



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE COMERCIAL A
PARTIR DO CULTIVO DA MICROALGA *SPIRULINA PLATENSIS* EM MEIO
CONTENDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS DA AMAZÔNIA**

MANAUS – AM

2024

DANIEL NASCIMENTO MOTTA

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE COMERCIAL A
PARTIR DO CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM MEIO
CONTENDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas como
partes dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Pablo da Silva

CO-ORIENTADOR(A): Prof. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho

MANAUS – AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M921e Motta, Daniel Nascimento
Extração de compostos bioativos de interesse comercial a partir
do cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio contendo
subprodutos agroindustriais da Amazônia / Daniel Nascimento
Motta . 2024
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edson Pablo da Silva
Coorientadora: Rosany Piccolotto Carvalho
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Bioprocessos. 2. Biorefinaria. 3. Biotecnologia. 4. Microalga. I.
Silva, Edson Pablo da. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

RESUMO

A *Spirulina platensis*, uma microalga amplamente estudada, tem sido cultivada com sucesso usando subprodutos agroindustriais como fonte alternativa de crescimento, oferecendo uma abordagem sustentável para sua produção em larga escala. Seu ciclo de cultivo envolve várias etapas, incluindo inoculação, crescimento, colheita e processamento. Durante o ciclo de cultivo, a produção de ficocianina, um pigmento natural com propriedades antioxidantes, é monitorada de perto. Para extrair a ficocianina, solventes são comumente usados, seguidos por processos de purificação. Estudos têm investigado a estabilidade da ficocianina e sua atividade antioxidante, fornecendo insights sobre seu potencial uso em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Esses avanços destacam o potencial da *Spirulina platensis* como uma fonte valiosa de compostos bioativos e seu papel na promoção da sustentabilidade e da saúde. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a inserção de um subproduto agroindustrial da Amazônia e testar sua eficácia como fonte alternativa de crescimento, além de avaliar a produtividade de compostos de interesse durante ciclos de cultivo. O composto de interesse será então extraído em diferentes solventes a fim de avaliar a estabilidade e sua atividade antioxidante em ambientes diferentes. Os resultados obtidos demonstraram que o subproduto se mostrou eficaz e que a concentração de biomassa da *Spirulina platensis* foi superior quando comparada ao meio sintético, os dados da composição proximal mostraram que o valor de proteínas da biomassa no meio alternativo foi superior com um valor de 8,63% comparado a biomassa do meio sintético que foi de 4,95%. E os ácidos graxos saturados como o ácido palmítico foi superior ao meio sintético, assim como os insaturados que mostraram valores superiores ou similares. O ponto ótimo de colheita para a determinação da produtividade da ficocianina foi obtido no ciclo T4 (12 dias) e para a extração a água destilada foi a que mostrou maior eficiência em relação à atividade antioxidante, para a estabilidade as soluções tampões pH 6,0 e 7,0 foram o que mostraram os melhores resultados. Concluimos diante dos resultados obtidos que a inserção do subproduto mostrou-se ser eficaz para a produção de biomassa e de ficocianina podendo ser usado para a produção em grande escala, a fim de aumentar a produção de biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

Palavras chaves: Bioprocessos; Biorrefinarias; Biotecnologia; Microalgas.

ABSTRACT

Spirulina platensis, a widely studied microalgae, has been successfully cultivated using agro-industrial by-products as an alternative source of growth, offering a sustainable approach to its large-scale production. Its cultivation cycle involves several steps, including inoculation, growth, harvesting and processing. During the cultivation cycle, the production of phycocyanin, a natural pigment with antioxidant properties, is closely monitored. To extract phycocyanin, solvents are commonly used, followed by purification processes. Studies have investigated the stability of phycocyanin and its antioxidant activity, providing insights into its potential use in pharmaceutical, cosmetic and food applications. These advances highlight the potential of *Spirulina platensis* as a valuable source of bioactive compounds and its role in promoting sustainability and health. Therefore, the objective of this work is to evaluate the insertion of an agro-industrial byproduct from the Amazon and test its effectiveness as an alternative source of growth, in addition to evaluating the productivity of compounds of interest during cultivation cycles. The compound of interest will then be extracted in different solvents in order to evaluate its stability and antioxidant activity in different environments. The results obtained demonstrated that the byproduct was effective and that the concentration of *Spirulina platensis* biomass was higher when compared to the synthetic medium, the proximal composition data showed that the value of biomass proteins in the alternative medium was higher with a value of 8,63% compared to the biomass of the synthetic medium, which was 4,95%. And saturated fatty acids such as palmitic acid were superior to the synthetic medium, as well as unsaturated fatty acids that showed higher or similar values. The optimum harvest point for determining phycocyanin productivity was obtained in the T4 cycle (12 days) and for extraction, distilled water was the one that showed the greatest efficiency in relation to antioxidant activity, for stability buffer solutions pH 6,0 and 7,0 were the ones that showed the best results. We conclude from the results obtained that the insertion of the byproduct proved to be effective for the production of biomass and phycocyanin and can be used for large-scale production, in order to increase the production of biomass from the microalgae *Spirulina platensis*.

Keywords: Bioprocesses; Biorefineries; Biotechnology, Microalgae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografias microscópicas de diferentes espécies de microalgas, <i>Chlorella vulgaris</i> (a), <i>Dunaliella salina</i> (b), <i>Haematococcus pluvialis</i> (c) e <i>Galdieria sulphuraria</i> (d).....	15
Figura 2 - Processo de cultivo de microalgas em sistema aberto (raceway) (a) e sistema fechado (fotobiorreatores) (b).....	17
Figura 3 - Visão microscópica da microalga <i>Spirulina platensis</i>	19
Figura 4 – Curva Padrão de Açúcares Solúveis Totais.....	28
Figura 5 – Curva Padrão de Polifenóis.....	29
Figura 6 – Curva padrão de DPPH.....	34
Figura 7 – Cepa da microalga <i>Spirulina platensis</i> (a), e pré-inóculo (b).....	39
Figura 8 - Obtenção do extrato do subproduto agroindustrial utilizando maceração mecânica (a) e extrato filtrado e esterilizado (b).....	41
Figura 9 - <i>Spirulina platensis</i> sendo cultivadas no meio sintético e no meio alternativo.....	42
Figura 10 - Sistema de filtração (a) e biomassa separada (b).....	43
Figura 11 – Processo de liofilização (a) e armazenamento da biomassa liofilizada para análises (b).....	44
Figura 12 – Curva Padrão de Açúcares Solúveis Totais.....	48
Figura 13 – Curva Padrão de Determinação de Polifenóis.....	49
Figura 14 - Gráfico da curva de crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> cultivada no meio sintético e no meio alternativo.....	51
Figura 15 - Análise termogravimétrica da biomassa <i>Spirulina platensis</i> produzida no meio sintético (a) e no meio alternativo (b).....	56
Figura 16 – Cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i> em diferentes ciclos de cultivo.....	65
Figura 17 – Experimento da determinação da taxa de crescimento da biomassa e produção da ficocianina da <i>Spirulina platensis</i>	66
Figura 18 – Extração da ficocianina da microalga <i>Spirulina platensis</i>	68
Figura 19 - Gráfico da taxa de crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> durante sete ciclos de cultivo.....	68
Figura 20 - Gráfico da determinação de quantificação da ficocianina durante os ciclos de cultivo da <i>Spirulina platensis</i> cultivada no meio sintético e no meio	

alternativo.....	70
Figura 21 – extração da ficocianina em diferentes tipos de solventes, pesagem da biomassa (a) e processo de maceração da biomassa com o solvente (b).....	70
Figura 22 – Delienamento do experimento da atividade de antioxidante (DPPH) da ficocianina no ambiente claro (a) e no ambiente escuro (b).....	71
Figura 23 – Curva padrão de DPPH.....	73
Figura 24 – ficocianina coletada, solução tampão pH 6,0 (a), solução tampão pH 7,0 (b), água destilada (c) e ácido sulfúrico 1% (d) após o processo de centrifugação.....	74
Figura 25 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....	74
Figura 26 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....	75
Figura 27 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....	75
Figura 28 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....	76
Figura 29 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas	

nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....**76**

Figura 30 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....**77**

Figura 31 – atividade antioxidante da ficocianina em diferentes ambiente e meios de crescimento, (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.....**79**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da composição da <i>Spirulina</i> com outros microrganismos e alimentos (em base seca)...	20
Tabela 2 - Composição do meio de cultura Zarrouk.....	40
Tabela 3 - Composição dos micronutrientes e metais traços.....	40
Tabela 4 - Composição do meio Zarrouk modificada com a adição do subproduto agroindustrial.....	42
Tabela 5 – Composição proximal da biomassa da <i>Spirulina platensis</i> cultivada no meio sintético (MS) e no meio alternativo (MA).....	52
Tabela 6 – Tabela 6 – Determinação do pH, acidez titulável e sólidos solúveis, polifenóis e açúcares totais da biomassa.....	53
Tabela 7 - Perfil de minerais presentes na biomassa da microalga <i>Spirulina platensis</i> cultivada no meio sintético (MS) e meio alternativo (MA).....	54
Tabela 8 - Ácidos graxos identificados na biomassa cultivada em meio sintético e no meio alternativo.....	57
Tabela 9 – Solventes usados na extração da ficocianina.....	68
Tabela 10 – Determinação do pH durante os ciclos de cultivos.....	71
Tabela 11 – Valores do pH da ficocinina após o período de 15 dias.....	78

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Referencial teórico.....	14
2.1 Microalgas.....	14
2.2 Processo de cultivo de microalgas.....	16
2.3 Fontes alternativas de crescimento.....	17
2.4 <i>Spirulina platensis</i>	18
3. Objetivos.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. Metodologia geral.....	24
4.1 Preparação do pre-inóculo das microalgas.....	24
4.2 Utilizando o subproduto agroindustrial na obtenção do meio alternativo.....	24
4.3 Cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i> utilizando o meio sintético e o meio alternativo(subproduto agroindustrial).	24
4.4 Determinação de crescimento celular da <i>Spirulina platensis</i>	25
4.5 Separação da biomassa.....	25
4.6 Composição proximal da biomassa.....	25
4.6.1 Determinação de umidade.....	25
4.6.2 Determinação de proteínas.....	25
4.6.3 Determinação de lipídios por Soxhlet.....	26
4.6.4 Determinação de fibra bruta.....	26
4.6.1 Determinação do teor de cinzas.....	27
4.6.1 Determinação de carboidratos.....	27
4.7 Caracterização físico-química da biomassa.....	27
4.8 Análise dos dados.....	34
5. Resultados.....	35

5.1	Artigo 1: <i>Spirulina platensis</i> : ALTERNATIVE SOURCE OF NUTRIENTS - A REVIEW	35
5.2	Artigo 2: UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS AMAZÔNICOS COMO SUBSTRATO DE CULTIVO PARA SPIRULINA PLATENSIS.....	36
5.3	Artigo 3: DETERMINAÇÃO DO PONTO ÓTIMO DE COLHEITA DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> CULTIVADA EM MEIO SINTÉTICO E ALTERNATIVO PARA EXTRAÇÃO DA FICOCIANINA	62
6.	CONCLUSÃO GERAL	84
7.	REFERÊNCIAS	86

1. Introdução

As microalgas são microrganismos unicelulares, podendo ser comumente encontradas em águas doces e salgadas, apresentando um rápido crescimento celular e fácil processos de adaptação a diferentes condições ambientais devido à simplicidade de sua estrutura celular (DE FREITAS COÊLHO *et al.*, 2019). São constituídas de uma importante fonte de biomoléculas podendo ser aproveitadas para o uso comercial como, suplementos de saúde, alimentação humana e animal, cosméticos e para a produção de energia (MOLINO *et al.*, 2018).

O grande interesse na obtenção de produtos naturais tornaram as microalgas foco de estudo, por serem microrganismos capazes de acumular importantes componentes em suas células, podendo ser convertido nos mais diversos produtos (CORONADO-REYES *et al.*, 2022), suas biomassas podem ser utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas, na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, através da biopropescção de óleos essenciais, pigmentos, antioxidantes, na alimentação na aquicultura, em processo de biorremediação de efluentes, atividade de cultivo hidropônico entre outras aplicações (SILVEIRA; FAUSTINO; CUNHA, 2019). Atualmente se tem um grande interesse na produção em escala de microlagas por elas serem classificadas como uma rica fonte de ingredientes nutritivos e funcionais (AMPOFO; ABBEY, 2022). Diversos estudos científicos mostram o quão grande é o potencial das microalgas como matéria-prima confiável e sustentável para inumeras aplicações comerciais, industriais e de diversos biocompostos valiosos que podem ser comercializados nas mais diferentes áreas (DEAMICI *et al.*, 2022).

A produção em larga escala tem chamado a atenção por causa da grande relevância comercial e econômica, e uma das estratégias mais adequada para aumentar o custo-efetividade de um sistema de produção de microalgas é utilizar recursos alternativos, como meios alternativos onde ocorre a biotransformação de subprodutos (DE MEDEIROS *et al.*, 2020a). Esta pode ser uma alternativa viável atuando na redução de custos de produção, mitigar os impactos ecológicos e diminuir a dependência externa no fornecimento de nutrientes de interesse comercial e com utilização diversificada (BAUER *et al.*, 2021).

Parâmetros físicos e químicos, como composição de nutrientes, temperatura e luz, influenciam diretamente a produção de biomassa e o crescimento de

qualquer microalga depende principalmente da qualidade do meio utilizado para o seu cultivo (SANGAPILLAI; MARIMUTHU, 2019). As necessidades dos nutrientes essenciais para o cultivo das microalgas podem ser de até 50% do custo total da produção de biomassa, sendo assim o teor de nutrientes presentes nos subprodutos agroindustriais representam um excelente recurso para suportar a produção de menor custo (CHOIX *et al.*, 2018).

A diversidade de espécies de microalgas reflete em diferentes metabolismos e propriedades bioquímicas, onde cada espécie de microalga pode sintetizar metabólitos diferentes de alto valor agregado e que podem ser usados como compostos farmacêuticos, produtos alimentares e pigmentos naturais (VIEIRA *et al.*, 2021), podendo apresentar atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e anticancerígenas (KHAVARI *et al.*, 2021). Para a produção em escala comercial dessas moléculas bioativas, as microalgas mais utilizadas são as da classe de Cianobactérias, por exemplo, a *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Astrophysa* (*Spirulina*), e da classe das *Chlorophyceae* que são as *Chlamydomonas*, *Dunaliella salina*, *Chlorella* e existem também outras classes de interesse (KRATZER; MURKOVIC, 2021). A capacidade de gerar compostos de interesse a partir da própria microalga, é um fator que contribui para a valorização da biomassa, e torna-se necessário acessar esses compostos para que todo o processo seja viável para que se obtenha um bioproduto de interesse comercial. Portanto, a microalga é submetida a diferentes métodos convencionais de extração, métodos como a homogeneização, aquecimento, choque osmótico ou exposição a solvente orgânico (MARTINS *et al.*, 2023).

A relevância da extração e caracterização de compostos bioativos de fontes naturais está sendo tratada atualmente como tema de pesquisa no mundo. Esses novos compostos bioativos são capazes de fornecer benefícios adicionais à saúde e estão sendo constantemente estudados hoje em dia, existem muitos exemplos de diferentes tipos de compostos bioativos naturais já incluídos em alguns produtos comerciais, incluindo os de vegetais, como os peptídeos, ácidos graxos poliinsaturados ou polifenóis (MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2022). A eficiência do processo de extração desempenha um papel fundamental na obtenção de componentes bioativos de microalgas. Normalmente, não há processo único para recuperar totalmente os compostos de interesse contidos em sua biomassa. A

escolha do método de extração mais adequado depende de alguns fatores e das características da microalga, como composição físico-química do composto extraível e seu uso futuro, às vezes, diferentes técnicas ou condições analíticas são requeridas (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2021).

Para cada espécie de microalga, as propriedades bioquímicas interferem diretamente na biomassa e os tipos de bioativos presentes e como eles podem ser extraídos de forma eficiente. Portanto, determinar as variáveis que podem afetar de forma significativa na obtenção dos compostos de interesse é de suma importância sendo assim o estudo do melhor tempo de cultivo e do uso de diferentes fontes de crescimento para se obter um composto com potencial biotecnológico e de interesse comercial, faz com que a introdução destas no mercado seja atrativa e atraem investimentos.

2. Referencial teórico

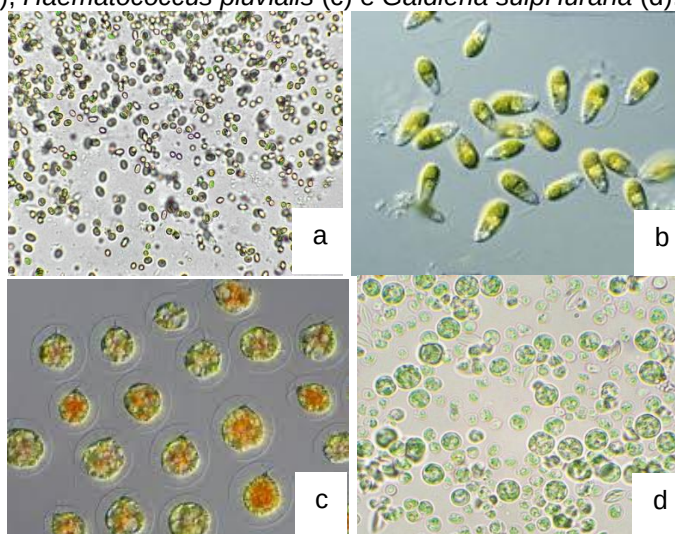
2.1 Microalgas

As microalgas são conhecidas como microrganismos unicelulares que possuem a facilidade em desenvolver-se em ambientes adversos como em meios aquáticos salinos ou salobros. São seres autótrofos, ou seja, produzem seu próprio alimento, apresentam uma eficiência fotossintética relevante, além de serem ótimas fixadoras de carbono (AMOLEGBE *et al.*, 2021). Existem também algumas microalgas heterótrofas, que dependem de substratos e são capazes de crescer em ambientes escuros, podendo também crescer em cultivo mixotróficos, ou seja, podem crescer tanto como autotróficos ou heterotróficos, dependendo da disponibilidade de luz e CO₂ (SOARES, 2021).

Fisiologicamente as microalgas podem ser procarióticas ou eucarióticas, podendo variar de tamanho, morfologia e entre outras características, sua composição é constituída basicamente de proteínas, carboidratos, vitaminas e lipídios. Para o seu crescimento, as microalgas precisam de um local adequado, nutrientes inorgânicos e uma fonte de carbono (DOURADO *et al.*, 2020) e dependendo do tipo de microalga utilizada, inúmeras moléculas bioativas podem ser obtidas a partir de sua biomassa para fins comerciais em diversos segmentos industriais (figura 1), que incluem produtos farmacêuticos, cosméticos, nutracêuticos, alimentos funcionais e biocombustíveis (SOUSA, 2020). Estas são capazes de crescer rapidamente e viver em uma ampla gama de condições ambientais, como fatores abióticos (luz, salinidade, pH, temperatura e limitação ou excesso trófico) e bióticos (relações tróficas) (HACHICHA *et al.*, 2022). Fator que lhe confere vantagens quanto a fornecimento de bioativos em grande quantidade em menor tempo quando comparadas a outras fontes de matérias-primas de interesse comercial, fornecendo suprimentos suficientes para atender à alta demanda com menos impacto ao meio ambiente (YAP *et al.*, 2021). Possuem características únicas devido às quais são de importância comercial. Uma grande variedade de espécies de microalgas foi identificada com várias características bioquímicas e fisiológicas, capazes de produzir isótopos estáveis, como ¹³C, ¹⁵N e ²H, que se tornam parte da biomassa de algas e são usados na fabricação de inúmeros produtos (RIZWAN *et al.*, 2018). As microalgas (figura 1) são

apresentadas como novos organismos modelo para uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, incluindo nutrição humana e animal, cosméticos, produtos farmacêuticos, captura de gás carbônico, produção de bioenergia e remoção de nutrientes de águas residuais e as atividades biológicas mais importantes dos produtos naturais da microalga são as atividades antioxidante, antiangiogênica, citotóxica, anticancerígena, antiobesidade e antimicrobiana (DE LUCA *et al.*, 2021).

Figura 1 - Fotografias microscópicas de diferentes espécies de microalgas. *Chlorella vulgaris* (a), *Dunaliella salina* (b), *Haematococcus pluvialis* (c) e *Galdieria sulphuraria* (d).



Fonte: (DERWENSKUS; HOLDMANN, 2016).

Uma variedade de produtos de alto valor, com potenciais aplicações biotecnológicas, pode ser extraída da biomassa de microalgas. Os produtos valiosos são principalmente pigmentos (clorofilas e carotenoides), PBPs, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas, nutracêuticos, etc. (MUTANDA *et al.*, 2020). O alto teor de proteína de várias espécies de microalgas é uma das principais razões para considerá-las como uma fonte não convencional de proteína e como suas células são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, elas podem fornecer os essenciais para humanos e animais (KOYANDE *et al.*, 2019). No quadro de proteínas alternativas, as microalgas vêm ganhando força devido à sua alta quantidade proteica (com variação de 30 a 70% da massa seca) e qualidade (possuindo um padrão completo de aminoácidos essenciais), e o conteúdo e a composição proteica das microalgas estão intimamente relacionados a diversos fatores, como espécie, linhagem, estágio de crescimento e condições de cultivo, como temperatura, composição do meio e luz (PRANDI *et al.*, 2023). No entanto,

para caracterizar completamente a proteína e determinar o teor de aminoácidos das microalgas, informações sobre o valor nutritivo da proteína e o grau de disponibilidade de aminoácidos devem ser divulgadas (KOYANDE *et al.*, 2019). O processamento de biomassa de microalgas é consideravelmente diferente de outros tipos de matérias-primas. As microalgas crescem em líquido e, portanto, requerem várias etapas para obter biomassa para extração bioquímica. As principais etapas do processamento de biomassa de microalgas envolvem cultivo, colheita e extração (RIZWAN *et al.*, 2018). Nas últimas décadas a biotecnologia de microalgas vem se tornando cada vez mais importante, fazendo com que o uso dessas moléculas bioativas a partir da biomassa seja usado em diversos segmentos (HASSAN *et al.*, 2022) e atualmente são produzidas toneladas de biomassa de microalgas por ano para a produção de vários bioprodutos valiosos. Portanto, pesquisas estão sendo realizadas em diversas aplicações com diferentes espécies de microalgas, e isso inclui espécies de interesse comercial como a *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e entre outras espécies de interesse (KAPOOR *et al.*, 2021).

2.2 Processo de cultivo de microalgas

As microalgas podem proliferar devido à sua capacidade de crescimento em vários ambientes e sua estrutura simples (RUSHAN; MAT YASIN; SAID, 2021), e precisam de um fornecimento regular de macro e micronutrientes, como fósforo, nitrogênio, ferro e enxofre em concentrações específicas, e esses nutrientes para o crescimento de microalgas são responsáveis por custos significativos na atual indústria de microalgas (TARHAN *et al.*, 2021).

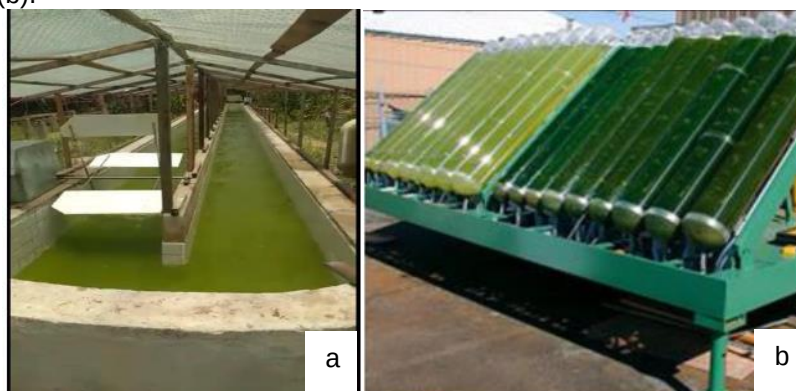
As células de microalgas retratam características chave importantes, como a alta taxa de crescimento, a alta produtividade da biomassa e a menor necessidade de água e para o crescimento, o que lhes permite ser uma matéria-prima ideal em relação às outras (SUPARMANIAM *et al.*, 2019). Além disso, o cultivo de microalgas não requer terras férteis, uma grande quantidade de água doce e herbicidas e pesticidas quando comparado com as outras culturas e, portanto, não estará competindo por recursos (TAN *et al.*, 2020).

Várias técnicas vêm sendo implementadas para separar as células de microalgas dos meios de cultura. Maneiras eficientes de separar células de

microalgas da água são, por exemplo, através de filtração por membrana, decantação, floculação e centrifugação (SEPIAN; YASIN; RAMESH, 2022). O desenvolvimento do cultivo e colheita de microalgas de forma de alto rendimento contribuiu para um campo ativo de pesquisa nas últimas décadas (UDAYAN *et al.*, 2022), e ao selecionar a cepa, o ambiente para o cultivo também precisa ser considerado, como o habitat das microalgas (água doce, salgada e águas residuais). A seleção do ambiente é essencial, pois diferentes águas fornecem diferentes nutrientes e aspectos ambientais que podem afetar o crescimento das células (CHEW *et al.*, 2018).

O cultivo de microalgas é realizado em sistemas diversificados, incluindo os abertos (figura 2a), como tanques circulares e lagoas de pista, e sistemas fechados (figura 2b), como fotobiorreatores (DZUMAN *et al.*, 2022), e como a tecnologia de cultivo de microalgas é um dos fatores que restringem uma produção em escala industrial economicamente viável, é necessário desenvolver mecanismos e/ou processos que visem à diminuição do custo que possam aumentar a produção de biomassa (ou uma molécula alvo escolhida) e, assim, reduzir os custos de cultivo (DE FREITAS COÊLHO *et al.*, 2019).

Figura 2 - Processo de cultivo de microalgas em sistema aberto (*raceway*) (a) e sistema fechado (*fotobiorreatores*) (b).



Fonte: (De pina *et al.*, 2021).

2.3 Fontes alternativas de crescimento

Os meios de crescimento tradicionais não são viáveis para a produção em larga escala devido ao seu alto custo (AHMAD; MOUNSEF; LTEIF, 2022) e o tipo de meio de cultura influencia diretamente no desenvolvimento da microalga em função dos nutrientes. Atualmente, os meios alternativos são frequentes para o crescimento das microalgas como forma de baratear o custo de produção (DE

PINA *et al.*, 2021). A simplificação de um meio de cultivo para a produção de biomassa de microalgas corresponde a uma estratégia sustentável para a melhor eficiência na utilização dos recursos energéticos, minimizando os impactos ambientais sem comprometer a prosperidade econômica dos negócios (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Os subprodutos agroindustriais são considerados um problema ambiental, devido à sua alta fermentabilidade e biodegradabilidade. Além disso, podem contribuir negativamente para as emissões de gases de efeito estufa (HC₄ e CO₂), e são uma fonte potencial de contaminação por descargas em aterros sanitários. No entanto, eles podem servir como fonte de carbono orgânico e outros nutrientes para o cultivo de microalgas após tratamento adequado, devido à sua composição química, presença de compostos bioativos e presença de nutrientes menores (PLEISSNER; RUMPOLD, 2018).

A estratégia mais adequada para aumentar o custo-efetividade de um sistema de cultivo de microalgas é utilizar recursos alternativos, sustentáveis e de baixo custo, como produtos de biotransformação a partir de subprodutos (MEDEIROS *et al.*, 2020), e a utilização desses resíduos e subprodutos agroindustriais na composição dos meios de cultura permite a valorização, contribuindo para o desenvolvimento de processos de economia circular com maior sustentabilidade (NAZARI *et al.*, 2021).

Diferentes subprodutos agroindustriais têm sido utilizados com sucesso como fonte de carbono para o cultivo de microalgas, incluindo extrato de vagem de alfarroba, hidrolisado em pó de milho, efluente de soro de queijo, águas residuais urbanas ou vinagre de maçã (LEÓN-VAZ *et al.*, 2019b). Os nutrientes contribuem significativamente para os custos totais de produção, de modo que o uso de águas residuais ou outros subprodutos agrícolas como fontes de nutrientes tem sido sugerido como uma maneira viável de tornar o processo viável não só para o crescimento de *Spirulina* como também de outras microalgas de interesse comercial (CIARDI *et al.*, 2022).

2.4 *Spirulina platensis*

A microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) refere-se a um grande número de espécies de bactérias que pertencem ao filo das cyanobactérias. Trinta e cinco espécies já

foram identificadas, as mais utilizadas são *S. máxima*, *S. platensis* e *S. Fusiformis* (CIRIACO *et al.*, 2022). A *Spirulina* (figura 4) é encontrada em lagos alcalinos, quentes tropicais, e subtropicais com altos valores de pH e concentrações de sal. Uma característica morfológica da *Spirulina* é a forma espiral de seus filamentos cilíndricos multicelulares em hélice aberta com comprimentos de 0,3 a 1,0 mm (RAMÍREZ-RODRIGUES *et al.*, 2021).

Essa espécie vem sendo estudada pelo seu potencial nutricional, por apresentar alta qualidade e quantidade de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos poliinsaturados. Além destes compostos, suas células apresentam produtos do metabolismo secundário, que induzem efeitos fisiológicos, como, por exemplo, os compostos fenólicos, tocoferol e pigmentos (carotenoides, ficocianina e clorofila), aos quais são atribuídas suas propriedades potencialmente funcionais (ALMEIDA *et al.*, 2020), possui uma parede celular macia formada por polissacarídeos e proteínas e não possui celulose em sua composição, proporcionando um fácil acesso a esses compostos de interesse e maior digestibilidade no organismo humano (AQUINO *et al.*, 2021).

Figura 3 - Visão microscópica da microalga *Spirulina platensis*



2.4.1 Valores nutricionais

A *Spirulina* é geralmente reconhecida como segura segundo a *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para consumo humano (Food & Administration, 2002), tendo sido adicionada a alguns produtos alimentares, como sorvete e queijo, pão e massas (DA SILVA *et al.*, 2019), sem efeito toxicológico e foi oficialmente aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esses principais constituintes conferem um potencial fisiológico e um benefício funcional que torna promissor para a indústria alimentícia superar o problema da desnutrição e em aplicações

em saúde contra patógenos (SEGHIRI; KHARBACH; ESSAMRI, 2019). A *Spirulina platensis* é uma microalga extensivamente cultivada, pois pode possuir várias aplicações como em alimentos, rações, nutracêuticos, produtos farmacêuticos e cosmecêuticos. Utilizada na nutrição humana não só devido ao seu alto teor de proteína (até 70% p/p), mas também devido ao seu perfil desejável de aminoácidos (AA) e boa digestibilidade, tornando-se fonte de proteína alternativa.

A *Spirulina platensis* é também uma fonte essencial de minerais, principalmente Fe, Zn, Mn e, bem como vitaminas hidrossolúveis (complexo B e C) e vitamina E, é rico em vitamina B12, como foi relatado que pode conter entre 1,6 e 3,2 µg desta vitamina por grama de massa seca, que pode cobrir entre 25 e 133% das recomendações de ingestão diária (RAMÍREZ-RODRIGUES *et al.*, 2021), além de apresentar melhores valores nutricionais quando comparadas com outras espécies vegetais comumente conhecidas e consumidas (tabela 1).

Tabela 1 - Comparação da composição da *Spirulina* com outros microrganismos e alimentos (em base seca).

FONTES PROTÉICA	PROTEÍNA (%)	LIPÍDIOS (%)	CARBOIDRATOS (%)	CINZAS (%)
CARNE BOVINA	57,1	37,1	2,0	3,1
MILHO	11,2	3,9	85,2	1,3
TRIGO	13,6	1,5	84,1	1,4
SOJA	46,7	7,1	40,9	5,3
<i>Bacillus subtilis</i>	63,1	4,4	2,1	9,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37,1	2,1	39,4	8,2
<i>Spirulina</i>	65,0	2,0	20,0	5,1

Fonte: (TELLES, 2021).

O interesse pela *Spirulina* é devido principalmente a sua composição química que varia entre quantidades significativas de proteínas, carboidratos e lipídios. Além de vitaminas, ácidos orgânicos, pigmentos e minerais presentes. Por isso essa microalga se destaca como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios (GREQUE *et al.*, 2021). Além de ser incorporada nos alimentos, existem múltiplas atividades relatadas da *Spirulina*, como anti-inflamatória, anticancerígena, redutora do colesterol e antiviral, e isso está atraindo a atenção dos cientistas por usar essa microalga como fonte

nutracêutica e farmacêutica (GABR; EL-SAYED; HIKAL, 2020).

A adição da *Spirulina* em alimentos viabiliza o enriquecimento nutricional. (ÇELEKLI; ALSLIBI; BOZKURT, 2020) adicionaram a *Spirulina* no iogurte onde promoveu o crescimento de probióticos. Eles afirmam também que a *S. platensis* tem uma influência positiva no crescimento de *Lactobacillus* no sistema intestinal e promove a produção ácida de lactococos.

Estudos existentes relataram vários benefícios para a saúde de compostos bioativos derivados de microalgas, tais como eles possuem atividade antiproliferativa, citotoxicidade para células tumorais, atividade da mieloperoxidase, atividade antioxidante entre outros benefícios (BHATNAGAR *et al.*, 2023). Embora as microalgas exibam propriedades tão valiosas, uma das principais preocupações é a ampliação dos processos para aproveitar ao máximo os valiosos compostos que as microalgas possuem (MARTINS *et al.*, 2023).

2.4.2 Compostos bioativos na *Spirulina*.

A *Spirulina* tem uma excelente composição nutricional e bioativa. Assim, a indústria alimentícia e farmacêutica pode se beneficiar das atividades biológicas encontradas nos componentes dessas matrizes. Além disso, a presença de compostos bioativos permite o seu uso em diferentes formulações alimentares (BORTOLINI *et al.*, 2022). Portanto, para a obtenção de extratos de microalgas de alta qualidade e aplica-los à produção farmacêutica e cosmética a jusante em larga escala é um tópico digno de pesquisa (ZHUANG *et al.*, 2022).

Efeitos bioativos, como atividade antioxidante de compostos presentes na biomassa dessa microalga, em especial de peptídeos tem despertado atenção dos pesquisadores para aplicação em alimentos (PEREIRA *et al.*, 2020) e devido à capacidade comprovada da *Spirulina* de produzir compostos bioativos destaca esses microrganismos biotecnologicamente para aplicações em diversas áreas (GREQUE *et al.*, 2021). Portanto, devido aos valiosos compostos presentes na *Spirulina*, muitos relatos demonstraram que o pigmento (ficocianina) contendo em sua biomassa depende de diferentes parâmetros ambientais (pH, temperatura e intensidade de luz), condições de extração e solventes usados para sua obtenção e uso (HACHICHA *et al.*, 2022).

As ficocianinas são comumente conhecidas como proteínas (Ficobiliproteínas)

e são grandes e altamente solúveis em água com aglomerados de proteínas supramoleculares. Na *Spirulina* a ficocianina está presente em alto nível, cerca de 40 a 60% em sua composição foi relatada (PRABAKARAN *et al.*, 2020). A ficocianina degrada facilmente quando exposta a elevadas temperaturas, à umidade e à luz, perdendo, ao longo do armazenamento, ou durante os processos tecnológicos de beneficiamento, boa parte de suas propriedades funcionais (MINATEL, 2021). Como um pigmento natural solúvel em água, a ficocianina às vezes é usada para alimentos corante, corante cosmético e reagente fluorescente para diagnóstico clínico, possui efeito antioxidante e anti-inflamatório. Portanto, a ficocianina tem o potencial de se tornar um agente terapêutico para doenças causadas pelo estresse oxidativo (DIANURSANTI; HAFIDZAH, 2021a).

Sua composição nutricional possui a vitamina A e a vitamina C, importantes antioxidantes naturais, e ácido fólico (B9), importante para a formação de células e bom funcionamento de alguns órgãos. Esta microalga destaca-se, sobretudo, pelo seu conteúdo de vitamina B12, difícil de encontrar em dietas vegetarianas (SANTOS NETO *et al.*, 2021).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Realizar o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fonte alternativa de crescimento para a extração dos compostos bioativos.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um meio alternativo a partir da inserção de subprodutos da região visando diminuir o custo de produção;
- Cultivar a *Spirulina platensis* em meio sintético e em meio alternativo para a obtenção da biomassa e caracterizar quimicamente, fisicamente e nutricionalmente;
- Determinar o ponto ótimo de colheita da microalga *Spirulina platensis* para a quantificação da produção da ficocianina cultivada no meio sintético e alternativo;
- Extrair, caracterizar e avaliar a atividade bioativa da ficocianina e determinar seu potencial biotecnológico.

4. Metodologia geral

4.1 Preparação do pre-inóculo das microalgas

A cepa da *Spirulina platensis* foi obtida através de doação do Instituto Senai Cimatec de Salvador - Bahia. O pré-inóculo foi feito utilizando o meio padrão descrito na literatura, foi usado o meio Zarrouk (tabela 2 e 3). O meio foi preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min, a microalga foi inoculada no meio e as condições de cultivo foram com temperatura controlada e fotoperíodo de 16/8h claro/escuro por um período de 15 dias.

4.2 Utilizando o subproduto agroindustrial na obtenção do meio alternativo

O subproduto (casca e coroa) agroindustrial foi obtido a partir do processamento da polpa do abacaxi da empresa Amazônia Polpas localizada no bairro Colônia Oliveira Machado em Manaus – Amazonas. Primeiramente foi realizado o processo de sanitização no subproduto utilizando hipoclorito de sódio (200 ppm), a fim de eliminar todo contaminante presente, e posteriormente foi colocado para a secagem em estufa com circulação de ar a 60° C por 48 horas. Após esse processo o subproduto foi reduzido em partículas menores utilizando moinho de facas para melhor extração. Após a obtenção das partículas menores do subproduto, foi realizado um tratamento utilizando um agitador mecânico de hélice por 10 minutos, o material foi filtrado para separação e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

4.3 Cultivo da microalga *Spirulina platensis* utilizando o meio sintético e o meio alternativo(subproduto agroindustrial).

Foram preparados 450 ml do meio sintético (Zarrouk) e 450 ml do meio alternativo com a adição do subproduto. Autoclavados a 121°C a 1 atm por 15 minutos. 50 ml do pré-inóculo da microalga *Spirulina platensis* foram retirados e adicionados aos meios (sintético e alternativo) previamente esterilizados. As condições de cultivo foram em ambiente com temperatura controlada e com fotoperíodo de 16/8h claro/escuro por um período de 12 dias. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

4.4 Determinação de crescimento celular da *Spirulina platensis*

Para a determinação celular das microalgas, a leitura foi realizada em dias alternados, foi retirada uma alíquota para a leitura em espectrofotômetro com absorbância de 670 nm (PEREIRA, 2017); (ROCHA SIMÕES *et al.*, 2019).

4.5 Separação da biomassa

A separação da biomassa foi através do processo de filtração utilizando uma bomba de vácuo, papel filtro com porosidade de 0,22 µm em conjunto de filtração da marca milipore. A biomassa da microalga foi congelada para posterior processo de liofilização. O processo de liofilização tem o objetivo de retirar toda a água presente sem passar pelo estado líquido. A biomassa liofilizada foi armazenada em tubo de ensaios para análises.

4.6 Composição proximal da biomassa

4.6.1 Determinação de umidade

Foi pesado 5g da biomassa da microalga em capsulas previamente seca e taradas. As capsulas antecipadamente foram submetidas à estufa a 105°C por cerca de 3h, foram retiradas com auxílio de uma pinça, acondicionadas num dessecador hermeticamente fechado por cerca de 30 minutos, em seguida as capsulas foram pesadas, foi anotado o peso e tarado para a pesagem das amostras. Após isso as capsulas com as amostras foram levadas à estufa a 60°C ± 5°C, até peso constante ou aproximadamente 6h, após esse período retirar as capsulas com o auxilio de uma pinça e acondicionar em dissecador por 30 minutos e realizar a pesagem. Retornar o material por mais 2h na estufa e pesar novamente, se não houver diferença, considera-se o peso constante. Após esse procedimento realizar o cálculo de umidade (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

4.6.2 Determinação de proteínas

A extração da amostra foi realizada seguindo a Metodologia de Kjeldahl, foi pesado 100mg da amostra (anotado o peso). A amostra foi embrulhada em um pedaço de papel manteiga e colocada dentro do tubo para o processo de digestão onde foram adicionados 600 mg de Sulfato de potássio, 300 mg de Sulfato de cobre e 5 ml de ácido sulfúrico. O tubo foi levado para o bloco digestor, suspendendo a temperatura de 50 em 50°C, até a temperatura de 400°C, até que

a amostra se torne incolor. Após o processo de digestão os tubos com as amostras foram levados para o processo de destilação, onde utilizou-se 10 ml de ácido bórico + indicadores. Durante o processo de destilação foi adicionado 15 ml de Hidróxido de sódio e 10 ml de água destilada. Durante o processo a caldeira do equipamento permaneceu ligada onde houve a conversão da amônia para o erlenmeyer contendo o ácido bórico + indicadores. Foi coletado aproximadamente cerca de 75 ml. O coletado foi levado para a titulação com ácido clorídrico até a viragem de cor (verde par vermelho). Foi realizado o cálculo de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{VG \times Fe \times N(HCl) \times 14 \times 100 \times 6,25}{\text{amostra (mg)}}$$

4.6.3 Determinação de lipídios por Soxhlet

A determinação de lipídeos ocorreu por extração com solvente orgânico (éter de petróleo) com o auxílio de um aparelho extrator do tipo Soxhlet, segundo método da AOAC (2023), realizado em triplicata para cada amostra. Em resumo, foi pesado 3g da biomassa em cartucho de Soxhlet e adicionado éter de petróleo até quantidade suficiente para um soxhlet e meio (200 ml), mantido em aquecimento por 8h. Posteriormente a esse tempo, os cartuchos foram retirados, o éter foi destilado e os reboilers foram colocados em estufa a 105°C até peso constante, para posterior pesagem.

4.6.4 Determinação de fibra bruta

Foram pesados 0,5g da amostra e adicionado à solução de ácido sulfúrico 1,25% e colocado no equipamento de analisador de fibra da Marca Tecnal por 30 minutos a temperatura de 100 °C, após esse processo foi realizado a lavagem da amostra com água destilada fervente para a retirada da solução ácida, foram feitas 5 lavagens sucessivamente. Logo após foi adicionado à solução de hidróxido 1,25% por 30 minutos a uma temperatura de 100 °C no equipamento. Foram feitas 5 lavagens com água destilada fervente para a retirada da solução de hidróxido de sódio da amostra. A amostra foi então retirada do equipamento e colocada em um bequer vazio e adicionado álcool etílico absoluto em quantidades suficiente para cobrir a amostra, foi lavada por 5 minutos e então desprezado o álcool do bequer. Em seguida a amostra foi lavada com acetona, por 5 minutos e desprezado a

acetona do bequer. A amostra então foi levada para estufa ventilada a 60 °C por 24 horas. Após esse período a amostra foi transferida para estufa a 105 °C por 2 horas e colocada no dessecador para esfriar, por aproximadamente 40 minutos. Foi realizada a pesagem em balança analítica para registro do peso da amostra (FERNANDES, 2022).

4.6.1 Determinação do teor de cinzas

Os cadinhos foram colocados na estufa para a secagem 105°C por 12 horas. Após o período de 12 horas os cadinhos foram colocados no dessecador por 20 minutos e pesados em balança analítica. Foram pesados 3g da microalga *Spirulina platensis*, os cadinhos com as amostras foram levados para a mufla a 600°C por 4 horas, após esse período a mufla foi desligada e os cadinhos foram retirados no dia seguinte e pesados novamente em balança analítica (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023); (IAL, 2012).

4.6.1 Determinação de carboidratos

Será calculada a fração de carboidratos pela diferença segundo a equação:

%F.G. = 100 – (%umidade + %lipídios + %proteína bruta + %fração cinza), considerando a materia integral (ADOLFO LUTZ, 2012).

4.7 Caracterização físico-química da biomassa

4.7.1 Determinação de acidez

Foi pesado 5 g da amostra, transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL com o auxílio de 50 mL de água. Foi adicionado de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M, até coloração rósea (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Cálculo:

$$\frac{V \times f \times 100}{P \times c} = \text{acidez em solução molar por cento } v/m$$

4.7.2 Determinação do pH

Foi pesado 5 g da amostra em um béquer e dilua com auxílio de 100 mL de água. Agitou o frasco com o conteúdo até que as partículas fiquem uniformemente suspensas. Após isso foi determinado o pH, com o aparelho previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

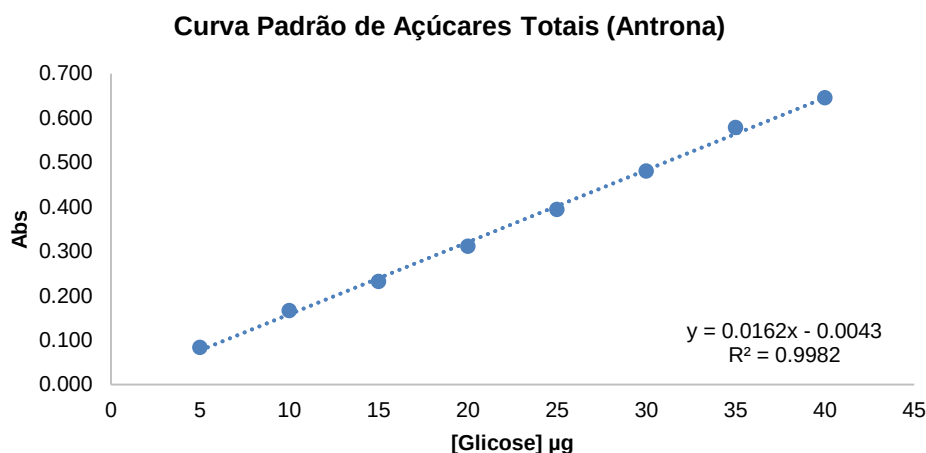
4.7.3 Determinação de sólidos solúveis por refratometria

A determinação dos sólidos solúveis totais foi feita usando um refratômetro digital da marca Hanna HI96800 com compensação de temperatura automática a 25°C e expressos em %, segundo a (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023). Previamente o equipamento foi zerado com água destilada e limpo com algodão. Foram retirados 1 a 2 gotas da solução homogeneizada da mistura e colocadas no refratômetro, três leituras foram feitas, sempre limpando a lente a cada leitura.

4.7.4 Determinação dos açúcares totais

A determinação dos açúcares solúveis totais foi determinada pelo método de Antrona. Foi pesado 2g da biomassa das microalgas e adicionado 20 mL de álcool etílico 95%. Depois as amostras foram levadas para chapa elétrica e foi fervido por 30 minutos. Após a fervura as amostras ficaram em repouso por 12 horas e em seguida foram filtradas e foram adicionados mais 20 mL de álcool etílico 95%. As amostras foram levadas novamente para a chapa elétrica para a evaporação completa do álcool, atingindo aproximadamente 5 mL. Em seguida completou-se o volume para 50 mL de água destilada (Extrato). Foi feita uma diluição pegando 0,5 mL do extrato para 200 mL de água destilada. Foi utilizado 1 mL para a determinação (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

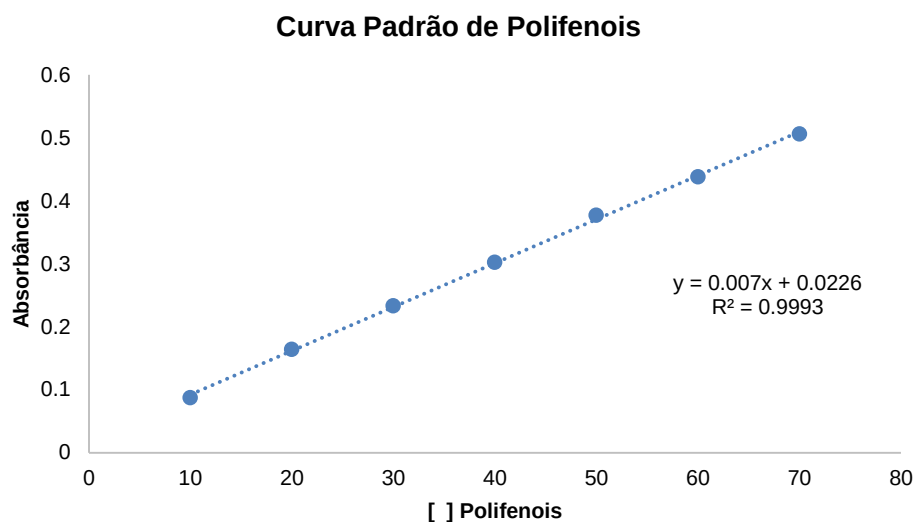
Figura 4 – Curva Padrão de Açúcares Solúveis Totais.



4.7.5 Determinação dos polifenóis

Para a determinação de polifenóis foi pesado e um erlenmeyer de 150 mL, previamente tarado, 2g da biomassa da *Spirulina* foi adicionado em 50 mL de metanol 80%. Foi colocado em banho-maria até ferver e contou-se o tempo de 15 minutos, foram usadas varetas de vidro em rolha de borracha para refluxo, em seguida foi filtrado (papel filtro). O resíduo do papel foi transferido para o mesmo erlenmeyer (de uso inicial) e o filtrado foi reservado. Foram adicionados mais 50 mL de metanol 80%, fervido por 15 minutos e filtrado. Esta etapa foi repetida 3 vezes dando um volume de aproximadamente de 150 mL do reservado. Os erlenmeyer foram levados para chapa elétrica quente para evaporar o filtrado até ± 5 ml. Foi completado um volume de 25 ml de água destilada. Para a leitura no espectrofotômetro a 760 nm foi retirado do volume de 25 ml, 0,1 ml para a determinação dos polifenóis das amostras conforme a curva padrão (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Figura 5 – Curva Padrão de Polifenóis



4.7.6 Determinação do perfil de minerais por RFX

A determinação do perfil de minerais foi caracterizado por energia fluorescência Raio X dispersiva, do modelo Shimadzu EDX-720, utilizando um tubo de raios-X de ródio (Rh) com tensões de 15 keV (Na e Sc) e 50 keV (Ti e U) com corrente de tubo de 50 a 100 μ A, colimador de 3mm, tempo de integração

real de 100s, tempo morto do detector de 40 e 39%, sob vácuo e detector de Si(Li) resfriado com nitrogênio líquido (IAL, 2012).

4.7.7 Determinação da termogravimetria (TGA)

As análises térmicas das amostras das biomassas de microalgas foram realizadas utilizando um equipamento de Análise Térmica Simultânea (TG/DSC), da marca PerkinElmer, modelo “STA 6000”. Para estas análises foram utilizadas amostras de aproximadamente 10 mg colocadas em cadinhos de alumina e submetidas a um programa de temperatura controlada sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 20 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As análises foram realizadas no intervalo de temperatura de 30 a 650 °C, para obtenção de cinzas, na determinação de umidade e atividade de água em algas e peixes por termogravimetria (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

4.7.8 Determinação dos ácidos graxos

Ácidos graxos em óleo foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos e então analisados usando um modelo Shimadzu de cromatografia gasosa (GC) para Mass Spectrometer Gas Chromatograph/GC-2010 PLUS equipado com um detector de ionização de chama. Os compostos foram separados em uma coluna de sílica fundida capilar RTxR-5 de 30 m com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de 0,25 µm. As condições operacionais foram as seguintes: temperatura programada da coluna, 80–220°C (5°C/min); temperatura do injetor, 230°C; temperatura do detector, 240°C; gás de arraste, hidrogênio; velocidade linear do gás, 40 cm/s; proporção de amostra, 1:50. Os ácidos graxos foram identificados comparando-se os tempos de retenção com os padrões e quantificados pela normalização das áreas dos picos. Os padrões de ácidos graxos usados (Sigma Supelco) foram ácido hexanóico (C6:0), ácido octanóico (C8:0), ácido decanóico (C10:0), ácido undecanóico (C11:0), ácido duodecanóico (C12:0), ácido tetradecanóico (C14:0), ácido cis-9-tetradecenóico (C14:1), ácido hexadecanóico (C16:0), ácido cis-9-hexadecenóico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), 8-heptadecanóico (C17:1), ácido octadecanóico (C18:0), ácido trans-9-octadecanoico (C18:1), ácido cis-9-octadecenoico (C18:1), ácido cis-9, ácido trans-11-octadecanoico (C18:2), cis-9, ácido cis-12-

octadecadienóico (C18: 2), ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18: 3), ácido 6,9,12-octadecatrienóico (C18:3), ácido ácido eicosanóico (C20:0), ácido cis-9-eicosenóico (C20:1), ácido ácido 8,11- eicosadenóico (C20:2), ácido 5,8,11-eicosatrienóico (C20:3), ácido docosanóico (C22:0), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5), ácido cis-13-docosenóico (C22:1), ácido tetracosanóico (C24:0), cis-15-tetracosenóico (C24:1) (SOUZA *et al.*, 2020).

4.7.9 Experimentos com diferentes ciclos de cultivo da microalga *Spirulina platensis*

Foram preparados 2,5L de meio sintético (Zarrouk) e de meio alternativo (Zarrouk modificado mais subproduto agroindustrial). Distribuídos 100 ml dos meios de cultivos nos erlenmeyers (em triplicata), e adicionado 10 ml do pré-inóculo da microalga *Spirulina platensis*. O experimento foi realizado em intervalos de tempo de cultivo: T0 (0 dias) – T1 (3 dias) – T2 (6 dias) – T3 (9 dias) – T4 (12 dias) – T5 (15 dias) – T6 (18 dias) – T7 (21 dias).

4.7.10 Taxa de crescimento e produção de biomassa.

A taxa de crescimento foi determinado pelo aumento da densidade celular, que foi medida pela densidade óptica (DO) a 670 nm onde uma alíquota foi retirada e realizada a leitura em espectrofotometro digital (UV-Visível faixa 190-1100 nm) da marca Global Trade Technology (PEREIRA, 2017). Para a determinação do peso seco, as células foram separadas do meio utilizando filtros 0,22µm. A produtividade (Q_x , g/L/dia) foi medido pela seguinte equação:

$$Q_x = \frac{(X_t - X_0)}{(t_1 - t_0)}$$

onde X_t e X_0 são a concentração de biomassa seca (g/L) no tempo t_t e t_0 respectivamente (JARUNGKEERATIVIMOL *et al.*, 2023) (UMETANI; SPOSÓB; TIRON, 2024).

4.7.11 Análises físico-químicas (pH, acidez e sólidos solúveis)

Para o preparo da amostra uma quantidade de 2 gramas foi macerada a frio e diluída em 30 mL de água destilada sobre agitação magnética, posteriormente, o eletrodo foi inserido e o valor foi anotado. Para a determinação de pH, a amostra

foi mensurada usando um pHmetro digital de bancada (Modelo PHS-3E-BI-SATRA). O equipamento foi calibrado com soluções tampão comercial em pH 7.0 e 10 e posteriormente, o eletrodo foi inserido e o valor foi anotado. Já a titulação foi realizada com solução de NaOH 0.1M, 3 gotas de fenolftaleína foram adicionadas como indicador do ponto de virada. O volume de NaOH foi expresso em acidez em solução molar por cento v/m e o valor foi obtido pela seguinte equação:

$$AT = \frac{[V \times (f) \times 100]}{P \times c}$$

Onde, V é o volume de NaOH utilizado, m é a massa da amostra e f, é o fator de correção do NaOH, P é o número de grama da amostra utilizado, c é a correção para solução de NaOH 1 M, 10 para solução NaOH 0,1 M.

Para os sólidos solúveis o equipamento foi ajustado para a leitura de n em 1,3330 com água a 20°C, de acordo com as instruções do fabricante. Foi transferido de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro e foi feito a leitura (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

4.7.12 Extração e quantificação da ficocianina

Durante o termino de cada ciclo de cultivo da microalga *Spirulina platensis* no meio sintético (Zarrouk) e no meio alternativo (subproduto agroindustrial) e após a separação da biomassa foi realizado a extração da ficocinana. A extração de ficocianina foi realizada segundo metodologia adaptada (PRATES *et al.*, 2015) onde a biomassa seca foi macerada com 20 ml de água destilada (pH 7,0) e mantidas em banho ultrassônico por 30 minutos, para o rompimento das células e melhor extração da ficocianina, e deixado em repouso por 12 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm utilizando uma centrífuga (Himac Centrifuge Cr7) por 10 minutos e recolhido o sobrenadante. As alíquotas dos 3 sobrenadantes foram misturadas, e imediatamente analisadas. As amostras foram submetidas à espectrofotometro digital (UV-Visível faixa 190-1100 nm) da marca Global Trade Technology, com comprimentos de onda de 615 nm e 652 nm. O resultado foi dado em mg/mL, de acordo com a Equação abaixo, de (SANDYBAYEVA *et al.*, 2022).

$$Ficocianina = \frac{A^{615} - 0,474 \times A^{652}}{5,34}$$

A concentração média de ficocianina na amostra (mg.mL^{-1}); $A_{615\text{nm}}$ é a absorbância da amostra a 615nm; e $A_{652\text{nm}}$ é a absorbância da amostra a 652 nm.

4.7.13 Extração da ficocianina com diferentes solventes.

Para a extração da ficocianina foram utilizados 4 tipos de solventes. Os solventes escolhidos são descritos em maior parte na literatura por apresentar resultados relevantes quando se trata de extração. Os solventes foram: solução tampão pH 6,0, solução tampão pH 7,0, água destilada pH 5,0 e ácido sulfúrico 1% pH 2,0. Primeiramente foi pesado um grama da biomassa da microalga *Spirulina platensis* e posteriormente macerada juntamente com o solvente.

Depois de realizado o processo de maceração, o macerado foi colocado em um tubo falcon de 50 ml para um repouso de 24 horas. Após o período de 24 horas foi realizada a centrifugação e coletada o sobrenadante (ficocianina) para a realização das análises.

4.7.14 Caracterização da ficocianina

Para o método de caracterização da ficocianina extraída da biomassa cultivada no meio sintético e no meio alternativo, foram determinados alguns parâmetros, como: estabilidade da cor e pH durante um período de 15 dias em dois ambientes (claro e escuro). Para determinar a estabilidade da cor durante o período determinado e o ambiente estabelecido, a avaliação foi realizada com registros de fotos. Para o pH foi utilizado um pHmêtro previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

4.7.15 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante de DPPH foi realizada segundo método elaborado por Silveira; Kassuia; Domahovski, R. C.; Lazzarotto (2018) com algumas alterações. Sintetizando, foi determinada a curva padrão de DPPH (figura 23) a 0,06 mM. Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados 75 μL da extração da ficocianina nos dois ambientes (claro e escuro) e 2,925 mL de solução de DPPH em etanol (0,06 mM), foram misturados em tubos de ensaio e depois

foram retirados 300 µl e adicionado na placa de 96 poços (figura 22). Após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi avaliada em 515nm utilizando um espectrofotômetro digital Flexstation3 Microplate Reader With Software.

A porcentagem de inibição de antioxidantes de acordo com as absorbâncias das amostras na placa de 96 poços é expressa em concentração equivalente de Trolox (µM). Mediante reta da curva de calibração pode-se calcular o valor [%I] usando a equação abaixo:

$$[\%I] = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{Controle}} \right\} \times 100$$

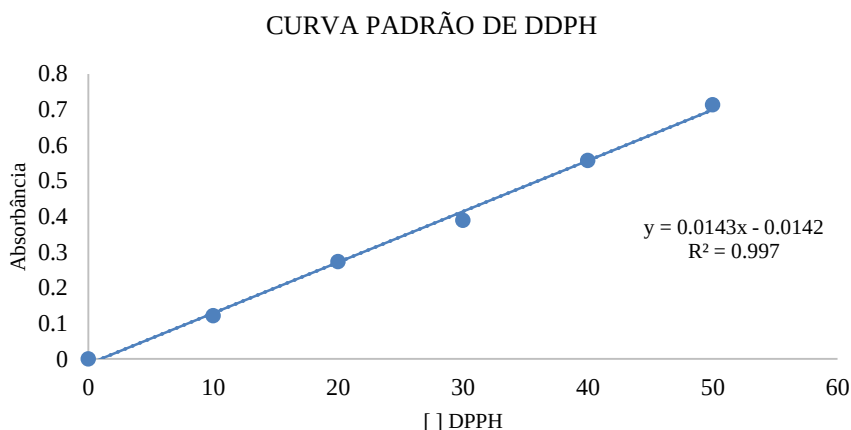
Sendo:

Absamostra = Absorbância da amostra.

Absbranco = Absorbância do valor branco obtido.

AbsControle = Absorbância do valor controle obtido.

Figura 6 – Curva padrão de DPPH.



4.8 Análise dos dados

Após a obtenção dos resultados foi realizada a análise do teste t (Student) dos dados obtidos, utilizando o Software Statistica 8.0.

5. Resultados

Os resultados a seguir serão apresentados em forma de ARTIGOS, sendo assim serão apresentados 3 artigos a serem publicados na revista *Algal Research*.

5.1 Artigo 1: *Spirulina platensis*: ALTERNATIVE SOURCE OF NUTRIENTS - A REVIEW

Daniel Nascimento Motta^{a,b}, Milena Botelho Pereira Soares^c, Leticia de Alencar Pereira Rodrigues^c, Vanessa Leal de Queiroz Hermino^{a,b}, Siglia Maria Braga Neves^a, Rosany Piccolotto Carvalho^b, Fábio Leandro Calderaro^b, Edson Pablo da Silva^{b,c}

^aAmazon Biobusiness Center, Brazil

^bPostgraduate Program in Biotechnology – PPGBIOTEC/UFAM

^cSENAI Institute of Innovation in Health Advanced Systems, University Center SENAI/CIMATEC, Brazil.

ABSTRACT

Spirulina is a blue-green cyanobacterium that grows in fresh and salt water. It is known to be a rich source of nutrients, including proteins, vitamins, minerals and antioxidants. Some of its main applications include: as a nutritional supplement, where *Spirulina* is often consumed as a dietary supplement due to its high protein content and other essential nutrients. It is especially popular among vegetarians and vegans due to its complete protein quality. As a health improvement, studies suggest that *Spirulina* may have several health benefits, such as reducing cholesterol, controlling blood pressure, strengthening the immune system and protecting against cardiovascular diseases. It also acts as a detox in that *Spirulina* is known for its ability to detoxify the body, helping to remove heavy metals and toxins from the body. In the cosmetics field, due to its antioxidant and nourishing properties, *Spirulina* is used in cosmetic products, such as facial creams, hair masks and body lotions, to promote skin and hair health. It is also used in agriculture and animal feed. In agriculture it is used as an organic fertilizer and in animal feed, especially in aquaculture, as a source of protein for fish and shrimp.

In summary, *Spirulina* is a valuable source of nutrients and has a variety of applications, from nutritional supplements to cosmetics and agriculture. Its health benefits and potential for sustainable use make it a popular choice in many areas. Therefore, this article aims to expand on the applications of *Spirulina platensis*.

Keywords: *Spirulina platensis*; Nutritional supplement; Health.

5.2 Artigo 2: UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS AMAZÔNICOS COMO SUBSTRATO DE CULTIVO PARA *SPIRULINA PLATENSIS*

Daniel Nascimento Motta^{1,2}, Milena Botelho Pereira Soares³, Leticia de Alencar Pereira Rodrigues³, Vanessa Leal de Queiroz Hermino^{1,2}, Rosany Piccolotto Carvalho², Edson Pablo da Silva^{1,2}.

¹Centro de Biotecnologia da Amazônia, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM

³SENAI Institute of Innovation in Health Advanced Systems, University Center SENAI/CIMATEC, Brazil.

RESUMO

A pesquisa com microalgas atualmente, vem se tornando cada vez mais importante, pois as microalgas são usadas principalmente como alimentos, aditivos alimentares, ração para aquicultura, corantes, cosméticos, produtos farmacêuticos e nutracêuticos. Porém para a obtenção da biomassa o processo de produção é muito caro, pesquisas estão sendo realizadas a fim de baratear esse custo de produção e como alternativas estão utilizando fontes alternativas de crescimento. Diante disso o objetivo desta pesquisa foi avaliar a inserção de um subproduto agroindustrial como fonte alternativa de crescimento para a microalga *Spirulina platensis*, foi avaliada análise da composição proximal, físicas e químicas na biomassa cultivada no meio sintético e no meio alternativo. Como resultados foram observados que a inserção do subproduto ao meio de cultivo mostrou-se eficiente, gerando uma quantidade de biomassa superior comparado ao meio sintético. A composição proximal mostrou valores superiores de proteínas em torno de 8,63%, além dos ácidos graxos identificados que apresentaram valores superiores ou similares, como os saturados destacando o ácido palmítico que apresentou 44,50% e os insaturados como o ácido oleico 7,50%, ácido linoleico e o ácido linolênico 21,78%. Concluímos que os subprodutos gerados podem servir como fonte alternativa de crescimento para as microalgas, onde podem apresentar uma taxa de crescimento superior quando comparado aos meios sintéticos descritos na literatura e que além do aumento de células esses subprodutos podem agregar valor nutricional na célula microalgal fazendo com que ela eleve a importância de ser usada com um suplemento alimentar.

Palavras chaves: Bioprocessos; Biomassa; Aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

Microalgae research is currently becoming increasingly important, as microalgae are mainly used as foods, food additives, aquaculture feed, dyes, cosmetics, pharmaceuticals and nutraceuticals. However, to obtain biomass, the production process is very expensive, research is being carried out in order to reduce this production cost and as alternatives, sources of growth are being used. Therefore, the objective of this research was to evaluate the insertion of an agro-industrial byproduct as an alternative source of growth for the microalgae *Spirulina platensis*. The analysis of the proximal, physical and chemical composition of the biomass cultivated in the synthetic medium and in the alternative medium was evaluated. As a result, it was observed that the insertion of the byproduct into the cultivation medium proved to be efficient, generating a higher amount of biomass compared to the synthetic medium. The proximal composition showed higher protein values of around 8.63%, in addition to specific fatty acids that presented higher or similar values, such as saturated ones, highlighting palmitic acid, which presented 44.50%, and unsaturated ones such as oleic acid 7, 50%, linoleic acid and linolenic acid 21.78%. We conclude that the by-products generated can serve as an alternative source of growth for microalgae, where they can present a higher growth rate when compared to the synthetic media described in the literature and that in addition to increasing cells, these by-products can add nutritional value to the microalgal cell, making that it raises the importance of being used as a dietary supplement.

Keywords: Bioprocesses; Biomass; Biotechnological applications.

Introdução

A denominação microalgas refere-se tanto a microalgas verdes quanto a cianobactérias. Apesar de serem dois microrganismos distintos (eucariótico e procariótico, respectivamente), ambos realizam fotossíntese e podem ser produzidos seguindo os mesmos princípios e tecnologias (DAGNAISSER *et al.*, 2022), estão amplamente distribuídas em diferentes habitats, como solo, oceanos, rios, lagos e até ambientes extremos (alta salinidade, baixo pH, alta temperatura, etc.) (SONG *et al.*, 2022).

Microalgas como a *Spirulina* vêm sendo estudadas por seu papel na

alimentação devido às suas altas propriedades nutricionais e funcionais (SWATI *et al.*, 2022), para a produção de biocombustíveis onde apresentam alto teor de lipídios em suas células e no tratamento de efluentes no qual podem ser usadas a fim de remover todos os nutrientes presentes (BEZERRA *et al.*, 2022). Esta pode se desenvolver em água doce, salobra ou salgada, tem formato espiral, possui clorofila, alto teor de proteína (acima de 50% do peso seco) e é rica em minerais e vitaminas (SUGIHARTO, 2020).

Um grande desafio no cultivo de microalgas é o uso do meio sintético que limita a produção de biomassa em escala comercial, devido o custo do processo (SERRÀ *et al.*, 2020). Isso é devido, principalmente, à alta demanda de nutrientes desses microrganismos durante o cultivo, que pode representar até 35% dos custos operacionais de produção (BEZERRA *et al.*, 2022). Sendo assim, a definição dos meios de cultura é um fator importante a ser considerado no cultivo de microalgas devido ao alto custo atual associado à produção de biomassa e metabólitos (BERMEJO *et al.*, 2021). Estratégias como o uso de meios alternativos estão sendo utilizados para diminuir os custos sem comprometer a produtividade e os valores nutricionais da cultura. Com esse propósito, alguns estudos têm sido realizados ao longo dos últimos anos, utilizando fertilizantes agrícolas, águas residuais e alguns subprodutos agroindustriais como fonte de crescimento para diferentes espécies de microalgas (ALI; MASOOD; SALEEM, 2021); (KASSIM; RAMLI; MENG, 2022); (LECA *et al.*, 2024).

Diferentes subprodutos agroindustriais têm sido utilizados com sucesso como fonte de carbono para leveduras e microalgas, incluindo extrato de vagem de alfarroba, hidrolisado de pó de milho, efluente de soro de queijo, águas residual urbana ou vinagre de maçã (LEÓN-VAZ *et al.*, 2019a). Neste sentido, o aproveitamento de subprodutos gerados do processamento de frutas na região amazônica, também pode vir a ser uma excelente estratégia, diminuindo custos e disponibilizando de subprodutos com alto valor nutricional. Alguns desses subprodutos precisam passar por um processo de pré-tratamento, principalmente os subprodutos orgânicos do processamento de alimentos, a fim de liberar os açúcares, fonte de glicose, importante para o crescimento das microalgas (ENDE; NOKE, 2019).

As microalgas são consideradas um rico tesouro de diversos

metabólitos secundários que exercem atividades biológicas notáveis (KAPOOR *et al.*, 2021). Esses metabólitos apresentam inúmeras e diferentes atividades, incluindo imunomoduladora, anti-inflamatória, anticancerígena, antimicrobiana, atividade antioxidante, com potencial uso na produção de fármacos e nutracêuticos (GRUBIŠIĆ *et al.*, 2022), e para a utilização eficaz da biomassa de microalgas para essas diversas aplicações, é necessário estudar e conhecer sua composição bioquímica (WAGHMARE *et al.*, 2022).

Diante disso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o uso de um meio de cultura alternativo obtido a partir de subprodutos agroindustriais amazônicos como fonte de crescimento para a microalga *Spirulina platensis*.

Material e métodos

Preparação do pre-inóculo das microalgas

A cepa da *Spirulina platensis* foi obtida através de doação do Instituto Senai Cimatec de Salvador - Bahia. O pré-inóculo foi feito utilizando o meio padrão descrito na literatura, foi usado o meio Zarrouk (tabela 2 e 3). O meio foi preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min, a microalga foi inoculada no meio e as condições de cultivo foram com temperatura controlada e fotoperíodo de 16/8h claro/escuro por um período de 15 dias.

Figura 7 – Cepa da microalga *Spirulina platensis* (a), e pré-inóculo (b).

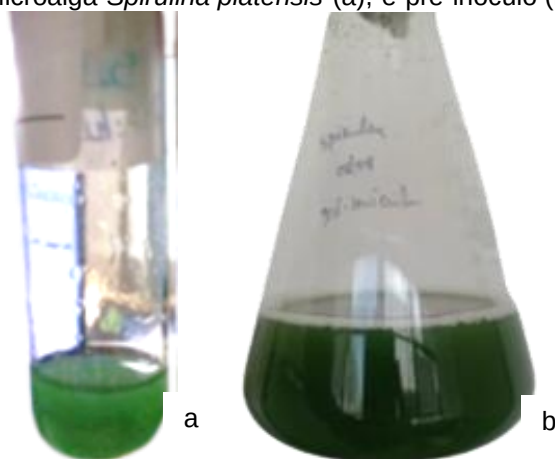


Tabela 2 - Composição do meio de cultura Zarrouk.

Composição	Quantidade (g/L)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,5
NaNO ₃	2,5
K ₂ SO ₄	1,0
NaCl	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,04
EDTA	0,08
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Solução A5*	1 ml
Solução PIV*	6ml

*Micronutrientes e metais traços

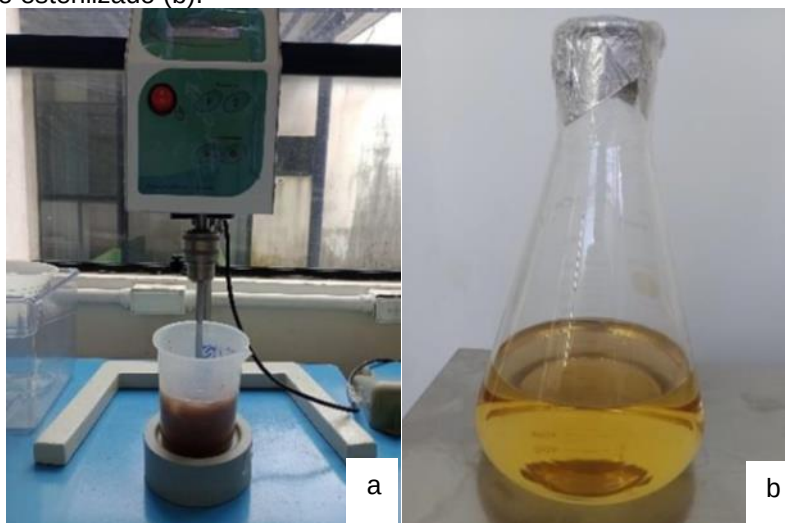
Tabela 3 - Composição dos micronutrientes e metais traços.

*Composição Solução A5	Quantidade (g/L)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0494
*Composição Solução PIV	Quantidade (g/L)
Na ₂ EDTA	0,75
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,097
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,041
ZnCl ₂	0,005
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,004

Obtenção do extrato do subproduto agroindustrial

O subproduto agroindustrial (casca e coroa) foi obtido a partir do processamento da polpa do abacaxi da empresa Amazônia Polpas localizada no bairro Colônia Oliveira Machado em Manaus – Amazonas. Primeiramente foi realizado o processo de sanitização no subproduto utilizando hipoclorito de sódio (200 ppm), a fim de eliminar todo contaminante presente, e posteriormente foi colocado para a secagem em estufa com circulação de ar a 60° C por 48 horas. Após esse processo o subproduto foi reduzido em partículas menores utilizando moinho de facas para melhor extração. Obtido então as partículas menores do subproduto agroindustrial, foi realizado um tratamento utilizando um agitador mecânico de hélice por 10 minutos (Figura 8a), o material foi filtrado para separação e autoclavado a 121°C por 20 minutos (Figura 8b).

Figura 8 - Obtenção do extrato do subproduto agroindustrial utilizando maceração mecânica (a) e extrato filtrado e esterilizado (b).



Cultivo da *Spirulina platensis* utilizando o meio sintético e o meio alternativo (subproduto agroindustrial).

Foi preparado 500 ml do meio sintético (Zarrouk), autoclavado a 121°C a 1 atm por 15 minutos. Após isso 50 ml de amostra da microalga *Spirulina platensis* foi retirado do pré-inóculo e inoculada no erlenmeyer contendo os 500 ml do meio sintético. As condições de cultivo foram em ambiente com temperatura controlada e fotoperíodo de 16/8h claro/escuro por um período de 12 dias. Para o ensaio com o subproduto oriundo do processamento de uma fruta amazônica, 50 ml da

microalga foram retiradas do pré-inóculo e inoculadas em 500 ml do meio de cultivo alternativo. As condições de cultivo foram às mesmas, em ambiente com temperatura controlada e fotoperíodo de 16/8h claro/escuro por um período de 12 dias. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

Tabela 4 – Composição do meio alternativo.

Composição		Quantidade (g/L)
Extrato do Subproduto agroindustrial	K Ca Si S Fe	10
NaHCO ₃		8,4
K ₂ HPO ₄		0,5
NaNO ₃		2,5
K ₂ SO ₄		1,0
NaCl		1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,2
CaCl ₂		0,04
EDTA		0,08
FeSO ₄ .7H ₂ O		0,01
Solução A5*		1ml
Solução PIV**		1ml

*Micronutrientes.

**Metais traços

Figura 9 – *Spirulina platensis* sendo cultivadas no meio sintético e no meio alternativo.



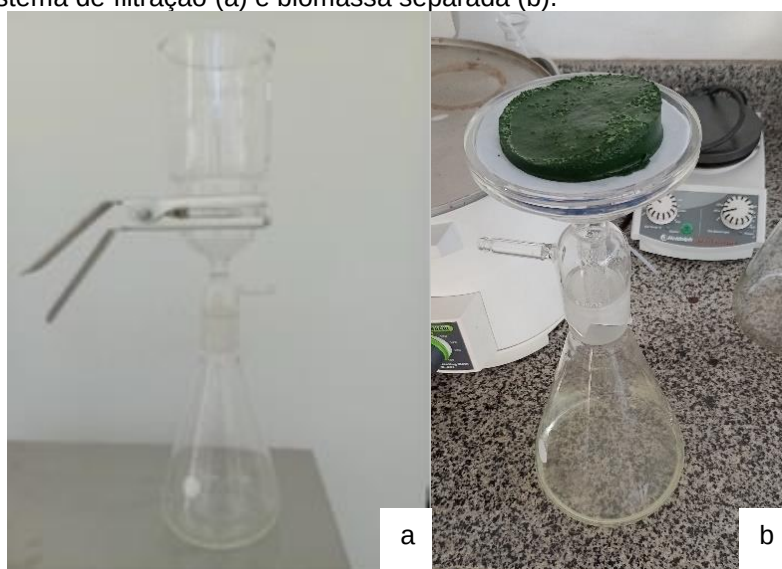
Determinação do crescimento celular da *Spirulina platensis*

Para a determinação celular da *Spirulina platensis*, a leitura foi realizada em dias alternados em um período de 12 dias. Foi retirada uma alíquota para a leitura em espectrofotômetro digital (UV-Visível faixa 190-1100 nm) da marca Global Trade Technology com absorvância de 670 nm (PEREIRA, 2017); (ROCHA SIMÕES *et al.*, 2019).

Separação da biomassa, liofilização e armazenamento

A separação da biomassa foi realizada através do processo de filtração (figura 10) utilizando uma bomba de vácuo, papel filtro com porosidade de 0,22 μm em conjunto de filtração da marca milipore.

Figura 10 – Sistema de filtração (a) e biomassa separada (b).



A biomassa da microalga foi congelada para posterior processo de liofilização no liofilizador (LH 0500 – Terroni), por um período de 48 horas. O processo de liofilização tem o objetivo de retirar toda a água presente sem passar pelo estado líquido. As biomassas liofilizadas foram armazenadas em foscos graduados para as análises.

Figura 11 – Processo de liofilização (a) e armazenamento da biomassa liofilizada para análises (b).



Composição proximal da biomassa

Determinação de umidade

Foi pesado 5g da biomassa da microalga e em capsulas previamente seca e taradas. As capsulas antecipadamente foram submetidas à estufa a 105°C por cerca de 3h, foram retiradas com auxílio de uma pinça, acondicionadas num dessecador hermeticamente fechado por cerca de 30 minutos, em seguida as capsulas foram pesadas, foi anotado o peso e tarado para a pesagem das amostras. Após isso as capsulas com as amostras foram levadas à estufa a 60°C $\pm$ 5°C, até peso constante ou aproximadamente 6h, após esse período retirar as capsulas com o auxílio de uma pinça e acondicionar em dessecador por 30 minutos e realizar a pesagem. Retornar o material por mais 2h na estufa e pesar novamente, se não houver diferença, considera-se o peso constante. Após esse procedimento realizar o cálculo de umidade (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Determinação de proteínas

A extração da amostra foi realizada seguindo a Metodologia de Kjeldahl, foi pesado 100mg da amostra (anotado o peso). A amostra foi embrulhada em um pedaço de papel manteiga e colocada dentro do tubo para o processo de digestão onde foram adicionados 600 mg de Sulfato de potássio, 300 mg de Sulfato de cobre e 5 ml de ácido sulfúrico. O tubo foi levado para o bloco digestor, suspendendo a temperatura de 50 em 50°C, até a temperatura de 400°C, até que a amostra se torne incolor. Após o processo de digestão os tubos com as amostras foram levados para o processo de destilação, onde utilizou-se 10 ml de ácido bórico + indicadores. Durante o processo de destilação foi adicionado 15 ml

de Hidróxido de sódio e 10 ml de água destilada. Durante o processo a caldeira do equipamento permaneceu ligada onde houve a conversão da amônia para o erlenmeyer contendo o ácido bórico + indicadores. Foi coletado aproximadamente cerca de 75 ml. O coletado foi levado para a titulação com ácido clorídrico até a viragem de cor (verde par vermelho). Foi realizado o cálculo de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{VG \times Fe \times N(HCl) \times 14 \times 100 \times 6,25}{\text{amostra (mg)}}$$

Determinação de lipídios por soxhlet

A determinação de lipídeos ocorreu por extração com solvente orgânico (éter de petróleo) com o auxílio de um aparelho extrator do tipo Soxhlet, segundo método da AOAC (2023), realizado em triplicata para cada amostra. Em resumo, foi pesado 3g da microalga em cartucho de Soxhlet e adicionado éter de petróleo até quantidade suficiente para um soxhlet e meio, mantido em aquecimento por 8h. Posteriormente a esse tempo, os cartuchos foram retirados, o éter foi destilado e os reboilers foram colocados em estufa a 105°C até peso constante, para posterior pesagem.

Determinação de fibra bruta

Foram pesados 0,5g da amostra e adicionado à solução de ácido sulfúrico 1,25% e colocado no equipamento de analisador de fibra da Marca Tecnal por 30 minutos a temperatura de 100 °C, após esse processo foi realizado a lavagem da amostra com água destilada fervente para a retirada da solução ácida, foram feitas 5 lavagens sucessivamente. Logo após foi adicionado à solução de hidróxido 1,25% por 30 minutos a uma temperatura de 100 °C no equipamento. Foram feitas 5 lavagens com água destilada fervente para a retirada da solução de hidróxido de sódio da amostra. A amostra foi então retirada do equipamento e colocada em um bequer vazio e adicionado álcool etílico absoluto em quantidades suficiente para cobrir a amostra, foi lavada por 5 minutos e então desprezado o álcool do bequer. Em seguida a amostra foi lavada com acetona, por 5 minutos e desprezado a acetona do bequer. A amostra então foi levada para estufa ventilada a 60 °C por 24 horas. Após esse período a amostra foi transferida para estufa a 105 °C por 2 horas e colocada no dessecador para esfriar, por aproximadamente 40 minutos.

Foi realizada a pesagem em balança analítica para registro do peso da amostra (FERNANDES, 2022).

Determinação do teor de cinzas

Os cadinhos foram colocados na estufa para a secagem 105°C por 12 horas. Após o período de 12 horas os cadinhos foram colocados no dissecador por 20 minutos e pesados em balança analítica. Foram pesados 3g da microalga *Spirulina*, os cadinhos com as amostras foram levados para a mufla a 600°C por 4 horas, após esse período a mufla foi desligada e os cadinhos foram retirados no dia seguinte e pesados novamente em balança analítica (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Determinação de carboidratos

Será calculada a fração de carboidratos pela diferença segundo a equação: %F.G. = 100 – (%umidade + %lipídios + %proteína bruta + %fração cinza + %fibras), considerando a matéria integral (ADOLFO LUTZ, 2012).

Caracterização físico-química da biomassa

Determinação de acidez

Foi pesado 5 g da amostra, transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 ml com o auxílio de 50 ml de água. Foi adicionado de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M, até coloração rósea (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Cálculo:

$$\frac{V \times f \times 100}{P \times c} = \text{acidez em solução molar por cento } v/m$$

Determinação do pH

Foi pesado 5 g da amostra em um béquer e diluído com auxílio de um bastão de vidro em 100 mL de água. Agitou o frasco com o conteúdo até que as partículas fiquem uniformemente suspensas. Após isso foi determinado o pH, com o aparelho previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

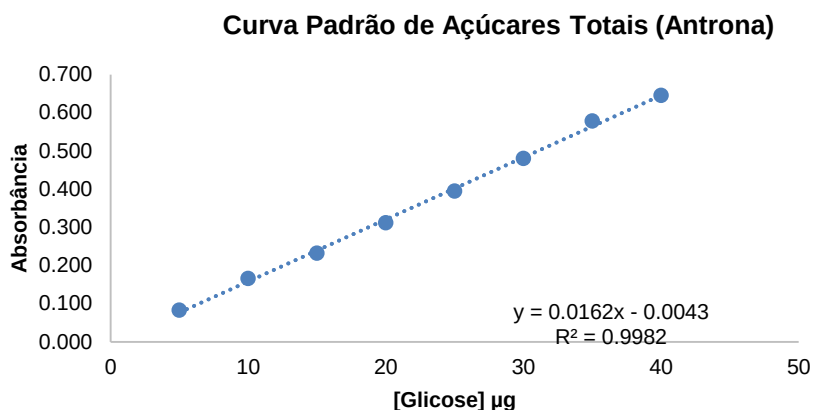
Determinação de sólidos solúveis por refratometria

A determinação dos sólidos solúveis totais foi feita usando um refratômetro digital da marca Hanna HI96800 com compensação de temperatura automática a 25°C e expressos em grau Brixº segundo a (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023). Previamente o equipamento foi devidamente higienizado e ajustado para leitura do zero. Foi retirado 1 a 2 gotas da solução homogeneizada da mistura e colocadas no refratômetro, três leituras foram feitas, sempre limpando a lente a cada leitura.

Determinação dos açúcares totais

A determinação dos açúcares solúveis totais foi determinada pelo método de Antrona. Foi pesado 2g da biomassa das microalgas e adicionado 20 mL de álcool etílico 95%. Depois as amostras foram levadas para chapa elétrica e foi fervido por 30 minutos. Após a fervura as amostras ficaram em repouso por 12 horas e em seguida foram filtradas e foram adicionados mais 20 mL de álcool etílico 95%. As amostras foram levadas novamente para a chapa elétrica para a evaporação completa do álcool, atingindo aproximadamente 5 mL. Em seguida completou-se o volume para 50 mL de água destilada (Extrato). Foi feito uma diluição pegando 0,5 mL do extrato para 200 mL de água destilada. Foi utilizado 1 mL para a determinação, os resultados foram expressos em porcentagem (g/100g de biomassa) (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

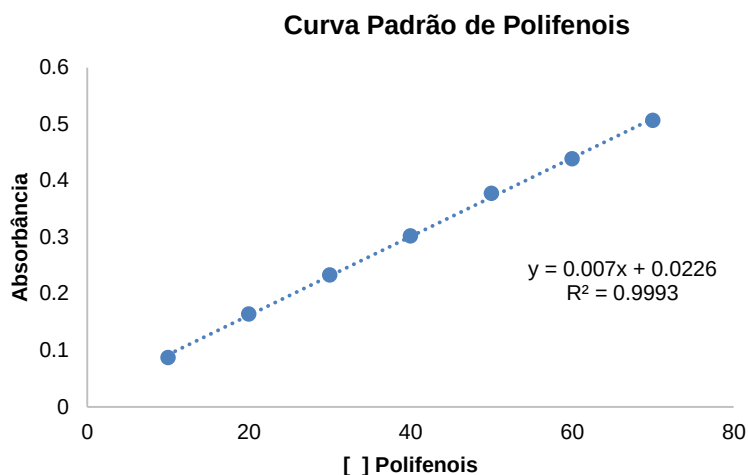
Figura 12 – Curva Padrão de Açúcares Solúveis Totais



Determinação dos polifenóis

Para a determinação de polifenóis foi pesado e um erlenmeyer de 150 mL, previamente tarado, 2g da biomassa da *Spirulina* foi adicionado em 50 mL de metanol 80%. Foi colocado em banho-maria até ferver e contou-se o tempo de 15 minutos, foi usadas varetas de vidro em rolha de borracha para refluxo, em seguida foi filtrado (papel filtro). O resíduo do papel foi transferido para o mesmo erlenmeyer (de uso inicial) e o filtrado foi reservado. Foram adicionados mais 50 mL de metanol 80%, fervido por 15 minutos e filtrado. Esta etapa foi repetida 3 vezes dando um volume de aproximadamente de 150 mL do reservado. Os erlenmeyer foram levados para chapa elétrica quente para evaporar o filtrado até ± 5 mL. Foi completado um volume de 25 mL de água destilada. Para a leitura no espectrofotômetro a 760 nm foi retirado do volume de 25 mL, 0,1 mL para a determinação dos polifenóis das amostras conforme a curva padrão, os resultados foram expressos em mg de ácido tânico/100g de biomassa (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Figura 13 – Curva Padrão de Determinação de Polifenóis.



Determinação do perfil de minerais por Espectrometria por fluorescência de raios X (FRX)

A determinação do perfil de minerais foi caracterizado por energia fluorescência Raio X dispersiva, do modelo Shimadzu EDX-720, utilizando um tubo de raios-X de ródio (Rh) com tensões de 15 keV (Na e Sc) e 50 keV (Ti e U) com corrente de tubo de 50 a 100 μ A, colimador de 3mm, tempo de integração real de 100s, tempo morto do detector de 40 e 39%, sob vácuo e detector de Si(Li) resfriado com nitrogênio líquido, os resultados foram expressos em porcentagem (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Determinação da termogravimetria (TGA)

As análises térmicas das amostras das biomassas de microalgas foram realizadas utilizando um equipamento de Análise Térmica Simultânea (TG/DSC), da marca PerkinElmer, modelo “STA 6000”. Para estas análises foram utilizadas amostras de aproximadamente 10 mg colocadas em cadinhos de alumina e submetidas a um programa de temperatura controlada sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 20 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As análises foram realizadas no intervalo de temperatura de 30 a 650 °C, para obtenção de cinzas, na determinação de umidade e atividade de água em algas e peixes por termogravimetria (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023).

Determinação dos ácidos graxos

Ácidos graxos em óleo foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos pelo método de saponificação e subsequente acidificação e então analisados usando um modelo Shimadzu de cromatografia gasosa (GC) para Mass Spectrometer Gas Chromatograph/GC-2010 PLUS equipado com um detector de ionização de chama. Os compostos foram separados em uma coluna de sílica fundida capilar RTxR-5 de 30 m com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de 0,25 µm. As condições operacionais foram as seguintes: temperatura programada da coluna, 80–220°C (5°C/min); temperatura do injetor, 230°C; temperatura do detector, 240°C; gás de arraste, hidrogênio; velocidade linear do gás, 40 cm/s; proporção de amostra, 1:50. Os ácidos graxos foram identificados comparando-se os tempos de retenção com os padrões e quantificados pela normalização das áreas dos picos. Os padrões de ácidos graxos usados (Sigma Supelco) foram ácido hexanóico (C6:0), ácido octanóico (C8:0), ácido decanóico (C10:0), ácido undecanóico (C11:0), ácido duodecanóico (C12:0), ácido tetradecanóico (C14:0), ácido cis-9-tetradecenóico (C14:1), ácido hexadecanóico (C16:0), ácido cis-9-hexadecenóico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), 8-heptadecanóico (C17:1), ácido octadecanóico (C18:0), ácido trans-9-octadecanóico (C18:1), ácido cis-9-octadecanóico (C18:1), ácido cis-9, ácido trans-11-octadecanóico (C18:2), cis-9, ácido cis-12-octadecadienóico (C18:2), ácido 9,12,15-octadecatrienóico (C18:3), ácido 6,9,12-octadecatrienóico (C18:3), ácido ácido eicosanóico (C20:0), ácido cis-9-eicosenóico (C20:1), ácido 8,11-eicosadienóico (C20:2), ácido 5,8,11-eicosatrienóico (C20:3), ácido docosanóico (C22:0), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5), ácido cis-13-docosenóico (C22:1), ácido tetracosanóico (C24:0), cis-15-tetracosenóico (C24:1) (SOUZA *et al.*, 2020).

Análise dos dados

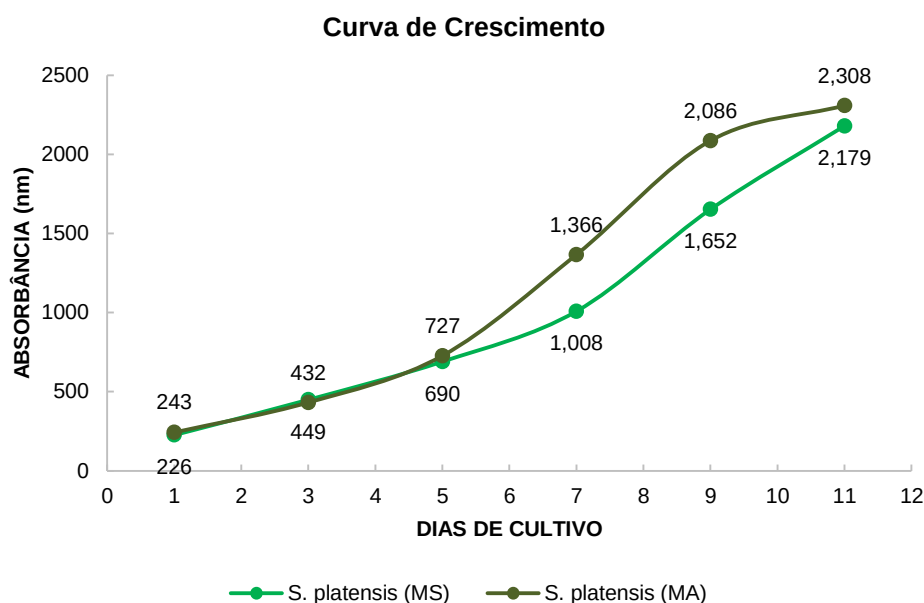
Após a obtenção dos resultados foi realizada a análise do teste t (student) dos dados obtidos, utilizando o Software BioEstat 5.0.

Resultados e discussões

Determinação do crescimento celular da *Spirulina platensis*

Abaixo segue resultado das microalgas cultivadas em meio comercial e meio alternativo por um período de 12 dias.

Figura 14 - Gráfico da curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético e no meio alternativo.



Isso sugere que a inserção do meio alternativo pode proporcionar melhores condições para o crescimento da *Spirulina platensis* em comparação com o meio sintético. Essas análises dos dados ajudam a entender a dinâmica de crescimento das duas amostras de *Spirulina platensis* em diferentes meios e que vem a ser útil para otimizar as condições de cultivo e aumentar a produção de biomassa no futuro.

O desenvolvimento de tecnologias para as otimizações ao longo de todo processo produtivo é fundamental para a produção de produtos energéticos a partir de biomassa algácea. Estas tecnologias devem proporcionar o maior aproveitamento energético e a menor geração de impactos ambientais. Dessa forma, reduções significativas nos custos do processo das etapas de *upstream* e *downstream* devem ocorrer para viabilizar a produção em escala competitiva. O processo de obtenção de biomassa algácea envolve o consumo de grandes volumes de meio de cultura. Quanto maior a complexidade, em termos de

constituintes energéticos, maior será o preço do investimento, o que contribuirá em um incremento no preço final do produto (TEIXEIRA *et al.*, 2015). De Medeiros *et al.*, (2020) tiveram como objetivo avaliar o cultivo de microalgas em um meio alternativo de baixo custo (biocomposto de frutas e hortaliças descartadas) com vistas a possíveis aplicações na indústria de alimentos. Como resultado obtiveram que o cultivo de microalgas no meio alternativo permitiu o crescimento celular adequado, e melhorou a atividade antioxidante e os teores de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados e resultou em aumento do teor de proteína e/ou fenólico total e melhorou os índices de saúde (menores níveis de índices de ácidos graxos saturados aterogênicos, trombogênicos e hipercolesterolêmicos, e maiores níveis de índice desejado de ácidos graxos) em comparação com o cultivo em meio sintético.

Embora existam vários métodos disponíveis para tratar esses subprodutos e descartá-los de forma segura, a sociedade atual de base tecnológica exige soluções eficazes para o manejo dos recursos residuais (VIDYA *et al.*, 2021).

Policastro *et al.*, 2022 tiveram como objetivo estudar e explorar oportunidades e desafios da simbiose industrial da digestão anaeróbia e cultivo de microalgas para melhorar o manejo de subprodutos agroindustriais. Testes foram realizados para comparar o uso de fontes de nitrogênio amoniacal e nítrico. Como resultado a maior concentração de biomassa de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ foi obtido usando CO_2 como fonte de carbono via descarga de ar como estratégia alimentar e nitrogênio amoniacal.

Resultados da composição proximal.

Tabela 5 – Composição proximal da biomassa da *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético (MS) e no meio alternativo (MA).

Macronutrientes (g/100g)	<i>Spirulina platensis</i> (MS)	<i>Spirulina platensis</i> (MA)
Umidade	18,87% $\pm$ 1,304	19,60% $\pm$ 0,813
Proteínas	4,95% $\pm$ 1,010	8,63% $\pm$ 0,202
Lipídeos	0,14% $\pm$ 0,075	0,30% $\pm$ 0,035
Fibra bruta	0,23% $\pm$ 0,006	0,23% $\pm$ 0,010
Cinzas	1,67% $\pm$ 0,231	1,55% $\pm$ 0,076
Carboidratos	74,37 $\pm$ 0,010	69,92% $\pm$ 0,020

Legenda: MS (Meio sintético); MA (Meio alternativo).

Ambas as amostras têm um teor de umidade relativamente baixo, com a amostra da biomassa cultivada no meio alternativo (MA) mostrando uma variabilidade maior. As cinzas representam os minerais presentes na amostra. Ambas as amostras têm teores semelhantes de cinzas. A amostra no meio alternativo tem um teor de lipídios significativamente maior em comparação com a amostra no meio sintético. A amostra da biomassa no meio alternativo possui um teor de proteínas mais elevado em comparação com a amostra no meio sintético. A maioria das *Spirulina* é composta por carboidratos, e ambas as amostras apresentam teores elevados, com a amostra no meio sintético tendo um teor ligeiramente mais alto e ambas as amostras têm quantidades semelhantes de fibras.

Esses dados nos forneceram uma visão detalhada dos macronutrientes presentes na *Spirulina platensis*, mostrando algumas diferenças entre as amostras da biomassa cultivada no meio sintético (MS) e no meio alternativo (MA), especialmente em termos de lipídios, proteínas e umidade.

Resultados das Análises físico-químicas.

Tabela 6 – Determinação do pH, acidez titulável e sólidos solúveis, polifenóis e açúcares totais da biomassa.

Parâmetros	<i>Spirulina platensis</i> (MS)	<i>Spirulina platensis</i> (MA)
pH	7,24 ± 0.020	7,5 ± 0.020
Acidez titulável	0,06375 ± 0.001	0,06375 ± 0.001
Sólidos solúveis (BRIX°)	1 ± 0.002	1 ± 0.002
Polifenóis (mg/100g)	154,66 ± 4.332	148.03 ± 2.483
Açúcares totais (%)	1.02 ± 0.113	0.74 ± 0.052

Ambas as amostras têm valores de pH próximos à neutralidade, com a amostra cultivada no meio alternativo sendo ligeiramente mais alcalina que a amostra cultivada no meio sintético. Ambas as amostras têm a mesma acidez titulável, o que indica uma baixa acidez. As duas amostras têm os mesmos sólidos solúveis, o que sugere uma baixa concentração de compostos solúveis na solução. As amostras apresentam níveis semelhantes de polifenóis, com a amostra do meio sintético mostrando uma média ligeiramente mais alta. A amostra

do meio sintético tem um teor ligeiramente mais alto de açúcares totais em comparação com a amostra do meio alternativo.

Pan-utai *et al.*, 2020, analisaram tanto a biomassa da *Spirulina* seca em estufa quanto a fresca suplementada em iogurte em diferentes concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5% (p/v) e 1, 5 e 10% (v/v) e durante o armazenamento, o pH, a acidez titulável e a cor do iogurte apresentaram variações insignificantes. Os resultados indicaram que a *Spirulina* aumentou a composição nutricional e as propriedades funcionais do iogurte como ingrediente alimentar natural. Já Almeida *et al.*, 2021 tiveram como objetivo desenvolver um molho funcional pronto enriquecido com *Spirulina sp.* e avaliar suas propriedades físico-químicas. A formulação controle apresentou menor pH e maior acidez. No geral, as quatro formulações diferiram significativamente em ambos os parâmetros e as diferenças aumentaram com o teor de *Spirulina sp.* incorporada ao molho. A suplementação com *Spirulina sp.* aumentou o pH dos molhos e diminuiu a acidez do produto. Essas diferenças foram atribuídas ao pH da biomassa, que é neutro ou levemente básico, variando de 7,0 a 8,0.

Verma *et al.*, 2020 tiveram como objetivo traçar o perfil dos açúcares e polifenóis em 37 variedades de *Spirulina* comumente disponíveis no mercado. As análises revelaram a presença de açúcares e polifenóis. Entre os açúcares, os níveis de hexose foram os mais elevados (73,85%). Os comprimidos naturais exibiram os níveis mais elevados de polifenóis (24 mg/g).

Esses dados são importantes para entender as características físico-químicas das amostras da microalga *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético e alternativo, fornecendo informações sobre o equilíbrio ácido-base, a presença de sólidos solúveis e a acidez da solução. E para entender o conteúdo de compostos bioativos na biomassa da microalga *Spirulina platensis*, como polifenóis, que têm propriedades antioxidantes, e açúcares totais, que fornecem informações sobre a composição nutricional das amostras.

Determinação do perfil de minerais por FRX

A composição mineral dos subprodutos agroindustriais pode variar amplamente, o que pode afetar o desempenho das microalgas durante o cultivo. Portanto, de acordo com a tabela 9 foi realizado o perfil de minerais do subproduto

do processamento do Abacaxi para se obter uma análise detalhada do perfil mineral para otimizar as condições de cultivo da microalga *Spirulina platensis* e maximizar a produção de biomassa.

Além disso, é importante considerar os possíveis efeitos colaterais da presença de certos minerais nos subprodutos agroindustriais, como o acúmulo de metais pesados, que podem ser tóxicos para as microalgas e afetar negativamente o processo de cultivo. Portanto, é essencial monitorar a qualidade dos subprodutos agroindustriais e implementar estratégias de remediação, se necessário, para garantir o sucesso do cultivo de microalgas.

Tabela 7 – Perfil de minerais presentes na biomassa da microalga *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético (MS) e meio alternativo (MA).

Componentes	<i>Spirulina platensis</i> (MS)	<i>Spirulina platensis</i> (MA)
K	55,54%	57,06%
Ca	9,17%	4,22%
Fe	9,24%	11,31%
P	13,19%	12,74%
S	12,11%	13,22%
Mn	0,29%	0,85%
Cu	0,18%	0,23%
Zn	0,13%	0,33%

Potássio (K), a amostra cultivada no meio alternativo possui um teor ligeiramente maior de potássio em comparação com a amostra cultivada no meio sintético, com 57,06% contra 55,54%. Cálcio (Ca), a amostra no meio sintético tem uma quantidade significativamente maior de cálcio em comparação com a amostra no meio alternativo, com 9,17% contra 4,22%. Ferro (Fe), a amostra no meio alternativo contém uma quantidade ligeiramente maior de ferro em comparação com a amostra meio sintético, com 11,31% contra 9,24%. Fósforo (P), a amostra no meio sintético tem um teor ligeiramente maior de fósforo em comparação com a amostra meio alternativo, com 13,19% contra 12,74%. Enxofre (S), a amostra no meio alternativo possui um teor ligeiramente maior de enxofre em comparação com a amostra no meio sintético, com 13,22% contra 12,11%. Manganês (Mn), a amostra no meio alternativo possui uma quantidade significativamente maior de

manganês em comparação com a amostra no meio sintético, com 0,85% contra 0,29%. Cobre (Cu), ambas as amostras têm teores de cobre relativamente baixos, com a amostra no meio alternativo ligeiramente mais alto em comparação com a amostra do meio sintético, com 0,23% contra 0,18%. Zinco (Zn), a amostra no meio alternativo tem um teor maior de zinco em comparação com a amostra no meio sintético, com 0,33% contra 0,13%.

Estes dados sugerem que as amostras podem diferir em termos de composição mineral, com algumas variações notáveis entre os elementos analisados. Essas diferenças podem ter implicações importantes para aplicações específicas, como suplementos alimentares ou alimentos funcionais. A composição mineral das microalgas pode ser altamente variável, mesmo quando a biomassa de diferentes cepas pertencentes à mesma espécie é aplicada a diferentes produtos (KRATZER; MURKOVIC, 2021).

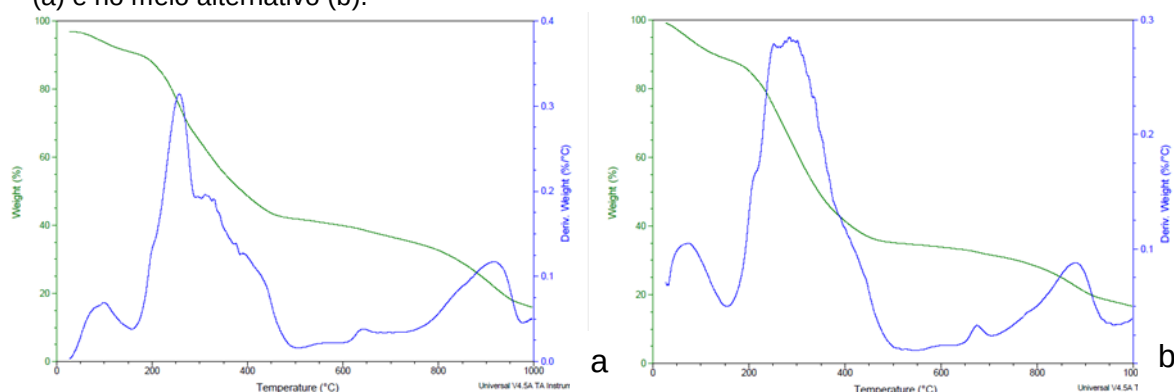
O potássio desempenha um papel fundamental na regulação do equilíbrio de fluidos no corpo, na transmissão nervosa e na contração muscular. Ele também está envolvido na função cardíaca, na regulação da pressão arterial e na manutenção do pH celular. Uma deficiência de potássio pode levar a problemas como fraqueza muscular, fadiga, câibras e até mesmo arritmias cardíacas (XIAO *et al.*, 2024). O cálcio é conhecido principalmente por seu papel na formação e manutenção de ossos e dentes fortes. Além disso, o cálcio é essencial para a contração muscular, a transmissão nervosa, a coagulação sanguínea e a função celular. Níveis adequados de cálcio são essenciais para prevenir a osteoporose e outras condições ósseas, bem como para manter a saúde geral do organismo (JAKŠE *et al.*, 2024). O ferro é crucial para a produção de hemoglobina, a proteína que transporta oxigênio pelo sangue para os tecidos do corpo. Ele desempenha um papel vital no metabolismo energético, na função cognitiva e no sistema imunológico. A deficiência de ferro pode levar a anemia, caracterizada por fadiga, fraqueza, palidez e dificuldade de concentração (BJØRKLUND *et al.*, 2023). Embora muitas vezes não seja mencionado como um nutriente essencial, o enxofre é crucial para várias funções metabólicas. Ele é uma componente chave de aminoácidos como a cisteína e a metionina, que são blocos de construção das proteínas. Além disso, o enxofre desempenha um papel importante na desintoxicação do corpo, na regulação do metabolismo lipídico e na saúde da

pele, cabelo e unhas (SUN *et al.*, 2023).

Segundo Gentsheva *et al.*, (2023), o pó de *Spirulina platensis* possui uma rica composição mineral, sendo o maior teor total de potássio ($1400 \text{ mg.100 g}^{-1}$), sódio ($900 \text{ mg.100 g}^{-1}$), fósforo ($800 \text{ mg.100 g}^{-1}$), cálcio ($700 \text{ mg.100 g}^{-1}$), magnésio ($400 \text{ mg.100 g}^{-1}$) e ferro ($100 \text{ mg.100 g}^{-1}$). Rahim *et al.*, (2021) revelaram que *S. platensis* contém grandes quantidades de minerais particularmente K ($17,00\% \pm 10,5$), P ($9,70\% \pm 9,25$), Ca ($2,70\% \pm 4,33$), Mg ($3,20\% \pm 2,89$) e Fe ($5,39\% \pm 1,45$).

Avaliação termogravimétrica da biomassa da *spirulina platensis* (TGA)

Figura 15 - Análise termogravimétrica da biomassa *Spirulina platensis* produzida no meio sintético (a) e no meio alternativo (b).



De acordo com os gráficos, houve a evaporação da umidade livre até 100°C . A partir daí percebeu-se uma segunda região, até aproximadamente a temperatura de 220°C , onde houve uma perda pequena de massa, nesta área iniciou-se a quebra de lipídios e proteínas. A partir da temperatura de 220°C , evidenciou-se uma queda maior da massa. Nesta região, entre as temperaturas de 220°C e 420°C mostrou que houve a degradação de carboidratos e lipídios. Na terceira faixa de temperatura entre 420°C e 550°C , ocorreu a terceira região, que é a degradação final dos ácidos graxos. Após a temperatura de 550°C , nota-se um evento de decomposição resultante da degradação de metais voláteis e carbonatos.

Segundo (TREVISAN; BRANCO; ARROYO, 2019) a utilização de avaliações termogravimétricas da biomassa de microalgas representa de maneira geral as principais características da perda de massa. Com fases distintas, que inicia em temperatura ambiente e vai até 160°C resultando na remoção da água absorvida

fisicamente nas células. Enquanto que de 160 a 440°C tem sido apontado à ocorrência da pirólise ativa, e de 440 a 650°C a pirólise passiva. Sukarni, (2020) investigou no seu trabalho o comportamento da *Spirulina platensis* com o subproduto sintético, tanto como materiais individuais quanto como blenda durante o processo de combustão em condições não isotérmicas, utilizando análise termogravimétrica (TG). Os parâmetros de temperatura que descrevem a decomposição do material em função da temperatura foram determinados a partir das curvas TG e termogravimétrica diferencial (DTG). Como resultado obteve que a adição das microalgas aos resíduos sintéticos levou a um aumento das energias de ativação aparente na Zona I na segunda etapa, enquanto uma proporção crescente das microalgas nas misturas resultou na diminuição das energias de ativação aparente na Zona II na segunda etapa.

Determinação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos obtidos a partir de microalgas são aplicados como alternativas alimentares sintéticas sustentáveis ao óleo de peixe e possuem potencial no tratamento, prevenção e manejo de algumas anomalias fisiológicas, algumas das vantagens dos ácidos graxos das microalgas sobre as do óleo de peixe estão principalmente relacionadas à produção renovável e econômica (JAIN *et al.*, 2022). A tabela 10 apresenta os resultados encontrados para ácidos graxos na microalga *Spirulina platensis* cultivadas em meio sintético e alternativo.

Tabela 8 - Ácidos graxos identificados na biomassa cultivada em meio sintético e no meio alternativo.

Simbologia	<i>Spirulina platensis</i> (MS)%	<i>Spirulina platensis</i> (MA)%	Nomenclatura
C11:0	4,06 ± 0,38	2,03±0,01	Ácido Undecanóico
C13:0	1,74 ± 0,18	1,90±0,21	Ácido Tridecanóico
C16:0	40,40 ± 0,96	44,50±0,92	Ácido Palmítico
C16:1n7	2,75 ± 0,11	2,84±0,03	Ácido Omega-7
C17:1n5	1,52 ± 0,09	1,16±0,08	Ácido cis- heptadecanóico
C18:0	2,63 ± 0,46	2,81±0,37	Ácido Estárico
C18:1n9c	4,56 ± 0,34	7,50±1,03	Ácido Omega-9- oleico

C18:2n6t	0,32 ± 0,01	0,58±0,03	Ácido Omega-6-linoleico
C18:2n6c	15,31 ± 0,02	14,92±0,66	Ácido Linoleico
C18:3n6	26,74 ± 0,69	21,78±0,98	Ácido Omega-3-linolênico

Ácido Undecanóico (C11:0) e Ácido Tridecanóico (C13:0), ambos são ácidos graxos saturados de cadeia curta. A amostra cultivada em meio sintético (MS) mostra uma concentração mais alta de Ácido Undecanóico, enquanto a concentração de Ácido Tridecanóico é ligeiramente maior na amostra cultivada em meio alternativo (MA). O Ácido Palmítico (C16:0), é um ácido graxo saturado de cadeia longa. A concentração é ligeiramente mais elevada na amostra cultivada em meio alternativo (MA). O Ácido Omega-7 (C16:1n7) e o Ácido cis-heptadecanóico (C17:1n5), são ácidos graxos monoinsaturados. As concentrações são semelhantes em ambas as amostras. O Ácido Estárico (C18:0), é um ácido graxo saturado de cadeia longa. As concentrações são semelhantes em ambas as amostras. Ácido Omega-9-oleico (C18:1n9c), é um ácido graxo monoinsaturado. A amostra cultivada em meio alternativo (MA) mostra uma concentração mais alta. Ácido Omega-6-linoleico (C18:2n6t) e Ácido Linoleico (C18:2n6c), ambos são ácidos graxos poli-insaturados. A concentração de Ácido Linoleico é mais alta em ambas as amostras, com uma concentração maior na amostra cultivada em meio sintético (MS). O Ácido Omega-3-linolênico (C18:3n6), é um ácido graxo poli-insaturado. Embora seja o mais predominante em ambas as amostras, a concentração é ligeiramente mais alta na amostra cultivada em meio sintético (MS).

Esses ácidos graxos têm diferentes papéis biológicos e podem ter efeitos variados na saúde. A variação na composição de ácidos graxos entre as duas amostras pode ser atribuída a diferenças nos meios de cultivo, com potenciais implicações na qualidade nutricional da *Spirulina platensis* produzida em diferentes ambientes. O Ácido graxo saturado palmítico identificado na microalga apresenta ser um ácido graxo importante devido à sua abundância e propriedades físico-químicas, o ácido palmítico tem uma ampla gama de aplicações industriais (NIKOLOVA *et al.*, 2024). O ácido palmítico é um ácido graxo saturado encontrado

em diversos alimentos e amplamente presente na dieta humana, é comumente utilizado na indústria de panificação e na produção de alimentos processados. Sua versatilidade e propriedades físicas fazem dele um ingrediente valioso em uma variedade de produtos alimentícios (FERREIRA *et al.*, 2024). É usado na fabricação de produtos cosméticos, como cremes e loções, devido às suas propriedades emolientes. Também é utilizado na produção de sabões, detergentes e produtos de limpeza, devido à sua capacidade de formar sabões sólidos e estáveis (ÖZYURT *et al.*, 2023).

Já os ácidos graxos insaturados como o oleico, linoleico e o linolênico desempenham papéis importantes na saúde humana, com aplicações que vão desde a alimentação até a indústria cosmética. O ácido oleico por exemplo, reduz o colesterol ruim (LDL) e aumenta o colesterol bom (HDL), prevenindo assim doenças cardíacas, o ácido linoleico ele é essencial para a saúde da pele, função cerebral e regulação do sistema imunológico e e por fim o ácido linolênico, que é essencial para a saúde do coração, função cerebral, desenvolvimento fetal e saúde ocular, ambos possuem aplicações na indústria cosmética atuando como emoliente e hidratantes, farmacêutica por possuírem atividades anti-inflamatórias e alimentícia como suplemento alimentar (ZAHRAN *et al.*, 2023).

Telles, (2021) apresentou o perfil de ácidos graxos presentes na biomassa de *Spirulina*, onde destacou uma razão entre ácidos insaturados e saturados de 0,7. Esta razão elevada garante relevância nutricional à biomassa bem como a presença de ácidos como ácido gama-linolênico (GLA) e o alto percentual de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), que os peixes não são capazes de sintetizar e que precisam ser fornecidos na dieta. Com base nas evidências científicas disponíveis, várias organizações (por exemplo, a Organização Mundial da Saúde, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos ou a American Heart Association) promovem a ingestão regular de ômega-3, com doses recomendadas de até 250 – 500 mg /dia e a proporção ideal de ômega-6 para humanos ainda não foi totalmente compreendida, mas sugere-se que varie entre 2,5-5 mg/dia (CARR; GLENCROSS; SANTIGOSA, 2023).

Conclusão

Com base nos dados fornecidos, podemos concluir que a inserção do subproduto agroindustrial como meio alternativo de crescimento proporcionou melhores condições para o crescimento celular da *Spirulina platensis* em comparação com o meio sintético. A análise dos dados durante a pesquisa contribuiu para a compreensão da dinâmica de crescimento da microalga nos diferentes meios, o que é crucial para otimizar as condições de cultivo e aumentar a produção de biomassa no futuro. A biomassa cultivada no meio alternativo apresentou um valor superior de proteínas 8,63% quando comparada a biomassa cultivada com o meio sintético, isso é importante, pois pode ser utilizado para quem busca uma suplementação a base de proteínas e utilizado como um insumo ou ingredientes proteíco em diversas preparações. Quanto aos minerais foram observados valores similares, em relação aos teores de potássio, cálcio, ferro, enxofre. Os resultados dos ácidos graxos foram resultados importantes obtidos, pois com a inserção do subproduto a biomassa mostrou valores superiores, o ácido palmítico, que é um ácido graxo saturado, por exemplo, foi encontrado em concentrações mais altas na biomassa cultivada no meio alternativo quando comparado à biomassa do meio sintético. Os valores dos ácidos insaturados como o oleico, linoleico e o linolênico, conhecido como os ômega 3, 6 e 9, os valores foram superiores ou similares quando comparado ao meio sintético. Esses ácidos graxos desempenham papéis importantes na saúde humana e têm diversas aplicações na indústria alimentícia e cosmética.

Portanto, os resultados sugerem que a inserção de subprodutos agroindustriais ao meio de cultivo pode influenciar significativamente a composição e o crescimento da *Spirulina platensis* como também de outras espécies de microalgas, e entender essas diferenças é fundamental para maximizar a produção e a qualidade da biomassa.

5.3 Artigo 3: DETERMINAÇÃO DO PONTO ÓTIMO DE COLHEITA DA MICROALGA *Spirulina platensis* CULTIVADA EM MEIO SINTÉTICO E ALTERNATIVO PARA EXTRAÇÃO DA FICOCIANINA

Daniel Nascimento Motta^{1,2}, Leticia de Alencar Pereira Rodrigues³, Vanessa Leal de Queiroz Hermino^{1,2}, Milena Botelho Pereira Soares³, Rosany Piccolotto Carvalho², Edson Pablo da Silva^{1,2}.

¹Centro de Biotecnologia da Amazônia, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM

³SENAI Institute of Innovation in Health Advanced Systems, University Center SENAI/CIMATEC, Brazil

RESUMO

A determinação do ponto ótimo de colheita da microalga *Spirulina platensis* utilizando subprodutos agroindustriais é um processo complexo que envolve diversas variáveis, geralmente envolve a avaliação de parâmetros como a densidade celular (densidade de biomassa), a produtividade de biomassa, o teor de compostos de interesse (como proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos e etc.). Com isso o objetivo do trabalho foi determinar o ponto ótimo de colheita para determinar a maior concentração de produção da ficocianina da microalga *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético e no meio alternativo, como parâmetros foram determinados ciclos de cultivo (T0 – 0 dias a T7 – 21 dias). Durante o término de cada ciclo de cultivo foi realizada a leitura em espectrofotômetro para saber a densidade celular, a biomassa foi então filtrada e realizada o processo de extração e a quantificação da ficocianina. Após a determinação do ponto ótimo foi feita a extração da ficocianina em diferentes solventes, em ambiente claro e escuro, para avaliar a atividade antioxidante e sua estabilidade. O resultado mostrou que no ciclo de cultivo T4 (12 dias) foi onde ocorreu a maior concentração de ficocianina em ambos os cultivos, o processo de extração usado foi eficiente e mostrou que a água destilada foi que obteve melhor atividade antioxidante, e as soluções tampões pH 6 e 7 apresentaram melhor estabilidade. Foi concluído que o subproduto pode ser usado para o crescimento da *Spirulina platensis* para a obtenção da ficocianina ou de outros compostos bioativos de interesse, podendo ser uma solução para aumentar a produção de biomassa em

grande escala.

Palavras chaves: Microalga; Subprodutos agroindustriais; Bioprocessos.

ABSTRACT

Determining the optimal harvesting point for *Spirulina platensis* microalgae using agro-industrial byproducts is a complex process that involves several variables, generally involving the evaluation of parameters such as cell density (biomass density), biomass productivity, the content of compounds of interest (such as proteins, lipids, carbohydrates, pigments, etc.). Therefore, the objective of the work was to determine the optimal harvesting point to determine the highest concentration of phycocyanin production from the microalga *Spirulina platensis* cultivated in the synthetic medium and in the alternative medium, as parameters were determined cultivation cycles (T0 – 0 days to T7 – 21 days). During the end of each cultivation cycle, a spectrophotometer reading was carried out to determine cell density, the biomass was then filtered and the extraction process and phycocyanin quantification were carried out. After determining the optimum point, phycocyanin was extracted in different solvents, in light and dark environments, to evaluate the antioxidant activity and its stability. The result showed that in the T4 cultivation cycle (12 days) was where the highest concentration of phycocyanin occurred in both cultures, the extraction process used was efficient and showed that the distilled water obtained the best antioxidant activity, and the buffer solutions pH 6 and 7 showed better stability. It was concluded that the byproduct can be used for the growth of *Spirulina platensis* to obtain phycocyanin or other bioactive compounds of interest, and could be a solution to increase biomass production on a large scale.

Keywords: Microalgae; Agro-industrial by-products; Bioprocesses.

Introdução

O desenvolvimento é marcado por uma crescente expansão celular onde compostos podem ser sintetizados e/ou catabolizados com o passar do ciclo de desenvolvimento. As microalgas durante esse processo de expansão celular, sintetizam uma variedade de compostos essenciais para o seu crescimento e sobrevivência. Isso inclui a síntese de proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos, que são fundamentais para as funções celulares básicas, como a

fotossíntese, a respiração e a reprodução (DIAO *et al.*, 2024).

A determinação do ponto ótimo de colheita é uma ferramenta extremamente importante no processo de obtenção de insumos e/ou bioativos de interesse a partir de fontes alternativas (DA SILVA; VILAS BOAS; XISTO, 2013), vale dizer que ao longo do ciclo de desenvolvimento pode ocorrer a síntese e/ou catálise de substâncias de interesse como pigmentos, proteínas, enzimas, minerais, entre outros, podendo ser o ponto ótimo de colheita, a chave do sucesso no aproveitamento máximo de compostos com funções bioativas. Diversos produtos biológicos de alto valor agregado são derivados da biomassa de microalgas, tais como polissacarídeos, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, compostos fenólicos, vitaminas, pigmentos, entre outros (NAZARI *et al.*, 2021). As microalgas do gênero *Spirulina* possuem um valor nutricional elevado, apresentando alto teor de proteínas de 60% a 70% com base no peso seco, vitaminas, minerais e outros nutrientes (ALFADHLY *et al.*, 2022b). Além disso, ela é abundante em compostos de alto valor agregado, especialmente ácidos graxos poli-insaturados e pigmentos, como a ficocianina. Estas características conferem-lhe um elevado valor como microalga, sendo amplamente utilizada em contextos comerciais e industriais (FERNANDES *et al.*, 2023). A colheita e a recuperação da biomassa de microalgas são elementos essenciais em qualquer processo biotecnológico baseado em microalgas. A fim de otimizar a colheita e recuperação da biomassa de microalgas utilizando meios alternativos, técnicas existentes são geralmente combinadas e implementadas como a determinação do tempo de cultivo da espécie a ser cultivada (ORTIZ *et al.*, 2022). Além disso as fontes alternativas de crescimento devem ter nutrientes em sua composição, como um fator essencial na cultura de microalgas. Os nutrientes básicos para o crescimento de microalgas são nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (RIFAI *et al.*, 2022).

A capacidade das microalgas de gerar biomassa em uma determinada área em um determinado período de tempo é chamada de produtividade (ALFADHLY *et al.*, 2022^a). Vários estudos têm procurado melhorar a biomassa da *Spirulina* e a produtividade da ficocianina com manejo de cultivo, como pré-colheita, cultivo alimentado com nitrato, distribuição de luz, comprimento de onda e configurações de fotobiorreatores (PBRs) (CHAIKLAHAN *et al.*, 2022). A produtividade da

ficocianina é calculada pela concentração de biomassa e pelo conteúdo correspondente de ficocianina, e determina o custo de produção da ficocianina com posterior processo de purificação (YU *et al.*, 2023).

Atualmente a ficocianina vem sendo usada como pigmento natural na indústria alimentícia para substituir aditivos químicos nocivos, sintéticos ou não recomendados pelo FDA, OMS entre outros. Além de ser utilizada como corante natural, a ficocianina possui excelentes propriedades antioxidantes e antiinflamatórias que permitem sua aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética (LIU; QIN; LI, 2022). Dentre o cultivo comercial das microalgas, a *Spirulina* é a principal fonte de matéria-prima para a produção industrial de ficocianina, sendo que o teor de ficocianina representa 47% de suas proteínas totais (THEVARAJAH *et al.*, 2022).

Devido à alta sensibilidade às proteínas e o baixo rendimento da produção, vem se aumentando barreiras técnicas que acabam levando o alto preço dessas proteínas, devido aos métodos que vem sendo utilizado (ZHUANG *et al.*, 2021). Os métodos mais comuns usados para extração da ficocianina em laboratórios ou em biorefinarias são a extração por solvente, processamento de alta pressão, campo elétrico pulsado, extração supercrítica de dióxido de carbono e congelamento-descongelamento (PEZ JAESCHKE *et al.*, 2021).

Ao longo dos anos, técnicas vêm sendo desenvolvidas para melhorar a estabilidade das proteínas e as suas propriedades funcionais (LI; ZHANG; ABBASPOURRAD, 2022). A ficocianina pura é extremamente instável devido à sua sensibilidade ao oxigênio, umidade, calor e luz, tornando sua aplicação limitada em diversos aspectos, como produtos alimentícios e/ou embalagens (MOREIRA *et al.*, 2019). Um âmbito mais amplo de aplicações industriais para a produção de ficocianina é restrito devido à sua falta de estabilidade e flexibilidade estrutural. Semelhante a muitas proteínas de origem natural, a ficocianina desnatura sob calor e condições extremas de pH (LI; ZHANG; ABBASPOURRAD, 2021).

Especificamente, a cor azul original da ficocianina muda para uma cor verde entre pH 2 e pH 4, enquanto em níveis de pH acima de 8 a cor torna-se púrpura. Essas alterações de cor induzidas pelo pH restringem o seu uso em sistemas alimentares que abrangem uma ampla faixa de pH, por exemplo, sucos de frutas

(pH 2 - 4), bebidas à base de leite (pH 6 - 7) e produtos de panificação (pH > 7) (COULTATE; BLACKBURN, 2018). A solução seria desenvolver um sistema para encapsulamento, proteção e controle da ficocianina (WANG *et al.*, 2022).

Diante disso, o objetivo do trabalho é determinar o ponto ótimo de colheita da microalga *Spirulina platensis* cultivada em meio sintético e alternativo avaliando sua produtividade e teor de concentração da ficocianina, avaliar também o processo de extração, sua estabilidade e atividade antioxidante.

Material e métodos

Experimentos com diferentes ciclos de cultivo da microalga *Spirulina platensis*.

Foram preparados 2,5L de meio sintético (Zarrouk) e de meio alternativo (Zarrouk modificado mais subproduto agroindustrial). Distribuídos 100 ml dos meios de cultivos nos erlenmeyers (em triplicata), e adicionado 10 ml do pré-inóculo da microalga *Spirulina platensis*. O experimento foi realizado em intervalos de tempo de cultivo: T0 (0 dias) – T1 (3 dias) – T2 (6 dias) – T3 (9 dias) – T4 (12 dias) – T5 (15 dias) – T6 (18 dias) – T7 (21 dias).

Figura 16 – Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em diferentes ciclos de cultivo.



Taxa de crescimento e produção de biomassa.

A taxa de crescimento foi determinada pelo aumento da densidade celular, que foi medida pela densidade óptica (DO) a 670 nm onde uma alíquota foi retirada e realizada a leitura em espectrofotômetro digital (UV-Visível faixa 190-

1100 nm) da marca Global Trade Technology (PEREIRA, 2017). Para a determinação do peso seco, as células foram separadas do meio utilizando filtros 0,22µm. A produtividade (Q_x , g/L/dia) foi medido pela seguinte equação:

$$Q_x = \frac{(X_t - X_0)}{(t_1 - t_0)}$$

onde X_t e X_0 são a concentração de biomassa seca (g/L) no tempo t_t e t_0 respectivamente (JARUNGKEERATIVIMOL *et al.*, 2023) (UMETANI; SPOSÓB; TIRON, 2024).

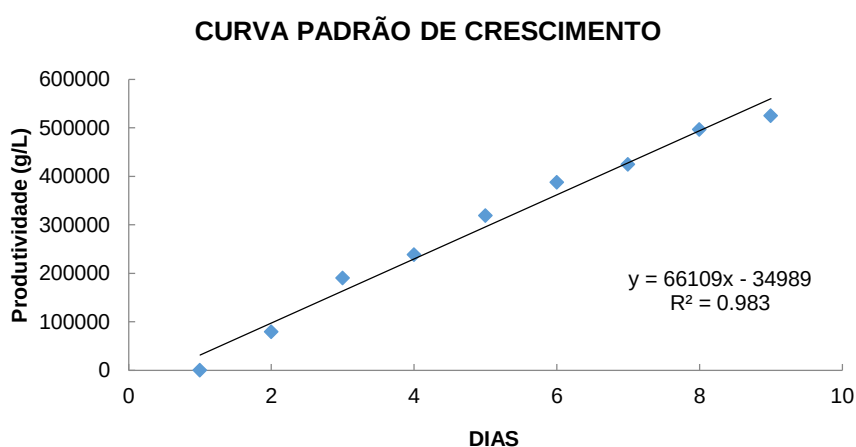


Figura 17 – Experimento da determinação da taxa de crescimento da biomassa e produção da ficocianina da *Spirulina platensis*.



Análises físico-químicas (pH, acidez e sólidos solúveis)

Para o preparo da amostra uma quantidade de 2 gramas foi macerada a frio e diluída em 30 ML de água destilada sobre agitação magnética, posteriormente, o eletrodo foi inserido e o valor foi anotado. Para a determinação de PH, a amostra foi mensurada usando um pHmetro digital de bancada (Modelo PHS-3E-BI-SATRA). O equipamento foi calibrado com soluções tampão comercial em PH 7.0

e 10 e posteriormente, o eletrodo foi inserido e o valor foi anotado. Já a titulação foi realizada com solução de NaOH 0.1M, 3 gotas de fenolftaleína foram adicionadas como indicador do ponto de virada. O volume de NaOH foi expresso em acidez em solução molar por cento v/m e o valor foi obtido pela seguinte equação:

$$AT = \frac{[V \times (f) \times 100]}{P \times c}$$

Onde, V é o volume de NaOH utilizado, m é a massa da amostra e f, é o fator de correção do NaOH, P é o número de grama da amostra utilizado, c é a correção para solução de NaOH 1 M, 10 para solução NaOH 0,1 M.

A determinação dos sólidos solúveis totais foi feita usando um refratômetro digital da marca Hanna HI96800 com compensação de temperatura automática a 25°C e expressos em %, segundo a (Off. Methods Anal. AOAC Int., 2023). Previamente o equipamento foi zerado com água destilada e limpo com algodão. Foi retirado 1 a 2 gotas da solução homogeneizada da mistura e colocadas no refratômetro, três leituras foram feitas, sempre limpando a lente a cada leitura.

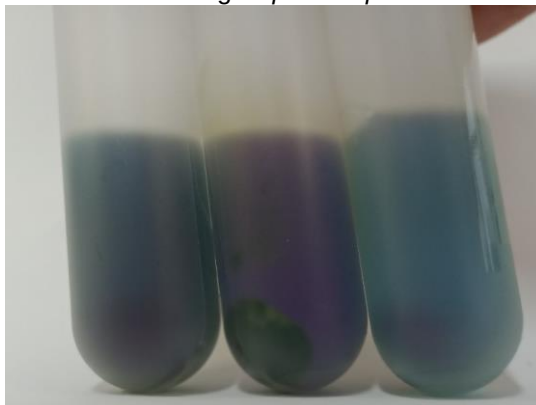
Extração e quantificação da ficocianina

Durante o termino de cada ciclo de cultivo da microalga *Spirulina platensis* no meio sintético (Zarrouk) e no meio alternativo (subproduto agroindustrial) e após a separação da biomassa foi realizado a extração da ficocianina. A extração de ficocianina foi realizada segundo metodologia adaptada (PRATES *et al.*, 2015) onde a biomassa seca foi macerada com 20 ml de água destilada (pH 7,0) e mantidas em banho ultrassônico por 30 minutos, para o rompimento das células e melhor extração da ficocianina, e deixado em repouso por 12 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm utilizando uma centrífuga (Himac Centrifuge Cr7) por 10 minutos e recolhido o sobrenadante. As alíquotas dos 3 sobrenadantes foram misturadas, e imediatamente analisadas. As amostras foram submetidas à espectrofotômetro digital (UV-Visível faixa 190-1100 nm) da marca Global Trade Technology, com comprimentos de onda de 615 nm e 652 nm. O resultado foi dado em mg/ML, de acordo com a Equação abaixo, de (SANDYBAYEVA *et al.*, 2022).

$$\text{Ficocianina} = \frac{A^{615} - 0,474 \times A^{652}}{5,34}$$

A concentração média de ficocianina na amostra (mg.ml^{-1}); $A_{615\text{nm}}$ é a absorbância da amostra a 615nm; e $A_{652\text{nm}}$ é a absorbância da amostra a 652 nm.

Figura 18 – Extração da ficocianina da microalga *Spirulina platensis*.



Extração da ficocianina com diferentes solventes.

Para a extração da ficocianina foram utilizados 4 tipos de solventes. Os solventes escolhidos são descritos em maior parte na literatura por apresentar resultados relevantes quando se trata de extração. Os solventes foram: solução tampão pH 6,0, solução tampão pH 7,0, água destilada pH 5,0 e ácido sulfúrico 1% pH 2,0 (tabela 14). Primeiramente foi pesado um grama da biomassa da microalga *Spirulina platensis* e posteriormente macerada juntamente com o solvente (figura 22).

Figura 19 – extração da ficocianina em diferentes tipos de solventes, pesagem da biomassa (a) e processo de maceração da biomassa com o solvente (b).

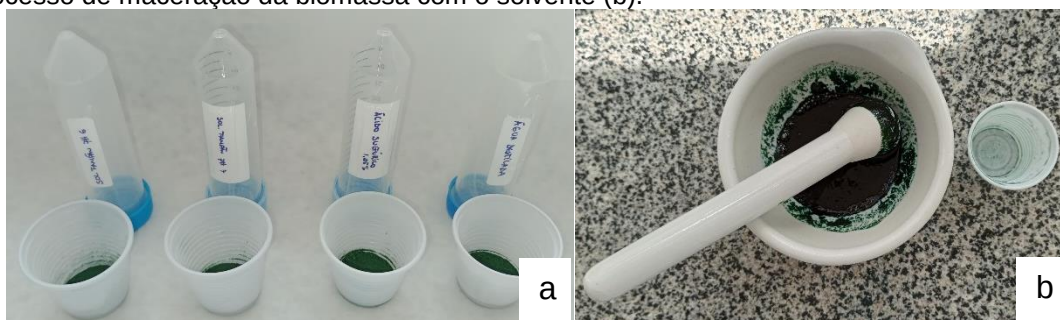


Tabela 9 – Solventes usados na extração da ficocianina.

Solventes	pH	Delineamento experimental
Solução Tampão	6.0	1 grama de

Solução Tampão	7.0	biomassa e 18,8 ml do solvente
Água destilada	5.0	
Ácido sulfúrico	2.0	

Depois de realizado o processo de maceração, o macerado foi colocado em um tubo falcon de 50 ml para um repouso de 24 horas. Após o período de 24 horas foi realizada a centrifugação e coletada o sobrenadante (ficocianina) para a realização das análises.

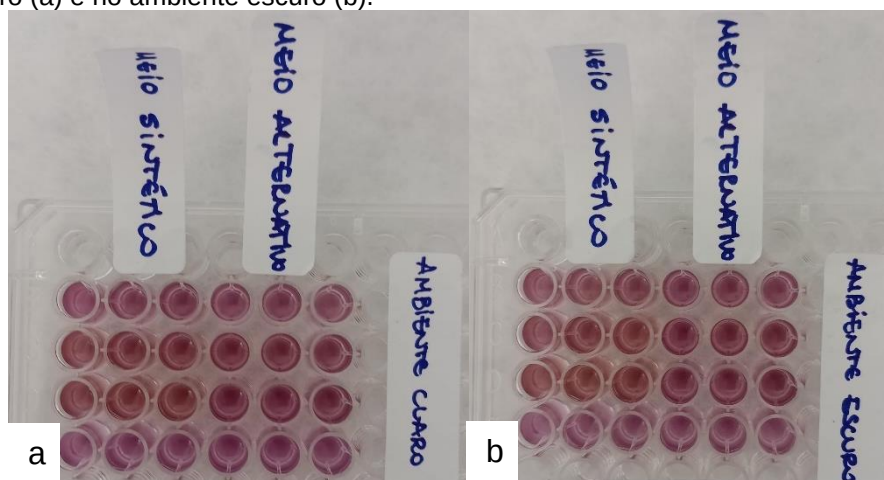
Caracterização da ficocianina

Para o método de caracterização da ficocianina extraída da biomassa cultivada no meio sintético e no meio alternativo, foram determinados alguns parâmetros, como: estabilidade da cor e pH durante um período de 15 dias em dois ambientes (claro e escuro). Para determinar a estabilidade da cor durante o período determinado e o ambiente estabelecido, a avaliação foi realizada com registros de fotos. Para o pH foi utilizado um pHmêtro previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante (ZHOU *et al.*, 2024).

Determinação da atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante de DPPH foi realizada segundo método elaborado por Silveira; Kassuia; Domahovski, R. C.; Lazzarotto (2018) com algumas alterações. Sintetizando, foi determinada a curva padrão de DPPH (figura 23) a 0,06 mM. Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados 75 µL da extração da ficocianina nos dois ambientes (claro e escuro) e 2,925 mL de solução de DPPH em etanol (0,06 mM), foram misturados em tubos de ensaio e depois foram retirados 300 µl e adicionado na placa de 96 poços (figura 23). Após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi avaliada em 515nm utilizando um espectrofotômetro digital Flexstation3 Microplate Reader With Software.

Figura 20 – Delenamento do experimento da atividade de antioxidante (DPPH) da ficocianina no ambiente claro (a) e no ambiente escuro (b).



A porcentagem de inibição de antioxidantes de acordo com as absorbâncias das amostras na placa de 96 poços é expressa em concentração equivalente de Trolox (μM). Mediante reta da curva de calibração pode-se calcular o valor [%I] usando a equação abaixo:

$$[\%I] = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \right\} \times 100$$

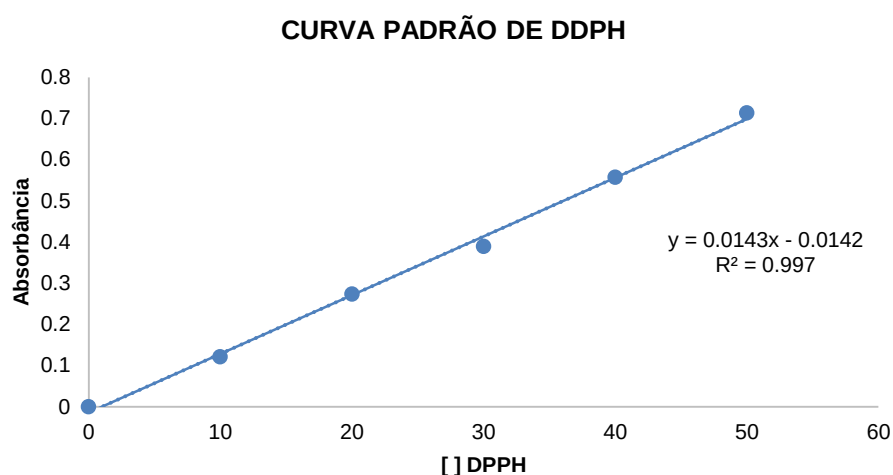
Sendo:

$Abs_{amostra}$ = Absorbância da amostra.

Abs_{branco} = Absorbância do valor branco obtido.

$Abs_{controle}$ = Absorbância do valor controle obtido.

Figura 21 – Curva padrão de DPPH.

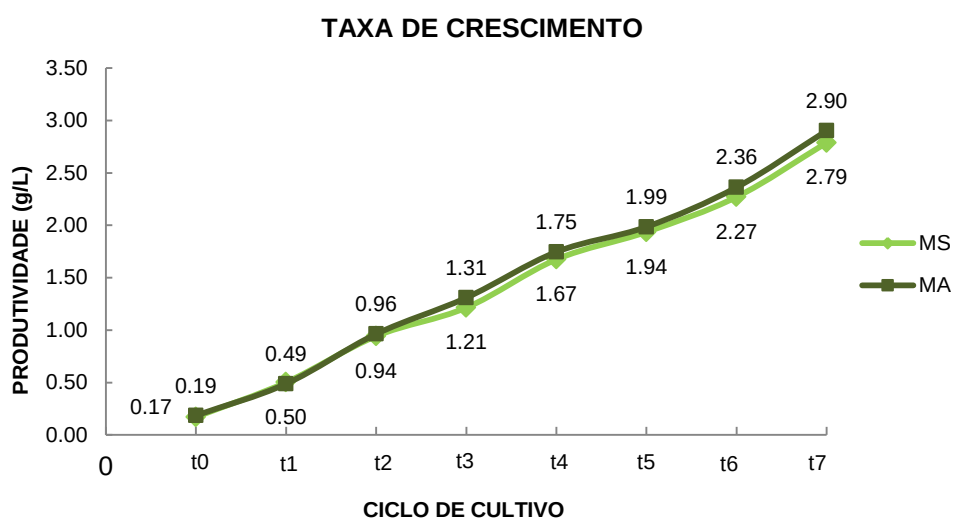


Resultados e discussões

Taxa de crescimento e caracterização química dos ciclos de cultivo da microalga *Spirulina platensis*.

A partir dos dados recolhidos no espectrofotômetro com absorvância de 670 nm, construiu-se um gráfico (figura 23), da produtividade de biomassa (g/L) em relação ao tempo de cultivo (t0, t1, t2, t3, t4, t5, t6 e t7) da *Spirulina platensis* utilizando o meio sintético e o meio alternativo.

Figura 22 – Gráfico da taxa de crescimento da microalga *Spirulina platensis* durante sete ciclos de cultivo.



MS (Meio sintético)

MA (Meio alternativo)

A produtividade de biomassa de microalgas em relação ao ponto ótimo de colheita é um aspecto crucial a ser considerado para maximizar a eficiência e o rendimento dos cultivos de microalgas. O ponto ótimo de colheita refere-se ao momento em que as microalgas atingem sua máxima concentração celular e produção de biomassa, considerando tanto a quantidade de biomassa quanto a qualidade do produto desejado.

Tabela 10 – Determinação do pH durante os ciclos de cultivos.

Amostra/ciclo de cultivo	<i>Spirulina platensis</i> (MS) – pH	<i>Spirulina platensis</i> (MA) – pH
t0	10,30	10,45
t1	10,27	10,68
t2	10,35	11,37
t3	10,58	10,24
t4	10,87	10,39
t5	10,47	10,28

t6	11,41	10,39
t7	12,03	10,25

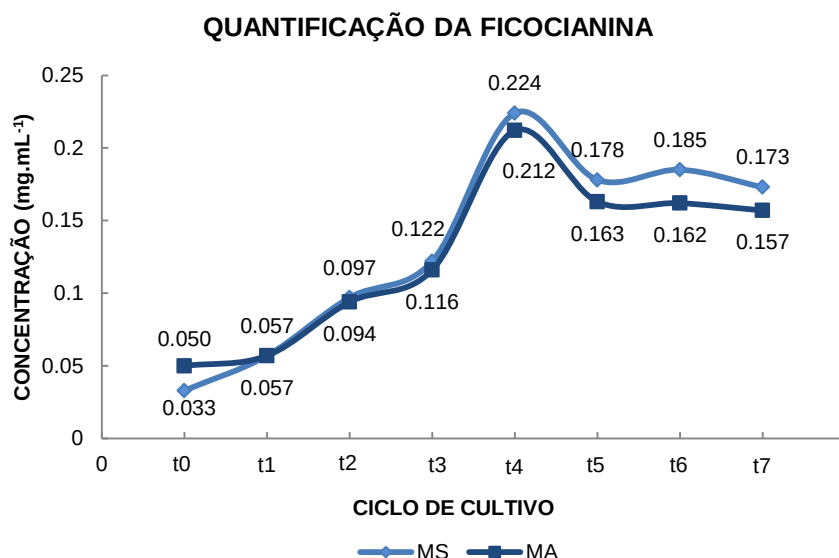
O pH é um importante parâmetro ambiental que pode afetar o crescimento e a saúde das microalgas como a *Spirulina platensis*. Variações significativas de pH podem influenciar a disponibilidade de nutrientes, a toxicidade de metais pesados, a atividade enzimática e outras funções fisiológicas das microalgas. É possível que as variações de pH observadas estejam associadas a diferentes estágios de crescimento das microalgas. Por exemplo, picos de pH mais elevados podem coincidir com estágios de crescimento exponencial, enquanto quedas de pH podem ocorrer durante períodos de estresse ambiental ou esgotamento de nutrientes (UBA *et al.*, 2024).

Os ciclos de cultivo apresentaram a mesma acidez com um teor de 0.06375 e o mesmo valor de sólidos solúveis totais que foi expresso grau e ficou em 1º BRIX. Segundo Almeida *et al.*, 2021 a constância dos valores de acidez titulável e sólidos solúveis (ºBRIX) sugere que essas propriedades permaneceram estáveis ao longo do tempo para ambas as amostras. Isso pode indicar uma consistência nas condições de cultivo ou na composição das amostras. A uniformidade dos valores ao longo dos ciclos de cultivo pode ser um indicador de que o processo de cultivo foi padronizado e controlado adequadamente. Isso é importante para garantir a qualidade e a reprodutibilidade das amostras.

Quantificação da ficocianina em cada ciclo de cultivo.

O gráfico abaixo representa as concentrações de ficocianina pela *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético e no meio alternativo nos ciclos de cultivo.

Figura 23 – Gráfico da determinação de quantificação da ficocianina durante os ciclos de cultivo da *Spirulina platensis* cultivada no meio sintético e no meio alternativo.



Em meio sintético, a produção de ficocianina parece aumentar ao longo dos ciclos de cultivo, atingindo um pico em t4 e depois diminuindo. Em meio alternativo, a produção de ficocianina parece ter uma tendência menos clara, com flutuações ao longo dos ciclos, mas sem uma tendência de aumento ou diminuição significativa. É interessante notar que a produção de ficocianina pode variar entre ciclos mesmo dentro do mesmo meio de cultivo. Isso pode ser influenciado por vários fatores, como condições de cultivo, estágio de crescimento das algas, entre outros.

Freire Balseca; Castro Reyes; Maldonado Rodríguez, (2024) estudaram o uso de duas fontes de nitrogênio (uréia e nitrato de potássio) para maximizar o crescimento de *Spirulina platensis* e a produção de ficocianina. Os autores revelaram que as diferentes concentrações de uréia foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para produção de biomassa e ficocianina. Entretanto, o nitrato de potássio (KNO_3) não apresentou influência significativa ($p > 0,05$) nas variáveis respostas. As análises indicaram que as concentrações ótimas de KNO_3 e ureia para maximizar as variáveis resposta foram $3,5 \text{ g L}^{-1}$ e $0,098 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Este estudo oferece perspectivas valiosas para a produção eficiente da microalga *Spirulina* e ao mesmo tempo reduz os custos de produção

para seu cultivo em maior escala.

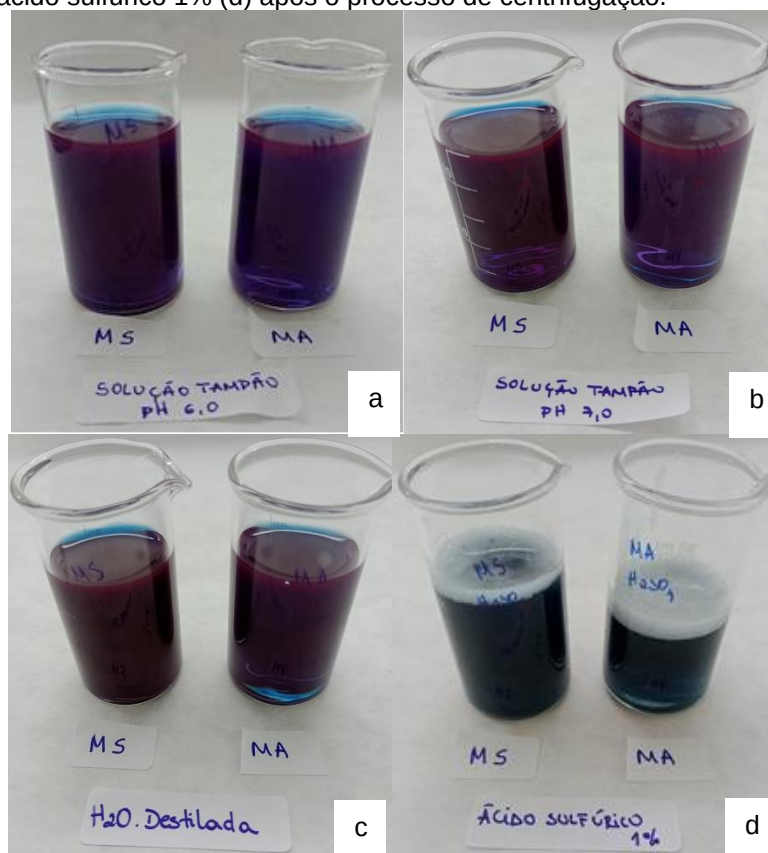
Lim *et al.*, 2023 investigaram o crescimento da *Spirulina* através da reciclagem de meio obtido no pós-cultivo e substituição de recursos hídricos pluviais para preparo do meio de cultivo. O meio BG-11 modificado foi selecionado como meio nesta pesquisa para cultivar *Spirulina platensis* e meio Zarrouk como controle. Os resultados mostraram que o cultivo controle alcançou a maior concentração de ficocianina ($160,8 \pm 4,715$ mg/g) em comparação com o meio alternativo ($141,1 \pm 3,468$ mg/g). Apesar do meio alternativo apresentar menor concentração de ficocianina em comparação ao controle, a concentração de biomassa obtida foi maior em comparação ao controle. Isso depende do produto final, se a concentração de ficocianina ou de biomassa é favorecida. A seleção dos métodos de pré-tratamento apropriados dependerá do objetivo final do processo de cultivo. Estas descobertas são de grande importância, pois permitem às indústrias de microalgas diminuir o desperdício de nutrientes e o consumo de água no cultivo da *Spirulina* através da reciclagem do meio.

A comparação entre os meios sintético e alternativo nos forneceu insights sobre a efetividade de cada meio na produção de ficocianina. No entanto, é importante considerar outros fatores além da produção de ficocianina, como custo, disponibilidade de ingredientes e impacto ambiental, ao avaliar a preferência por um meio de cultivo em particular. E seria importante realizar mais ciclos de cultivo e replicar o experimento para determinar a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados observados.

Extração da ficocianina com diferentes solventes.

Após determinar o melhor ponto ótimo de colheita, onde se obteve a maior concentração de ficocianina em ambos os cultivos, foi então realizado os processos de extração da ficocianina, a figura abaixo mostra a extração nos diferentes solventes.

Figura 24 – ficocianina coletada, solução tampão pH 6,0 (a), solução tampão pH 7,0 (b), água destilada (c) e ácido sulfúrico 1% (d) após o processo de centrifugação.



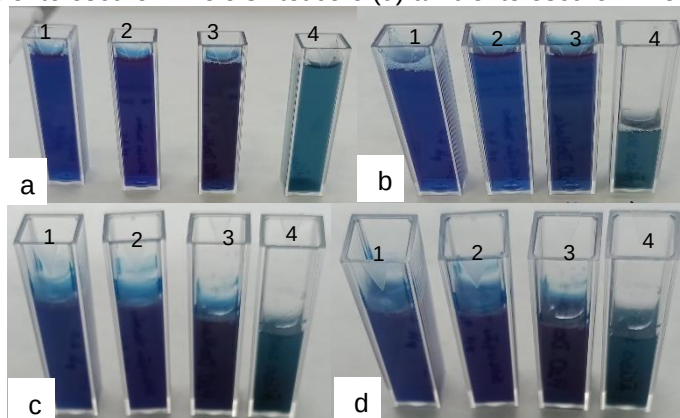
Legenda: MS (meio sintético); MA (meio alternativo).

Caracterização da ficocianina

Depois do processo de extração, as ficocininas foram submetidas a teste de estabilidade em dois tipos de ambientes, claro e escuro. As figuras abaixo mostram o teste de estabilidade da cor da ficocianina durante os ciclos determinados.

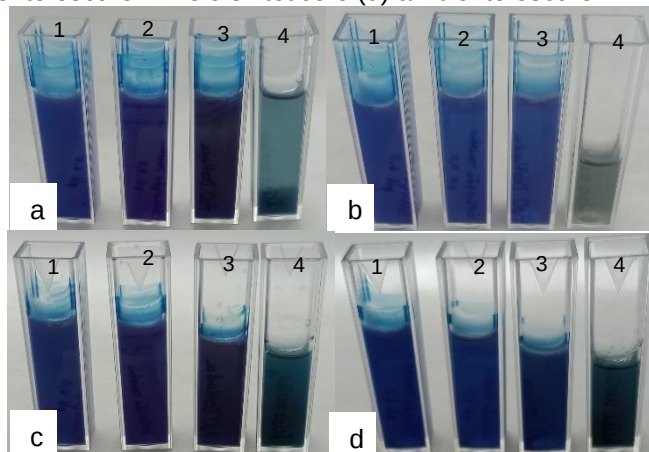
- T0 (início)

Figura 25 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6,0, 2 – solução tampão pH 7,0, 3 – água destilada pH 7,0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2,0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.



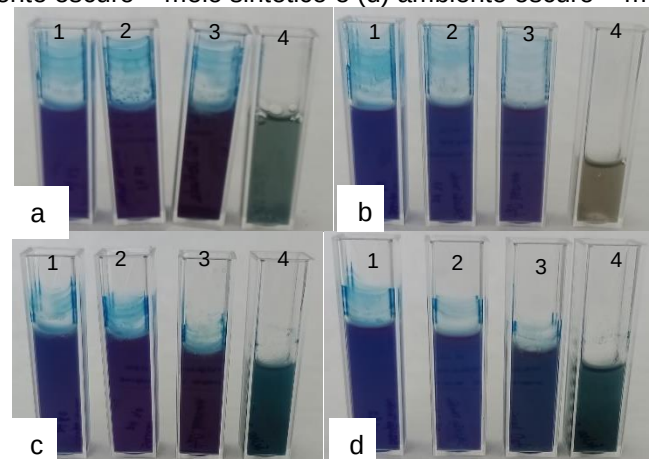
- T1 (3 dias)

Figura 26 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.



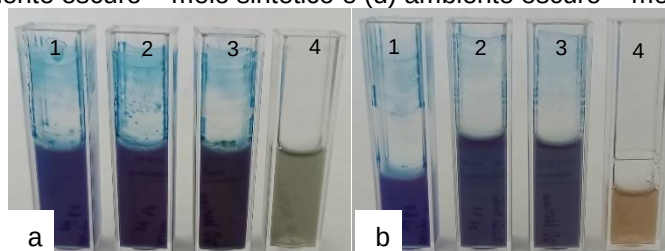
- T2 (6 dias)

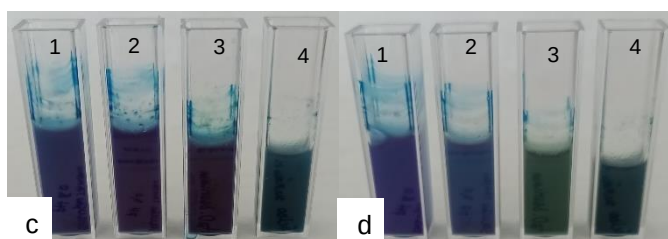
Figura 27 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.



- T3 (9 dias)

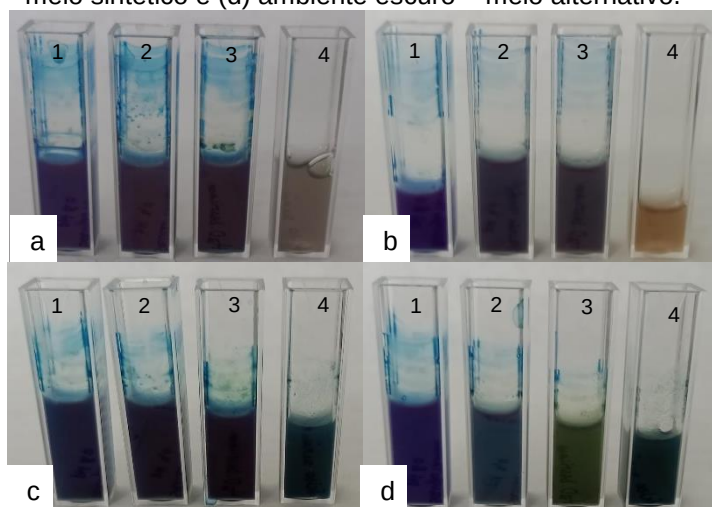
Figura 28 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.





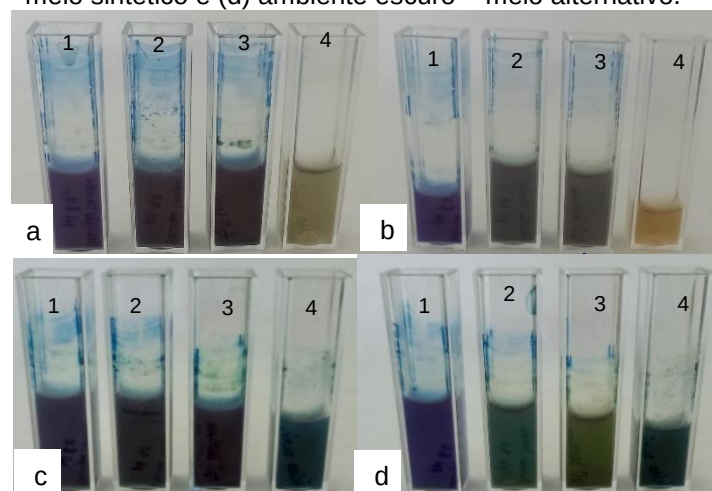
- T4 (12 dias)

Figura 29 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.



- T5 (15 dias)

Figura 30 – Resultado do teste de estabilidade da cor das ficocianinas extraídas nos diferentes solventes: 1 – solução tampão pH 6.0, 2 – solução tampão pH 7.0, 3 – água destilada pH 7.0 e 4 – ácido sulfúrico pH 2.0, onde (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.



Durante os 15 dias de estabelecidos para o teste de estabilidade da cor da ficocianina, observou-se que em cada tempo (T0 ao T5) a cor azul da ficocianina extraída nos diferentes solventes se mostrou estável durante os 6 primeiros dias. As ficocianinas mantidas no ambiente claro (com luz) do sexto dia em diante a cor azul foi sofrendo degradação. Isso ocorre porque a ficocianina é sensível a fotodegradação, ou seja, ela se decompõe quando exposta a luz. E essa degradação tornou-se mais notável na ficocianina extraída da biomassa cultivada no meio alternativo, isso ocorreu devido os meios alternativos não apresentarem cofatores ou antioxidantes que ajudam a proteger a ficocianina da degradação. Em meios de cultura convencionais, esses cofatores podem estar presentes em concentrações adequadas para ajudar a estabilizar a ficocianina.

Segundo Yu *et al.*, (2024), a ficocianina é susceptível à oxidação enzimática, especialmente em condições de estresse oxidativo. Enzimas como peroxidases e oxidases podem catalisar reações de oxidação que levam à degradação da ficocianina. Já as proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas em proteínas. Em condições de estresse ou degradação celular as proteases podem ser ativadas e contribuir para a quebra da estrutura proteica da ficocianina, resultando em sua degradação.

Papadopoulos *et al.*, (2022) investigara o potencial da *Arthrospira platensis* no tratamento de águas residuárias não diluídas e não pré-tratadas de cervejarias. A adição de NaHCO_3 e NaCl , juntamente com um pH elevado, favoreceu o crescimento da *Arthrospira*. O fotoperíodo promoveu a máxima concentração de biomassa, enquanto carboidratos e lipídios foram acumulados em maior quantidade, embora as proteínas e pigmentos tenham permanecido em baixos níveis devido ao baixo teor de nitrogênio na água residuária.

O pH ideal para a ficocianina é entre a faixa de 5,0 a 7,5. Nessa faixa de pH, a ficocianina tende a manter sua estrutura tridimensional e, portanto, sua funcionalidade e estabilidade são preservadas. No entanto, é importante notar que essa faixa pode variar entre diferentes espécies de microalgas ou cianobactérias, e também pode ser influenciada por fatores ambientais específicos.

A tabela abaixo mostra o valor final do pH das ficocianinas extraídas e mantidas nos ambientes claro e escuro durante o período de 15 dias.

Tabela 11 – valores do pH da ficocinina após o período de 15 dias.

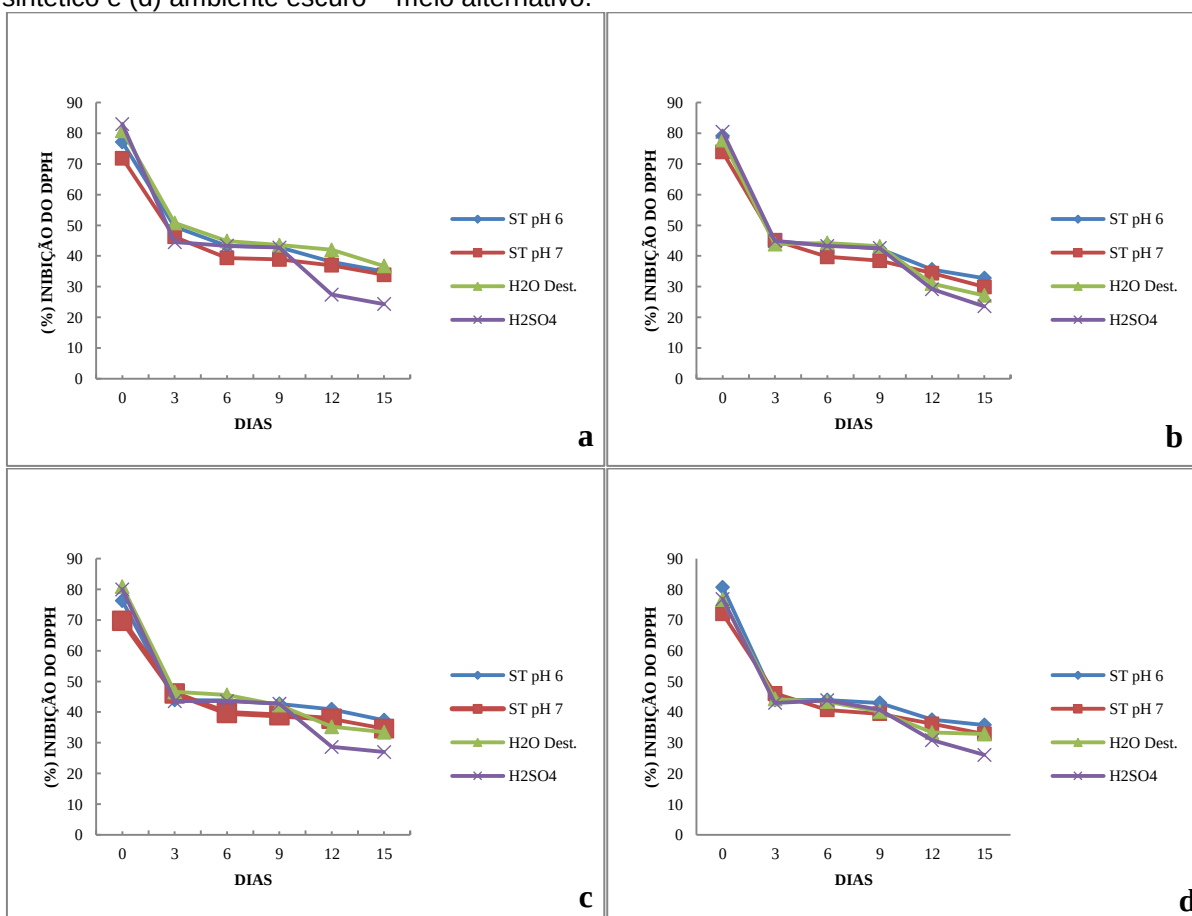
Ambiente claro	Ambiente escuro	Ambiente claro	Ambiente escuro
Meio sintético	Meio alternativo	Meio sintético	Meio alternativo
pH Final	pH Final	pH Final	pH Final
5,31	5,28	5,91	5,87
6,12	5,77	6,84	6,58
4,19	3,85	4,95	4,33
1,09	0,19	1,87	1,51

Adjali *et al.*, 2022 elaboraram um artigo de revisão, onde identificaram soluções sobre a estabilidade da ficocianina como pH, temperatura e luz, onde autores consideram que sejam esses os parâmetros físico-químicos ideais para a sua estabilidade. Como resultado os autores obtiveram que a faixa ideal de pH de trabalho para a ficocianina está entre 5,5 e 6,0 e permanece estável até 45 °C; entretanto, a exposição a temperaturas relativamente altas ou pH ácido diminui sua meia-vida e aumenta a constante cinética de degradação. Concluíram também que as ficobiliproteínas são sensíveis à luz e que conservantes como mono e dissacarídeos, ácido cítrico ou cloreto de sódio parecem ser agentes estabilizantes eficazes. O encapsulamento em materiais nano ou microestruturados, como nanofibras, micropartículas ou nanopartículas, também pode preservar ou aumentar sua estabilidade.

Determinação da atividade antioxidante da ficocianina pelo método de DPPH.

Os gráficos abaixo (figura 31) representam o comportamento da atividade antioxidante da ficocianina extraídas por meio dos quatro solventes que foram usados na extração da ficocianina durante um período de 15 dias.

Figura 31 – atividade antioxidante da ficocianina em diferentes ambiente e meios de crescimento, (a) ambiente claro – meio sintético, (b) ambiente claro – meio alternativo, (c) ambiente escuro – meio sintético e (d) ambiente escuro – meio alternativo.



Legenda: ST (solução tampão); H2O Dest. (água destilada); H2SO4 (ácido sulfúrico).

No ambiente claro no meio sintético, inicialmente, o ácido sulfúrico 1% apresentou a maior atividade antioxidante, seguido pela água destilada, ST pH 6,0 e ST pH 7,0. Após três dias, a água destilada mostrou a maior atividade antioxidante, seguida pelo ST pH 6,0 e ST pH 7,0, com o ácido sulfúrico mostrando a menor atividade. Esse padrão se manteve ao longo dos dias seguintes, com a água destilada mantendo a maior atividade antioxidante. No meio alternativo no ambiente claro o ácido sulfúrico 1% teve a maior atividade antioxidante inicialmente, seguido pelo ST pH 6,0, ST pH 7,0 e água destilada. Os resultados variaram ao longo dos dias, conforme o gráfico, com diferentes substâncias mostrando maior atividade antioxidante em momentos diferentes.

No ambiente escuro em meio sintético, inicialmente, a água destilada apresentou a maior atividade antioxidante, seguida pelo ácido sulfúrico, ST pH 6,0 e ST pH 7,0. Ao longo do tempo, a água destilada manteve consistentemente a maior atividade antioxidante. Já no ambiente escuro em meio alternativo, a ST pH

6,0 apresentou a maior atividade antioxidante no início, seguido pelo ácido sulfúrico, ST pH 7,0 e água destilada, os resultados variaram ao longo do tempo, com diferentes substâncias mostrando maior atividade antioxidante em momentos diferentes.

Em geral, a água destilada demonstrou ter uma atividade antioxidante consistente em todos os ambientes e ao longo do tempo, enquanto as outras substâncias mostraram variações em sua atividade antioxidante dependendo do ambiente e do tempo de observação.

Essa análise mostrou como a atividade antioxidante varia entre os diferentes solventes ao longo do período de 15 dias. Cada solvente mostrou diferentes níveis de atividade antioxidante em momentos diferentes, o que pode ser útil para determinar a estabilidade da ficocianina e sua atividade antioxidante em cada solvente ao longo do tempo. Portanto, a escolha do meio de cultura é crucial para a produção e preservação da ficocianina. Meios de cultura bem formulados e condições de cultivo adequadas são essenciais para garantir uma produção estável e de alta qualidade desse pigmento valioso.

Segundo Dianursanti; Hafidzah, 2021b a ficocianina pode ser extraída por diversos procedimentos que foram afetados por diversos fatores, um deles é o tipo de solvente utilizado no processo de extração. Os autores estudaram a utilização de diferentes solventes, utilizando tampão fosfato de sódio e cloreto de cálcio. O método de extração utilizado na pesquisa é o congelamento-descongelamento. Os parâmetros da extração segundo os autores foram o rendimento e a pureza da ficocianina. O resultado obtido mostrou maior rendimento de ficocianina na extração com tampão fosfato, com valor de 35,31 mg/g, e maior pureza de ficocianina na extração com CaCl_2 na proporção de 2,6.

İlter *et al.*, 2018 utilizou três solventes diferentes, água destilada, suspensão de na-fosfato pH: 7,4 e solução aquosa de CaCl_2 a 1,5%, que foram aplicados como meio de extração. O maior teor total de ficocianina (55,33 mg/g) foi extraído de biomassa congelada usando solução de CaCl_2 a 1,5% (p/v). O Autor concluiu que o método de extração clássico proporcionou cor azul vívida, maior quantidade de ficocianina e atividade antioxidante máxima em comparação com outros métodos de extração.

CONCLUSÃO

Este estudo enfatizou a importância do ponto ótimo de colheita da microalga *Spirulina platensis* a fim de melhorar a produção de compostos bioativos, com foco específico na ficocianina. Os resultados destacaram a eficácia da inserção do subproduto no meio de cultivo como um método promissor para aumentar a produção desse composto valioso. Ao longo dos ciclos de cultivo, foi identificado que o ciclo de cultivo T4 (12 dias) foi o ponto ótimo para alcançar a maior concentração de ficocianina, tanto no meio sintético quanto no meio alternativo. Além disso, observou-se que a microalga respondeu de maneira diferenciada aos diferentes meios de cultivo, sugerindo a necessidade de considerar essas variações na formulação de estratégias de cultivo.

A avaliação da estabilidade da atividade antioxidante da ficocianina revelou insights importantes sobre seu potencial de aplicação prática. Embora tenha sido observada uma tendência geral de diminuição na atividade antioxidante ao longo do tempo, a escolha do solvente teve um impacto significativo nessa estabilidade, destacando a importância de selecionar o solvente adequado para manter a eficácia da ficocianina como antioxidante em aplicações industriais, como na indústria de alimentos e cosméticos. A água destilada se mostrou como o melhor solvente quando se trata de atividade antioxidante, em relação a estabilidade da cor as soluções tampões se mostraram eficiente comparados com os outros solventes usados.

Em última análise, este estudo fornece uma compreensão abrangente dos fatores que influenciam a produção e a eficácia da ficocianina, oferecendo uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias de cultivo mais eficientes e aprimoradas. Essas descobertas não apenas contribuem para o avanço do conhecimento científico no campo da biotecnologia de microalgas, mas também têm o potencial de impulsionar inovações significativas na indústria, promovendo o uso sustentável de recursos biológicos para o benefício humano.

6. CONCLUSÃO GERAL

A inserção do subproduto agroindustrial usado no projeto ao meio de cultivo para a microalga *Spirulina platensis* se mostrou eficaz, isso mostra que o uso de subprodutos agroindustriais pode vir a se tornar fontes alternativas de crescimento para as microalgas, tornando-se um fator em que possa reduzir o impacto do descarte desses subprodutos ao meio ambiente. Vale ressaltar que esses subprodutos devem passar por um processo de caracterização para saber se possuem os nutrientes adequados para o crescimento das microalgas.

Após o cultivo da microalga utilizando o meio sintético e o meio alternativo, é importante realizar a caracterização da biomassa em ambos os cultivos, para poder comparar e saber se houve ou não mudança na sua composição, alguns subprodutos podem mudar a composição da biomassa, no caso o subproduto utilizado no projeto, foi observado que houve um aumento na composição de proteínas quando comparado com o meio sintético. E a produção de ácidos graxos, saturados como o palmítico e os insaturados destacando os da família dos ômega (3, 6 e 9), a biomassa cultivada no meio alternativo teve resultados superiores quando comparado com o meio sintético, esses ácidos são importantes pois podem ajudar na regulação do nosso organismo quando são implementados no consumo ou na dieta.

A ficocianina é uma proteína valiosa encontrada principalmente nas cianobactérias, tem ações antioxidantes e anti-inflamatórias, além de atuarem como pigmentos e corantes naturais em indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. A biomassa cultivada com a inserção do subproduto teve uma produção de ficocianina significativa, e que o tempo de colheita ideal para se obter a maior quantidade de ficocianina é entre 12 e 15 dias.

A extração da ficocianina é um processo que vem chamando atenção dos pesquisadores, pois a ficocianina é uma proteína que sofre degradação rápida de alguns fatores como a luz, temperatura, armazenamento e entre outros. No entanto, realizar testes de extração e estabilidade é a melhor maneira para se obter a ficocianina. Tivemos resultados que mostraram que as extrações com os solventes utilizados foram positivas, que a metodologia do processo de extração foi eficiente, e a água foi o solvente que apresentou melhor atividade antioxidante, porém os solventes solução tampão pH 6,0 e 7,0, foram os que apresentaram a

maior estabilidade de cor. Porém o ambiente onde é feito o armazenamento é importante, observamos que no ambiente escuro foi o que apresentou melhores resultados de atividade antioxidante e estabilidade da ficocianina extraída da biomassa cultivada no meio sintético e no meio alternativo.

Com isso podemos dizer que a inserção do subproduto utilizado nos revelou resultados importantes, e que o uso dessa fonte alternativa poderá servir como uma solução para a produção não só da *Spirulina platensis* como de outras microalgas, a fim de aumentar a produção de biomassa quando comparado com o uso dos meios sintéticos usados e descritos na literatura. E que poderá vir a ser útil também para a extração de compostos bioativos de interesse comercial, no caso a ficocianina que atualmente vem mostrando ser um dos pigmentos mais valiosos no mercado.

7. REFERÊNCIAS

- ADJALI, A.; CLAROT, I.; CHEN, Z.; MARCHIONI, E.; BOUDIER, A. Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 406–414, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005>>.
- AHMAD, N.; MOUNSEF, J. R.; LTEIF, R. Pigment production by *Scenedesmus dimorphus* using different low-cost and alternative culture media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 287–294, 2022.
- ALFADHLY, N. K. Z.; ALHELFI, N.; ALTEMIMI, A. B.; VERMA, D. K.; CACCIOLA, F. Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus *Spirulina*: An Investigative Review on Current Trends. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3063, 2022a.
- ALFADHLY, N. K. Z.; ALHELFI, N.; ALTEMIMI, A. B.; VERMA, D. K.; CACCIOLA, F.; NARAYANANKUTTY, A. Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of *Spirulina* and Their Health Benefits: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 1–40, 2022b.
- ALI, M.; MASOOD, A.; SALEEM, M. Microalgae cultivation in wastewater for simultaneous nutrients removal and biomass production. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 2021.
- ALMEIDA, L. M. R.; CRUZ, L. F. da S.; MACHADO, B. A. S.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V.; FERREIRA, E. de S.; LEMOS, P. V. F.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O. de. Effect of the addition of *Spirulina* sp. biomass on the development and characterization of functional food. **Algal Research**, v. 58, n. February, p. 102387, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102387>>.
- ALMEIDA, L. M. R.; FALCÃO, J. S.; TAVARES, P. P. L. G.; SILVA CRUZ, L. F.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O. Utilização de Biomassa de *Spirulina Platensis* para desenvolvimento de molho com alto teor proteico: um estudo piloto. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 21172–21185, 2020.
- AMOLEGBE, K. B.; UPTON, J.; BAGEANT, E.; BLOM, S. Food price volatility and household food security: Evidence from Nigeria. **Food Policy**, v. 102, p. 102061, 1 jul. 2021.
- AMPOFO, J.; ABBEY, Lord. Functional Food Industry. 2022.
- AQUINO, L. L.; SANTOS, M. R. dos; BITTENCOURT, P. R. S.; HERCULANO, L.; COLLA, E. UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA DE *SPIRULINA PLATENSIS* NA ALIMENTAÇÃO HUMANA E MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO PARA ADIÇÃO EM MATRIZES ALIMENTARES: UM REFERENCIAL TEÓRICO. In: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 5**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2021. p. 502–510.
- BALASUBRAMANIAM, V.; GUNASEGAVAN, R. D. N.; MUSTAR, S.; LEE, J. C.; NOH, M. F. M. Isolation of industrial important bioactive compounds from

microalgae. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1–45, 2021.

BAUER, L.; RANGLOVÁ, K.; MASOJÍDEK, J.; DROSG, B.; MEIXNER, K. Digestate as sustainable nutrient source for microalgae—challenges and prospects. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 1–21, 2021.

BERMEJO, E.; GONZÁLEZ, C.; MONTERO-LOBATO, Z.; VÍLCHEZ, C.; GARBAYO, I.; CUARESMA, M. Improvements in the cultivation of *Botryococcus braunii* using commercial fertilisers. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 4, p. 1939–1948, 2021.

BEZERRA, P. Q. M.; MORAES, L.; SILVA, T. N. M.; CARDOSO, L. G.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V. Innovative application of brackish groundwater without the addition of nutrients in the cultivation of *Spirulina* and *Chlorella* for carbohydrate and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 345, n. December 2021, p. 126543, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126543>>.

BHATNAGAR, P.; GURURANI, P.; JOSHI, S.; SINGH, Y. P.; VLASKIN, M. S.; KUMAR, V. Enhancing the bio-prospects of microalgal-derived bioactive compounds in food industry: a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-023-04410-7>>.

BJØRKLUND, G.; SEMENOVA, Y.; HANGAN, T.; PEN, J. J.; AASETH, J.; PEANA, M. Perspectives on Iron Deficiency as a Cause of Human Disease in Global Public Health. **Current Medicinal Chemistry**, 2023.

BORTOLINI, D. G.; MACIEL, G. M.; FERNANDES, I. de A. A.; PEDRO, A. C.; RUBIO, F. T. V.; BRANCO, I. G.; HAMINIUK, C. W. I. Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, n. April, 2022.

CARR, I.; GLENCROSS, B.; SANTIGOSA, E. The importance of essential fatty acids and their ratios in aquafeeds to enhance salmonid production, welfare, and human health. **Frontiers in Animal Science**, v. 4, n. May, p. 1–7, 2023.

ÇELEKLI, A.; ALSLIBI, Z. A.; BOZKURT, H. Boosting effects of *Spirulina platensis*, whey protein, and probiotics on the growth of microflora and the nutritional value of ayran. **Engineering Reports**, v. 2, n. 9, p. 1–10, 2020.

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, n. September 2021, p. 126077, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126077>>.

CHEW, K. W.; CHIA, S. R.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; LING, T. C.; CHANG, J. S. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 91, p. 332–344, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>>.

CHOIX, F. J.; OCHOA-BECERRA, M. A.; HSIEH-LO, M.; MONDRAGÓN-CORTEZ, P.; MÉNDEZ-ACOSTA, H. O. High biomass production and CO₂ fixation from biogas by *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae using tequila vinasses as culture medium. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2247–2258, 2018.

CIARDI, M.; GÓMEZ-SERRANO, C.; MORALES-AMARAL, M. del M.; ACIÉN, G.; LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M. Optimisation of *Scenedesmus almeriensis* production using pig slurry as the sole nutrient source. **Algal Research**, v. 61, n. December 2021, 2022.

CIRIACO, R. R. C.; SILVA, T. R. da; PONTES, S. R. L.; MADUREIRA, L.; GONÇALVES, P.; MRUE, F.; REIS, P. R. M. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA, GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DA SPIRULINA. **Vita et Sanitas**, v. 16, n.1, n. ISSN 1982-5951, p. 1–14, 2022.

CORONADO-REYES, J. A.; SALAZAR-TORRES, J. A.; JUÁREZ-CAMPOS, B.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 42, p. 1–11, 2022.

COULTATE, T.; BLACKBURN, R. S. Food colorants: their past, present and future. **Coloration Technology**, 2018.

DA SILVA, E. P.; VILAS BOAS, E. V. de B.; XISTO, A. L. P. R. Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora*, Mart.). **Food Science and Technology**, 2013.

DA SILVA, S. C.; FERNANDES, I. P.; BARROS, L.; FERNANDES, Â.; JOSÉ ALVES, M.; CALHELHA, R. C.; PEREIRA, C.; BARREIRA, J. C. M.; MANRIQUE, Y.; COLLA, E.; FERREIRA, I. C. F. R.; FILOMENA BARREIRO, M. Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. **Journal of Functional Foods**, v. 60, n. February, 2019.

DAGNAISSER, L. S.; DOS SANTOS, M. G. B.; RITA, A. V. S.; CHAVES CARDOSO, J.; DE CARVALHO, D. F.; DE MENDONÇA, H. V. Microalgae as Bio-fertilizer: a New Strategy for Advancing Modern Agriculture, Wastewater Bioremediation, and Atmospheric Carbon Mitigation. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 233, n. 11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11270-022-05917-x>>.

DE FREITAS COELHO, D.; TUNDISI, L. L.; CERQUEIRA, K. S.; DA SILVA RODRIGUES, J. R.; MAZZOLA, P. G.; TAMBOURGI, E. B.; DE SOUZA, R. R. Microalgae: Cultivation aspects and bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

DE LUCA, M.; PAPPALARDO, I.; LIMONGI, A. R.; VIVIANO, E.; RADICE, R. P.; TODISCO, S.; MARTELLI, G.; INFANTINO, V.; VASSALLO, A. Lipids from microalgae for cosmetic applications. **Cosmetics**, v. 8, n. 2, 2021.

DE PINA, L. C. C.; DE LIRA, E. B.; DA COSTA, M. H. J.; PEREIRA, D. A.; VARANDAS, R. C. R.; ALMEIDA, P. de M.; NONATO, N. da S.; COSTA-SASSI, C. F. **Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos / Evaluation of a microalgae cultivation system with a mix of tubular aBrazilian Journal of Development**Curitiba. 2021.

DEAMICI, K. M.; DZIERGOWSKA, K.; SILVA, P. G. P.; MICHALAK, I.; SANTOS, L. O.; DETYNA, J.; KATARIA, S.; BRESTIC, M.; SARRAF, M.; ISLAM, M. Microalgae Cultivated under Magnetic Field Action: Insights of an Environmentally Sustainable Approach. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 20, 2022.

DIANURSANTI; HAFIDZAH, M. A. The enhancement of phycocyanin yield and purity from *Spirulina platensis* using freeze-thawing method on various solvents. **AIP Conference Proceedings**, v. 2344, n. March, 2021a.

DIANURSANTI; HAFIDZAH, M. A. The enhancement of phycocyanin yield and purity from *Spirulina platensis* using freeze-thawing method on various solvents. **AIP Conference Proceedings**, v. 2344, n. 1, p. 20015, 23 mar. 2021b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/5.0047581>>.

DIAO, Y.; GONG, X.; XU, D.; DUAN, P.; WANG, S.; GUO, Y. From culture, harvest to pretreatment of microalgae and its high-value utilization. **Algal Research**, v. 78, n. October 2023, p. 103405, 2024.

DOURADO, M. S.; CARDOSO, C. C. A.; CALADO, C. S. C.; FRET, R. T. F.; SALES, E. A. Microalgas como matéria prima para a produção de compostos lipídicos precursores de combustíveis verdes. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 13985–13994, 2020.

DZUMAN, M. J.; SEVERO, I. A.; MOREIRA, M. A. C.; DE LIMA LUZ JUNIOR, L. F.; MITCHELL, D. A.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B. Microalgae Culture Medium Recycling: Improved Production of Biomass and Lipids, Biodiesel Properties and Cost Reduction. **Bioenergy Research**, p. 2076–2089, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12155-022-10395-4>>.

ENDE, S. S. W.; NOKE, A. Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 3, p. 1565–1571, 2019.

FERNANDES, P. H. Determinação da fibra bruta em alimento volumoso e concentrado. p. 1–27, 2022.

FERNANDES, R.; CAMPOS, J.; SERRA, M.; FIDALGO, J.; ALMEIDA, H.; CASAS, A.; TOUBARRO, D.; BARROS, A. I. R. N. A. Exploring the Benefits of Phycocyanin: From *Spirulina* Cultivation to Its Widespread Applications. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, 2023.

FERREIRA, M. dos S.; MACHADO, L. C.; SOUZA, T. C. S. de; UCHÔA, B. C.; CRUZ, A. P. da S.; OLIVEIRA, Z. B. De; SÁ, A. B.; SILVA JÚNIOR, A. Q. da. Avaliação do perfil nutricional e ácidos graxos da polpa in natura do Buriti (*Mauritia*

flexuosa) e do Mucajá (*Acrocomia aculeata*), provenientes de Santarém-PA. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 24, n. 6, p. e16773, 25 jun. 2024. Disponível em: <<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/16773>>.

FREIRE BALSECA, D. A.; CASTRO REYES, K. S.; MALDONADO RODRÍGUEZ, M. E. Optimization of an Alternative Culture Medium for Phycocyanin Production from *Arthrospira platensis* under Laboratory Conditions. **Microorganisms**, v. 12, n. 2, 2024.

GABR, G. A.; EL-SAYED, S. M.; HIKAL, M. S. Antioxidant Activities of Phycocyanin: A Bioactive Compound from *Spirulina platensis*. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 32, n. 2, p. 73–85, 2020.

GREQUE, M.; MORAIS, D.; GABRIELLE, A.; ALVARENGA, P.; VAZ, S.; ALBERTO, J.; COSTA, V. Nanoencapsulation of *Spirulina* biomass by electrospraying for development of functional foods – a review. **Biotechnology Research & Innovation**, v. 5, n. 2, p. 6, 2021.

GRUBIŠIĆ, M.; ŠANTEK, B.; ZORIĆ, Z.; ČOŠIĆ, Z.; VRANA, I.; GAŠPAROVIĆ, B.; ČOŽ-RAKOVAC, R.; IVANČIĆ ŠANTEK, M. Bioprospecting of Microalgae Isolated from the Adriatic Sea: Characterization of Biomass, Pigment, Lipid and Fatty Acid Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1248, 12 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/4/1248>>.

HACHICHA, R.; ELLEUCH, F.; HLIMA, H. Ben; DUBESSAY, P.; DE BAYNAST, H.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; HACHICHA, R.; ABDELKAFI, S.; MICHAUD, P.; FENDRI, I. Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 4, 2022.

HASSAN, S.; MEENATCHI, R.; PACHILLU, K.; BANSAL, S.; BRINDANGNANAM, P.; AROCKIARAJ, J.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, n. September 2021, p. 999–1029, 2022.

İLTER, I.; AKYIL, S.; DEMIREL, Z.; KOÇ, M.; CONK-DALAY, M.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, n. April, p. 78–88, 2018.

JAIN, P.; MINHAS, A. K.; SHUKLA, S.; PURI, M.; BARROW, C. J.; MANDAL, S. Bioprospecting Indigenous Marine Microalgae for Polyunsaturated Fatty Acids Under Different Media Conditions. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. March, p. 1–13, 2022.

JAKŠE, B.; GILIĆ, B.; ĐUROVIĆ, M.; ŠAJBER, D. The Effects of an Eight-Week Swimming Program on Body Composition and Assessment of Dietary Intake in Post-COVID-19 Patients. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2024, 2024.

JARUNGKEERATIVIMOL, P.; CHONGSONGKRAM, J.; SAPPAMONGKOLCHAI,

W.; SULTAN, I. N.; TAREEN, A. K.; PARAKULSUKSATID, P. Screening of high lipid content and productivity of microalgae under photoautotrophic cultivation for biodiesel production. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 42, n. 1, p. 1–10, 2023.

KAPOOR, S.; SINGH, M.; SRIVASTAVA, A.; CHAVALI, M.; CHANDRASEKHAR, K.; VERMA, P. Extraction and characterization of microalgae-derived phenolics for pharmaceutical applications: A systematic review. **Journal of Basic Microbiology**, n. October 2021, p. 1044–1063, 2021.

KASSIM, M. A.; RAMLI, S. H.; MENG, T. K. Analysis of microalgal growth kinetic model and carbohydrate biosynthesis cultivated using agro-industrial waste residuals as carbon source. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 514–524, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1969576>>.

KHAVARI, F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; NOURI, F. Microalgae: therapeutic potentials and applications. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 5, p. 4757–4765, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>>.

KOYANDE, A. K.; CHEW, K. W.; RAMBABU, K.; TAO, Y.; CHU, D. T.; SHOW, P. L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 16–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>>.

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

LECA, M. A.; BEIGBEDER, J. B.; CASTEL, L.; SAMBUSITI, C.; LE GUER, Y.; MONLAU, F. Cultivation of *Arthrospira platensis* using different agro-industrial liquid anaerobic digestates diluted with geothermal water: A sustainable culture strategy. **Algal Research**, v. 77, n. November 2023, p. 103348, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103348>>.

LEÓN-VAZ, A.; LEÓN, R.; DÍAZ-SANTOS, E.; VIGARA, J.; RAPOSO, S. Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. **New Biotechnology**, 2019a.

LEÓN-VAZ, A.; LEÓN, R.; DÍAZ-SANTOS, E.; VIGARA, J.; RAPOSO, S. Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. **New Biotechnology**, v. 51, n. July, p. 31–38, jul. 2019b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678418300682>>.

LI, Y.; ZHANG, Z.; ABBASPOURRAD, A. Improved thermal stability of phycocyanin under acidic conditions by forming soluble complexes with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 119, n. December 2020, p. 106852, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106852>>.

LI, Y.; ZHANG, Z.; ABBASPOURRAD, A. Improved pH stability, heat stability, and

functionality of phycocyanin after PEGylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, n. PB, p. 1758–1767, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.261>>.

LIM, H. R.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; TAO, Y.; XIA, A.; MA, Z.; MUNAWAROH, H. S. H.; HUYNH, N. D.; SHOW, P. L. Upstream bioprocessing of *Spirulina platensis* microalgae using rainwater and recycle medium from post-cultivation for C-phycocyanin production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, n. June, p. 104986, 2023.

LIU, R.; QIN, S.; LI, W. Phycocyanin: Anti-inflammatory effect and mechanism. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 153, n. June, p. 113362, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113362>>.

MARTÍNEZ-RUIZ, M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C. A.; KIM, D. H.; SANTIESTEBAN-ROMERO, B.; REYES-PARDO, H.; VILLASEÑOR-ZEPEDA, K. R.; MELÉNDEZ-SÁNCHEZ, E. R.; RAMÍREZ-GAMBOA, D.; DÍAZ-ZAMORANO, A. L.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; CORONADO-APODACA, K. G.; GÁMEZ-MÉNDEZ, A. M.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDIVAR, R. Microalgae Bioactive Compounds to Topical Applications Products—A Review. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 1–22, 2022.

MARTINS, R.; SALES, H.; PONTES, R.; NUNES, J.; GOUVEIA, I. **Food Wastes and Microalgae as Sources of Bioactive Compounds and Pigments in a Modern Biorefinery: A Review** *Antioxidants* 2023.

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

MINATEL, G. G. Caracterização de biomassas de *Spirulina* para uso como ingrediente. **Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis** -, 2021.

MOLINO, A.; IOVINE, A.; CASELLA, P.; MEHARIYA, S.; CHIANESE, S.; CERBONE, A.; RIMAURO, J.; MUSMARRA, D. Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 1–21, 2018.

MOREIRA, J. B.; LIM, L. T.; ZAVAREZE, E. da R.; DIAS, A. R. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. de. Antioxidant ultrafine fibers developed with microalga compounds using a free surface electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 93, n. July 2018, p. 131–136, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.015>>.

MUTANDA, T.; NAIDOO, D.; BWAPWA, J. K.; ANANDRAJ, A. Biotechnological

Applications of Microalgal Oleaginous Compounds: Current Trends on Microalgal Bioprocessing of Products. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, n. December, p. 1–21, 2020.

NAZARI, M. T.; RIGUETO, C. V. T.; REMPEL, A.; COLLA, L. M. Harvesting of *Spirulina platensis* using an eco-friendly fungal bioflocculant produced from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 322, n. December 2020, p. 1–8, 2021.

NIKOLOVA, K.; GENTSCHEVA, G.; GYUROVA, D.; PAVLOVA, V.; DINCHEVA, I.; VELIKOVA, M.; GERASIMOVA, A.; MAKEDONSKI, L.; GERGOV, G. Metabolomic Profile of *Arthrospira platensis* from a Bulgarian Bioreactor—A Potential Opportunity for Inclusion in Dietary Supplements. **Life**, v. 14, n. 2, p. 174, 2024.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. [s.l: s.n.]

ORTIZ, A.; GARCÍA, J.; UGGETTI, E.; DÍEZ-MONTERO, R. Optimization of multi-stage thickening of biomass in a demonstrative full-scale microalgae-based wastewater treatment system. **Separation and Purification Technology**, v. 281, 2022.

ÖZYURT, G.; USLU, L.; DURMUŞ, M.; SAKARYA, Y.; UZLAŞIR, T.; KÜLEY, E. Chemical and physical characterization of microencapsulated *Spirulina* fermented with *Lactobacillus plantarum*. **Algal Research**, v. 73, n. May, 2023.

PAN-UTAI, W.; ATKONGHAN, J.; ONSAMARK, T.; IMTHALAY, W. Effect of *arthrospira* microalga fortification on physicochemical properties of yogurt. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 8, n. 2, p. 531–540, 2020.

PAPADOPOULOS, K. P.; ECONOMOU, C. N.; MARKOU, G.; NICODEMOU, A.; KOUTINAS, M.; TEKERLEKOPOULOU, A. G.; VAYENAS, D. V. Cultivation of *Arthrospira platensis* in Brewery Wastewater. **Water (Switzerland)**, v. 14, n. 10, 2022.

PEREIRA, A. M.; ALBERTO, J.; COSTA, V.; SANTOS, T. D.; GRANDE, R. ENCAPSULAMENTO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE *Spirulina* PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS. 2020.

PEREIRA, M. I. B. Avaliação do cultivo mixotrófico da *Spirulina platensis* (*Arthrospira Platensis*) utilizando soro de queijo mozzarella de búfala como fonte de carbono orgânico. p. 75, 2017.

PEZ JAESCHKE, D.; ROCHA TEIXEIRA, I.; DAMASCENO FERREIRA MARCZAK, L.; DOMENEGHINI MERCALI, G. Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. **Food Research International**, v. 143, n. October 2020, 2021.

PLEISSNER, D.; RUMPOLD, B. A. Utilization of organic residues using heterotrophic microalgae and insects. **Waste Management**, v. 72, p. 227–239, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.020>>.

POLICASTRO, G.; CESARO, A.; FABBRICINO, M.; PIROZZI, F. Opportunities and Challenges from Symbiosis of Agro-Industrial Residue Anaerobic Digestion with Microalgae Cultivation. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 23, 2022.

PRABAKARAN, G.; SAMPATHKUMAR, P.; KAVISRI, M.; MOOVENDHAN, M. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 256–263, 15 jun. 2020.

PRANDI, B.; BOUKID, F.; VAN DE WALLE, S.; CUTRONEO, S.; COMAPOSADA, J.; VAN ROYEN, G.; SFORZA, S.; TEDESCHI, T.; CASTELLARI, M. Protein Quality and Protein Digestibility of Vegetable Creams Reformulated with Microalgae Inclusion. **Foods**, v. 12, n. 12, p. 2395, 2023.

PRATES, D. da F.; BARCIA, M. T.; FANKA, L. S.; RADMANN, E. M.; BALLUS, C. A.; GODOYS, H. T.; COSTA, J. A. V. Atividade Antioxidante de Ficocianina Extraída de *Spirulina* Cultivada com LEDs. v. 55, n. 43, p. 259–262, 2015.

RAMÍREZ-RODRIGUES, M. M.; ESTRADA-BERISTAIN, C.; METRI-OJEDA, J.; PÉREZ-ALVA, A.; BAIGTS-ALLENDE, D. K. *Spirulina platensis* protein as sustainable ingredient for nutritional food products development. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 12, 2021.

RIFAI, A.; JAMILAH, S.; ADMIRASARI, R.; PRAYITNO, J. Alternative Source of Nutrients for Microalgae Cultivation in a Photobioreactor System. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 1034, n. 1, 2022.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. May, p. 394–404, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>>.

RUSHAN, N. H.; MAT YASIN, N. H.; SAID, F. M. The effect of culture medium on the oil yield and fatty acid methyl ester of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering Communications**, v. 208, n. 4, p. 592–600, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00986445.2020.1864622>>.

SANDYBAYEVA, S. K.; KOSSALBAYEV, B. D.; ZAYADAN, B. K.; SADVAKASOVA, A. K.; BOLATKHAN, K.; ZADNEPROVSKAYA, E. V.; KAKIMOV, A. B.; ALWASEL, S.; LEONG, Y. K.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; CHANG, J. S. Prospects of cyanobacterial pigment production: Biotechnological potential and optimization strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 187, n. September, p. 108640, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108640>>.

SANGAPILLAI, K.; MARIMUTHU, T. Isolation and selection of growth medium for freshwater microalgae *Asterarcys quadricellulare* for maximum biomass production. **Water Science and Technology**, v. 80, n. 11, p. 2027–2036, 2019.

SANTOS NETO, J. P. dos; SANTOS, Y. M. P. dos; CUNHA, P. S. J.; GATTI, V. C. do M.; BARATA, H. da S.; NUNES, G. G. T.; OLIVEIRA, J. T. de; CARVALHO, F. I. M.; SILVA, P. A.; SANTANA, M. C. C. B. de. Licor funcional a base de umbu

(*Spondias tuberosa* Arruda) e microalga (*Spirulina* spp.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e42010313557, 2021.

SEGHIRI, R.; KHARBACH, M.; ESSAMRI, A. Functional composition, nutritional properties, and biological activities of moroccan spirulina microalga. **Journal of Food Quality**, v. 2019, 2019.

SEPIAN, N. R. A.; YASIN, N. H. M.; RAMESH, N. Immobilization Method to Separate Microalgae Biomass for Fatty Acid Methyl Ester Production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 45, n. 8, p. 1474–1481, 2022.

SERRÀ, A.; PIP, P.; GÓMEZ, E.; PHILIPPE, L. Efficient magnetic hybrid ZnO-based photocatalysts for visible-light-driven removal of toxic cyanobacteria blooms and cyanotoxins. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 268, n. January, p. 118745, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118745>>.

SILVEIRA, A. C. da; KASSUIA, Y. S. .; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutiva. **Comunicado Técnico 421 - Embrapa**, 2018.

SILVEIRA, A. M.; FAUSTINO, S. M. M.; CUNHA, A. C. Bioprospection of biocompounds and dietary supplements of microalgae with immunostimulating activity: A comprehensive review. **PeerJ**, v. 2019, n. 10, 2019.

SOARES, L. S. **REVISÃO TEÓRICA: CULTIVO DE MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDE** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bioprocessos e Biotecnologia. 2021.

SONG, X.; BO, Y.; FENG, Y.; TAN, Y.; ZHOU, C.; YAN, X.; RUAN, R.; XU, Q.; CHENG, P. Potential applications for multifunctional microalgae in soil improvement. **Frontiers in Environmental Science**, v. 10, n. October, p. 1–10, 2022.

SOUSA, V. E. **Evaluation of Ohmic Heating processing on extraction of bioactive compounds from microalgae biomass** 2020.

SOUZA, F. das C. do A.; SILVA, E. P. da; MOURA, L. G. S.; AGUIAR, J. P. L. Evaluation of fatty acid and mineral profiles and bioaccessibility of diosgenin in different types of Peruvian maca (*Lepidium meyenii* Walp). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 6, p. e181963519, 23 abr. 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3519>>.

SUGIHARTO, S. *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*: Their Nutrient Contents and Bioactive Compounds for Improving Poultry Productivity. **Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences**, v. 30, n. 3, p. 123, 2020.

SUN, Y.; TANG, S.; LI, E.; WANG, C.; CHANG, H.; HUANG, Y.; YANG, Y.; JIAO, L.; YAN, W.; LU, Y.; WAN, Y. Identification of Sulfur-Containing Chlorinated

Paraffin Structural Analogues in Human Serum: Origination from Biotransformation or Bioaccumulation? **Environmental Science and Technology**, 2023.

SUPARMANIAM, U.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; LEE, K. T.; SHUIT, S. H. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, n. January, p. 109361, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109361>>.

SWATI; WAIDHA, K.; NEGAM, S.; PARVEEN, N.; CHUSKIT, D.; MAYARNAGAM, K.; CHAURASIA, O. P. Effect of dietary supplementation of microalgae Spirulina and Chlorella on growth performance and blood profile of broiler chicken at high altitude. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 92, n. 8, p. 995–998, 2022.

TAN, J. Sen; LEE, S. Y.; CHEW, K. W.; LAM, M. K.; LIM, J. W.; HO, S. H.; SHOW, P. L. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 116–129, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>>.

TARHAN, S. Z.; KOÇER, A. T.; ÖZÇİMEN, D.; GÖKALP, İ. Cultivation of green microalgae by recovering aqueous nutrients in hydrothermal carbonization process water of biomass wastes. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, n. June 2020, 2021.

TEIXEIRA, D. A.; NASSAR, C. A. G.; RODRIGUES, M. I.; COELHO, C. T. R.; MENDES, L. B. B. Otimização De Meio De Cultura Para Microalgas Com Aplicações Energéticas : Bom Para Economia E Bom Para O Meio Ambiente. p. 1–8, 2015.

TELLES, M. **Efeito da fortificação de Spirulina maxima em rações para tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus): análise bromatológica e avaliação da digestibilidade** Rio de Janeiro - RJ. 2021.

THEVARAJAH, B.; KANKANAMALAGE, G.; HASARA, S.; PREMARATNE, M.; NIMARSHANA, P. H. V; NAGARAJAN, D.; CHANG, J.; ARIYADASA, T. U. Large-scale production of Spirulina -based proteins and c-phycoerythrin: A biorefinery approach. v. 185, n. May, 2022.

TREVISAN, E.; BRANCO, K. B. Z. F.; ARROYO, P. A. Avaliação termogravimétrica da biomassa de Chlorella vulgaris cultivada em diferentes condições nutricionais Thermogravimetric evaluation of the biomass of Chlorella vulgaris cultivated in different nutritional conditions. **Engevista**, p. 242–255, 2019.

UBA, K. I. N.; GAID, G. D.; PERALES, J. M. L.; BONGGA, F. C.; GAID, R. D. From Laboratory to Production: Innovating the Small-scale Mass Production of Spirulina (Arthrospira platensis) with an Alternative Culture Medium and Refined Culture Conditions. **Agricultural Research**, 2024.

UDAYAN, A.; SIROHI, R.; SREEKUMAR, N.; SANG, B. I.; SIM, S. J. Mass cultivation and harvesting of microalgal biomass: Current trends and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 344, n. PB, p. 126406, 2022.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126406>>.

UMETANI, I.; SPOSÓB, M.; TIRON, O. Semi-continuous cultivation for enhanced protein production using indigenous green microalgae and synthetic municipal wastewater. **Journal of Applied Phycology**, n. 0123456789, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-023-03179-6>>.

VERMA, R.; KUMARI, K. V. L. K.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, A. Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104149, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104149>>.

VIDYA, D.; NAYANA, K.; SREELAKSHMI, M.; KEERTHI, K. V.; MOHAN, K. S.; SUDHAKAR, M. P.; ARUNKUMAR, K. A sustainable cultivation of microalgae using dairy and fish wastes for enhanced biomass and bio-product production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 33, n. 2, p. 121–128, 2021.

VIEIRA, M. V.; TURKIEWICZ, I. P.; TKACZ, K.; FUENTES-GRÜNEWALD, C.; PASTRANA, L. M.; FUCIÑOS, P.; WOJDYŁO, A.; NOWICKA, P. Microalgae as a potential functional ingredient: Evaluation of the phytochemical profile, antioxidant activity and in-vitro enzymatic inhibitory effect of different species. **Molecules**, v. 26, n. 24, 2021.

WAGHMARE, A. G.; CHUGH, N.; SAGARAM, U. S.; ARUN, S.; MENON, D.; SUBHASH, G. V.; NAGLE, V.; DATTAROY, T.; DASGUPTA, S. Characterization of storage stability of microalgal biomass for its applications as protein feed ingredients in animal and aquafeeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 288, n. March, p. 115323, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115323>>.

WANG, X.; ZHU, M.; WANG, K.; HE, S.; SHI, X.; YUAN, B.; DONG, B.; WANG, Z. Preparation of core-shell microcapsules based on microfluidic technology for the encapsulation, protection and controlled delivery of phycocyanin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 72, n. April, p. 103361, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103361>>.

XIAO, N.; RUAN, S.; MO, Q.; ZHAO, M.; LIU, T.; FENG, F. Effects of potassium sorbate on systemic inflammation and gut microbiota in normal mice: A comparison of continuous intake and washout period. **Food and Chemical Toxicology**, v. 184, n. November 2023, p. 114443, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114443>>.

YAP, J. K.; SANKARAN, R.; CHEW, K. W.; HALIMATUL MUNAWAROH, H. S.; HO, S. H.; RAJESH BANU, J.; SHOW, P. L. A review manuscript submitted to Chemosphere advancement of green technologies: A comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. **Chemosphere**, 2021.

YU, Y.; HOU, X.; YU, Q.; HUO, Y.; WANG, K.; WEN, X.; DING, Y.; LI, Y.; WANG, Z. A novel two-stage culture strategy to enhance the C-phycocyanin productivity and purity of *Arthrospira platensis*. **Lwt**, v. 184, n. June, p. 115010, 2023.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115010>>.

YU, Z.; ZHAO, W.; SUN, H.; MOU, H.; LIU, J.; YU, H.; DAI, L.; KONG, Q.; YANG, S. Phycocyanin from microalgae: A comprehensive review covering microalgal culture, phycocyanin sources and stability. **Food Research International**, v. 186, n. December 2023, p. 114362, 2024.

ZAHRAN, E.; ELBAHNASWY, S.; AHMED, F.; IBRAHIM, I.; KHALED, A. A.; ELDESSOUKI, E. A. Nutritional and immunological evaluation of *Nannochloropsis oculata* as a potential Nile tilapia-aquafeed supplement. **BMC Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 2023.

ZHOU, Y.; HUANG, Z.; LIU, Y.; LI, B.; WEN, Z.; CAO, L. Stability and bioactivities evaluation of analytical grade C-phycocyanin during the storage of *Spirulina platensis* powder. **Journal of Food Science**, v. 89, n. 3, p. 1442–1453, 2024.

ZHUANG, D.; HE, N.; KHOO, K. S.; NG, E. P.; CHEW, K. W.; LING, T. C. Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. **Chemosphere**, v. 291, n. P2, p. 132932, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132932>>.

ZHUANG, D.; TANG, D. Y. Y.; CHEW, K. W.; LING, T. C. Phycocyanin: A Natural Antioxidant to Combat Free Radicals. **Current Nutrition & Food Science**, 2021.