dentre as espécies. Song; Pei (2018), cultivaram a *Scenedesmus sp.* em meio suplementado com xilose e obtiveram o valor de k de 0,35. Já Leite *et al.* (2016), obtiveram uma produtividade de 34,7 mg.L⁻¹ com o meio suplementado de xilose. A *Spirulina máxima* (D8Z-RM) cultivada em meio com resíduo de malte obteve o valor de k de 0,59 ± 0,40, a produtividade foi de 38,4 mg.L⁻¹ e o rendimento em biomassa foi de 500 mg.L⁻¹. Dos Santos *et al.* (2016), obtiveram o valor de k de 0,54 e o rendimento de 676 mg.L⁻¹ cultivaram a *Spirulina máxima* no meio suplementado com 0,1% de vinhaça.

Composição bioquímica das biomassas das microalgas

A composição química das microalgas estudadas foram influenciadas pelos meios alternativos nos quais foram cultivadas (Tabela 3). Sabe-se que a composição química varia de espécie para espécie e ainda de cultivo para cultivo de microalgas (MATOS, 2019). O teor de

carboidratos, proteínas e lipídios entre as espécies do presente estudo diferiram dependendo do meio de cultura utilizado (Tabela 4). Resultados mais elevados foram encontrados para as proteínas, no cultivo realizado com biocomposto de hortifruti que obteve o maior resultado quando comparado com o meio controle para a *Scenedesmus ecornis* (D545WC) e para carboidratos, na espécie *Xanthonema sp.*(D464WC) cultivada no meio mix que obteve maior teor quando comparado com o meio controle.

A biomassa das microalgas estudadas foram caracterizadas por ter maiores teores proteicos seguidos por carboidratos e lipídios. Quando o meio de cultura possui alto teor de nutrientes (especialmente nitrogênio), geralmente há um maior acúmulo de proteína e carboidrato com diminuição do teor de lipídios (MATTHIENSEN et al., 2016). Corroborando com os dados do presente estudo para maioria das espécies de microalgas.

Tabela 3. Composição química das microalgas estudadas no meio controle e nos meios alternativos

Espécies	Carboidratos (g 100g ⁻¹)	Proteínas (g 100g ⁻¹)	Lipídios (g 100g ⁻¹)
D545WC- C	18 ^d ±1	49 ^{ef} ±1	12,5 ^f ±0,5
D545WC- BH	23 ^c ±0,4	55 ^{ab} ±0,5	12,5 ^f ±0,5
D9Z-C	15 ^{ef} ±1	50,1 ^{def} ±0,1	13,6 ^f ±0,4
D9Z- RM	17,6 ^d ±0,7	56,5 ^a ±0,7	13,4 ^f ±0,2
D8Z-C	13,2 ^{fg} ±0,2	50,1 ^{def} ±0,1	13,3 ^f ±0,3
D8Z -RM	17,3 ^d ±0,7	53,2 ^{abc} ±0,7	13,1 ^f ±0,1
D245WC- C	15,8 ^d ±0,6	50,5 ^{def} ±0,8	16,5 ^e ±0,5
D245WC- FE	17,6 ^d ±0,1	49,7 ^{def} ±0,9	17 ^{de} ±0,2
D464WC- C	27,5 ^b ±0,7	52,8 ^{bcd} ±1,4	10 ^g ±0,5
D464WC- MIX	38,8 ^a ±0,7	48 ^{fg} ±0,5	10 ^g ±0,5
D498WC-C	11,7 ^{gh} ±0,4	52,1 ^{bcd} ±1,1	18 ^{cd} ±0,5
D498WC-MIX	11,9 ^{gh} ±0,4	45,4 ^g ±2,4	22 ^b ±0,7
D467WC-C	11,8 ^{gh} ±0,6	50,2 ^{def} ±0,9	18,3 ^{cd} ±0,3
D467WC-BH	12,2 ^{gh} ±0,5	52 ^{bcd} ±1	24 ^a ±1
D459WC-C	11 ^h ±1	50 ^{cdef} ±0,5	20 ^c ±0,5
D459WC-RM	11 ^h ±0,2	50 ^{cdef} ±0,5	25 ^a ±0,5

Nas colunas, letras iguais não tem diferença significativa (p>0,05) Teste de Tukey

Geralmente a proteína é o principal constituinte orgânico das microalgas (MATOS, 2019). Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, já que os teores mais altos de proteínas foram para as espécies *Scenedesmus ecornis* (D545WC), *Spirulina platensis* (D9Z) e *Spirulina maxima* (D8Z). O Teor mais significativo foi observado para a *Spirulina platensis* cultivada em meio com resíduo de malte de cevada com 56,5 g 100g⁻¹. Sabe-se que o teor proteico desse gênero de microalga varia de 50 a 70% (LUPATINI et al., 2016). Michael et al. (2019), obtiveram 65% de proteína cultivando em meio Zarrouk, já utilizando um meio otimizado com menos reagentes registraram 52% de proteína.

Os níveis mais altos de carboidrato foram encontrados na *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em meio MIX (38,8 g 100g⁻¹) e na mesma espécie cultivada em meio controle (27,5 g 100g⁻¹), seguida pela espécie *Scenedesmus ecornis* (D545) cultivada em meio BH (23 g 100g⁻¹) e em meio controle (18 g 100g⁻¹). Medeiros *et al.* (2020), obteve 18% de carboidrato em cultivos de *Scenedesmus quadricauda* efetuados em meio alternativo preparado a base de biocomposto de frutas e hortaliças. A literatura não dispõe de informações acerca do cultivo da *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em extrato de biocomposto de hortifrutis e/ou extrato de resíduo de malte de cevada. Esses altos teores de carboidratos dessas duas espécies cultivadas em meios alternativos podem ter ocorrido devido a limitação de nutrientes muitas vezes encontrados nesses meios podendo redirecionar o metabolismo celular para a síntese de compostos de reserva (carboidratos) (GULDHE *et al.*, 2017).

As maiores concentrações lipídicas foram observadas nos cultivos de *Actinastrum hantzschii* (D467WC-BH) com 24 g 100g⁻¹ e na *Monoraphidium arcuatun* (D459WC-RM) com 25 g 100g⁻¹, obtidas utilizando os meios alternativos e foram superiores as concentrações obtidas utilizando o meio controle.

Os resultados do presente estudo indicam que cada espécie de microalga apresenta um perfil nutricional peculiar. Já que cada espécie responde de forma distinta as condições de cultivo (CALIXTO *et al.*, 2018). Desse modo, a seleção das espécies para finalidades de cultivo em larga escala deve ser realizada a partir do componente esperado. No presente caso, pode-se recomendar a utilização das espécies *Xanthonema sp.* (D464MIX) e *Scenedesmus ecornis* (D545BH) para carboidrato, da *Scenedesmus ecornis* (D545BH), *Spirulina platensis* (D9RM) e *Spirulina máxima* (D8RM) para proteína e ainda as espécies D467WC-BH, *Monoraphidium arcuatun* (D459WC-RM) e *Kirchneriella concorta* (D498WC-MIX) para lipídios.

Diante disso, é importante investigar o conteúdo nutricional das biomassas das microalgas já que podem ser incorporadas na elaboração de diversos alimentos como em pães, sopas, sucos, iogurtes, pudins, bolos, massas, barras de cereais e assim incrementar nutricionalmente e/ou tecnologicamente o produto final potencializando o interesse da indústria de alimentos e agregando valor ao produto.

Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos de microalgas

Ocorreu uma diversificação dos ácidos graxos no que se refere às variações do comprimento das cadeias, geralmente entre quatorze e vinte e quatro carbonos, e ainda nos teores de insaturações (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos de microalgas cultivadas em diferentes meios alternativos

Espécies	D9ZRM	D8ZRM	D464MIX	D545BH	D245FE	D498MIX	D467BH	D459RM
SFA	30,38	25,09	55,09	31,19	34,26	41,51	40,08	45,8
C14:0	0,25±0,05	ND	0,6 ±0,2	ND	0,26±0,05	0,58±0,02	5,38± 0,4	7,16±0,16
C15:0	ND	0,31±0,02	ND	ND	ND	ND	ND	0,36±0,06
C16:0	29,56±0,8	24,78 ±1	42,61±0,5	31,19±0,19	31,98±0,02	40,14±0,14	33,82±0,2	38,28±0,2
C17:0	0,57±0,2	ND	9,4 ±0,4	ND	ND	ND	ND	ND
C18:0	ND	ND	1,7±0,7	ND	0,69± 0,09	0,79± 0,2	0,88± 0,1	ND
C26:0	ND	ND	0,78 ±0,2	ND	1,33± 0,33	ND	ND	ND
MUFA	8,17	8,62	35,58	36,16	26,43	36,99	7,97	13,19
C16:1	4,48±0,7	3,5 ±0,07	9,4±0,4	4,14 ±0,14	5,49± 0	5,68± 0,2	1,81± 0,1	2,56± 0,1
C24:1	ND	ND	2,38 ±0,3	7,64± 0,2	ND	ND	ND	ND
C18:1ω9c	3,1±0,11	2,82 ±0,1	14,9±0,03	21,93± 0	19,79± 0,2	28,56 ±0,3	4,66 ±0,3	5,54± 0,3
C18:1ω9t	0,59±0,2	2,3±0,33	8,9 ±0,2	2,45± 0	1,15± 0,15	2,75± 0,2	1,5±0,48	5,09± 0
PUFA	59,54	36,18	17,91	30,71	37,34	9,23	51,59	41,03
C20:5ω3	ND	ND	ND	ND	8,11± 0,11	4,57± 0,2	ND	ND
C18:2ω6c	29±0,5	3 ±1	8,91±0,4	9,4 ±0,4	10,47± 0,4	4,46 ±0,3	13,5±0,3	13±0,02
C18:3 ω3	28,79±13	30,6 ±0,2	9,01± 0,7	21,31± 0,2	18,76 ±0,2	0,2± 0	38,09±0	28,03 0,5
C18:3 ω6	1,75±0,2	2,58 ±0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND

O ácido palmítico (C16:0) foi encontrado em altas concentrações em todas as espécies testadas. Principalmente a *Xanthonema sp.* (D464) (42,61 %) e a 458 (40,14 %). Resultado similar foi encontrado por Calixto et al. (2018), Sassi et al. (2017) e Rocha et al. (2019), que também encontraram o ácido palmítico como o predominante dentre os ácidos graxos.

O ácido alfa linolênico (C18:3 ω3) foi encontrado em altas concentrações para a maioria das cepas testadas. A *Actinastrum hantzschii* (D467BH) chegou a alcançar 38% e a *Spirulina máxima* (D8ZRM) com 30%. O ácido alfa-linolênico é um dos ácidos graxos essenciais usados no tratamento de distúrbios do sistema nervoso, artrite reumatóide, (NAVARINI *et al.*, 2017) e diabetes (NUNEZ *et al.*, 2019).

A espécie *Ankistrodesmus falcatus* (D245FE) e a *Kirchneriella concorta* (D498MIX) obtiveram 8,11% e 4,57% respectivamente de ácido graxo eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3) um ácido graxo essencial da série ômega 3, desempenha um papel essencial nos benefícios de saúde a longo prazo dos sistemas cardiovascular e imunológico (WATANABE; TATSUNO *et al.*, 2017). Gerando grande interesse pela indústria de alimentos já que os estoques de peixes estão em escassez, e muitas dietas não suprem a necessidade de ômega-3. As microalgas são

uma fonte rica em ômega-3, que pode atender às restrições da dieta vegana. Um suplemento alimentar, feito de microalgas, pode fornecer ômega-3 em substituição ao óleo de peixe (BENEMAN *et al.*, 2018).

Variações nas composições de ésteres foram observadas em todas as espécies quando cultivadas em diferentes meios, embora, em geral ocorreram maiores concentrações de ésteres polinsaturados e monoinsaturados. Apenas a cepa *Xanthonema sp.* (D464MIX) apresentou tendência oposta com o teor de ésteres saturados (SFA) mais elevados. Vale salientar que o conteúdo de ácidos graxos varia de espécie para espécie e ainda em diferentes meios de cultivo (LU *et al.*, 2017). E o valor nutricional das microalgas está principalmente relacionada ao seu conteúdo de ácidos graxos essenciais (SHAHIDI *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019).

Teor de polissacarídeos

Algumas espécies de microalgas são capazes de acumular uma significativa quantidade de polissacarídeos. Contudo, o desenvolvimento de procedimentos analíticos padrão para a caracterização de biomassa de microalgas para quantificação de polissacarídeos tem sido difícil devido à existência de várias espécies de microalgas com diferentes estruturas celulares e composições químicas (SOUZA *et al.*, 2017). Neste contexto, o presente estudo realizou quatro diferentes extrações de polissacarídeos (Tabela 5). Vale salientar que diferentes tipos de extrações têm se mostrado bem-sucedidas para diversas microalgas, sendo ainda necessária otimização já que existe uma imensidão de espécies de microalgas e que algumas ainda possuem uma parede celular muito rígida que podem limitar os rendimentos de extração de produtos de elevado valor (BERNAERTS *et al.*, 2018).

Variações nos rendimentos de polissacarídeos foram observadas em todas as espécies, dentre os diferentes métodos de extração e ainda entre o meio alternativo e o meio controle (Tabela 5). Sabe-se que a modificação de condições de cultura que afetam diretamente a composição da biomassa podem promover a produtividade dos polissacarídeos (BRACKEN *et al.*, 2015).

Tabela 5. Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos extrações nas biomassas das microalgas estudadas com maiores teores de carboidratos

Cultivos	Extrações (%)			
	Ext alcalina	Água quente	Ultrassom	Água quente/ultrassom
D9Z- C	7,1 ^{Bc} ±0,1	2,5 ^{Cd} ±0,2	6,1 ^{Bab} ±0,2	8 ^{Ae} ±0,1
D9Z- RM	9,2 ^{Bb} ±0,2	3 ^{Dc} ±0,1	7 ^{Cab} ±0	10,3 ^{Ac} ±0,3
D8Z- C	7,7 ^{Bbc} ±0,1	2,1 ^{Dd} ±0,2	5,4 ^{Cb} ±0,1	8,3 ^{Aef} ±0,1
D8Z- RM	9,1 ^{Ab} ±0,1	3,2 ^{Cc} ±0,2	6,4 ^{Bab} ±0,4	9,3 ^{Ac} ±0,2
D464WC- C	9,0 ^{Ab} ±0	4,1 ^{Da} ±0,1	6,8 ^{Cab} ±0,1	11,1 ^{Ac} ±0,2
D464WC-MIX	10,2 ^{Ba} ±0,2	3,8 ^{Dab} ±0	8,4 ^{Ca} ±0,3	15 ^{Aa} ±0
D545WC- C	8,1 ^{Bc} ±0,2	3,1 ^{Dc} ±0,1	7 ^{Cab} ±0,2	10,5 ^{Ac} ±0,5
D545WC-BH	9,6 ^{Bab} ±0,5	3,4 ^{Dbc} ±0,1	7,1 ^{Cab} ±0,1	13,1 ^{Ab} ±0,2
D245WC- C	7,1 ^{ABc} ±0,2	3,0 ^{Dc} ±0,1	6 ^{Ca} ±1	8,3 ^{Aef} ±0,5
D245WC-FE	7,1 ^{Bc} ±0,1	3,1 ^{Dc} ±0,1	7 ^{Bab} ±0,1	9,1 ^{Ac} ±0,2

Letras minúsculas diferença as entre as colunas; Letras maiúsculas diferença entre as linhas (Teste de Tukey)

O método de extração que obteve o maior rendimento foi o realizado com água quente/ultrassom variando de 8 a 15% de polissacarídeos. Diferente de Yu *et al.* (2019) que analisaram seis diferentes métodos de extrações de polissacarídeos e obtiveram um maior acúmulo de polissacarídeos proveniente de microalgas quando utilizaram a extração alcalina. Diante dos dados obtidos, o presente estudo se mostrou eficaz em relação ao método adaptado (água quente e ultrassom), utilizado como alternativa a extração alcalina. Este método se mostrou mais eficiente por obter maior rendimento mesmo sem o uso de solventes, nessa primeira fase do experimento. O desenvolvimento de novos processos que não utilizem solventes tóxicos podem aumentar a eficiência e a sustentabilidade, que está intimamente ligada aos princípios da química verde (GALEGGIO *et al.*, 2018).

A espécie *Xanthonema sp.* (D464WC) cultivada em meio mix foi a que obteve o maior teor com 15% de polissacarídeos. A espécie *Scenedesmus ecornis* (D545WC), cultivada em meio BH obteve 13,1% e em meio controle 10,1%. Essa descoberta é particularmente relevante, pois indica que essas microalgas cultivadas nesses meios alternativos possuem potencial para produção de polissacarídeos visto que, os teores foram superiores ao controle. Resultado similar obtido por Singaba *et al.* (2018), obtiveram 9% do polissacarídeo da *Scenedesmus obliquos* cultivada em meio controle e chegaram obter 17% em meio otimizado.

Os teores de polissacarídeos variaram de 2 a 15% entre as microalgas estudadas. Diante dos resultados obtidos podemos corroborar que o teor de polissacarídeos varia em cada espécie de microalga (COSTA *et al.*, 2021).

A variação nos rendimentos dos polissacarídeos é atribuída à complexidade da parede celular das microalgas que podem ser rígidas e não serem expostas de forma eficiente pelos diferentes métodos realizados. Então, além da quantificação dos polissacarídeos, a compreensão da composição da parede celular não é apenas desejada em termos de otimização do processo, mas também porque polissacarídeos podem mostrar potencial para diversos fins biotecnológicos (BERNAERTS *et al.*, 2018). Já que possuem atividades antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias (De JESUS RAPOSO *et al.*, 2013). E esses compostos bioativos ainda podem ser uma fonte promissora de novos hidrocolóides alimentares (BERNAERTS *et al.*, 2019).

O efeito dos parâmetros tecnológicos do processo de cultivo de microalgas pode aumentar, diminuir ou até mesmo modificar o conteúdo de polissacarídeos na célula (ROSSI *et al.*, 2016).

Tabela 6. Perfil de monossacarídeos e teor de carboidratos e proteínas dos polissacarídeos das microalgas *Scenedesmus ecornis* (D545WC-BH) e *Xanthonema sp.* (D464WC-RM)

Componentes	D545WC-BH	D464WC-RM
Glicose (g/L)	7,62	7,72
Maltose (g/L)	2,052	9,05
Xilose (g/L)	4,23	6,12
Arabinose (g/L)	1,28	3,58
Proteínas com SEVAGE	0,3 ^a ± 0,1	0,3 ^a ± 0,1
Proteínas sem SEVAGE	18 ^a ± 1	18,6 ^a ± 0,5
Carboidratos	54,6 ^a ± 0,5	51,6 ^a ± 0,5

Letras iguais não tem diferença significativa (p>0,05)

A análise de monossacarídeos da *Scenedesmus ecornis* (D545WC-BH) e da *Xanthonema sp.* (D464WC-RM) (Tabela 6) mostrou uma composição mista de monossacarídeos, incluindo glicose, maltose, xilose e arabinose. O maior teor refere-se a glicose com 7,62 g/L para *Scenedesmus ecornis* (D545WC-BH) e 7,72 g/L para *Xanthonema sp.* (D464WC-RM). Singaba *et al.* (2018), obtiveram glicose, xilose e arabinose da análise de monossacarídeos, cultivando a *Scenedesmus obliquus*. Teuling *et al.* (2017), registram a glicose como componente majoritário para o polissacarídeo da *S. dimorphus*. Resultado similar com o das espécies avaliadas no presente estudo.

O teor de proteínas foi registrado com e sem o método SEVAGE (WU *et al.*, 2017). Com a utilização do método obteve um teor de proteína muito baixo para as duas espécies (0,3%) demonstrando que esse método foi eficiente na retirada da proteína remanescente do polissacarídeo. Quando não foi utilizado o método, o teor de proteínas variou de 12 a 15%. Singaba *et al.* (2018), registraram 19,44% de proteína e 53% de carboidratos do polissacarídeo extraído da *Scenedesmus obliquus*.

A avaliação da composição de polissacarídeos relacionados à parede celular, como o perfil de monossacarídeos, pode aumentar a funcionalidade das microalgas para diversas aplicações (BERNAERTS *et al.*, 2018). A diversidade evolutiva das microalgas envolve uma enorme complexidade em termos de presença, composição e organização molecular de biopolímeros estruturais. Diante disso, os polissacarídeos obtidos a partir de microalgas possuem potencial para serem usados como espessantes na indústria de alimentos. Para ter sucesso ao introduzir esses polissacarídeos como novos hidrocolóides alimentares, a caracterização e funcionalidade devem ser direcionadas para polissacarídeos obtidos a partir da individualidade da cepa. Conhecimentos fundamentais sobre a composição dos polissacarídeos pode ajudar a prever a funcionalidade de extratos específicos de polissacarídeos (BERNAERTS *et al.*, 2019).

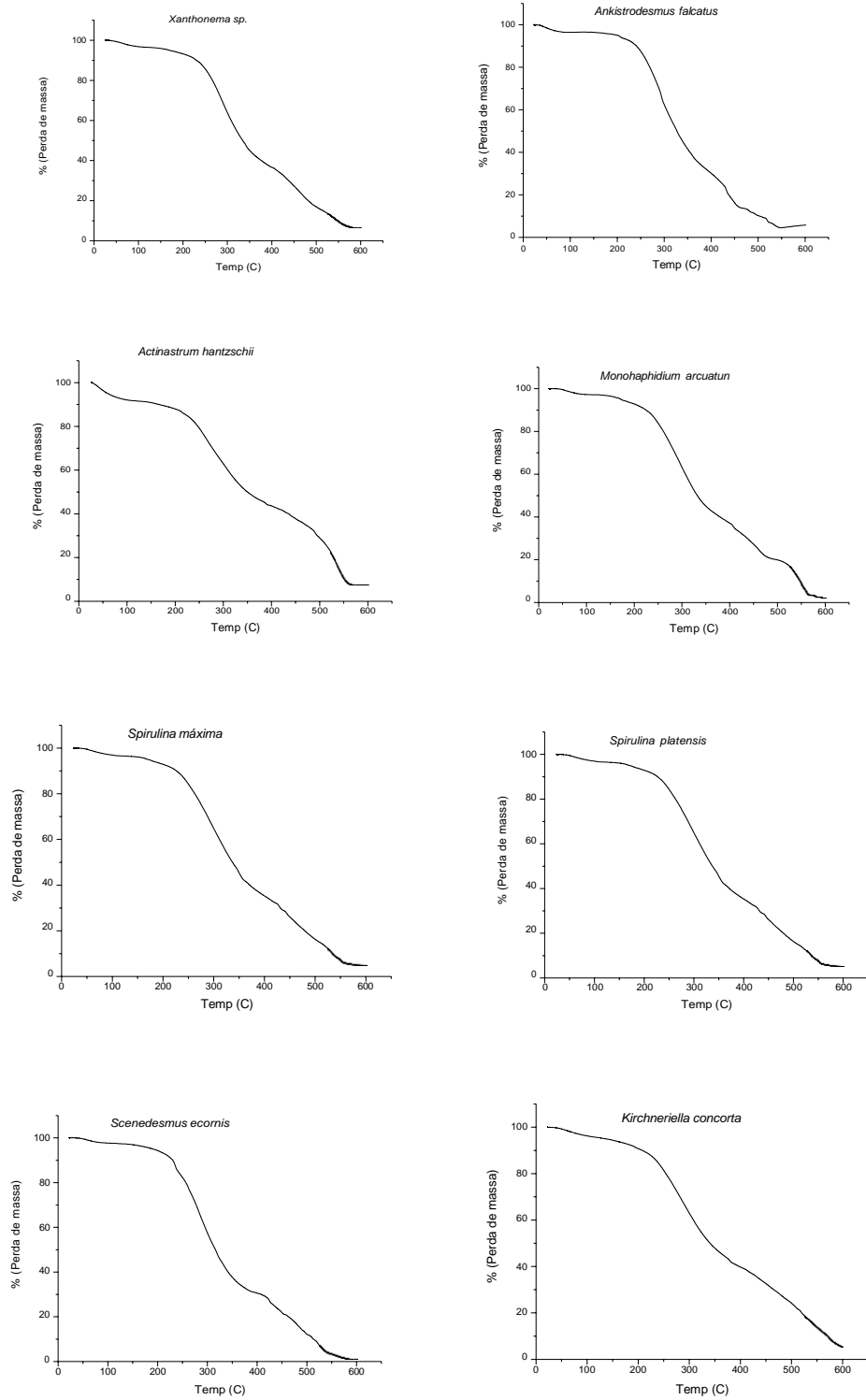
Perfil Térmico das biomassas das microalgas cultivadas em meios alternativos

Avaliar as características térmicas das microalgas é importante para poder entender o comportamento de decomposição de lipídios, proteínas e carboidratos (BACH, 2017).

Os resultados das análises termogravimétricas das biomassas das microalgas cultivadas em meios alternativos mostraram alterações no perfil térmico apresentando de três a quatro eventos de perda de massa dependendo da microalga, como pode ser visto na Figura 2.

A avaliação do comportamento térmico de carboidratos, lipídios e proteínas desempenham um papel importante na investigação das características das microalgas (VUPPALADADIYAM *et al.*, 2019).

Figura 2- Curvas TG de biomassas de microalgas cultivadas em meios alternativos



Entre as microalgas estudadas o primeiro evento variou de 25,3 a 130°C (Tabela 7). As espécies de *Spirulina* obtiveram maior temperatura (130°C). Sukani (2020), encontrou resposta semelhante para a espécie *Spirulina platensis* no primeiro evento e a temperatura final foi de 170°C. A perda de massa no primeiro evento variou de 3 a 5% (Tabela 7), atribuída à desidratação das amostras. O baixo teor de umidade refere-se ao fato das amostras terem sido liofilizadas (De JESUS *et al.*, 2018).

Já o segundo evento teve uma variação de 120 a 400°C entre as espécies, com perda de massa de 45,5 a 66,7%. Possivelmente nesse evento ocorreu a decomposição térmica de carboidratos e proteínas (BACH *et al.*, 2017). A espécie que obteve a maior perda de massa durante esse evento foi a *Scenedesmus ecornis* chegando a 66,7%. Kumar *et al.* (2015), cultivaram a *Scenedesmus sp.* e obtiveram a maior decomposição térmica de biomassa na temperatura de 294 a 330°C. Ferreira *et al.* (2020), cultivaram a *Secenedesmus obliquios* em diferentes águas residuais (indústria leiteira, esgotos, indústria aviária e bovina) e demonstraram um comportamento semelhante ao presente estudo em relação a decomposição térmica.

O terceiro evento térmico teve uma variação de 380 a 600°C entre as espécies, com perda de massa de 17,6 a 38,3%. Este evento possivelmente pode ter sido atribuído a decomposição térmica de carboidratos, proteínas e lipídios (BACH *et al.*, 2017).

Em algumas espécies o quarto evento esteve presente e variou de 500 a 600°C com perda de massa de 4,4 a 11,9%. O quarto evento pode ter sido atribuído à decomposição dos materiais carbonáceos (VUPPALADADIYAM *et al.*, 2019).

Tabela 7- Temperaturas iniciais e finais de cada evento térmico e a respectiva perda de massa em amostras de microalgas cultivadas em meios alternativos

Amostra	Evento térmico	ΔT (°C)	Δm (%)
<i>Xanthonema sp.</i>	1	29-125	3,528
	2	125-400	59,824
	3	400-500	19,727
	4	500-600	10,318
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	1	25,3-120,0	3,280
	2	120-380	62,793
	3	380-500	23,524
	4	500-600	4,405
<i>Actinastrum hantzschii</i>	1	27-130	8,467
	2	130-380	45,572
	3	380-600	38,315

<i>Monoraphidium arcuatun</i>	1	27,45-125	2,824
	2	125-400	60,018
	3	400-600	17,603
<i>Spirulina máxima</i>	1	32,6-130	2,876
	2	130-400	58,797
	3	400-500	18,919
	4	500-600	11,918
<i>Spirulina platensis</i>	1	30,7-130	3,580
	2	130-400	61,120
	3	400-500	18,997
	4	500-600	11,120
<i>Scenedesmus ecornis</i>	1	28-130	2,694
	2	130-400	66,751
	3	400-600	18,480
<i>Kirchneriella concorta</i>	1	28,8-125	4,501
	2	130-400	55,650
	3	400-600	34,183

Verificou-se que ocorreram algumas diferenças na degradação térmica entre as microalgas estudadas. Sabe-se que variações nos compostos orgânicos e minerais nas espécies de microalgas levam a diferenças na degradação térmica (SUKANI, 2020).

A análise termogravimétrica permite a avaliação da resistência térmica das biomassa das microalgas ao serem aquecidas, o que pode ser útil considerando algumas tecnologias utilizadas no processamento de alimentos em algumas operações ou ingredientes modificados, como secagem, troca de calor, cozimento, etc (BATISTA *et al.*, 2013)

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos constatar que a utilização do biocomposto de hortifrutis, biocomposto do resíduo de malte de cevada e o resíduo de fécula de mandioca podem ser utilizados como meios alternativos promissores para o cultivo de microalgas se mostrando uma alternativa eficiente para diminuir os custos de produção. Visto que os parâmetros de crescimento e a composição nutricional das biomassas obiveram resultados iguais ou superiores ao meio de cultura sintético. E ainda, no geral ocorreram maiores concentrações de estéres polinsaturados e monoinsaturados nas biomassas provenientes dos meios alternativos. E também altos teores de polissacarídeos com resultados iguais ou superiores ao controle. Deste modo, a biomassa obtida a partir de microalgas e seus compostos

bioativos de alto valor agregado possuem potencial para serem utilizados pela indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, **Official Method** 935.46. 21 ed. Rockville: 2019.

APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American public health Association. American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, 1998.

ALAM, M. A.; YUAN, T.; WENLONG, X.; ZHANG, B.; LV, Y.; XU, J. Process Optimization for the Production of High-Concentration Ethanol with *Scenedesmus raciborskii* Biomass. **Bioresource Technology**, 2019

BACH, Q.V.; CHEN, W.H. Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review, **Bioresource Technology**, v.246, 88- 100, 2017.

BARONE, V.; PUGLISI, I.; FRAGALÀ, F.; ARLPIERO, ARL.; GIUFFRIDA F.; BAGLIERI, A. Novo bioprocesso para o cultivo de microalgas em sistema de cultivo hidropônico de tomateiro. **Journal of Applied Phycology**, v.31, 2019.

BENEMANN, J. R.; WOERTZ, I.; LUNDQUIST, T. Autotrophic Microalgae Biomass Production: From Niche Markets to Commodities. **Industrial Biotechnology**, v.14,n.1,2018.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, 911-917, 1959.

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

BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v.2, n.2, 2013.

BERNAERTS, M.M. T.; KYOMUGASHOA, C.; LOOVERENA, N.V.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; MARC, E. HENDRICKX, A.M. LOEYA, V. Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate Polymers**, v.195, 2018.

BERNAERTS, T.M.M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M.E.; VAN, LOEY AM. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnol Adv**, 2019

BOSSO, A.; VELOSO, N.F.S.; ALBA, C.F.; SILVA, J.B. Microalgas cultivadas em soro de queijo e produção de β -galactosidase. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, v.24, n.3, 2020.

CALIXTO, C. D.; DA SILVA SANTANA, J. K.; TIBÚRCIO, V. P.; DE PONTES, L.; DE F. B. L.; DA COSTA SASSI, C. F.; DA CONCEIÇÃO, M. M.; SASSI, R. Productivity and fuel quality parameters of lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil. **Renewable Energy**, v.115, 1144–1152, 2018.

CARVALHO, J. C., BORGHETTI, I. A., CARTAS, L. C., WOICIECHOWSKI, A. L., & SOCCOL, V. T. Biorefinery integration of microalgae production into cassava processing industry: Potential and perspectives. **Bioresource Technology**, v.247, 1165–1172, 2018.

CHOIX, MA OCHOA-BECERRA, M. HSIEH-LO, M.; MONDRAGÓN, P. et al. Alta produção de biomassa e fixação de CO₂ a partir de biogás por microalgas *Chlorella* e *Scenedesmus* usando vinhaça de tequila como meio de cultura **Journal of Applied Phycology**, v.30, 2018

COSTA, J.A.V.; LUCAS, B.F.; ALVARENGA, A.G.P.; MOREIRA, J.B.; MORAIS, M.G. Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications. **Polysaccharides**, v.2, 759–772, 2021.

DE JESUS RAPOSO, M.F.; DE MORAIS, A.M.B.; DE MORAIS, R.M.S.C. **Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae**. In: Merillon, J.M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer, Cham, Switzerland 2013

DONG, S.T. et al. Impact of biochemical composition on susceptibility of algal biomass to acid-catalyzed pretreatment for sugar and lipid recovery. **Algal Research**, n. 18, p. 69–77, 2016

DOS SANTOS, R. R.; ARAÚJO, O.Q. F.; DE MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M.. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, 204, 2016.

FERREIRA, A.F.; FERREIRA, A.; DIAS, A.P.S.; GOUVEIA, L. Pyrolysis of *Scenedesmus obliquus* Biomass Following the Treatment of Different Wastewaters. **BioEnergy Research**, v.13, p.896–906, 2020.

GALLEGO, R.; MONTERO, L.; CIFUENTES, A. et al. Green Extraction of Bioactive Compounds from Microalgae. **J. Anal. Test**, v.2, 109–123, 2018.

Gao, A.; Tian, Z.; Wang, Z.; Wennersten, R.; Sun, Q. *Comparison between the Technologies for Food Waste Treatment*. **Energy Procedia**, v.105, 3915–3921, 2017.

GULDHE, A.; ANSARI, F. A.; SINGH, P.; BUX, F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v.99, 47–53, 2017.

HLAING, S. A. A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, 2019

JOE, M.-H.; KIM, J.-Y.; LIM, S.; KIM, D.-H.; BAI, S.; PARK, H.; CHOI, J.-I. Microalgal lipid production using the hydrolysates of rice straw pretreated with gamma irradiation and alkali solution. **Biotechnology Biofuels**, v. 8, 1–9, 2015.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.52, 1834–1846, 2015.

KOYANDE, K.; CHEWA, W.; RAMBABUB, K.; TAOC, Y.; CHUD, D.; SHOWA, P.L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Apurav Krishna Food Science and Human Wellness**, v.8, 2019

KUMAR, R.; RAMESH, D.; MUTANDA, T.; RAWAT, I.; BUX, F. Thermal Behavior and Pyrolytic Characteristics of Freshwater *Scenedesmus* sp. Biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, v.37,n.13, 1383–1391, 2015.

KUMAR, B. R.; DEVIRAM, G.; MATHIMANI, T.; DUC, P. A.; PUGAZHENDHI, A. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019

KOCHERT, G. **Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric.** in: HELLEMBUST, J.A., GRAIGIE, J.S. (eds). *Handbook of Physiological Methods. Physiological and Biochemical methods.* Cambridge: Cambridge University 1978. p.95-97

LEITE, G.B.; PARANJAPE, K.; HALLENBECK, P.C. Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Res**, v.16, 338-348, 2016.

LEVASSEUR, W., PERRÉ, P., POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, v. 41, n. 107545, p. 1–21, 2020.

LU, Q.; LI, J.; WANG, J.; LI, K.; LI, J.; HAN, P.; ZHOU, W. Exploration of a mechanism for the production of highly unsaturated fatty acids in *Scenedesmus* sp. at low temperature grown on oil crop residue based medium. **Bioresource Technology**, v.244, 542–551, 2017.

LUPATINI, A. L.; COLLA, L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, n.3, 724–732, 2016

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14: 217-232, 2010.

MATOS, J.; CARDOSO, C.; BANDARRA, N.M.; AFONSO, C. Microalgae as a healthy ingredient for functional food: A review. **Food Funct**, v.8, 2017

MATOS, Â. P. Microalgae as a Potential Source of Proteins. Proteins: Sustainable Source, **Processing and Applications**, 2019

MEDEIROS, V.P.; PIMENTEL, T.C.; VARANDAS, R.C.R.; DOS SANTOS, S.A.; SOUZA, G.S.; SASSI, C. F.C.; MAGNANI, M. Exploiting the use of agro-industrial residues from fruit and vegetables as alternative microalgae culture medium. **Food Research International**, v.137, 2020.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v.13, n.1, 2013

MICHAEL, A.; MARGARETH SERAPIO, M.; KYEWALYANGA.; LUGOMELA, C.V. Biomass and nutritive value of *Spirulina* (*Arthrospira fusiformis*) cultivated in a cost-effective médium. **Annals of Microbiology**, v.69, n.1, 2019.

MOBIN, S.; & ALAM. F. Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. **Energy Procedia**, v.110, 510–517, 2017.

NAVARINI, L.; AFELTRA, A.; GALLO AFFLITTO, G.; MARGIOTTA, D. P. E. Polyunsaturated fatty acids: any role in rheumatoid arthritis? **Lipids in Health and Disease**, v.16, n.1, 2017.

NUÑEZ, M. V. M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, B. I.; ROSADO-PÉREZ, J.; SANTIAGO-OSORIO, E.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; HERNÁNDEZ-ABAD, V. J. The Effect of 600 mg Alpha-lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress, Inflammation, and RAGE in Older Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–12, 2019.

RENUKA, A.; BHISHEK, G.; PRASANNAB, R.; FAIZAL, P.S. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges **Nirmal Bux Biotchnology advances**, n.36, 2018

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

ROSSI, F.; PHILIPS, R.D. **Exocellular Polysaccharides** in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. In *The Physiology of Microalgae*; Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, pp. 565–590, 2016.

SALLA, A. C.V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, 2016

SANTOS-SÁNCHEZ, R. N.F.; VALADEZ-BLANCO, B.; HERNÁNDEZ-CARLOS, A.B.; TORRES-ARIÑO P. C.A.; GUADARRAMA-MENDOZA, P.C.; SALAS-CORONAD, R.

Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.20, 2016

SIBI, G. Low cost carbon and nitrogen sources for higher microalgal biomass and lipid production using agricultural wastes. **Journal of Environmental Science and Technology**, v.8,n.3, 2015.

SIGANAMI, S.; RAMAMURTHY, D.; NATARAJAN, H. A Review on Potential Biotechnological applications of Microalgae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v.6 , n.8, pp. 179-184, 2016.

SINGABA, A.N.; IBRAHIMB, N.; EL-SAYEDC , A.E.; EL-SENOUSYD , W.; ALYE, H.; ELSAMraIAEB, A.A.;MATLOU, A.A. Antiviral, cytotoxic, antioxidant and anticholinesterase activities of polysaccharides isolated from microalgae *Spirulina platensis*, *Scenedesmus obliquus*, and *Dunaliella salina*. **Arch Pharm Sci ASU**, v.2, n.2, 2018

SHARMA, P.; GAUR, V. K.; SIROHI, R.; LARROCHE, C.; KIM, S. H.; PANDEY, A. Valorization of cashew nut processing residues for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 152, 2020

VUPPALADADIYAM, A. K.; ZHAO, M.; MEMON, M. Z.; SOMROO, A. F. Microalgae as renewable fuel resource: A comparative study on thermogravimetric and kinetic behavior of four microalgae. **Sustainable Energy & Fuels**, 2019.

WATANABE, Y.; TATSUNO, I. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for cardiovascular diseases: Present, past and future. *Expert Rev. Clin. Pharmacol*, v.10, 865–873, 2017.

WU, X.; CEN, Q.; ADDY, M.; ZHENG, H.; LUO, S.; LIU, Y.; CHENG, Y.; ZHOU, W.; CHEN, P.; RUAN, R.A. novel algal biofilm photobioreactor for efficient hog manure wastewater utilization and treatment. **Bioresource Technol**, v.292, 2019

YU, J.; HU, Y.; XUE, M.; DUN, Y.; LI, S.; PENG, N.; LIANG, Y.;ZHAO, S. Purification and identification of antioxidant peptides fromenzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*.**J. Microbiol. Biotechnol**, v.26, n.7, 2016.

YU, M.; CHEN, M.; GUI, J.; HUANG, S.; LIU, Y.; SHENTU, H.; ... ZHANG, Y. Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

ZHU, L.D.; HILTUNEN, E. Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, v.54, 2016.

CULTIVOS DE *Scenedesmus ecornis* EM LARGA ESCALA UTILIZANDO BIOCÓMPOSTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS: EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Roberta conceição Ribeiro Varandas^a (corresponding author robertacoriva@hotmail.com)

Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan^a

Vilma Barbosa da Silva Araújo^a

Luís Celso Cardoso de Pina^a

Evandro Bernardo de Lira^a

Andressa Coimbra Pereira^a

Cristiane Francisca da Costa Sassi^a

Marta Maria da Conceição^b

^aLaboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^bDepartamento de Tecnologia de Alimentos/Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional/IDEP, João Pessoa, Paraíba 58058-600, Brazil

RESUMO

As microalgas possuem vários compostos bioativos que podem complementar as necessidades nutricionais e energéticas do ser humano. E sua composição química pode variar durante as diferentes fases de crescimento como também a utilização de meio alternativo como substrato para o cultivo. Nesta pesquisa foram avaliadas as características da cinética de crescimento e a composição química das biomassas obtidas proveniente do cultivo em fotobiorreator com capacidade de 2.000L. Foram observadas diferenças nas características de crescimento, a fase exponencial durou 12 dias, já a fase estacionária 5 dias e a fase de declínio durou 4 dias. O teor de nitrato e fosfato se esgotou na fase de crescimento de declínio. Na composição química, os valores de carboidratos (20,9 g 100 g⁻¹) e lipídios (25,5 g 100 g⁻¹) foram superiores na fase de declínio. Porém o teor de proteína foi superior na fase exponencial (48,5 g 100 g⁻¹). O perfil lipídico evidenciou a presença dos ácidos ácido palmítico, ácido linolênico em maiores quantidades. Pode-se constatar ainda que a fase de declínio/ morte do cultivo obteve um maior teor de ácidos graxos polinsaturados (42,84%) e monoinsaturados (21,83%). Em relação a extração de polissacarídeo o maior rendimento foi obtido através da extração com ultrassom/água (13,3±0,2%). O perfil de monossacarídeo evidenciou a presença de glicose, xilose, maltose e arabinose. O presente estudo evidenciou que o biocómposto de frutas e hortaliças mostrou-se um meio promissor para o cultivo da microalga *Scenedesmus ecornis* em larga escala. E ainda, sua biomassa e compostos bioativos possui potencial principalmente para possíveis aplicações na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Cultivo; bioativos; biocómposto

ABSTRACT

Microalgae have several bioactive compounds that can complement human nutritional and energy needs. And its chemical composition can vary during the different phases of growth as well as the use of an alternative medium as a substrate for cultivation. In this research, the characteristics of the growth kinetics and the chemical composition of the biomass obtained from the cultivation in a photobioreactor with a capacity of 2,000L were evaluated. Differences in growth characteristics were observed, the exponential phase lasted 12 days, the stationary phase lasted 5 days and the decline phase lasted 4 days. The nitrate and phosphate content was depleted in the declining growth phase. In the chemical composition, the values of carbohydrates ($20.9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and lipids ($25.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) were higher in the decline phase. However, the protein content was higher in the exponential phase ($48.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). The lipid profile showed the presence of palmitic acid and linolenic acid in greater amounts. It can also be seen that the decline/death phase of the crop had a higher content of polyunsaturated (42.84%) and monounsaturated (21.83%) fatty acids. Regarding the polysaccharide extraction, the highest yield was obtained through ultrasound/water extraction ($13.3 \pm 0.2\%$). The monosaccharide profile showed the presence of glucose, xylose, maltose and arabinose. The present study showed that the fruit and vegetable biocomposite proved to be a promising medium for the large-scale cultivation of the microalgae *Scenedesmus ecornis*. Furthermore, its biomass and bioactive compounds have potential mainly for possible applications in the food industry.

Keywords: Cultivation; bioactives; biocompost

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios que enfrentamos no século 21 é a necessidade de alimentar uma população humana cada vez maior, porém com recursos naturais cada vez mais escassos. Atualmente estima-se que cerca de 1 em cada 9 pessoas no mundo esteja desnutrida. Sabe-se que as microalgas podem ser utilizadas como uma nova alternativa de alimentos surgindo a oportunidade de aumentar a oferta desses produtos essenciais para atender às demandas globais de maneira mais eficiente e ambientalmente sustentável. Muitas espécies de microalgas são alimentos nutricionalmente completos e ainda seus rendimentos superam a maioria das culturas vegetais (TIJI *et al.*, 2020; AMPOFO; ABBEY, 2022).

Para que as microalgas sejam consideradas como uma nova fonte potencial de alimento, uma fator primordial é sua composição nutricional. A composição nutricional varia entre as espécies, e ainda entre a mesma espécie, o conteúdo nutricional pode variar significativamente dependendo do ambiente de crescimento, da iluminação, da temperatura, dos nutrientes presentes, dentre outros (TIJI *et al.*, 2020; AMPOFO; ABBEY, 2022).

As microalgas são um dos componentes mais importantes nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos e têm sido utilizadas como fonte promissora para a produção de vários

compostos bioativos. Incluindo os aminoácidos essenciais, ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, fibras, polipeptídeos, dentre outros. Devido ao seu potencial, esses microrganismos se tornaram uma das fontes mais inovadoras para novos alimentos. Além disso, podem ser usadas como ingredientes funcionais para aumentar o valor nutricional dos alimentos e, portanto, favorecendo a saúde humana, melhorando o bem-estar e a qualidade de vida (MATOS *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2017). Estes compostos bioativos possuem efeitos anticâncer, anti-inflamatório, antimicrobiano, e antioxidantes (SIGANAMI *et al.*, 2016).

Essa abundância de biocompostos de alto valor derivados de microalgas tornou esses microrganismos uma fonte promissora de produto útil. Porém, para que essa tecnologia envolvendo a utilização microalgas seja eficiente ela deve ser economicamente viável e ambientalmente sustentável. Tendo como uma das prerrogativas a produção em larga escala de forma que possa obter principalmente alta produtividade de biomassa e ainda a utilização de meios alternativos como resíduos agroindustriais para poder também diminuir os custos operacionais do processo (De CARVALHO *et al.*, 2019).

Entre todas as microalgas, a *Scenedesmus*, que pertence à ordem *Clorococcales* da família *Scenedesmaceae* é frequentemente dominante em lagos e rios de água doce. Muitas espécies deste gênero estão sendo usadas em todo o mundo para diversos fins, devido à sua capacidade de adaptação condições ambientais adversas, capacidade de crescer rapidamente e facilidade de cultivo e manuseio (HO *et al.*, 2012). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar os compostos bioativos presentes na *Scenedesmus ecornis* já que não é apenas importante compreender a natureza do microrganismo, mas principalmente investigar substâncias que são obtidas durante as diferentes fases de crescimento da microalga com possíveis aplicações na indústria de alimentos. E ainda avaliar a eficiência do cultivo em larga escala utilizando como substrato o biocomposto de frutas e hortaliças.

2.MATERIAL E MÉTODOS

21.Espécie estudada e condições de cultivo

A espécie *Scenedesmus ecornis* foi obtida da Coleção de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) foi cultivada em meio alternativo preparado com a partir do extrato de biocomposto hortifrutis (BH) obtido junto a EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas), localizada no município de João Pessoa, originário da compostagem de restos de legumes e verduras

descartados. A preparação desse meio seguiu o procedimento descrito por Erd-Schreiber (GROSS, 1937) modificado por (CALIXTO *et al.*, 2016).

Inicialmente a microalga foi inoculada em balões de 250 mL. Após 15 dias a cultura foi colocada em balões de 6L de capacidade contendo 5L do mesmo meio de cultura e após 15 dias foram colocados em mariotes com capacidade de 20 litros. Todos os ensaios foram mantidos a $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ em câmara de cultivo climatizada com de sistema de iluminação [$150 \mu\text{mols.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$] e fotoperíodo de 12 horas e aeração fornecida por um mini compressor de membrana RESUN AOC2. Após 15 dias de cultivo a cultura foi transferida para o fotobiorreator.

Foi utilizado fotobiorreator tubular “outdoor” pertencente ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LAR BIM/UFPB), com volume total de 2.000 L. O experimento teve duração de 21 dias. O meio alternativo (1.940 L) foi então colocado no fotobiorreator juntamente com os 60 L de inóculo otimizado e o cultivo durou até a fase de declínio.

Para as colheitas, o meio de cultivo foi transferido para uma esteira de decantação. Após 24 horas a biomassa decantou e foi seca ao sol até ficar completamente seca e depois foi pesada em balança analítica e guardada em sacos herméticos em refrigerador.

O crescimento das culturas foi acompanhado através da fluorescência “in vivo” (Turner Design Fluorometer). A Curva de crescimento foi preparada, permitindo cálculos de seu crescimento velocidade (k), expressa como o número de divisões celulares por dia (STEIN 1973), a duração (em dias), tempo de cultura, rendimento final de biomassa e a produtividade de biomassa por dia.

2.2 Análises físicas e químicas do cultivo do fotobiorreator

O pH do cultivo foi verificado a cada dois dias através do pHmetro portátil digital (KASVI). A Luminosidade e temperatura foram analisadas durante todo o cultivo do fotobiorreator através do Hobo Pendant temperature/Light Data Logger (UA-0020XX). O Nitrato e fosfato foram analisados a cada dois dias durante o cultivo do fotobiorreator, através das determinações de nitrato (método do ácido fenoldissulfônico) e fosfato (método do ácido ascórbico), segundo a metodologia de Standard Methods (APHA, 1998).

2.3 Caracterização físico química da biomassa microalgal

Foram realizadas determinações (em triplicata) de: proteínas, com leituras espectrofotométricas a 485nm seguindo a metologia de Lowry *et al.* (1951); Carboidratos,

segundo a metodologia de Kochert (1978); lipídios totais, de acordo com o método proposto por Bligh Dyer (1959); Umidade e cinzas de acordo com AOAC (2019); O perfil de ácidos graxos das espécies foram determinados através da cromatografia a gás, adaptada pra microescala descrita por Menezes et al. (2013) e os ésteres metílicos foram e expressos em percentuais (%).

2.4 Extração de polissacarídeo

Foram realizadas 4 metodologias de extrações de polissacarídeos: alcalina, água, ultrassom e água com ultrassom (adaptado) de acordo com as metodologias de Yu *et al.*(2019), e Kang *et al.*, (2019).

2.5 Perfil de monossacarídeos

O perfil de monossacarídeos foi obtido através da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) seguindo a metodologia de Patel *et al.* (2013).

2.6 Extração de exopolissacarídeos

A extração de exopolissacarídeos foi realizada através da metodologia de Goyal *et al.* (2019) e Patwal; Baranwal (2021). Utilizando como métodos de extração o ultrassom e o turrac.

2.7 Análise estatística

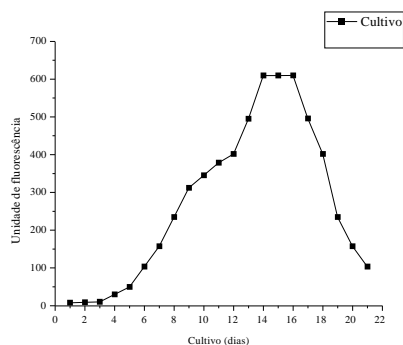
Os dados da composição química das microalgas foram analisados primeiramente em relação à homocedasticidade das variâncias pelo teste de Levene. Os resultados foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA), seguida de comparações múltiplas do teste HSD Tukey ($p < 0,05$). E o teste t foi utilizado para comparação de duas médias usando o programa Estatística 10 (STATSOFT, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento efetuado com meio preparado a partir de biocomposto de hortifrúti teve duração de 21 dias que foi até a fase de declínio (Figura 1). O cultivo foi realizado para efeito de comparação em relação aos compostos bioativos obtidos nas diferentes fases de crescimento.

Propor estudos baseados nas diferentes fases de crescimento juntamente com estratégias alimentares pode ser uma abordagem viável para aumentar o crescimento e a produtividade em microalgas (AZIZ *et al.*, 2020).

Figura 1. Curva de crescimento obtida do cultivo da microalga estudada. Valores médios das medidas da fluorescência in vivo da amostra.



A espécie testada mostrou variações na cinética de crescimento (Tabela 1). O melhor desempenho foi na fase estacionária por obter maior rendimento ($0,490 \text{ mg.L}^{-1}$) e ainda altos valores de k ($0,92$) respectivamente. As taxas de crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* dependem de diferentes condições ambientais, tolerância e capacidade de sua sobrevivência (LATIFFI *et al.*, 2017). Sabe-se que a *Scenedesmus sp.* é uma das espécies mais tolerantes, geralmente apresenta capacidade de crescer rapidamente e ainda possui habilidade de remover nutrientes presente nos resíduos (CHOIX *et al.*, 2018). Características primordiais para possível utilização em larga escala empregando biocomposto de frutas e hortaliças como meio alternativo.

Tabela 1. Parâmetros de crescimento e produtividade das biomassas nas diferentes fases de crescimento *Scenedesmus ecornis*

Fases de crescimento	Biomassa mg.L^{-1}	PB ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	K (média e desvio padrão)
Exponencial	$310 \pm 0,3$	$44,2 \pm 0,3$	$0,22 \pm 0,07$
Estacionária	$490 \pm 0,4$	$81,6 \pm 0,4$	$0,92 \pm 1,49$
Declínio	$280 \pm 0,5$	$70 \pm 0,5$	$0,19 \pm 0,29$

A utilização de meios de cultivos alternativos baseados em resíduos diversos se mostra uma saída eficiente para diminuir os custos de produção de biomassa de microalgas. O uso de resíduos como fonte de nutrientes para a produção de microalgas têm sido investigada em vários estudos com diferentes resíduos utilizando a *Scenedesmus sp.* como o cultivo em 100%

águas residuais (TRIPATHI *et al.*, 2019), águas residuais de curtume (Da FONTOURA *et al.*, 2017).

A falta contínua de nitrogênio poder aumentar o conteúdo lipídico e de carboidratos das microalgas ela também pode diminuir seu crescimento, reduzindo consequentemente suas produtividades globais (CHOKSHI *et al.*, 2017; PANCHA *et al.*, 2015). Corroborando com o resultado obtido do presente estudo que quando ocorreu a falta desse nutriente (fase de declínio) ocasionou a diminuição de rendimento de biomassa (280 mg.L^{-1}) quando comparado com a fase estacionária (490 mg.L^{-1}). Sulochana *et al.* (2016), cultivaram a *Scenedesmus quadricauda* e também obtiveram uma redução no rendimento de biomassa ocasionada pela depleção de nitrogênio.

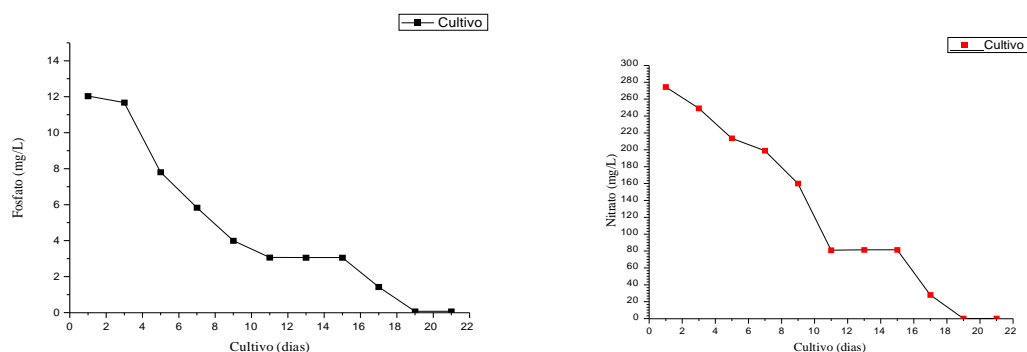
Uma das principais dificuldades dos cultivos de microalgas é a presença da colheita que é comumente realizada por centrifugação, o que requer muita energia, principalmente na produção de microalgas em larga escala. Portanto, métodos alternativos como floculantes e/ou decantação são necessários (LI *et al.*, 2015). Porém, no presente trabalho não houve essa dificuldade já que a *Scenedesmus ecornis* teve uma boa decantação sem a necessidade de floculantes ou ainda de centrifugação.

Vale salientar que uma boa sedimentação ou flotação natural de culturas de microalgas pode ser vantajosa, já que o tratamento adicional para a colheita pode ser evitado. Reduzindo assim os custos do processo nos sistemas de produção de microalgas, correspondendo até 30% dos custos totais de produção (SINGH; PATIDAR, 2018).

A concentração de nitrato e fosfato (Figura 2) nos meios de cultura tem um papel fundamental e direto na influência no crescimento de microalgas (Lee *et al.*, 2013).

A falta de nitrogênio necessário para o acúmulo de substâncias varia distintamente entre as espécies de microalgas (CHOKSHI *et al.*, 2017; PANCHA *et al.*, 2015). Essas diferenças originam da extensa biodiversidade dessas espécies (LIU *et al.*, 2018).

Figura 2. Teor de nitrato e fosfato no cultivo da *Scenedesmus ecornis*



A depleção completa do nitrato e do fosfato ocorreu nos últimos dias do cultivo quando constatado a fase de declínio ou morte da microalga estudada. Resultados similares de depleção desses nutrientes foram vistos em diferentes estudos com a *Scenedesmus sp.* Como em Gupta et al. (2016), obtiveram uma remoção de 99% para o nitrogênio e 98% para fosfato utilizando a *Scenedesmus obliquus*. Da Fontoura (2017), verificaram um máximo de remoção de nitrogênio (85,63%) e fósforo (96,78%) com a *Scenedesmus sp.* em águas residuais de curtume.

Kim et al. (2015), demonstraram que a *Scenedesmus sp.* metaboliza efetivamente o nitrogênio e fósforo sem suprimir assimilação de quaisquer nutrientes.

O nitrogênio desempenha um papel importante no aprimoramento da composição bioquímica durante a fotossíntese (SHANTHI *et al.*, 2018). É um dos elementos de crescimento mais importantes, pois é um componente importante de moléculas biológicas como DNA, clorofila e proteína (CHOKSHI *et al.*, 2017; PANCHA *et al.*, 2015).

O padrão de temperatura e as intensidades de luz foi registrado durante o cultivo. A variação simultânea desses parâmetros é normal principalmente porque em culturas de grande escala, é difícil manter todas elas como variáveis constantes ao longo do ciclo produtivo (AL JABRI *et al.*, 2021).

A temperatura é um parâmetro sensível para o crescimento de microalgas e concomitantemente as atividades metabólicas (EL-SHEEK *et al.*, 2017). Durante cultivo a temperatura máxima foi de 41,6 °C e a mínima de 21,25 °C. Já no que concerne a luminosidade, o resultado máximo foi de 99,20 lux e mínima de 0 lux. Vale salientar que microalga *Scenedesmus sp.* é considerada um dos mais promissores gêneros por ter facilidade de cultivo e tolerância a altas temperaturas (CHEN et al., 2013).

A intensidade da irradiação desempenha um papel fundamental no crescimento das microalgas e pode afetar fortemente o acúmulo de carboidratos nas células (WANG *et al.*, 2017).

Os resultados do pH do cultivo variaram de 8,7 a 9,2 durante o cultivo. Já Latiffi *et al.* (2017), cultivaram no meio BBM (Bold's Basal Medium) a *Scenedesmus sp.* e obtiveram variações de pH 6-7.

O pH é um das condições ambientais mais críticas no cultivo de microalgas, uma vez que determina a solubilidade e disponibilidade de CO₂ e de nutrientes tendo uma influência significativa no metabolismo desses microrganismos. Cada espécie de microalga possui uma faixa de pH ideal para a produção de biomassa, que é estreita e específica da cepa (MOHEIMANI *et al.*, 2013).

Os teores de proteínas, carboidratos, lipídios, umidade e cinzas na biomassa da microalga estudada estão dispostos na Tabela 2. A composição química das microalgas é frequentemente determinada com o objetivo de fornecer as informações nutricionais necessárias para o consumidor e também para determinar as variações em relação às condições sob as quais as microalgas foram cultivadas. A composição química varia de espécie para espécie e ainda de cultivo para cultivo. Geralmente a proteína é o principal constituinte orgânico (MATOS, 2019).

Tabela 2. Composição proximal no cultivo da *Scenedesmus ecornis*

Fases de crescimento	Carboidrato (g 100 g ⁻¹)	Proteína (g 100 g ⁻¹)	Lipídio (g 100 g ⁻¹)	Umidade (g 100 g ⁻¹)	Cinzas (g 100 g ⁻¹)
Exponencial	16,37 ^b ±0,4	38,7 ^c ± 0,7	15,7 ^c ±0,2	2,0 ^b ±0,5	25,1 ^a ±1
Estacionária	10,9 ^c ±0,6	48,5 ^a ± 0,5	14,5 ^b ±0,4	3,5 ^a ±0,5	19,8 ^b ±0,9
Declínio	20,9 ^a ± 0,4	30,1 ^b ± 0,8	25,5 ^a ±0,5	4 ^a ±0	16 ^c ±0,2

Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (p > 0,05). Teste de Tukey

O teor de proteína da *Scenedesmus ecornis* mostrou ser influenciado pela depleção de nitrato e fosfato no meio já que o cultivo na fase de morte obteve um menor teor do componente (30,1 g 100 g⁻¹). Os resultados obtidos por Prancha *et al.* (2014), revelam que as condições de limitação de nitrogênio e privação sequencial de nitrogênio diminuem significativamente a atividade fotossintética, bem como o teor de proteína bruta no microrganismo.

Já os maiores teores de proteínas foram encontrados na fase estacionária (48,5 g-100 g⁻¹). Diferentes resultados foram encontrados por Telung *et al.* (2017), verificaram valores de proteínas da *S. dimorphus* de 26,6 g 100 g⁻¹. Já Ferreira *et al.* (2019), obtiveram 31,4 g 100 g⁻¹ de proteínas da *Scenedesmus obliquus* cultivada em efluente de cervejaria. Valor similar ao encontrado por Gouveia *et al.* (2016), utilizaram a *S. obliquus* em águas residuais domésticas e obtiveram 32,7 g 100 g⁻¹.

O maior teor de carboidratos ($20,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) foi encontrado na fase de declínio. Resultado similares a Ho *et al.* (2012), constataram um aumento no teor de carboidratos de 29% da *Scenedesmus obliquus* cultivada com deficiência de nitrogênio. O acúmulo de carboidratos pela via de limitação de nitrogênio é um processo amplamente estabelecido, o carbono é fixado fotossinteticamente no ciclo de Calvin é convertido diretamente em carboidratos em vez de seguir a síntese de aminoácidos (MAYERS *et al.*, 2018).

Alguns estudos com meios alternativos obtiveram resultados diferentes de carboidratos correlacionados com o presente estudo ($10,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ a $20,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) como Ferreira *et al.* (2019), cultivaram a *Scenedesmus obliquus* em efluente de cervejaria e obtiveram $30,2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de carboidratos. Kathoon *et al.* (2017), relataram valores de carboidratos de $27,7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ da *Scenedesmus obliquus* cultivadas em meios de Bristol sob condição de controle. Diferente de Batista *et al.* (2015), obtiveram $11,7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de carboidratos cultivando a mesma espécie em águas residuais domésticas.

O crescimento de microalgas e a composição celular podem ser significativamente afetados por vários parâmetros de cultura (por exemplo, temperatura, intensidade de luz, quantidade de nutrientes) (WU *et al.*, 2019). No entanto, o acúmulo de carboidratos geralmente ocorre devido ao esgotamento de nutrientes (QU *et al.*, 2020).

A acumulação lipídica sob condições de inanição por nitrogênio em várias microalgas é amplamente estudado (MINHAS *et al.*, 2016). Ratificando o que ocorreu no presente estudo com a fase de declínio onde houve diferença significativa no teor de lipídios ($25,5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Pancha *et al.* (2015), obtiveram valores em torno de $25 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de lipídio. Corroborando com os dados de Pancha *et al.* (2014), que verificaram $27,93 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de lipídio com a limitação de nitrogênio. Kathoon *et al.* (2017), obtiveram valores de lipídios de $42,6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ da *Scenedesmus obliquus* cultivadas em meios de Bristol sob condição de controle. Resultados similares foram registrados também por Chavan; khobragade (2018), com valores de $26,7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de lipídio da *Scenedesmus vacuolatus* cultivada em meio BG11.

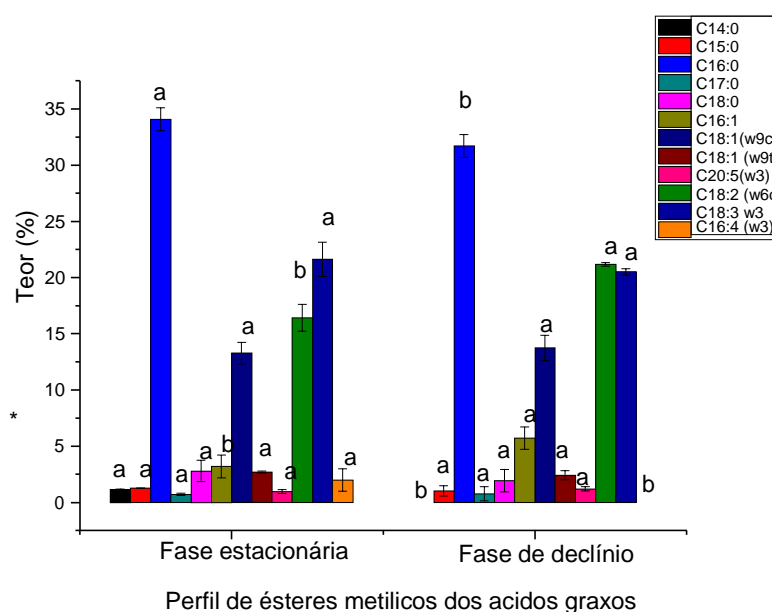
Olofsson *et al.* (2014), também relataram que a condição limitadora de nitrogênio favoreceu o desvio do excedente pool de energia e carbono de uma via de síntese de aminoácidos para síntese de lipídios.

Quanto ao teor de cinzas, o maior teor foi obtido na fase exponencial ($25,1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Valores diferentes foram encontrados por Telung *et al.* (2017), obtiveram o teor de cinzas de 18,1% da *S. dimorphus*. Já Kent *et al.* (2015), registraram 15,72% de cinzas da biomassa da *Scenedesmus sp.* cultivada em meio BOLD.

O teor de umidade entre as amostras variou de 2 a 4 g 100 g⁻¹ dentro as diferentes fases do cultivo estando com valores adequados. Já que um produto deve ter um teor de água inferior a 10% visto que a umidade afeta sua deterioração podendo contribuir para o crescimento de bactérias, mofo e fungos (MATOS, 2019).

A composição de ácidos graxos microalgal está intimamente relacionada à composição química do meio de cultivo (PALIWAL *et al.*, 2017; DARKI *et al.*, 2017). A *Scenedesmus ecornis* apresentou um total de 60 mg/g de ésteres totais na fase estacionária e 55mg/g na fase de declínio. Ocorrendo uma diversificação dos ácidos graxos no que se refere às variações do comprimento das cadeias, geralmente entre quatorze e dezoito carbonos, e ainda nos teores de insaturações (Figura 3).

Figura 3. Perfil de ácidos graxos da *Scenedesmus ecornis* na fase estacionária e de declínio



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$). Teste de Tukey

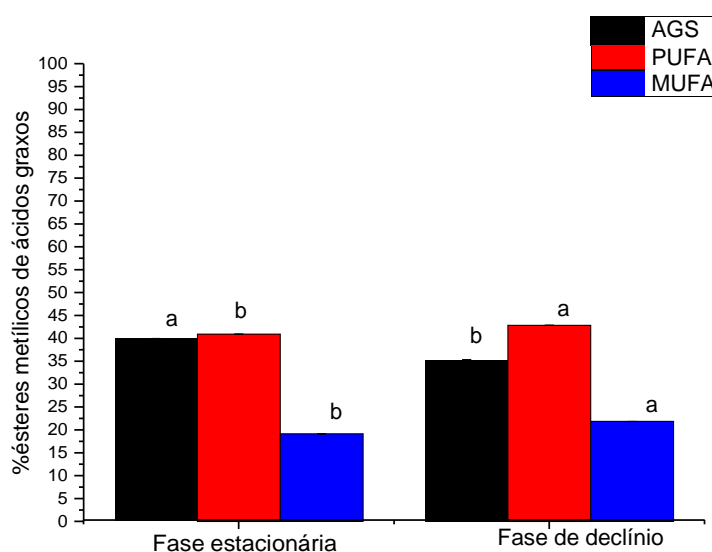
O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido predominante nos dois ensaios e em maior quantidade na fase de morte. Corroborando com outros estudos que evidenciaram o ácido palmítico como o mais abundante com o mesmo gênero da microalga estudada (ANAND *et al.* 2014, JI *et al.* 2015, Almeida *et al.* 2018; MAHESH *et al.*, 2019; CICCINI; BAVI, 2016). Jethani *et al.* (2018), obtiveram 30,97% de ácido palmítico da *Scenedesmus obtusus* cultivada em lagos circulares.

O ácido alfa-linolênico (C18:3n3), foi o segundo ácido encontrado em maior quantidade não ocorrendo diferença significativa entre as duas fases de crescimento. Darki et al. (2017), obtiveram 28,4% desse ácido quando cultivaram com deficiência/a de nitrogênio e fósforo da *Scenedesmus obliquus*. Já Hlaing et al. (2019), obtiveram 50,91% com meio de água doce otimizado da *S. obliquus*.

Nos resultados de ácido oleico (C18:1) não houve diferença significativa entre as amostras. Chavan; khobragade (2018), relataram valores do ácido oleico (65,83%), com a *Scenedesmus vacuolatus* cultivada em meio BG11. Jil et al. (2015), registraram 10% do ácido oleico da *Scenedesmus obliquus* em águas residuais de alimentos.

Houve diferença significativa na fase de morte para o ácido linoleico (C18:2 ω -6). Resultados similares a Chavan; khobragade (2018), registraram valores de ácido linoleico (20,10%), da *Scenedesmus vacuolatus* cultivada em meio BG11.

Figura 4. % Ésteres metílicos de ácidos graxos encontrados na fase estacionária e de declínio



Colunas seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$). Teste de Tukey

Em relação aos tipos de ésteres de ácidos graxos (Figura 4), observa-se que a fase de declínio obteve um maior teor de ácidos graxos polinsaturados (42,84%) e monoinsaturados (21,83%) quando comparado com a fase estacionária. Corroborando com os resultados de Darki et al. (2017), registraram 43,7% de ácidos graxos poliinsaturados quando cultivaram a *Scenedesmus obliquus* com deficiência de nitrogênio e fósforo. Hlaing et al. (2019), obtiveram

63,43% de ácidos graxos poli-insaturados *S. obliquus* com meio de água doce otimizado. Recentemente, o interesse em microalgas se concentrou na produção de compostos bioativos, como os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), que proporcionam às microalgas um alto valor agregado devido ao seu valor nutricional podendo ser utilizados nas indústrias nutracêuticas, de cosméticos, alimentos e rações (KUMAR et al., 2019; HLAING et al., 2019; SANCHEZ et al., 2016).

Houve diferença significativa entre os ácidos graxos saturados na fase estacionária (39,95%) e na fase de declínio (35,33%). Resultado idêntico a El-Sheek et al. (2018), que registraram com 37,73% quando cultivaram a *Scenedesmus obliquus* em meio Bold.

Tabela 3. Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos de extrações nas biomassas da *Scenedesmus ecornis*

Fases de crescimento	Extrações (%)			
	Ext alcalina	Água quente	Ultrassom	Água/ultrassom
Estacionária	7,2 ^{Bb} ±0,2	2,4 ^{Bd} ±0,1	4,4 ^{Bc} ±0,4	8,6 ^{Ba} ±0,1
Declínio	12 ^{Ab} ±0,5	5 ^{Ad} ±0,5	7 ^{Ac} ±0,6	13,3 ^{Aa} ±0,2

Letras maiúsculas- diferença entre os estágios na mesma extração (Teste T). Letra minúscula- diferença entre as extrações ($p < 0,05$). Colunas e linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$). Teste de tukey

Variações no rendimento de polissacarídeos são influenciadas por condições de cultivo, localizações geográficas, época e técnicas de colheita e metodologias de extração. A estrutura química dos polissacarídeos determina suas atividades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas (de Jesus Raposo et al., 2013). Diante disso, foram avaliados quatro diferentes metodologias de extrações (Tabela 3) para poder analisar qual dos métodos obteve maior rendimento.

Pôde-se constatar que houve diferença significativa entre todos os tipos de extração. E na fase de declínio houve um maior acúmulo de polissacarídeo independente do tipo de extração. He et al. (2014), obtiveram um maior acúmulo do polissacarídeo em um meio otimizado quando a concentração de nitrato diminuiu influenciando significativamente a produção de polissacarídeos intracelulares de *Scenedesmus sp.* Enfatizando que o efeito da limitação de nitrogênio pode levar ao maior acúmulo de polissacarídeos.

E ainda houve um maior acúmulo de polissacarídeos na extração com água/ultrassom, na fase de morte. Diferente de You et al. (2019), analisaram seis diferentes métodos de extrações de polissacarídeos e obtiveram um maior acúmulo quando utilizaram a extração alcalina.

Vale ressaltar que os polissacarídeos possuem atividades farmacêuticas, como antioxidantes, antibacterianos, antivirais, imunoestimulantes, efeitos anticoagulantes e anticâncer. Além disso, esses polissacarídeos têm muitos efeitos benéficos para a saúde e, portanto, possuem potencial nutracêutico (RUOCCO *et al.*, 2016).

Tabela 4. Composição química dos polissacarídeos em diferentes métodos de extrações.

Fase de crescimento	Extrações	Carboidratos	Proteínas
Fase de declínio	Ext alcalina	66 ^b ± 1	6,2 ^a ±0,2
	Água quente	55 ^c ±1	5,1 ^b ±0,1
	Ultrassom	54,4 ^c ±0,6	4,5 ^b ±0,6
	Água/Ultrassom	71,3 ^a ± 1	0,6 ^c ±0,1

Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$). Teste de Tukey

A composição química dos polissacarídeos nos diferentes métodos de extração (Tabela 4) atraem atenção a pesquisa devido à sua ampla gama de importantes atividades biológicas. Houve diferença significativa no teor de carboidratos na extração com água/ultrassom. Corroborando com Belhaj *et al.* (2017), que obtiveram um alto teor de carboidratos decorrente da extração de polissacarídeo.

As amostras analisadas mostraram que o menor teor de proteínas foi obtido na extração água/ultrassom e provavelmente se deu devido a metodologia utilizada que retirou a proteína remanescente do polissacarídeo. Resultado similar Belhaj *et al.* (2017), que obtiveram 0,4% de proteína do monossacarídeo da microalga *Phormidium versicolor*, utilizando a mesma metodologia de extração.

Tabela 5. Perfil de monossacarídeos na fase de declínio do cultivo da *Scenedesmus ecornis*.

Componentes	Concentração final (g/L ⁻¹)
Glucose	7,89
Maltose	2,1
Xilose	4,33
Arabinose	1,36

A análise de monossacarídeos (Tabela 5) mostrou uma composição mista de quatro monossacarídeos, incluindo a glicose, maltose, xilose e arabinose. Singaba *et al.* (2018), obtiveram a glicose, a xilose e a arabinose da análise de monossacarídeos, cultivando a *Scenedesmus obliquus* em meio BG11. Já Alam *et al.* (2019), obtiveram da análise de monossacarídeos do cultivo da *Scenedesmus raciborskii* em meio BG11, a glicose e a xilose

como componentes em comum, sendo a xilose como componente majoritário. Porém, corroborando com os resultados do presente trabalho, Teuling *et al.* (2017), registraram a glicose como componente principal componente e cultivaram a *S. dimorphus*.

A diversidade evolutiva das microalgas envolve uma enorme complexidade em termos de presença, composição, e organização molecular de biopolímeros estruturais. Assim, os polissacarídeos obtidos a partir de microalgas possuem potencial para serem usados como espessantes na indústria de alimentos. Para ter sucesso ao introduzir esses polissacarídeos como novos hidrocolóides alimentares, a caracterização e funcionalidade devem ser direcionadas para polissacarídeos obtidos a partir da individualidade da cepa. Conhecimentos fundamentais sobre a composição de polissacarídeo pode ajudar a prever a funcionalidade de extratos específicos de polissacarídeos (BERNAERTS *et al.*, 2019).

Tabela 6. Composição do Exopolissacarídeos nas diferentes fases de crescimento da *Scenedesmus ecornis*.

Fase de crescimento	Rendimento EPS mg/L	Proteína (EPS)	Carboidrato (EPS)
Estacionária	36 ^a ± 0,2	0 ^a	55 ^a ± 0,3
Declínio	56 ^b ± 0,4	0 ^a	58 ^b ± 0,4

Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$).

O rendimento de Exopolissacarídeos (EPS) (Tabela 6) na fase estacionária foi de 36 mg/L e na fase de declínio foi de 56 mg/L. Halaj *et al* (2019), testaram 17 tipos de cepas diferentes para produção de EPS e a produção variou de 16 a 1064 mg/L de meio de cultura. Demonstrando que o processo de excreção de polissacarídeos extracelulares é espécie-específico e ainda que nenhum dos fatores limitantes influenciam a liberação de EPS da mesma forma (BABIAK; KRZEMINSK, 2021; PATWAL *et al.*, 2021). Corroborando com resultados de diferentes estudos que obtiveram diferentes valores de EPS no cultivo de *Scenedesmus sp*, como Angelaalincy *et al* (2017) com 48,6 mg/L EPS. Sivaramakrishnan *et al.* (2020), com 51 mg/L de EPS. E ainda Shen *et al.* (2017), que obtiveram 81,5 mg/L de EPS.

No presente estudo pode-se constatar um aumento da produção de EPS quando ocorreu a depleção de nitrogênio. Um dos fatores que contribuem para o aumento da síntese de EPS pelas células de microalgas é a deficiência de nitrogênio (BABIAK; KRZEMINSK, 2021). Vários estudos confirmaram os benefícios dessa depleção para o rendimento de EPS (SASAKI *et al.* 2020; ANGELAALINCY *et al.*, 2017; MAHESH *et al.*, 2019).

Os teores de carboidratos no exopolissacarídeo foram de 55% para a fase estacionária e de 58% para a fase de declínio. Halaj *et al.* (2019), demonstraram que os teores de carboidratos nos EPS variaram de 1 a 88% em diferentes espécies de microalgas. No mesmo estudo, o teor de proteínas variou de 0 a 16%. Essa variação pode ter ocorrido devido a presença de glicanos puros, proteoglicanos ou glicoproteínas com diferentes teores de proteína, corroborando com resultado de vários estudos (DELATTRE *et al.* 2016 ; ROSSI; DE PHILIPPIS, 2016). Já o presente estudo não apresentou teor de proteína no EPS. Corroborando com resultado obtido por Patwal; Baranwal (2021), que cultivaram a *Scenedesmus acutus*. Diferentes composições podem ocorrer entre as microalgas para o EPS (LAROUCHE *et al.*, 2022).

As proteínas também são frequentemente encontradas nas amostras estudadas, mas provavelmente são contaminantes e não fazem parte do EPS. Porém, é importante quantificá-los, pois, em alguns casos, não se pode excluir que algumas propriedades das amostras podem ser modificadas pela sua presença (LAROUCHE *et al.*, 2022).

Diante dos resultados obtidos vale salientar a extrema importância de otimizar os componentes e condições cruciais que aumentam o rendimento de polissacarídeos (ANGELAALINCY *et al.*, 2017). Já que esse rendimento depende principalmente dos meios e condições de cultura (DELATTRE *et al.*, 2016).

Os polissacarídeos extracelulares de microalgas (EPS) têm chamado a atenção dos pesquisadores devido às suas amplas aplicações na indústria farmacêutica, terapêutica, mecânica e alimentícia. Atualmente, os EPS são muito utilizados na indústria alimentícia como agentes gelificantes e espessantes que estão sendo utilizados para melhorar a textura e a qualidade dos produtos alimentícios (XIAO; ZHENG 2016; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2020).

CONCLUSÃO

O cultivo da *Scenedesmus ecornis* em meio com biocomposto de frutas e hortaliças em larga escala se mostrou eficiente durante as diferentes fases de crescimento. Pois permitiu crescimento celular satisfatório, durante as fases de crescimento. Os maiores teores proteicos foram encontrados durante a fase estacionária. Diferente dos teores de carboidratos e lipídios que foram superiores na fase de declínio, quando também houve uma diminuição do teor de nitrato e fosfato da cultura. Durante a fase de declínio também houve uma maior produção de ácidos graxos mono e polinsaturados e também um maior acúmulo de polissacarídeo independente do tipo de extração. Ainda ocorreu, um maior acúmulo de EPS. Constatou-se que durante as diferentes fases de crescimento, as microalgas são capazes de produzir diferentes compostos. Inclusive muitos desses possuem potencial para serem aplicados na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- AL JABRI, A.; TALEB, A.; TOUCHARD, R.; SAADAOU, I.; GOETZ, V.; PRUVOST, J. Cultivating Microalgae in Desert Conditions: Evaluation of the Effect of Light-Temperature Summer Conditions on the Growth and Metabolism of *Nannochloropsis* QU130. **Appl. Sci**, v11, 2021.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, **Official Method** 935.46. 21 ed. Rockville: 2019.
- APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American public health Association. American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, 1998.
- ALAM, M. A.; YUAN, T.; WENLONG, X.; ZHANG, B.; LV, Y.; XU, J. Process Optimization for the Production of High-Concentration Ethanol with *Scenedesmus raciborskii* Biomass. **Bioresource Technology**, 2019
- ALMEIDA, G.F.; ARAÚJO, P.H.F.; FLORENTINO, A.C. BEZERRA, R.M.; CARVALHO, J.C.T. M. FAUSTIN, S.M.M.; FERREIRA, I.M. Fatty acid ethyl esters from microalgae of *Scenedesmus ecornis* by enzymatic and acid catalysis. **Quim. Nova**, v. 41, n. 1, 2018
- AMPOFO, J.; ABBEY, L. Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. **Foods**, 2022
- ANAND, V.; KASHYAP, M.; SAMADHIYA, K.; GHOSH, A.; KIRAN, B. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger? **Biomass and Bioenergy**, v.127, 2019
- ANGELAALINCY, M.; SENTHILKUMAR, N.; KARPAGAM, R.; KUMAR, G.G.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Enhanced Extracellular Polysaccharide Production and Self-Sustainable Electricity Generation for PAMFCs by *Scenedesmus* sp. **SB1ACS Omega**, v.2, n.2, 2017.
- AZIZ, M. M. A., KASSIM, K. A., SHOKRAVI, Z., JAKARNI, F. M., LIEU, H. Y., ZAINI, N., SHOKRAVI, H. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.119, 2020
- BABIAK, W.; KRZEMINSKA, I. Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. **Energies**,v.14, 4007, 2021.
- BATISTA, A.P.; AMBROSANO, L.; GRAÇA, S.; SOUSA, C.; MARQUES, P.A.S.S.; RIBEIRO, B.; BOTREL, E.P.; NETO, P.C.; GOUVEIA, L. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production e an integrated microalgae-based approach. **Bioresour. Technol**, v.184, 2015

BELHAJ, D.; FRIKHA, D.; ATHMOUNI, K.; JERBI, B.; AHMED, M. B.; BOUALLAGUI, Z.; AYADI, H. Box-Behnken design for extraction optimization of crude polysaccharides from Tunisian *Phormidium versicolor* cyanobacteria (NCC 466): Partial characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.105, 2017

BERNAERTS, T.M.M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M.E.; VAN, LOEY AM. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnol Adv**, 2019

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, 911-917, 1959.

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

CHAVAN, D.B.; KHOBRADE, C.N. Evaluation of Fatty Acid Profile and Biodiesel Characterization Obtained from Novel Algae *Scenedesmus vacuolatus* X56104. **IJAEB**. v.11, n.1, 2018

CHEN, L.; WANG, C.; WANG, W.; WEI, J. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. **Bioresource Technology**, 2013

CHOIX, M.A; OCHOA-BECERRA.;HSIEH-LO ,M.et al. Alta produção de biomassa e fixação de CO₂ a partir de biogás por microalgas *Chlorella* e *Scenedesmus* usando vinhaça de tequila como meio de cultura **Journal of Applied Phycology** , v.30, 2018

CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for Biofuels**, v.10, n.1, 2017

CICCI, A.; BRAVI, M. Fatty Acid Composition and Technological Quality of the Lipids Produced by the Microalga *Scenedesmus dimorphus* a Function of Culturing Conditions Agnese. **Chemical engineering transactions**, v. 49, 2016.

DA FONTOURA, J. T.; ROLIM, G. S.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. **Process Safety and Environmental Protection**, v.111, 2017

DARKI, B.Z.; SEYFABADI, J. Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*, Sima Fayazi. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.60, 2017

De CARVALHO, J.C.; SYDNEY, E.B.; TESSARI, L.F.A.; RICARDO, C. **Culture media for mass production of microalgae**. In: Ashok Pandey, Jo-Shu Chang, Carlos Ricardo Soccol,

Duu-Jong Lee, Yusuf Chisti (Eds Biomass, Biofuels, Biochemicals, Biofuels from Algae (Second Edition), Elsevier, 2019

DE JESUS RAPOSO, M.F.; DE MORAIS, A.M.B.; DE MORAIS, R.M.S.C. **Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae**. In: Merillon, J.M., Ramawat, K.G. (Eds.), Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology. Springer, Cham, Switzerland 2013

EL-SHEEKH, M.; ABOMOHOORA, A.E.F.; EL-AZIM, A.E.; SHANNAB, R.A. Effect of temperature on growth and fatty acids profile of the biodiesel producing microalga *Scenedesmus acutus*. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, v.21, n.4, 233-239, 2017.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnol Adv**, v.34,n.7, 2016

EL-SHEEKH, M.; ABOMOHOORA, A.; E.-F., ELADEL.; H., BATTAH, M.; Mohammed, S. Screening of different species of *Scenedesmus* isolated from Egyptian freshwater habitats for biodiesel production. **Renewable Energy**, v.129, 2018

FERREIRA, A.; RIBEIRO, B.; FERREIRA, A. F.; TAVARES, M. L. A.; VLADIC, J.; VIDOVIĆ, S.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2019

FU, W.; NELSON, D. R.; YI, Z.; XU, M.; KHRAIWESH, B.; JIJAKLI, K.; SALEHI-ASHTIANI, K. Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects. **Studies in Natural Products Chemistry**, 2017

GUPTA S.K., ANSARI F.A.; SHRIWASTAV A.,;SAHOO N.K.; RAWAT I.; BUX F. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. **J. Cleaner Prod.**, 115, 2016

GOUVEIA, L., GRAÇA, S., SOUSA, C., AMBROSANO, L., RIBEIRO, B., BOTREL, E.P., NETO, P.C., FERREIRA, A.F., SILVA, C.M. Microalgae biomass production using wastewater: treatment and costs. Scale-up considerations. **Algal Res**, 2016

GUPTA S.K.; ANSARI F.A.; SHRIWASTAV A.; SAHOO N.K.; RAWAT I.; BUX F. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. **J. Cleaner Prod.**, v.115, 2016

HALAJ, M.; CHVALOVA, B.; CEPÁK, V.; LUKAVSKÝ, J.; CAPEK, P. Searching for microalgal species producing extracellular biopolymers, **Chemical Papers**, v.72, 2018

HLAING, S. A. A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, 2019

HO, S.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresour Technol**, v.113, 2012

JIL, M.-K.; YUN, H.-S.; PARK, Y.-T.; KABRA, A. N.; OH, I.-H.; CHOI, J. Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production. **Journal of Environmental Management**, v.159, 2015

KANG, Q.; CHEN, S.; LI, S.; WANG, B.; LIU, X.; HAO, L.; LU, J.; Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.124, 2019

KENT, M.; WELLADSEN, H.M.; MANGOTT, A.; LI, Y. Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. **PLoS ONE**, 2015

KIM, G.Y.; YUN, Y.M.; SHIN, H.S.; KIM, H.S.; HAN, J.I. *Scenedesmus* based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. **Bioresour. Technol**, v.196, 2015

KOCHERT, G. **Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric**. in: HELLEMBUST, J.A., GRAIGIE, J.S. (eds). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical methods*. Cambridge: Cambridge University 1978. p.95-97

KUMAR, B. R.; DEVIRAM, G.; MATHIMANI, T.; DUC, P. A.; PUGAZHENDHI, A. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019

LAROCHE, C. Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications. **Mar. Drugs**, v.20, 2022.

LATIFFI, N. A.; MOHAMED, R. M. S.; APANDI, N. M.; TAJUDDIN, R. M. Experimental Assessment on Effects of Growth Rates Microalgae *Scenedesmus sp.* in Different Conditions of pH, Temperature, Light Intensity and Photoperiod. **Key Engineering Materials**, v.744, 2017

LEE, S.H., AHN, C.Y.; JO, B.H.; LEE, S.A.; PARK, J.Y.; AN, K.G.; OH, H.M. Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N:P ratio in wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.2, 2013

LI, X.; WANG, M.; LIAO, X.; CHEN, H.; DAI, Y.; CHEN, B. Two Stages of N-Deficient Cultivation Enhance the Lipid Content of Microalga *Scenedesmus sp.* **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.92, n.4, 2015

LIU, J.; YAO, C.; MENG, Y.; CAO, X.; WU, P.; XUE, S. The guided supply of nitrogen in culture medium facilitates sustainable production of TAG in *Nannochloropsis oceanica* IMET1. **Biotechnol Biofuels**, v.11, 2018

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951.

MATOS, J.; CARDOSO, C.; BANDARRA, N.M.; AFONSO, C. Microalgae as a healthy ingredient for functional food: A review. **Food Funct**, v.8, 2017

MAHESH, R.; NAIRA, V.R.; MAITI, S.K. . Concomitant production of fatty acid methyl ester (biodiesel) and exopolysaccharides using efficient harvesting technology in flat panel photobioreactor with special sparging system via *Scenedesmus abundans*. **Bioresour. Technol**, v.278, 2019.

MATOS, Â. P. Microalgae as a Potential Source of Proteins. **Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications**, 2019

MAYERS, J.J.; VAICIULYTE, S.; MALMHÄLL-BAH, E.; ALCAIDE-SANCHO, J.; EWALD, S.; GODHE, A.; EKENDAHL, S.; ALBERS, E. Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. **Algal Res**, v.31, 2018.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v.13, n.1, 2013

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.7, 2016.

MOHEIMANI, N.R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella sp* (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors, **J. Appl. Phycol**, v. 25, 2013

OLOFSSON, M.; LAMELA, T.; NILSSON, E.; BERGÉ, J.-P.; DEL PINO, V.; URONEN, P.;LEGRAND, C. Combined Effects of Nitrogen Concentration and Seasonal Changes on the Production of Lipids in *Nannochloropsis oculata*. **Marine Drugs**, v.12, n., 2014

PALIWAL, C., MITRA, M., BHAYANI, K., BHARADWAJ, S.V.V., GHOSH, T., DUBEY, S., MISHRA, S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, v.244, 2017

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

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus sp*. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v.156, 2014

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MISHRA, S. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v.79, 2015

QU, W.; SHOW, P.L.; HASUMUMA, T.; HO, S.H. Optimizing real swine wastewater treatment efficiency and carbohydrate productivity of newly microalga *Chlamydomonas sp.* QWY37 used for cell-displayed bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 305, 2020.

ROSSI ,F.; PHILIPPIS, R. **Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis.** In: Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (eds) The physiology of microalgae. Springer International Publishing, Cham, 2016.

RUOCCO, N.; COSTANTINI, S.; GUARINIELLO, S.; COSTANTINI, M. Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential. **Molecules**, v.21, 2016

SHANTHI, G.;PREMALATHA, M.; ANANTHARAMAN, N. Effects of L-amino acids as organic nitrogen source on the growth rate, biochemical composition and polyphenol content of *Spirulina platensis*. **Algal research**, v.35, 2018

SHEN, G., QU, D., LI, K., & LI, M. Composition of Extracellular and Intracellular Polymeric Substances Produced by *Scenedesmus* and *Microcystis*. **Environmental Engineering Science**, v.34, n.12, 2017.

SINGABA, A.N.; IBRAHIMB, N.; EL-SAYEDC , A.E.; EL-SENOUSYD , W.; ALYE, H.; ELSAMIAEB, A.A.;MATLOU, A.A. Antiviral, cytotoxic, antioxidant and anticholinesterase activities of polysaccharides isolated from microalgae *Spirulina platensis*, *Scenedesmus obliquus*, and *Dunaliella salina*. **Arch Pharm Sci ASU**, v.2, n.2, 2018

SINGH, G.; PATIDAR, S.K. Microalgae harvesting techniques: a review . **J. Environ. Manag.**, v.217, 2018.

SIVARAMAKRISHNANA , R.; SURESHB , S.; PUGAZHENDHIC , J. A.; PAULINED M.N.; INCHAROENSAKDIA, A. Response of *Scenedesmus sp.* to microwave treatment: Enhancement of lipid, exopolysaccharide and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 312, 2020

SULOCHANA, S.B.; ARUMUGAN, M. Influence of abscisic acid on growth, biomass and lipid yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition, **Bioresource Technology**, v.213, 2016

TEULING, E.; WERENGA, P.A.; SCHRAMA, J.W.; GRUPPEN, H. Comparison of protein extracts from various unicellular green sources. **J. Agric. Food Chem.**, 2017

TIJI, Y.T.; FIELDS, F. J.; MAYFIELD, S. P. Microalgae as a future food source. **Biotechnology Advances**, v.41, 2020.

TRIPATHI, R.; GUPTA, A.; THAKUR, I.S. Renewable An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus sp.* ISTGA. **Energy**, v.135, 2019

WU, X.; CEN, Q.; ADDY, M.; ZHENG, H.; LUO, S.; LIU, Y.; CHENG, Y.; ZHOU, W.; CHEN, P.; RUAN, R.A. novel algal biofilm photobioreactor for efficient hog manure wastewater utilization and treatment. **Bioresource Technol**, v.292, 2019

YU, J.; HU, Y.; XUE, M.; DUN, Y.; LI, S.; PENG, N.; LIANG, Y.; ZHAO, S. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.26, n.7, 2016.

WANG, Y.; HO, S.H.; CHENG, C.L.; NAGARAJAN, D.; GUO, W.Q.; LIN, C.; LI, S.; REN, N.; CHANG, J.S. **Nutrients and COD removal of swine wastewater with an isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* CL-M1 accumulating high carbohydrate content used for biobutanol production.** **Bioresource Technol**, v.242, 2017.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnol Adv**, v.34, 2016

Utilização do resíduo de malte da indústria cervejeira como meio alternativo para o cultivo da *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima*

Use of malt residue from the brewing industry as an alternative medium for growing *Spirulina platensis* and *Spirulina máxima*

Uso de residuos de malta de la industria cervecera como medio alternativo para el cultivo de *Spirulina platensis* y *Spirulina máxima*

Roberta Conceição Ribeiro Varandas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5494-5080>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: robertacoriva@hotmail.com

Andressa Coimbra Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6240-0809>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: andressacope@gmail.com

Vilma Barbosa da Silva Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9973-4060>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: vilmaengenhaira2@gmail.com

Patrícia de Moura Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2848-3847>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: patricia_moura_almeida@hotmail.com

Nyelson da Silva Nonato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2208-2265>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: nyelsonnonato@gmail.com

Maria Helena Juvito da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3355-2373>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: helenajuvito@gmail.com

Luís Celso Cardoso de Pina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7123-1197>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: luiscelso91@hotmail.com

Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan

ORCID:

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail:

Cristiane Francisca da Costa Sassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4980-1779>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: cfcosta_ccosta@yahoo.com

Marta Maria da Conceição

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2654-2276>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: martamaria8@yahoo.com

Resumo

Espécies pertencentes ao gênero *Spirulina* estão entre os microrganismos fotossintéticos de maior importância comercial. Este trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo da *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima* com substituição parcial de meio sintético por meio de cultura de baixo custo RM (resíduo de malte de cevada) bem como extrair compostos bioativos aplicáveis a indústria de alimentos. Foram avaliados os parâmetros de crescimento, composição da biomassa, concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos graxos, extração de ficocianina, polissacarídeos e monossacarídeos. Os cultivos utilizando RM na concentração de 50% obtiveram crescimento equivalente ao controle. O teor de clorofila foi superior para as duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio controle. Os teores de ficocianina foram superiores para *Spirulina platensis*. Os maiores teores proteicos foram encontrados para *Spirulina platensis* (55,9g 100g⁻¹) seguida da *Spirulina maxima* (53,3g 100g⁻¹) cultivadas em RM. Os ácidos polinsaturados linoleico e alfa-linolênico apresentaram percentuais mais elevados nas cepas cultivadas em RM. O teor de PUFA foi maior nos cultivos em meio RM, variando de 57 a 59%. A extração de polissacarídeos com água quente/ultrassom apresentou maiores valores nas duas espécies cultivadas em meio RM variando de 8,3 a 11,2%. O teor de exopolissacarídeos destacou-se no cultivo com meio RM (191 a 193mg·L⁻¹) para ambas as espécies. Os resultados obtidos evidenciam que a utilização de resíduo de malte como substituto parcial ao meio controle é adequada como meio alternativo para o cultivo das *Spirulinas platensis* e *maxima*. Além disso, destaca-se o potencial de seus compostos bioativos para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: Microrganismos Fotossintéticos; Resíduo; Cultivo.

Abstract

Species belonging to the genus *Spirulina* are among the most commercially important photosynthetic microorganisms. This work aimed to evaluate the cultivation of *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima* with partial replacement of synthetic medium by RM (barley malt residue) as well as to extract bioactive compounds applicable to the food industry. Growth parameters, biomass composition, concentrations of proteins, carbohydrates, lipids, fatty acids, phycocyanin extraction, polysaccharides and monosaccharides were evaluated. The cultures using RM at a concentration of 50% obtained growth equivalent to the control. The chlorophyll content was higher for the two *Spirulina* species grown in the control medium. Phycocyanin levels were higher for *Spirulina platensis*. The highest protein contents were found for *Spirulina platensis* (55.9g 100g⁻¹) followed by *Spirulina maxima* (53.3g 100g⁻¹) cultivated in RM. The polyunsaturated linoleic and alpha-linolenic acids showed higher percentages in the strains cultivated in MR. The PUFA content was higher in cultures in RM medium, ranging from 57 to 59%. The extraction of polysaccharides with hot water/ultrasound showed higher values in the two species grown in RM medium, ranging from 8.3 to 11.2%. The content of exopolysaccharides was highlighted in the culture with RM medium (191 to 193mg·L⁻¹) for both species. The results show that the use of malt residue as a partial substitute for the control medium is suitable as an alternative medium for the cultivation of *Spirulinas platensis* and *maxima*. In addition, the potential of its bioactive compounds for the food industry is highlighted.

Keywords: Photosynthetic Microorganisms; Residue; Cultivation.

Resumen

Las especies pertenecientes al género *Spirulina* se encuentran entre los microorganismos fotosintéticos de mayor importancia comercial. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el cultivo de *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima* con reemplazo parcial de medio sintético por medio de cultivo RM (barley malt residue) de bajo costo, así como extraer compuestos bioactivos aplicables a la industria alimentaria. Se evaluaron parámetros de crecimiento, composición de la biomasa, concentraciones de proteínas, carboidratos, lípidos, ácidos grasos, extracción de ficocianinas, polisacáridos y monosacáridos. Los cultivos que utilizaron RM a una concentración del 50% obtuvieron un crecimiento equivalente al control. El contenido de clorofila fue mayor para las dos especies de *Spirulina* cultivadas en el medio de control. Los

niveles de ficocianina fueron más altos para *Spirulina platensis*. Los mayores contenidos de proteína se encontraron para *Spirulina platensis* (55,9g 100g⁻¹) seguida de *Spirulina maxima* (53,3g 100g⁻¹) cultivada en RM. Los ácidos poliinsaturados linoleico y alfa-linolénico presentaron mayores porcentajes en las cepas cultivadas en MR. El contenido de PUFA fue mayor en los cultivos en medio RM, variando del 57 al 59%. La extracción de polisacáridos con agua caliente/ultrasonido mostró valores superiores en las dos especies cultivadas en medio RM, variando de 8,3 a 11,2%. Se destacó el contenido de exopolisacáridos en el cultivo con medio RM (191 a 193mg·L⁻¹) para ambas especies. Los resultados muestran que el uso de residuos de malta como sustituto parcial del medio control es adecuado como medio alternativo para el cultivo de *Spirulina platensis* y *maxima*. Además, se destaca el potencial de sus compuestos bioactivos para la industria alimentaria.

Palabras clave: Microorganismos Fotosintéticos; Residuo; Cultivo.

1. Introdução

Na indústria de alimentos, há uma demanda crescente por vários componentes de ação natural, como pigmentos, proteínas e vitaminas, a fim de substituir as contrapartes sintéticas e aumentar o valor nutricional dos produtos alimentícios (Shabana *et al.*, 2017).

Além de exigir produtos com alto valor nutricional e benefícios à saúde, os consumidores estão buscando cada vez mais ingredientes e/ou produtos mais naturais (Vigani *et al.*, 2015). As microalgas são excelentes fontes naturais de compostos bioativos altamente valiosos e se tornaram as mais promissoras e inovadoras fontes de novos alimentos e produtos funcionais no século XXI (Matos *et al.*, 2017). O mercado global de produtos derivados de microalgas, usados especialmente para nutracêuticos, suplementos alimentares e de ração, registram uma taxa de crescimento anual de 5,8% no período 2017-2026, onde espera-se atingir mais de 53 bilhões de dólares (Credence Research, 2018).

O gênero *Spirulina* (*Arthrospira*) representa entre as microalgas de maior importância comercial. É responsável por mais de 30% da biomassa produzida globalmente devido à alta concentração proteica (até 60%) e ao conteúdo de pigmentos (carotenoides, ficocianinas, clorofila), ácidos graxos insaturados (ácido linoleico e ácido gama-linolênico GLA), polissacarídeos e antioxidantes. Além disso, sua morfologia celular facilita recuperação de biomassa, o que contribui para a redução de custos do processo (Abd El Baky *et al.*, 2015; Patil *et al.* 2015; Ye *et al.*, 2018). Baseada na sua composição química a *Spirulina* tem sido chamada de super alimento (Mishra *et al.*, 2014). Sendo considerada uma microalga de fácil digestibilidade (Triveti *et al.*, 2015).

Diferentes espécies do gênero *Spirulina* são consumidas em todo o mundo, sendo a *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis* as mais utilizadas em virtude dos seus benefícios à saúde (Ghaeni; Roomiani, 2016). São amplamente comercializadas como nutracêuticos em diversos países como Austrália, China, Coreia do Sul, Malásia,

Cingapura, Taiwan, EUA, Holanda, Espanha, Portugal, França, Dinamarca, Japão e ainda alguns países da África (Raja *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2018).

Devido à sua ampla utilização na nutrição humana e animal (Asghari *et al.*, 2016), a Food and Drug Administration (FDA) concedeu Certificação GRAS (Generally Recognized as Safe) para *Spirulina* e teve seu consumo autorizado como alimento desde 2003 (Kumar *et al.*, 2018; Enzing *et al.*, 2014). Desde então, a biomassa ou os compostos bioativos da *Spirulina* vem sendo incorporados na elaboração de diversos alimentos como em massas (Fradinho *et al.*, 2020), pães (Khemiri *et al.*, 2020), iogurtes (Patel *et al.*, 2019), barras nutricionais (Kumar *et al.*, 2018) e ainda bebidas isotônicas, cereais, sopas instantâneas, pudim, mistura para bolo em pó (Vaz, 2016). Ressalta-se também sua aplicação como um suplemento dietético (Ye *et al.*, 2018), além da extração de compostos bioativos que podem ser utilizados em diferentes formas, como líquidos, concentrados, extratos, pó ou flocos (Raja *et al.*, 2018), e dessa forma, incrementar nutricionalmente e/ou tecnologicamente o produto final gerando o agregado.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o cultivo da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* com substituição parcial de meio sintético por meio de cultura de baixo custo (resíduo de malte), bem como extrair compostos bioativos com possíveis aplicações a indústria de alimentos.

2. Metodologia

2.1 Cultivo de espécies em condições controladas

A *Spirulina platensis* e a *Spirulina máxima* foram obtidas da Coleção de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB). As cepas foram cultivadas em meio alternativo preparado a partir do extrato de biocomposto do resíduo de malte de cevada (RM). O resíduo de malte foi fornecido por uma cervejaria artesanal (Turmalina), localizada no município de Cabedelo – PB. No LARBIM/UFPB foi realizado a compostagem do malte de cevada e posteriormente a preparação do extrato. A cada litro de água destilada foi utilizado 10 mL de extrato com adição de nitrato e fosfato.

As microalgas selecionadas foram cultivadas inicialmente em balões de vidro de 250 mL com 150 mL de meio de cultura preparado com resíduo de malte (RM) nas concentrações de 100%, 50% e 25%. Como controle utilizou-se o meio Zarrouk no qual também foi usado como diluente nas duas últimas concentrações de RM. Os cultivos foram realizados em triplicatas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), com iluminação fornecida por lâmpadas

fluorescentes tipo luz-do-dia ($150 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas. A concentração de partida para o cultivo das microalgas selecionadas foi de 2×10^4 células mL^{-1} .

Após a seleção da concentração do meio de cultivo mais adequado. O cultivo foi realizado em bancada em balões de 6L contendo 5L de meio. O crescimento das culturas foi acompanhado através da fluorescência “in vivo” (Turner Design Fluorometer). Os seguintes parâmetros de crescimento foram determinados: velocidade de crescimento (k), expressa como o número de divisões celulares por dia (Stein 1973), duração do cultivo (em dias), rendimento final de biomassa e a produtividade de biomassa (PB) por dia.

2.2 Análises da biomassa

Foram feitas determinações (em triplicata) de: proteínas, seguindo Lowry *et al.* (1951); carboidratos, seguindo Kochert (1978); lipídios totais, seguindo Bligh e Dyer (1959); Umidade e cinzas de acordo com AOAC (2016); O perfil de ácidos graxos das espécies foram determinados usando cromatografia a gás, descrita por Menezes *et al.* (2013) e os ésteres metílicos foram expressos em percentuais (%). Clorofila a, b e carotenoides totais seguindo o método de Sumanta *et al.* (2014); Hlaing *et al.* (2019). A extração da ficocianina foi determinada por Ilter *et al.* (2018), com modificações. E a pureza da ficocianina foi realizada através da metodologia de Chentir *et al.* (2018), com modificações. A extração de polissacarídeo foi realizada através de quatro metodologias diferentes descritas por Yu *et al.* (2019). A extração da proteína residual do polissacarídeo foi realizado pelo método SEVAGE (Wu *et al.*, 2017). Os exopolissacarídeos foram extraídos por de De Jesus Raposo *et al.* (2015).

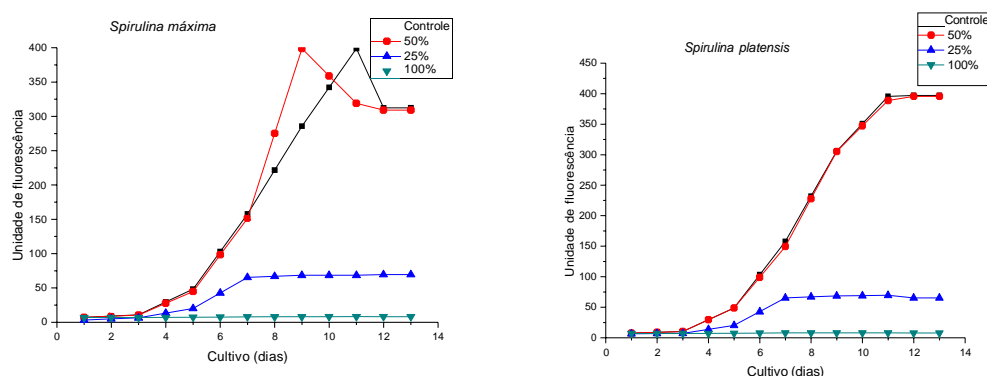
2.3 Análises estatísticas

Os dados da composição química das microalgas foram analisados primeiramente com relação à homocedasticidade das variâncias pelo teste de Levene. Os resultados foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA), seguida de comparações múltiplas do teste HSD Tukey ($p < 0,05$) (Statsoft, 2001).

3. Resultados e discussão

Os cultivos tiveram duração de 13 dias e mostraram diferenças nas respostas de crescimento entre as espécies. Os maiores crescimentos foram registrados na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* na concentração de 50% de RM com valores equivalentes ao controle (Figura 1).

Figura 1. Curvas de crescimento obtidas para os cultivos das microalgas estudadas. Valores médios das medidas da fluorescência in vivo de cada amostra.



Fonte: autoria própria

Os valores de rendimento de biomassa (Tabela 1) mostraram diferença significativa entre os ensaios variando de 511 a 503 mg.L⁻¹ (*S. platensis* e *S. maxima*, respectivamente). Evidenciando que esse meio alternativo apresenta potencialidade para o cultivo de algumas espécies de microalgas como a *Spirulina sp.* já que obteve uma quantidade considerável de biomassa seca.

Tabela 1. Parâmetros de crescimento e produtividade das microalgas estudadas nos meios controle e RM

Cultivos	Biomassa mg.L ⁻¹	PB (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	K (média e desvio padrão)	Duração da fase Log (dias)
<i>S. platensis</i> - C	510 ^a ± 1	39,2	0,69	7
<i>S.platensis</i> -RM	511 ^a ±1	39,3	0,71	7
<i>S. máxima</i> – C	504 ^b ±1	38,7	0,54	6
<i>S.máxima</i> - RM	503 ^b ±1	38,6	0,49	6

Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$). Teste De Tukey

As duas espécies testadas mostraram variações na cinética de crescimento, os melhores desempenhos foram para os cultivos da *Spirulina platensis* cultivadas em meio alternativo com valores que não diferiram significativamente para biomassa (511 mg.L⁻¹) em relação ao controle. As duas espécies ainda apresentaram altos valores de k (0,49-0,69). Vale salientar que o crescimento e a produção de biomassa de *Spirulina sp.* dependem da disponibilidade de nutrientes, pH, luz e temperatura. A composição do meio e seus

custos são fatores desafiadores para o cultivo em larga escala viável de microalgas (Soni *et al.*,2019).

Nos dois experimentos com a utilização do meio alternativo não houve diferença significativa em relação ao controle, corroborando com vários estudos utilizando meios alternativos para ao cultivo da *Spirulina sp.* e obtendo crescimento satisfatório. Como dos Santos *et al.* (2016), mostraram respostas de crescimento efetivos com o uso da vinhaça, assim como, Salla *et al.* (2016), com proteína do soro de leite e ainda Michael *et al.* (2019), formularam um meio econômico com utilização de fertilizantes comerciais em substituição parcial do meio Zarrouk. Trinh e Nguten (2020), utilizaram água mineral natural Vinh Hao para diminuir o custo do meio Zarrouk em cultivos com *Spirulina platensis*.

3.1 Análises químicas da biomassa

A Tabela 2 demonstra os teores de Carotenoides, Clorofila a, b e total na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* utilizando meio controle e meio com RM. O teor de clorofila foi superior para as duas espécies de *Spirulina* (8,5-8,7 mg g⁻¹) quando foram cultivadas no meio controle. Valores similares aos encontrados por outros estudos quando cultivaram a *Spirulina sp.* no meio Zarrouk (Nouri *et al.*, 2018; Çelekli *et al.*, 2016).

Tabela 2. Clorofila a, b e total e Carotenóides na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* no meio controle e no meio com RM

Cultivos	Clorofila a (mg g ⁻¹)	Clorofila b (mg g ⁻¹)	Clorofila total (mg g ⁻¹)	Carotenoides (mg g ⁻¹)
<i>S. platensis</i> - Controle	5,2 ^a ±0,2	3,5 ^a ±0,1	8,7 ^a ±0,1	3,2 ^a ±0,1
<i>S.platensis</i> - RM	2 ^c ±0,1	2 ^b ±0	4 ^b ±0,2	2,5 ^b ±0,1
<i>S. máxima</i> - Controle	4,8 ^b ±0,05	3,7 ^a ±0,1	8,5 ^a ±0,3	3,2 ^a ±0,1
<i>S.máxima</i> - RM	2,1 ^c ±0,1	1,8 ^b ±0,2	3,9 ^b ±0,2	2,1 ^b ±0,1

Nas colunas, letras iguais não tem diferença significativa (p<0,05) Teste de Tukey.

A clorofila é um dos pigmentos dominantes na *Spirulina sp.* que desempenham um papel importante papel na captura da luz como elemento crucial para a fotossíntese. Esse pigmento pode ser utilizado pela indústria de alimentos como corante verde natural para substituir a coloração artificial (Munawaroh *et al.*, 2019).

O teor de carotenoides (Tabela 2) foi superior quando as duas espécies estudadas foram cultivadas em meio controle (3,2 mg g⁻¹). Corroborando com Marzorati *et al.* (2020), que obtiveram 3,4 mg g⁻¹ de carotenoides da *Spirulina platensis* cultivada no meio Zarrouk.

Estudos demonstraram que a suplementação da *Spirulina sp.* na dieta de codornas e frangos levaram ao aumento dos níveis de carotenoides e consequentemente o aumento da coloração da gema que é um fator primordial para o consumidor e também para indústria de alimentos que preferem gemas com a coloração mais escuras (Roza *et al.*, 2018; Zahroojian *et al.*, 2013). Já Alavi e Golmakani (2017), adicionaram biomassa da *Spirulina sp.* em óleo de oliva e constataram que a presença de carotenóides e do conteúdo de clorofila retardaram a oxidação do azeite.

Tabela 3. Rendimento das Ficobiliproteínas na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* no controle e no meio com RM

	Ultrassom				Turrac			
	D9C	D9RM	D8C	D8RM	D9C	D9RM	D8C	D8RM
CPC	71,2 ^{Abc} ±1,2	69 ^{ABcd} ±1	67 ^{Bd} ±1	2,1 ^{Ce} ±0,1	73,8 ^{Aa} ±1,5	72,4 ^{Aa} ±0,5	71,6 ^{Aab} ±0,5	3,7 ^{Ce} ±0,2
APC	11,5 ^{Ab} ±0,5	9,4 ^{Bc} ±0,5	9,7 ^{Bc} ±0,6	0,3 ^{Cd} ±0,1	13,3 ^{Aa} ±0,5	12,7 ^{Aab} ±0,6	12 ^{Aab} ±1	0,8 ^{Bd} ±0,1
PE	3,2 ^{Abc} ±0,3	3,3 ^{Ab} ±0,2	2,6 ^{Bcd} ±0,1	0,2 ^{Ce} ±0,1	4,3 ^{Aa} ±0,1	3,8 ^{Aab} ±0,2	2,4 ^{Bd} ±0,4	0,4 ^{Ce} ±0,1
PBP	85,9 ^{Ac} ±0,7	82 ^{Bb} ±0,7	79,3 ^{Ce} ±0,3	2,6 ^{Dg} ±0,7	91,2 ^{Aa} ±0,3	88,9 ^{Bb} ±0,9	86,3 ^{Cc} ±0,5	4,9 ^{Df} ±0,6

Nas linhas letras maiúsculas comparação entre as espécies e um método de extração. Nas linhas letras minúsculas comparação entre as espécies e os dois métodos de extração APC - Alococianina, CPC- Concentração de ficocianina, PE-ficoeritrina; PBP-Ficobiliproteína. Fonte: autoria própria. Colunas e linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (p < 0,05). Teste De Tukey

As ficobiliproteínas (PBP) são compostas por C-ficocianina (CPC), alococianina (APC) e fitoeritrina (PE). A Tabela 3 demonstra a extração de ficobiliproteínas em termos de rendimento e índice de pureza sob diferentes condições de extração. Entre as ficobiliproteínas, a C-ficocianina (CPC) foi o componente majoritário em todos os experimentos. Os resultados mostraram que a concentração de CPC, APC, PE e PBP estavam na faixa de 2,1 a 72,4; 0,3 a 13,3; 0,2 a 4,3; 2,6 a 91,2 (mg/) respectivamente.

Os teores de ficocianina foram mais elevados independente do método de extração para *Spirulina platensis* no meio controle (73,8 mg g⁻¹) e no meio RM (72,4 mg g⁻¹) não possuindo diferença significativa entre os dois. Valores similares foram encontrados por Ilter *et al.* (2018), com 74,7 mg g⁻¹ e por Prates *et al.* (2018) com 83,7 mg g⁻¹ de ficocianina da *Spirulina platensis* em meio Zarrouk. Vale salientar que vários estudos têm utilizado eficientemente meios alternativos para produção de ficocianina como resíduos de alimentos de restaurantes ou padarias (Sloth *et al.*, 2017), água residual do cultivo de camarão (Sandeep *et al.*, 2015), extratos de broto de feijão (Dianursanti *et al.*, 2018) extratos de conchas de ostras e solo (Jung *et al.*, 2014). Evidenciando a eficiência dos meios alternativos já que o crescimento e a produção de ficocianina de *Spirulina platensis* são altamente dependentes da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura (Amanatin *et al.*, 2013). Comprovando a eficácia da utilização do resíduo de malte como meio alternativo já que os resultados do presente estudo obtiveram altos teores de ficocianina quando cultivaram as espécies de *Spirulina sp.*

A extração de ficocianina têm sido o foco por muitos anos, resultando em diversas estratégias que levam a resultados diferentes (Cevallos e Ortega, 2016; Song *et al.*, 2013; Tavanandi *et al.*, 2018; Chia *et al.*, 2019). No presente estudo pôde-se constatar que o rendimento através da extração do Turrac foi superior para maioria dos experimentos para extração de ficocianina, podendo afirmar que é um método eficiente de ruptura celular de *Spirulina sp.* para obtenção da ficocianina.

No tocante ao índice de pureza, observou-se que em todos os experimentos o resultado ficou acima de 0,7 após ser realizada a purificação. Resultado este adequado ao uso em alimentos (Antelo *et al.*, 2015, Güroy *et al.*, 2017). Geralmente um alto teor de pureza requer técnicas de purificação com alto custo como sulfato de amônio (Izadi e Fazilati 2018), sistemas aquosos bifásicos (Ruiz *et al.* 2018), porém essas técnicas podem levar também a uma perda significativa da substância. Enfatizando assim a eficiência do uso da membrana de diálise utilizada no presente estudo como metodologia de purificação. Brião *et al.* (2020), também demonstraram que quando utilizaram uma etapa de diafiltração obtiveram uma pureza maior de grau alimentício para a ficocianina extraída da *Spirulina platensis*.

Apesar da diálise não ser frequentemente adotada na literatura, no entanto, apresenta muitas vantagens em comparação com outros métodos de purificação em termos de economia de custos, fator primordial para indústria (Janoschka *et al.*, 2015).

O índice de pureza é altamente influenciado por vários fatores, como proporção de biomassa / líquido, métodos de secagem de biomassa, métodos de extração, temperatura de extração, pH, tipo e concentração da extração (Chentir *et al.*, 2018). Diferentes autores avaliaram a purificação da ficocianina da *Spirulina sp.* cultivada em meios alternativos como Leema *et al.* (2010), obteve 0,78 quando cultivaram a *Spirulina platensis* em água do mar. Chentir *et al.* (2018), cultivaram a *Spirulina platensis* em meio Zarrouk e obtiveram 0,77.

Considerando que a extração de ficocianina é um tecnologia simples e de baixo custo, é de particular interesse investigar sua usabilidade em um contexto industrial e aplicado para usá-lo como alimento funcional ou aditivos alimentares (Chen *et al.*, 2017). As ficobiliproteínas podem ser usadas na produção de fermentados laticínios, sorvetes, refrigerantes, decoração de bolos doces, leite shakes, et (Sonani *et al.*, 2016). Extratos de ficocianina de *Spirulina platensis* foram introduzidos no cozimento de biscoitos para aumentar o teor de fibras e proteínas (Singh *et al.*, 2015).

Tabela 4. Composição química da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* nos meios de cultivo Controle e RM.

Cultivo	Carboidratos (g 100 g ⁻¹)	Proteína (g 100 g ⁻¹)	Lipídios (g 100 g ⁻¹)
<i>S.platensis</i> – Controle	15 ^b ± 0,2	50,1 ^c ± 0,1	12 ^c ± 0,1
<i>S.platensis</i> - RM	16,9 ^a ± 0,1	55,9 ^a ± 0,9	13,9 ^a ± 0,8
<i>S.máxima</i> - Controle	12,8 ^c ± 0,2	49,8 ^c ± 0,7	13,9 ^a ± 0,7
<i>S.máxima</i> – RM	17,2 ^a ± 0,7	53,3 ^b ± 0,3	12,3 ^{b,c} ± 0,5

Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (p < 0,05). Teste De Tukey

Os teores de proteínas, carboidratos e lipídios das microalgas estudadas estão expressos na tabela 4. Os teores de proteína determinados nas microalgas estudadas foram consideravelmente altos nas duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio alternativo com *Spirulina platensis* (55,9 g 100 g⁻¹) seguida da *Spirulina máxima* (53,3 g 100 g⁻¹) os valores encontrados no meio controle apesar de mais baixos se encontram dentro da média esperada pelo gênero que é de 50 a 70% de proteína dessa microalga (Manirafasha *et al.*, 2016). Michael *et al.* (2019), obtiveram 65% de proteína cultivando em meio Zarrouk, já em um meio otimizado com menos reagentes registraram 52% de proteína.

A fração proteica na *Spirulina sp.* é reconhecida por sua excelente composição em termos de aminoácidos essenciais (García *et al.*, 2012) Além disso, quando

comparado com fontes tradicionais de proteínas, como carne ou soja, a biomassa de microalgas tem as vantagens de um rápido crescimento celular, custos de cultura reduzidos e falta de concorrência com outros tipos de produção de alimentos. Dessa forma, o uso de *Spirulina sp.* como fonte de proteína para a dieta humana é uma alternativa sustentável que pode ser usada para satisfazer a crescente demanda mundial. As proteínas da *Spirulina sp.* ainda podem ser aplicadas na formulação de alimentos produtos sob a forma de emulsões, espumas ou ainda gel (Zhang *et al.*, 2018; Benelhadj *et al.*, 2016).

Vale salientar ainda que a OMS (Organização Mundial da Saúde) o designou a *Spirulina sp.* como "Alimento do Futuro" por causa de seu alto teor de proteínas e rápido crescimento. Além disso, também é chamado de "super alimento" ou "alimento maravilhoso" e vários estudos científicos publicados revelam como ele estimula o sistema imunológico e melhora a saúde. É aprovado na Rússia como 'Alimento medicinal para o tratamento de efeitos induzidos por radiação, enquanto a NASA o considerava um "melhor alimento" para viagens espaciais, pois sua pequena quantidade contém uma variedade de nutrientes (Sinha *et al.*, 2018).

O teor de carboidratos de todos os cultivos se manteve dentro da média esperada para a *Spirulina sp.* As duas espécies de *Spirulina sp.* demonstraram um aumento da produção de carboidrato quando cultivada em meio com RM em relação ao meio controle. Quando cultivada em meio controle as espécies de *Spirulina* tiveram o teor de carboidrato de 13-14 g 100 g⁻¹. Salla *et al.* (2016), utilizaram o mesmo meio controle e cultivaram a *Spirulina sp.* e obtiveram 14,94% de carboidrato.

Outros estudos com utilização de meios alternativos como água salobra (Duarte *et al.*, 2020) obtiveram aumento no teor de carboidrato quando comparada com o controle. Demonstrando que o resíduo de malte pode ser utilizado como meio alternativo para a *Spirulina sp.* podendo utilizar sua biomassa para extração de compostos bioativos como polissacarídeos, exopolissacarídeos e outros, ou ainda suplementação humana e animal.

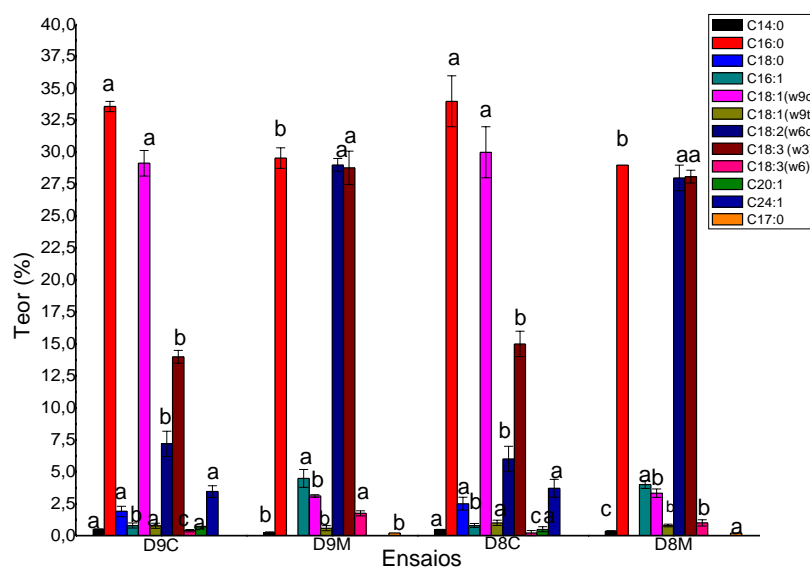
Os carboidratos produzidos pelas microalgas servem como um componente estrutural nas paredes celulares e como um componente de armazenamento dentro da célula (Markou *et al.*, 2012).

O teor de lipídios das espécies de *Spirulina* variou de 12 a 13,9 g 100 g⁻¹ em meio RM e o controle. Resultado superior ao encontrado por Pohndorf *et al.* (2016), que cultivaram a *Spirulina sp.* e obtiveram 5,8% de lipídio.

O óleo de microalgas ainda pode ser uma alternativa viável ao óleo de peixe já que o vegano não consome esse produto e o cheiro desagradável produzido a partir de óleo de peixe não é adequado para ser usado como ingrediente alimentar (Tang *et al.*, 2020). E o mercado estimado de óleos a partir de microalgas pode chegar a US \$ 898,7 milhões em 2025 (Hu, 2019).

A *Spirulina platensis* apresentou um total de 60 mg/g de ésteres totais no meio controle e no meio RM 62mg/g. Já a *Spirulina máxima* apresentou 55mg/g no controle e no meio RM 52 mg/g de ésteres totais. Ocorre uma diversificação dos ácidos graxos no que se refere às variações do comprimento das cadeias, geralmente entre quatorze e vinte e quatro carbonos, e ainda nos teores de insaturações (Figura 2).

Figura 2. Perfil de ácidos graxos da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* cultivada no meio controle e no meio RM



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$). Fonte: autoria própria

Entre os ácidos graxos, o ácido palmítico (C16:0) predominou em todos os ensaios, com concentrações variando de 29 a 34%. Sendo o maior percentual encontrado na *Spirulina máxima* cultivada no meio controle. Resultados similares foram encontrados por Tai *et al.* (2016), 37,5% e por Hadyanto *et al.* (2018), 34,6 % cultivando a *Spirulina sp.*

Entre os ácidos graxos monoinsaturados, os teores dos ácidos oleico (C18:1 w9- c) também esteve presente em todas as espécies e condições de cultivo, porém foram superiores nas espécies quando cultivadas em meio Controle com concentrações variando de 29 a 30%.

No que concerne aos ácidos polinsaturados, o ácido linoleico (C18:2w6-c) e ácido alfa-linolênico (c18:3 w3), os resultados nas condições de cultivo com RM mostraram sempre os maiores teores, indicando melhor efetividade com esse meio alternativo na produção destes dois tipos de ácidos graxos. Vale ressaltar que o ácido alfa-linolênico é um dos ácidos graxos essenciais usados no tratamento de distúrbios do sistema nervoso, artrite reumatóide, (NAVARINI *et al.*, 2017) e diabetes (NUNEZ *et al.*, 2019).

O teor de PUFA foi maior para as duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio RM variando de 57 a 59%. Hultberg *et al.* (2017), obtiveram concentrações maiores de ácidos graxos insaturados na biomassa produzida com o meio à base de efluentes para *Spirulina sp.* Matos (2017); Paliwal *et al.* (2017), afirmam que a quantidade dos PUFAs varia com a espécie e condições de cultivo e ainda que está intimamente relacionada à composição química do meio de cultivo.

Vale salientar que as biomassas da *Spirulina máxima* e da *Spirulina platensis* investigadas no presente estudo podem ser utilizadas na suplementação alimentar por possuir ácidos graxos de alto valor, principalmente as espécies quando foram cultivadas no meio RM. Estudos sugeriram a adição da *Spirulina sp.* em massas (Mostolizadeh *et al.*, 2017), na suplementação alimentar de trutas (Roohani *et al.*, 2019), de codornas (Boiago *et al.*, 2019), e frangos (Bonos *et al.*, 2016), podendo ser uma estratégia eficiente para introduzir os compostos bioativos e assim produzir produtos funcionais já que a demanda do consumidor por alimentos saudáveis cresce cada vez mais e consequentemente a da indústria de alimentos.

O conteúdo de polissacarídeos da *Spirulina platensis* e *máxima* cultivada no meio controle e no meio RM (Tabela 5) variaram de 2,1 a 11,2 % nos diferentes tipos de extração. Variações na composição de polissacarídeos são influenciadas por condições de cultivo, localizações geográficas, época e técnicas de colheita e metodologias de extração. A estrutura química dos polissacarídeos determina suas atividades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas (de Jesus Raposo *et al.*, 2015). O potencial biotecnológico dos polissacarídeos tem atraindo cada vez mais atenção principalmente da indústria alimentícia. Contudo, faz-se necessárias pesquisas a respeito da extração desse composto (Kadam *et al.*, 2013).

Tabela 5. Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos extrações nas biomassas no da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* cultivada no meio controle e RM

Cultivos	Extrações (%)			
	Ext alcalina	Água quente	Ultrassom	Água quente/ultrassom
Spirulina platensis- C	8,2 ^{C,a} ±0,2	2,6 ^{B,c} ±0,1	6 ^{B,b} ±0,2	8,6 ^{C,a} ±0
Spirulina platensis- RM	10,2 ^{A,a} ±0,2	2,9 ^{AB,c} ±0,2	7 ^{A,b} ±0	10,2 ^{B,a} ±0,3
Spirulina máxima- C	8,7 ^{B,a} ±0,1	2,1 ^{C,d} ±0,2	5,3 ^{C,c} ±0,1	8,3 ^{C,b} ±0,1
Spirulina máxima- RM	10,1 ^{A,b} ±0,2	3,2 ^{A,d} ±0,2	6,5 ^{AB,c} ±0,3	11,2 ^{A,a} ±0,2

Letras maiúsculas- diferença entre as colunas

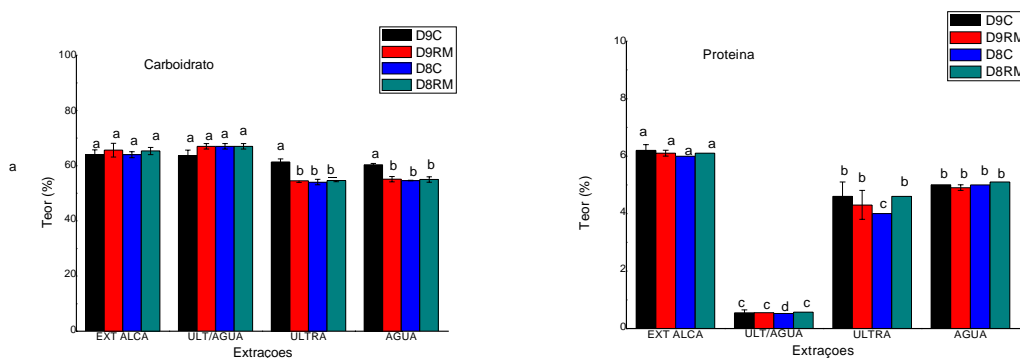
Letras minúsculas- diferença entre as linhas

Colunas e linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$). Teste De Tukey

Tecnologias de extração estão atraindo interesse das indústrias por causa de suas vantagens (maior rendimento, menor tempo de tratamento e menor custo) em comparação a técnicas convencionais de extração por solvente (Khanra et al., 2018). Das extrações realizadas no presente trabalho evidencia-se que a extração com água quente/ultrassom foi a que apresentou maiores valores nas duas espécies de *Spirulina* cultivadas em meio RM variando de 8,3 a 11,2 %. Esses dados indicam que o cultivo da *Spirulina sp.* em meio RM mostrou-se promissor. Já que a *Spirulina sp.* é uma das cepas mais estudadas para extração de polissacarídeo (Phélippé et al., 2019). Levando a necessidade de cada vez mais pesquisas voltadas para a utilização de meios alternativos para assim diminuir os custos com o cultivo que ainda são um dos principais entraves para o cultivo em larga escala desses microrganismos.

As atividades do polissacarídeo de *Spirulina sp.* variam com a forma e estrutura existentes e, portanto, seu método de extração desempenha papel significativo suas atividades (Dananjaya et al., 2020). A extração desse composto se faz cada vez mais importante já que possuem ação antitumoral, antioxidante, radioprotetor, regulador imunológico, antimicrobiano, e atividades anti-inflamatórias (Kurd e Samavati, 2015).

Figura 3. Composição química dos polissacarídeos em diferentes métodos de extrações



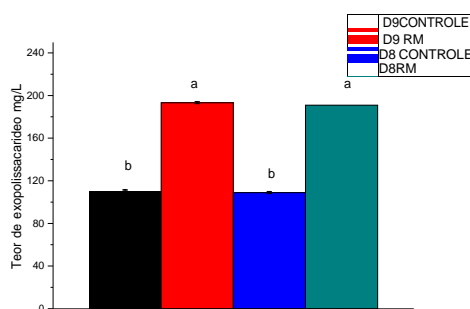
Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$). Teste De Tukey

Os valores de carboidratos obtidos nos polissacarídeos extraídos a partir de diferentes métodos (Figura 3) variando de 55 a 63%. Constatando com Rajasekar *et al.* (2019), que registraram 38,7 % de carboidratos do polissacarídeo extraído da *Spirulina platensis*.

As amostras analisadas mostraram que o menor teor de proteínas foi obtido na extração água/ultrassom e isso se deu devido a metodologia utilizar o método SEVAGE que retira a proteína remanescente do polissacarídeo. Diferente de Rajasekar *et al.* (2019), que obtiveram 21,3 % de proteína de *Spirulina platensis* e não utilizaram método algum para retirar a proteína.

A diversidade evolutiva das microalgas envolve uma enorme complexidade em termos de presença, composição, e organização molecular de biopolímeros estruturais. Diante disso, os polissacarídeos obtidos a partir de microalgas possuem potencial para serem usados como espessantes na indústria de alimentos. Para ter sucesso ao introduzir esses polissacarídeos como novos hidrocolóides alimentares, a caracterização e funcionalidade devem ser direcionadas para polissacarídeos obtidos a partir da individualidade da cepa. Conhecimentos fundamentais sobre a composição de polissacarídeo pode ajudar a prever a funcionalidade de extratos específicos de polissacarídeos (Bernaerts *et al.*, 2019).

Figura 4. Teor de Exopolissacarídeos nas biomassas da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* cultivada no meio controle e RM



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$). Teste De Tukey

As microalgas são produtoras significativas de exopolissacarídeos que variam de $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Markou; Nerantzis, 2013). Os resultados desses compostos registrados nessa pesquisa foram maiores no cultivo com meio RM (191 a $193\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para as duas espécies de *Spirulina* (Figura 4). Evidenciando a possibilidade das espécies desse gênero serem utilizadas para produção de exopolissacarídeos a partir do cultivo em meio com RM. Estes achados demonstraram que EPS produzidos são influenciadas por muitos fatores, como espécie, linhagem, nutriente, condição de cultivo (Zhang *et al.*, 2016).

A utilização do sobrenadante após a colheita de *Spirulina sp.* é uma alternativa interessante para obter bioprodutos de alto valor como os EPS reaproveitando o que seria descartado (de Jesus Raposo *et al.*, 2015).

A coleta de cepas adequadas com alto rendimento e procedimentos de extração menos complexos podem aumentar o mercado comercial de EPS no futuro próximo. Nos alimentos, o EPS funciona com sucesso como viscosificantes, estabilizadores, emulsificantes, gelificantes e agentes de ligação à água (Singh *et al.*, 2019).

4. Conclusão

Parâmetros de crescimento e composição nutricional das biomassas da *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis* obiveram resultados iguais ou superiores ao meio de cultura sintético. Os maiores teores proteicos foram encontrados para *Spirulina platensis* seguida da *Spirulina máxima* cultivadas em meio com resíduo de malte. No que concerne aos ácidos polinsaturados, o ácido linoleico (C18:2w6 -c) e ácido alfa-linolênico (c18:3 w3), os resultados nas condições de cultivo com RM mostraram maiores resultados

quando comparados com o controle. O teor de PUFA foi maior para as duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio RM. Os rendimentos de polissacarídeos e exopolissacarídeos foram superiores para as duas espécies de *Spirulina* quando cultivada no meio RM. Diante dos resultados obtidos, podemos observar que o cultivo da *Spirulina* máxima e da *Spirulina platensis* com meio alternativo utilizando o resíduo de malte decorrente do processo cervejeiro tem potencial para obtenção de compostos de interesse. Podendo ser utilizadas em diversas aplicações voltadas para indústria de alimentos. Que vão desde a introdução da biomassa para enriquecimento proteico em um novo alimento até a utilização de polissacarídeo e exopolissacarídeos como hidrocolóide na indústria alimentícia.

Referências

- Abd El Baky, H. H., El Baroty, G. S., & Ibrahem, E. A. (2015). Functional characters evaluation of biscuits sublimated with pure phycocyanin isolated from *Spirulina* and *Spirulina* biomass. *Nutricion Hospitalaria*, 32(1), 231-241. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.8804>
- Alavi, N., & Golmakani, M.-T. (2017). Antioxidant properties of whole-cell *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) powder expressed in olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 2971–2978. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1190-7>
- Amanatin, D. R., Rofidah, E., Rosady, N., & Duratun, S. (2013, December). Produksi protein sel tunggal (pst) *Spirulina* sp. sebagai super food dalam upaya penanggulangan gizi buruk dan kerawanan pangan di Indonesia. In *Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian 2013*. Indonesian Ministry of Research, Technology and Higher Education.
- Antelo, F. S., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2015). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201502621>
- AOAC International (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 935.46. 21 ed. Rockville.
- Asgashi, A. Fazilati, M., Latifi, A.M., Salavati, H., Choopani, A. (2016). *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3, (1).
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H., & Ghorbel, D. (2016). Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate. *Food Chemistry*, 194, 1056-1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.133>.

Bernaerts, T.M.M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M.E., Van, Loey AM. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnol Adv*, 37 (8).

Bligh, E.G.; Dyer, W.J (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Boiago, M. M., Dilkin, J. D., Kolm, M. A., Barreta, M., Souza, C. F., Baldissera, M. D., ... & Da Silva, A. S. (2019). Spirulina platensis in Japanese quail feeding alters fatty acid profiles and improves egg quality: Benefits to consumers. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12860>

Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Nikolakakis, I., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2016). Spirulina as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science*, 46(1), 94-102. <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i1.12>

Brião, V.B., Sbeghen, A.L., Colla, L.M., Castoldi, V., Seguenka, B., Schimidt, G.O., & Costa, J.A.V. (2020). Is downstream ultrafiltration enough for production of food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 1129-1140. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02006-1>

Çelekli, A., Topyürek, A., Markou, G., & Bozkurt, H. (2016). A Multivariate Approach to Evaluate Biomass Production, Biochemical Composition and Stress Compounds of *Spirulina platensis* Cultivated in Wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(4), 728-739. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2128-2>.

Cevallos, C. G., Ortega, M.H. (2016). Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-phycocyanin: 50 years of Research in Review. *Int. J. Food Nutr. Sci.*, 3. <https://doi.org/10.15436/2377-0619.16.946>

Chen, X., Wu, M., Yang, Q., & Wang, S. (2017). Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. *Lwt*, 77, 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.005>

Chentir, I., Hamdi, M., Li, S., Doumandji, A., Markou, G., & Nasri, M. (2018). Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. *Algal Research*, 35, 395-406. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.005>

Chia, S. R., Chew, K. W., Show, P. L., Xia, A., Ho, S. H., & Lim, J. W. (2019). Spirulina platensis based biorefinery for the production of value-added products for food and pharmaceutical applications. *Bioresource Technology*, 289, 121727. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121727>.

Credence Research. Algae Products Market By Application (Nutraceuticals, Food & Feed Supplements, Pharmaceuticals, Paints & Coatings, Pollution Control, Others) - Growth, Future Prospects & Competitive Analysis, 2018 - 2026. 2018. Url (<https://www.credenceresearch.com/report/algae-products-market>).

Dananjaya, S. H. S., Thao, N. T., Wijerathna, H. M. S. M., Lee, J., Edussuriya, M., Choi, D., & Kumar, R. S. (2020). In vitro and in vivo anticandidal efficacy of green synthesized gold

nanoparticles using *Spirulina maxima* polysaccharide. *Process Biochemistry*, 92, 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.003>

Dianursanti, Taurina, Z., & Indraputri, C. M. (2018, February). Optimization growth of *Spirulina platensis* in bean sprouts extract medium with urea fertilizer for phycocyanin production as antioxidant. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1933, No. 1, p. 030014). AIP Publishing LLC.

Dos Santos, R. R., Araújo, O.Q. F., De Medeiros, J. L., & Chaloub, R. M. (2016). Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.077>

Duarte, J. H., Cardoso, L. G., de Souza, C. O., Nunes, I. L., Druzian, J. I., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2020). Brackish groundwater from Brazilian backlands in *Spirulina* cultures: potential of carbohydrate and polyunsaturated fatty acid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(3), 907-917. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03126-7>

Enzing, C., Ploeg, M., Sijtisma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *Jrc. Scientific and policy reports*.

Fradinho, P., Niccolai, A., Soares, R., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., ... & Raymundo, A. (2020). Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. *Algal Research*, 45, 101743. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101743>

García, J. R., Fernández, F. A., & Sevilla, J. F. (2012). Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 112, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.094>.

Ghaeni, M., & Roomiani, L. (2016). Review for application and medicine effects of *Spirulina*, microalgae. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 3(2). <https://doi.org/10.18178/joaat.3.2.114-117>

Güroy, B., Karadal, O., Mantoğlu, S., & Cebeci, O. I. (2017). Effects of different drying methods on C-phycocyanin content of *Spirulina platensis* powder. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(2), 129-132. <https://doi.org/10.12714/egejfas.2017.34.2.02>

Hadiyanto, H., & Adetya, N. P. (2018). Response surface optimization of lipid and protein extractions from *Spirulina platensis* using ultrasound assisted osmotic shock method. *Food Science and Biotechnology*. doi:10.1007/s10068-018-0389-y

Hlaing, S. A. A., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2019). Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. *Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1007/s13197-019-04144-3

Hu, I. C. (2019). Production of potential coproducts from microalgae. In *Biofuels from algae* (pp. 345-358). Elsevier.

Hultberg, M., Lind, O., Birgersson, G., & Asp, H. (2017). Use of the effluent from biogas production for cultivation of *Spirulina*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(4), 625-631. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1726-2>

İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>

Izadi, M., & Fazilati, M. (2018). Extraction and purification of phycocyanin from *spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. *Asian Journal of Green Chemistry*, 2(4), 364-379. <https://doi.org/10.22034/ajgc.2018.63597>

Janoschka, T., Martin, N., Martin, U., Friebe, C., Morgenstern, S., Hiller, H., & Schubert, U. S. (2015). An aqueous, polymer-based redox-flow battery using non-corrosive, safe, and low-cost materials. *Nature*, 527(7576), 78-81. <https://doi.org/10.1038/nature15746>

Jung, J. Y., Kim, S., Lee, H., Kim, K., Kim, W., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Use of extracts from oyster shell and soil for cultivation of *Spirulina maxima*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(12), 2395-2400. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1216-3>.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4667-4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>.

Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 60-84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>

Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M. C., Ferreira, A., Gouveia, L., Smaali, I., & Raymundo, A. (2020). Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Research*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101998>

Kochert, G. (1978). *Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric*. in: Hellebust, J. A., Graigie, J. S. (eds). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical methods*. Cambridge: Cambridge University, p.95-97.

Kumar, B. R., Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P. A., Pugazhendhi, A. (2019). Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17.

Kurd, F., & Samavati, V. (2015). Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.005>

Leema, J.T. M.; Kirubakaran, R., VInithkumar, N.V., Dheenani, P.S., & Hight, S.K. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101(23), 9221-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.120>

Lowry, O.H., et al. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282-296. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>

Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532-1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>.

Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631-645.. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>.

Marzorati, S., Schievano, A., Idà, A., & Verotta, L. (2020). Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: supercritical CO₂ and water extraction methods for added value products cascade. *Green Chemistry*, 22(1), 187-196. <https://doi.org/10.1039/C9GC03292D>

Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, 8(8), 2672-2685. <https://doi.org/10.1039/c7fo00409e>

Menezes, R. S., Leles, M. I. G., Soares, A. T., Franco, P. I. M., AntoniosI Filho, N. R., Sant'ANna, C. L., Vieira, A. A. H. (2013). Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, 13, (1), p. 10-15.

Michael, A.; Kyewalyanga, M.S., & Lugomela, C.V. (2019). Biomass and nutritive value of *Spirulina* (*Arthrospira fusiformis*) cultivated in a cost-effective médium. *Annals of Microbiology*, 69, 1387–1395. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01520-4>

Mishra, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2014). *Spirulina* and its nutritional importance: A possible approach for development of functional food. *Biochemical. Pharmacology*, 3, e171. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000e171>

Mostolizadeh, S., Moradi, Y., Mortazavi, M. S., Motallebi, A., & Ghaeni, M. (2017). Application effects of *Spirulina* powder on the fatty acid and amino acid composition of pasta. *Isfj*, 26(4), 119-130.

Munawaroh, H. S. H., Fathur, R. M., Gumilar, G., Aisyah, S., Yuliani, G., Mudzakir, A., & Wulandari, A. P. (2019). Characterization and physicochemical properties of chlorophyll extract from *Spirulina* sp. *Journal of Physics: Conference Series*, 1280, 022013. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1280/2/022013>

Navarini, L., Afeltra, A., Gallo Afflitto, G., & Margiotta, D. P. E. (2017). Polyunsaturated fatty acids: any role in rheumatoid arthritis? *Lipids in Health and Disease*, 16(1). doi:10.1186/s12944-017-0586-3

Nouri, E., Abbasi, H., & Rahimi, E. (2018). Effects of processing on stability of water-and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycoerythrin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of *Spirulina platensis*. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 10(4), 335-349. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1304>

Núñez, M. V. M., García-Martínez, B. I., Rosado-Pérez, J., Santiago-Osorio, E., Pedraza-Chaverri, J., & Hernández-Abad, V. J. (2019). The Effect of 600 mg Alpha-lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress, Inflammation, and RAGE in Older Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–12. doi:10.1155/2019/3276958

Paliwal, C., Mitra, M., BHAYANI, K., Bharadwaj, S.V.V., Ghosh, T., Dubey, S., Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>.

Patel, P.; Jethani, H.; Radha, C.; Vijayendra, S. V. N.; Mudliar, S. N.; Sarada, R., & Chauhan, V. S. (2019). Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 56(8), 3721-3731. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03844-0>

Patil, S., Al-Zarea, B. K., Maheshwari, S., & Sahu, R. (2015). Comparative evaluation of natural antioxidants spirulina and aloe vera for the treatment of oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(1), 11-15.. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2014.12.005>

Phéllipé, M., Gonçalves, O., Thouand, G., Cogne, G., & Laroche, C. (2019). Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 38, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101426>

Prates, D.F., Radmann, E.M., Hartwig, J.D., Morais, M.G., & Costa, J.A.V. (2018). *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*, 256, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>

Pohndorf, R. S., Camara, Á. S., Larrosa, A. P. Q., Pinheiro, C. P., Strieder, M. M., & Pinto, L. A. A. (2016). Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. *Biomass and Bioenergy*, 93, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.02>

Raja, R.; Coelho, A.; Hemaiswarya, S.; Kumar, P.; Carvalho, I. S., & ALagarsamy, A. (2018). Applications of Microalgal Paste and Powder as food and feed: An update using Text Mining Tool. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4).<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.10.004>

Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V., & Carvalho, I. S. (2016). Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 394-405.<https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.957640>

Rajasekar, P., Palanisamy, S., Anjali, R., Vinosha, M., Elakkiya, M., Marudhupandi, T.,.....& Prabhu, N. M. (2019). Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from

Spirulina platensis and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. *International journal of biological macromolecules*, 141, 809-821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.024>

de Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. B., & De Morais, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(5), 2967-3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>

Roohani, A. M., Abedian Kenari, A., Fallahi Kapoorchali, M., Borani, M. S., Zoriezahra, S. J., Smyley, A. H., & Rombenso, A. N. (2019). Effect of spirulina *Spirulina platensis* as a complementary ingredient to reduce dietary fish meal on the growth performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 633-645. <https://doi.org/10.1111/anu.12885>

Roza, L. F., Tavernari, F. C., Surek, D., Sordi, C., Silva, M. L. B., Albino, L. F. T., & Boiago, M. M. (2018) Apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of microalgae *Spirulina platensis* as an ingredient in broiler chicken diets. *British Poultry Science*, 59(5), 562-567. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1496401>.

Ruiz, S. C. A., Emmery, D. P., Wijffels, R. H., Eppink, M. H., & van den Berg, C. (2018). Selective and mild fractionation of microalgal proteins and pigments using aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(9), 2774-2783. <https://doi.org/10.1002/jctb.5711>.

Sandeep K.P., Shukla S.P., Vennila, A., Purushothaman, C.S., & Manjulekshmi, N. (2015) Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in low cost seawater based medium for extraction of value added pigments. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44, (3).

Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., Colla, L. M., Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina platensis* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*, 209, p. 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.069>.

Shabana, E. F., Gabr, M. A., Moussa, H. R., El-Shaer, E. A., & Ismaiel, M. M. (2017). Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in response to gamma irradiation. *Food Chemistry*, 214, 550-555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.109>

Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>

Singh, S., Kant, C., Yadav, R. K., Reddy, Y. P., & Abraham, G. (2019). Cyanobacterial Exopolysaccharides: Composition, Biosynthesis, and Biotechnological Applications. *Cyanobacteria*, 347-358. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814667-5.00017-9>

Sinha, S., Patro, N., & Patro, I. K. (2018). Maternal protein malnutrition: Current and future perspectives of spirulina supplementation in neuroprotection. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 966, <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00966>

Sloth, J. K., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.0>

Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., & Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 100. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.100>

Song, W., Zhao, C., & Wang, S. (2013). A large-scale preparation method of high purity C-phycocyanin. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 293-297. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.216>

Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina—From growth to nutritional product: A review. *Trends in food science & technology*, 69, 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>

Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*, 5, 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.02.009>

Tang, D.Y.Y., Khoo, K.S., Chew, K.W., Tao, Y., Ho, S.H., Show, P.L., 2020. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresour. Technol*, 304. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122997>

Tavanandi, H. A., Devi, A. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). A newer approach for the primary extraction of allophycocyanin with high purity and yield from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Separation and Purification Technology*, 204, 162-174. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.057>

Trinh D.V., & Nguyen P.T.H.(2020). Minimising the Cost of *Spirulina platensis* Culture Medium using Vinh Hao Natural Mineral Water, *Chemical Engineering Transactions*, 78, 19-24. <https://doi.org/10.3303/CET2078004>

Triveti, J., Aila, M., Bangwal, D., & Kaul, S. (2015). Algae based biorefinery—How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295-307. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>

Vaz, B. S., Moreira, J. B., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>

Salla, A. C. V., Margarites, A. C.; Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*, 209, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.069>

Sumanta, N., Haque, C.I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* 4, 63–69

Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C.(2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>

Ye, C., Mu, D., Horowitz, N., Xue, Z., Chen, J., Xue, M., & Zhou, W. (2018).Life cycle assessment of industrial scale production of spirulina tablets. *Algal Research*, 34, 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.013>

Wu, X.; Cen, Q.; Addy, M., Zheng, H., Luo, S.; Liu, Y., Cheng, Y., Zhou, W., Chen, P., Ruan, R.A. (2019). Novel algal biofilm photobioreactor for efficient hog manure wastewater utilization and treatment. *Bioresource Technol*, 292.

Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., LI, S., Peng, N., Liang, Y., Zhao, S.(2016). Purification and identification of antioxidant peptides fromenzymatic hydrolysate ofSpirulina platensis.J. *Microbiol. Biotechnol*, 26, (7).

Zahroojian, N., Moravej, H., & Shivazad, M. (2013). Effects of dietary ma- rine algae (Spirulina platensis) on egg quality and production perfor- mance of laying hens. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, (7), 1353-1360.

Zhang, X., Yuan, H., Jiang, Z., Lin, D., & Zhang, X. (2018). Impact of surface tension of wastewater on biofilm formation of microalgae *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 266, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.082>

Pedido de patente**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS E/OU CIANOBACTÉRIAS
UTILIZANDO RESÍDUO DE MALTE DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA COMO MEIO
ALTERNATIVO**

Roberta Conceição Ribeiro Varandas

Cristiane Francisca da Costa Sasi

Marta Maria da Conceição

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata do processo de elaboração de meio de cultivo de microalgas utilizando resíduo de malte de cevada da indústria de cervejaria. Mais especificamente, a presente invenção trata da formulação de um meio de cultivo alternativo composto pelo resíduo de malte da indústria de cervejaria in natura e/ou concentrado e/ou diluído e/ou enriquecido com nutriente e/ou extrato. A biomassa obtida através do cultivo da microalga pode ser utilizada em indústrias do ramo alimentício, nutracêutico, farmacêutico, cosmético, de biocombustível, bioetanol, químico dentre outros. Visando a utilização da biomassa como ingrediente em um alimento funcional por possuir propriedades nutricionais atrativas.

