

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS MICROALGAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA

Gabriel Augusto de Oliveira Moreira¹, Andréia Anschau², Evelyn Pereira Ribeiro Garcia³

RESUMO: O estresse oxidativo, causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), é essencial na inflamação, principalmente as crônicas, mas os tratamentos atuais para doenças inflamatórias são frequentemente limitados ou ineficazes, sendo os antioxidantes a principal profilaxia utilizada. Antioxidantes sintéticos, apesar de seu baixo custo, podem ter efeitos adversos como carcinogenicidade. Em contrapartida, microalgas, que produzem naturalmente compostos antioxidantes como fenólicos e carotenóides, ainda são pouco exploradas comercialmente, indicando uma necessidade de bioprospecção para encontrar linhagens com potencial de aplicação comercial no tratamento de doenças inflamatórias de forma menos nociva ao organismo. Foi avaliado e comparado em dois meios de cultura distintos, o crescimento celular, a concentração de compostos fenólicos, atividade antioxidante e anti-inflamatória de extratos metanólicos não purificados e livres de proteínas de um consórcio de microalgas bioprospectado no município de Dois Vizinhos, no sudoeste do Paraná. A metodologia incluiu a coleta de amostra de água do lago do município e inoculação em meios BBM e CHU. A identificação morfológica, revelou a predominância da espécie *Scenedesmus quadricauda*. O consórcio de microalgas apresentou maior concentração celular em meio BBM. A partir dos resultados das análises de Folin-Ciocalteu e DPPH, constatou-se que os extratos microalgais livres de proteínas apresentaram menor concentração de compostos fenólico (2,98-3,79 mgEqAcGal/L) e menor capacidade antioxidante (9,7-10,7%), e consecutivamente anti-inflamatória, quando comparados ao extratos metanólicos sem purificação (4,74-5,09 mgEqAcGal/L e 6-6,6% de atividade antioxidante). Os resultados obtidos são inferiores aos da literatura, revelando que são necessários novos ensaios a fim de se otimizar as condições de cultivo deste consórcio para favorecer o potencial de aplicação no desenvolvimento de novas terapias para combater doenças associadas ao estresse oxidativo e inflamação.

Palavras-chave: *Scenedesmus quadricauda*, antioxidante, compostos fenólicos

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo é um fator significativo na patogênese da inflamação, associado a doenças como: artrite, doença coronariana, infarto do miocárdio, asma e fibrose cística

¹Discente do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, gabrielaugustomoreira@alunos.utfpr.edu.br

² Doutora, Docente do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, andreiaanschau@utfpr.edu.br

³ Discente do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, eveprgarcia@gmail.com

(Franceschi *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). Hotamisligil (2017) ressalta a limitação ou ineficácia das intervenções existentes para muitas doenças inflamatórias crônicas. Devido ao seu baixo custo e estabilidade, os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados para mitigar os danos oxidativos ao corpo humano, apesar dos potenciais efeitos adversos já relatados, incluindo toxicidade e carcinogenicidade, levando a busca por antioxidantes naturais que apresentam o mesmo efeito terapêutico porém, menos agressivos ao corpo em longo prazo (Barlow, 1990).

As microalgas são microrganismos eucariontes aquáticos fotossintetizantes que produzem naturalmente compostos bioativos como fenólicos e carotenóides, conhecidos por suas potentes propriedades antioxidantes e potencial anti-inflamatório (Saini *et al.*, 2020). Embora amplamente utilizadas na indústria nutracêutica, poucas linhagens de microalgas têm sido exploradas comercialmente, evidenciando a necessidade de novas pesquisas e bioprospecção de microalgas para identificar linhagens com propriedades que possam ser potencialmente exploradas comercialmente (González *et al.*, 2020). Este estudo buscou avaliar e comparar o crescimento celular em dois meios de cultivo diferentes, concentração de compostos fenólicos, atividade antioxidante de diferentes extratos de um consórcio de microalgas bioprospectado de um lago do município de Dois Vizinhos, no sudoeste do Paraná.

2 METODOLOGIA

Uma amostra de água do Lago da Paz (-25.740339, -53.061366), localizado no município de Dois Vizinhos, sudoeste do Paraná, foi coletada e em triplicata foi inoculada em meio Bold's Basal Medium (BBM) e CHU, seguindo o protocolo de Anderson (2005). O cultivo ocorreu sem controle de temperatura (18-32°C) com pH neutro (6,8-7,3), fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 1800 lux, e aeração suplementar. Os cultivos foram conduzidos durante 15 dias. Foi realizada a identificação morfológica pela comparação com bancos de dados. Para a obtenção do extrato, 0,1 g de biomassa seca foi homogeneizada em 1 mL de metanol utilizando agitador orbital, o extrato foi filtrado e lavado três vezes com 10 mL de hexano para fins de purificação, parte do extrato foi clarificada com hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5%, submetido a centrifugação durante 10 min a 3000 rpm e filtrada novamente para eliminação de proteínas. A quantificação de fenólicos foi realizada em triplicata pelo método de Folin-Ciocalteu que consistiu em uma solução composta por 250 µl da

amostra, 250 µl do reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:1 em água), 500 µl da solução de Na₂CO₃ e 4 ml de água destilada, que foi incubada no escuro por 30 min, seguido por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e finalmente, a absorbância foi medida a 725 nm e o resultado foi dado por mgEqAcGal/L (miligramas de equivalente ácido gálico por litro). A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade de captura de radicais livres com a metodologia modificada de Quencher, utilizando em triplicata uma solução metanólica de DPPH 0,5 mM misturada a 200 µl do extrato microalgal a absorbância foi lida a 525 nm após 30 minutos de incubação no escuro e em temperatura ambiente. O percentual de captura de radicais livres foi calculado usando a equação proposta por Brand-Williams *et al.* (1995):

$$Atividade\ Antioxidante(\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

Onde, A_{amostra} é a absorbância da amostra após 30 minutos, e A_{controle} é a absorbância da solução de DPPH controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 evidencia que o consórcio microalgal apresentou maior concentração celular em meio BBM em todas as fases de crescimento microbiano: lag (24h-72h), exponencial (72h-240h) e estacionária (à partir de 240h). A composição do meio CHU apresenta maior diversidade de sais em sua composição e como sugerido por CHU (1942), altas concentrações de determinados sais podem influenciar negativamente no crescimento de algumas espécies de microalgas.

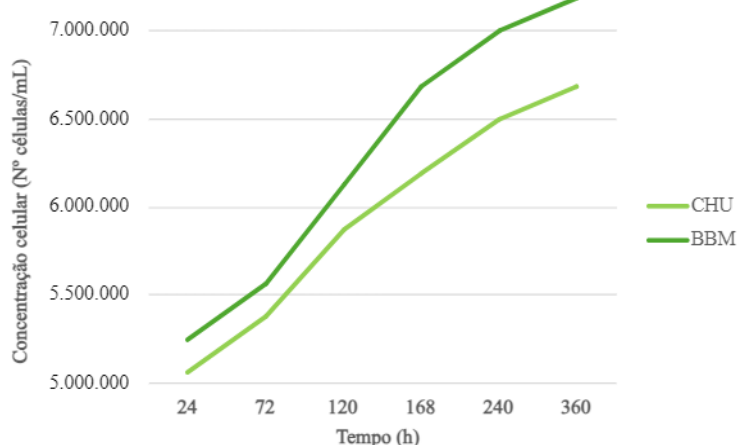


Figura 1: Concentração celular dos cultivos de microalgas em meios CHU e BBM.
Fonte: Autoria própria (2024).

A partir da comparação morfológica com os bancos de dados Blades Biological Ltda e Algaebase, verificou-se que o consórcio é predominantemente composto pela espécie *Scenedesmus quadricauda*, como pode ser observado na Figuras 2.

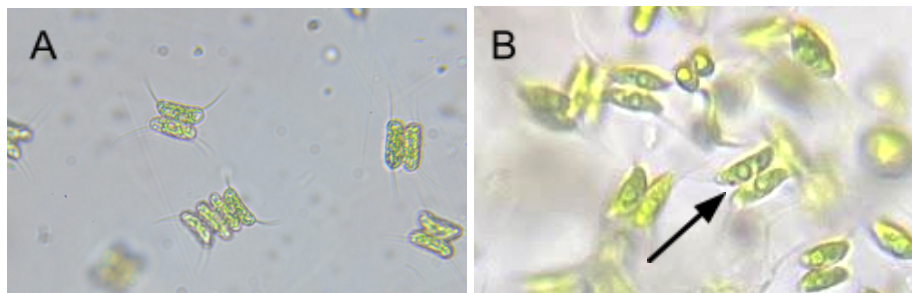


Figura 2A: *Scenedesmus quadricauda*. Fonte: Blades Biological Ltda. Figura 2B : Consórcio microalgal obtido no presente estudo. Fonte: Autoria própria (2024)

A Tabela 1 apresenta a concentração de fenólicos contidos nos extratos metanólicos, mostrando novamente melhores resultados no meio BBM. Comparando os resultados do extrato metanólico comum e o clarificado, livre de proteínas, conforme demonstrado por Agbor *et al.* (2014), as proteínas sofrem uma reação de redução quando em contato com o reagente de Folin–Ciocalteu produzindo compostos que apresentam a mesma faixa de absorção dos compostos fenólicos, causando um falso aumento no teor encontrado em extratos não clarificados. Apesar da redução do teor de fenólicos, os resultados são considerados coerentes com a literatura que aponta que a concentração de fenólicos de extratos microalgais varia de 3 a 14 mgEqAcGal/L (Goiris *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos nos diferentes tipos de extratos

EXTRATOS	mgEqAcGal/L
Metanólico do cultivo em meio CHU	4,74
Metanólico do cultivo em meio BBM	5,09
Metanólico clarificado do cultivo em meio CHU	2,98
Metanólico clarificado do cultivo em meio BBM	3,79

Fonte: Autoria própria (2024).

A Tabela 2 apresenta o percentual de captura de radicais livres que foi inferior ao esperado, uma vez que estudos da literatura relatam que valores acima de 50% de inibição são geralmente considerados indicativos de boa atividade antioxidante (Sacramento *et al.*, 2023).

Tabela 2 – Concentração de Trolox e de atividade antioxidante em diferentes nos extratos

EXTRATOS	Concentração de Trolox ($\mu\text{mol/L}$)	Atividade Antioxidante (%)
Metanólico do cultivo em meio CHU	44,4	9,7%
Metanólico do cultivo em meio BBM	49,2	10,7%
Metanólico clarificado do cultivo em meio CHU	30,0	6,0%
Metanólico clarificado do cultivo em meio BBM	32,0	6,6%

Fonte: Autoria própria (2024).

Esse resultado pode estar relacionado ao tempo insuficiente de reação com o reagente DPPH, visto que em protocolos recentes, o tempo de exposição da amostra com o reagente tem sido aumentado, sendo medido a cada 15 min até que atinja estabilidade, o que leva uma média de 45 min, essa nova metodologia visa melhores resultados (Sacramento *et al.*, 2023).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que houve melhor adaptação do consórcio ao meio de cultivo BBM, que apresentou resultado superior em todas as análises feitas, demonstrando que esse é o meio ideal para o cultivo desse consórcio de microalgas. Constatou-se também que os extratos microalgais livres de proteínas apresentaram menor concentração de compostos fenólicos e menor capacidade antioxidante, e consecutivamente anti-inflamatória, visto que a ação anti-inflamatória está diretamente ligada a capacidade antioxidante, quando comparados ao extratos metanólicos sem purificação. Os resultados obtidos no presente trabalho se mostraram inferiores aos encontrados na literatura, porém são necessários novos ensaios a fim de se otimizar as condições de cultivo da microalga para favorecer o potencial de aplicação destas microalgas no desenvolvimento de novas terapias alternativas para combater doenças associadas ao estresse oxidativo e inflamação crônica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UTFPR e ao LABMULT LABIA (Laboratório Multiusuário de Biotecnologia Ambiental e Alimentos) pela utilização da estrutura essencial para a realização deste trabalho. Também expresso minha gratidão às minhas colegas de pesquisa, Sofia de Souza e Evelyn Pereira, que me introduziram ao tema e contribuíram com esta pesquisa com seu entusiasmo e conhecimento.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, G. A.; VINSON, J. A.; DONNELLY P, E. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J Food Sci, Nutr and Diet*, n. 8, p. 147–156, 2014.
- ANDERSEN, R. A. (ED.). *Algal Culturing Techniques*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2005.
- BARLOW, S. M. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Em: *Food Antioxidants*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990. p. 253–307.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]*, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- FRANCESCHI, C. *et al.* Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature reviews. Endocrinology*, v. 14, n. 10, p. 576–590, 2018.
- GOIRIS, K. *et al.* Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology*, v. 24, n. 6, p. 1477–1486, 2012.
- GONZALEZ, E. G. *et al.* Bioprospection of green microalgae native to Paraná, Brazil using a multi-criteria analysis: Potential for the production of lipids, proteins, and carotenoids. *Bioresource technology reports*, v. 10, n. 100398, p. 100398, 2020.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.
- LIU, J. *et al.* Biomedical application of reactive oxygen species–responsive nanocarriers in cancer, inflammation, and neurodegenerative diseases. *Frontiers in chemistry*, v. 8, 2020.
- SACRAMENTO, V. DE M. *et al.* Métodos para determinação de capacidade antioxidante. Atena Editora, , 3 fev. 2023.
- SAINI, D. K. *et al.* Enhancing production of microalgal biopigments through metabolic and genetic engineering. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 60, n. 3, p. 391–405, 2020.