

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**PAMELA PEREIRA GUARINGUE**

**EFEITO DO pH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA MICROALGA  
POLIEXTREMÓFILA *Galdieria sulphuraria***

**PONTA GROSSA**

**2022**

**PAMELA PEREIRA GUARINGUE**

**EFEITO DO pH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA MICROALGA  
POLIEXTREMÓFILA *Galdieria sulphuraria***

**THE EFFECT OF pH AND DISSOLVED OXYGEN ON THE PRODUCTION OF  
PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF THE  
POLYEXTREMOPHILE MICROALGAE *Galdieria sulphuraria***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia Química  
do Curso de Bacharelado em Engenharia  
Química da Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Cristine  
Novak Sydney

Coorientador: Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

**PONTA GROSSA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**PAMELA PEREIRA GUARINGUE**

**EFEITO DO pH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA MICROALGA  
POLIEXTREMÓFILA *Galdieria sulphuraria***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia Química  
do Curso de Bacharelado em Engenharia  
Química da Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná.

Data de aprovação: 18/novembro/2022

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Cristine Novak Sydney  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Ma. Bárbara Ruivo Válio Barretti  
Mestrado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof. Me. José Mauro Giroto  
Mestrado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**PONTA GROSSA  
2022**

## AGRADECIMENTOS

Nesse espaço, gostaria de primeiramente agradecer os meus orientadores, prof.<sup>o</sup> Eduardo e prof.<sup>a</sup> Alessandra, por toda a ajuda e orientação que me proporcionaram durante a realização do Trabalho de Conclusão de Curso, também por me receberem e me darem autonomia no laboratório. A experiência que tive foi de grande valor para minha formação e espero ter contribuído muito para as futuras pesquisas sobre a microalga *Galdieria sulphuraria*. Também agradeço todos os colegas que tive contato no laboratório, os quais me ensinaram as metodologias utilizadas na pesquisa e todos os procedimentos específicos relacionados à microbiologia durante o período em que frequentei o Laboratório de Fermentações da UTFPR, no Campus Ponta Grossa.

Um agradecimento especial aos meus amigos e amigas da graduação de Engenharia Química, por todos os momentos compartilhados dentro e fora da universidade e todos os trabalhos e estudos que realizamos juntos. O apoio de vocês foi essencial para que eu pudesse chegar ao final dessa jornada.

Agradeço também às minhas melhores amigas de infância, Letícia e Lisiele, por estarem ao meu lado em todas as fases da minha vida e serem meu refúgio para todas as dificuldades que enfrentamos ao longo do caminho.

Obrigada família, em especial meus pais, José Augusto e Cleusa, por me proporcionarem todos os recursos para que eu tivesse a oportunidade de realizar uma graduação de carga horária integral, além de todo o apoio moral e incentivo aos estudos. Obrigada irmã, Raphaela, por todo o suporte e por ser uma grande inspiração na vida acadêmica.

Finalmente, sou grata ao meu parceiro, Egon, por nunca soltar minha mão e por caminhar ao meu lado, me ajudando a realizar todos os nossos sonhos. Obrigada por me inspirar a ir além todos os dias e acreditar no meu potencial.

Dedico este trabalho à todos vocês, que fizeram parte dessa conquista!

## RESUMO

Pesquisas sobre microalgas têm sido consideradas de grande importância devido aos compostos produzidos por elas. A microalga em estudo, *Galdieria sulphuraria*, possui um potencial comercial devido sua capacidade de crescer em meios ácidos (pH de 0 a 4) e temperaturas altas de até 56 °C, além de produzir compostos fenólicos e pigmentos que possuem características antioxidantes, as quais permitem diversas aplicações nas das indústrias alimentícias, indústrias cosméticas e até mesmo na medicina. Estudos realizados por Zimmermann (2019, p. 63) demonstram que o cultivo da microalga *G. sulphuraria* produz diferentes compostos fenólicos comparando cultivo em biorreator e em agitação orbital. Os parâmetros que diferenciam esses dois métodos de cultivo são o pH (devido controle de pH do biorreator) e a oxigenação. Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de analisar o efeito do pH e da quantidade de oxigênio dissolvido no teor de compostos fenólicos totais e no potencial antioxidante da biomassa da microalga. A otimização desses dois parâmetros foi realizada utilizando-se a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e a partir de um planejamento estatístico, com uma ferramenta de extensão do *Excel*, gerou-se 7 experimentos diferentes com as variáveis pH e o oxigênio dissolvido variando em 3 níveis cada. Para a determinação de compostos fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu e com o resultado gerou-se o gráfico de superfície de resposta, o qual mostrou que o cultivo estático mantido em estufa BOD com pH inicial do meio de cultivo igual a 1, pode-se obter uma maior quantidade de compostos fenólicos. Para a determinação da capacidade antioxidante utilizou-se o método DPPH e através da superfície de resposta determinou-se que o melhor cultivo para otimizar esse parâmetro é cultivo estático com pH inicial igual a 5. Concluiu-se que essas foram as condições que podem ser consideradas para otimizar a produção de compostos fenólicos ou de antioxidantes, quantitativamente, dos extratos de *Galdieria sulphuraria*. Nessa pesquisa, não foram consideradas avaliações qualitativas, as quais poderiam especificar quais compostos fenólicos e antioxidantes estão sendo produzidos em cada experimento performado.

**Palavras-chave:** *Galdieria sulphuraria*; microalgas; compostos fenólicos; antioxidantes.

## ABSTRACT

Research on microalgae has been considered of great importance due to the compounds produced by them. The microalgae under study, *Galdieria sulphuraria*, has a commercial potential due to its ability to grow in acidic media (pH from 0 to 4) and high temperatures of up to 56 °C, in addition to producing phenolic compounds and pigments that have antioxidant characteristics, which allow diverse applications in the food industry, cosmetic industries and even in medicine. Studies carried out by Zimmermann (2019) demonstrate that the cultivation of the microalgae *G. sulphuraria* produces different phenolic compounds comparing cultivation in a bioreactor and in orbital agitation. The parameters that differentiate these two cultivation methods are pH (due to pH control bioreactor) and oxygenation. Therefore, this work aims to analyze the effect of pH and amount of dissolved oxygen on the amount of total phenolic compounds and on the antioxidant potential of the microalgae biomass. The optimization of these two parameters was performed using the Response Surface Methodology (RSM) and from a statistical planning, with an *Excel* extension tool, 7 different experiments were generated with the variables pH and dissolved oxygen varying in 3 levels each. For the determination of total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu method was used and with the result, the response surface graph was generated, which showed that the static culture maintained in a BOD incubator with an initial pH of the culture medium equal to 1, a greater amount of phenolic compounds can be obtained. To determine the antioxidant capacity, the DPPH method was used, through the response surface it was determined that the best culture to optimize this parameter is static culture with an initial pH equal to 5. It was concluded that these were the conditions that can be considered to optimize the production of phenolic compounds or antioxidants, quantitatively, from the extracts of *Galdieria sulphuraria*. In this research, qualitative evaluations were not considered, which could specify which phenolic and antioxidant compounds are being produced in each experiment performed.

**Keywords:** *Galdieria sulphuraria*; microalgae; phenolic compounds; antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Galdieria sulphuraria</i> vista em microscópio . . . . .	14
Figura 2 – Estrutura do radical livre estável DPPH . . . . .	18
Figura 3 – Fluxograma da metodologia . . . . .	23
Figura 4 – Cultivos de <i>G. sulphuraria</i> em diferentes pHs e oxigenação . . . . .	24
Figura 5 – Reação dos extratos da amostra 2, cultivo em <i>shaker</i> e pH inicial igual a 3, de <i>G. sulphuraria</i> no método Folin-Ciocalteu e amostra branco . . .	26
Figura 6 – Análise de DPPH da amostra 4, cultivo em <i>shaker</i> com pH inicial igual a 3, e da amostra controle . . . . .	29

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 – Contorno da superfície de resposta CFT</b> . . . . .	<b>27</b>
<b>Gráfico 2 – Superfície de resposta CFT</b> . . . . .	<b>28</b>
<b>Gráfico 3 – Contorno da superfície de resposta EC<sub>50</sub></b> . . . . .	<b>30</b>
<b>Gráfico 4 – Superfície de resposta EC<sub>50</sub></b> . . . . .	<b>31</b>
<b>Gráfico 5 – Contorno da superfície de resposta da AA EAG</b> . . . . .	<b>32</b>
<b>Gráfico 6 – Superfície de resposta da AA EAG</b> . . . . .	<b>33</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Classe de compostos fenólicos em plantas . . . . .</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 2 – Metodologia de Superfície de Resposta . . . . .</b>	<b>21</b>
<b>Tabela 3 – Composição do meio Allen's com adição de glicose (fonte de carbono) . . . . .</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 4 – Determinação de compostos fenólicos totais . . . . .</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 5 – Concentração do extrato e alíquotas do método DPPH . . . . .</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 6 – Determinação de EC<sub>50</sub> . . . . .</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 7 – Determinação de atividade antioxidante EAG . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 8 – Resultados das determinações de CFT e capacidade antioxidante . . . . .</b>	<b>34</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
dO <sub>2</sub>	oxigênio dissolvido
DOE	<i>Design of Experiment</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC <sub>50</sub>	Concentração Efetiva 50%
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	íon bicarbonato
OH <sup>-</sup>	íon hidróxido ou hidroxila
pH	potencial hidrogeniônico
RSM	Metodologia de Superfície de Respostas
UV/VIS	luz ultravioleta e luz visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Contextualização</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>12</b>
1.2.1	Objetivo geral	12
1.2.2	Objetivos específicos	12
<b>1.3</b>	<b>Justificativa</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Microalgas</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Galdieria sulphuraria</i></b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Meios e parâmetros de cultivo</b>	<b>15</b>
2.3.1	Meio Heterotrófico e Autotrófico	15
2.3.2	Efeito do pH no crescimento	16
2.3.3	Efeito do Oxigênio Dissolvido no Crescimento	16
<b>2.4</b>	<b>Compostos fenólicos e antioxidantes</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Local</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Material</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Planejamento estatístico</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Métodos de determinação de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante</b>	<b>21</b>
3.4.1	Meio de cultivo	21
3.4.2	Metodologia	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Determinação de compostos fenólicos totais</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Determinação do potencial antioxidante com o método DPPH</b>	<b>27</b>
4.2.1	Concentração efetiva 50% (EC <sub>50</sub> )	27
4.2.2	Atividade antioxidante (AA) equivalente de ácido gálico (EAG)	31
<b>4.3</b>	<b>Resumo do resultado da RSM</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> . . . . .	<b>36</b>
------------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A seguir, como forma de introdução ao presente trabalho, apresenta-se uma contextualização do tema e os objetivos.

### 1.1 Contextualização

As microalgas têm sido alvo de grande apreço, por cientistas e empresários, nos últimos anos devido a algumas moléculas de interesse industrial ou comercial que elas produzem. Suas aplicações em alimentos já vêm sendo realizadas há alguns anos, como fonte de proteínas, pigmentos, vitaminas e antioxidantes. Wang *et al.* (2015) salienta que microalgas também já são utilizadas em tratamentos de água, biocombustíveis e horticulturas.

Existe uma demanda de produtos com ingredientes menos agressivos ou formulações totalmente naturais na área cosmética. Isso porque a indústria cosmética está em constante evolução e os consumidores, devido ao acesso à informação e polêmicas envolvendo ingredientes sintéticos nocivos à saúde, principalmente de pessoas com sensibilidades ou doenças de pele, ou então por questões ambientais, exigem cada vez mais e tendem a optar por cosméticos com formulações menos agressivas.

Estudos envolvendo cultivos da *Galdieria sulphuraria* demonstram que sua biomassa fornece compostos fenólicos, como por exemplo o estudo realizado por Zimermann (2019), que avaliou o cultivo dessa microalga em permeado de soro de leite e obteve uma produção significativa de catequina e de ácido elágico dentre os compostos fenólicos avaliados. Compostos fenólicos atuam como antioxidantes e, portanto, têm a função de impedir a oxidação lipídica, mantendo as propriedades dos cosméticos e evitando qualquer instabilidade no cheiro e na aparência (WANG *et al.*, 2015). Antioxidantes também são conhecidos por prevenirem o envelhecimento de células e outros danos à pele. Dentre os tipos de antioxidantes, além dos compostos fenólicos, podemos citar: vitamina C, vitamina E, carotenoides (astaxantina, por exemplo) e alguns minerais (como o zinco).

Apesar de os estudos sobre a microalga *Galdieria sulphuraria* serem recentes, ela possui um grande potencial de comercialização devido às suas características extremófilas, já que possui a capacidade de se desenvolver em ambientes extremos em que muitos microrganismos não conseguem.

O potencial hidrogeniônico (pH) e a oxigenação em meios de cultivo implicam no favorecimento ou desfavorecimento de crescimento de microrganismos, sendo que cada um tem suas particularidades em relação ao meio ótimo a ser cultivado. A importância dessa pesquisa se justifica por todos os levantamentos citados com relação à indústria cosmética e às características promissoras da microalga em questão. Com a análise a ser realizada será possível identificar as melhores condições de cultivo, as quais são capazes de aumentar a produção de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante da biomassa da *G. sulphuraria*. Esse trabalho servirá de

base para posteriores estudos com relação à aplicação dos compostos fenólicos produzidos por essa microalga, os quais não precisam se limitar a aplicações cosméticas.

## 1.2 Objetivos

A seguir, apresentam-se os objetivos gerais e específicos do estudo.

### 1.2.1 Objetivo geral

Analisar o efeito do pH e o teor de oxigênio dissolvido no teor de compostos fenólicos e no potencial antioxidante da biomassa da microalga *G. sulphuraria*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- I. Realizar o cultivo da *G. sulphuraria* com agitação mecânica (orbital), pneumática e sem agitação em diferentes pHs iniciais;
- II. Determinar os compostos fenólicos totais das biomassas produzidas;
- III. Avaliar o potencial antioxidante das biomassas;
- IV. Comparar os resultados obtidos em cada situação de cultivo proposta.

## 1.3 Justificativa

Pesquisas realizadas no laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Campus Ponta Grossa), envolvendo a *Galdieria sulphuraria*, demonstraram que a biomassa dessa alga nos fornece significantes quantidades de compostos fenólicos. Experimentos realizados por Zimermann (2019, p. 63) demonstram que em diferentes condições de cultivo, a *G. sulphuraria* produz quantidades diferentes de compostos fenólicos e também diferentes tipos desses compostos; sendo que o cultivo em biorreator produziu maiores quantidades de ácido elágico e o cultivo com agitação orbital produziu grandes quantidades de catequina. As diferenças entre essas condições de cultivo estão no controle de pH e no teor de oxigênio dissolvido no meio. Desse modo, o presente estudo irá verificar a influência dessas variáveis para se obter maior quantidade de compostos fenólicos e antioxidantes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Microalgas

O Reino Protista é constituído principalmente por seres eucariontes diversos, como protozoários e algas, que não são classificáveis em outros reinos. Incluindo as algas unicelulares, que também são conhecidas como microalgas por terem a característica microscópica. As microalgas estão presentes no fitoplâncton, o qual serve de alimento para seres que vivem em ambientes aquáticos. Portanto, são importantes para a produtividade desse ambiente (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Devido à biodiversidade das microalgas existentes, em relação à morfologia, metabolismo, tamanho e pigmentos, elas são classificadas em grandes grupos. Para as procarióticas temos o Cyanophyta e Prochlorophyta. Já as eucarióticas possuem 9 filos, são eles: Chlorophyta, Chlorarachniophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Glaucophyta, Haptophyta, Heterokontophyta e Rhodophyta (MUTANDA, 2013). Microalgas são seres capazes de realizar fotossíntese, onde é sintetizado oxigênio e liberado para o meio. Desse modo, a maioria das algas possuem a Clorofila a (principal clorofila para fotossíntese) presente em suas células. Portanto, uma das características que diferem os filos entre si é a presença das clorofilas b, c, d, e, ou até mesmo outros pigmentos (PELCZAR; REID; CHAN, 1980; BETSY; KEOGH, 2005).

Existem algumas microalgas que já são exploradas e comercializadas há tempos, como a *Arthrospira spp.*, conhecida como *Spirulina*, e a *Chlorella spp.* (NAIDOO *et al.*, 2013). A *Spirulina spp.* pertence ao grupo Cyanophyta, que são as cianobactérias ou algas azuis e são bactérias fotossintetizantes, porém tratadas como microalgas. A *Chlorella* é uma alga verde (Chlorophyta). As algas desses gêneros ganham destaque pela alta quantidade de proteínas que possuem em sua composição, chegando a mais de 60% de seu peso seco em condições favoráveis de crescimento (HU; LIU, 2013; OLIVEIRA, 2003). Ambas são comercializadas como *Superfoods*, um superalimento ou suplemento nutricional, pois possuem características nutritivas muito atrativas se comparadas às plantas incluídas na alimentação humana (JASSBY, 1988). Além do alto teor de proteínas, são ricas em vitaminas, minerais, esteróis e produzem ácidos graxos insaturados, pigmentos (carotenoides e ficobilinas) e compostos fenólicos (ANDRADE *et al.*, 2018; HU; LIU, 2013).

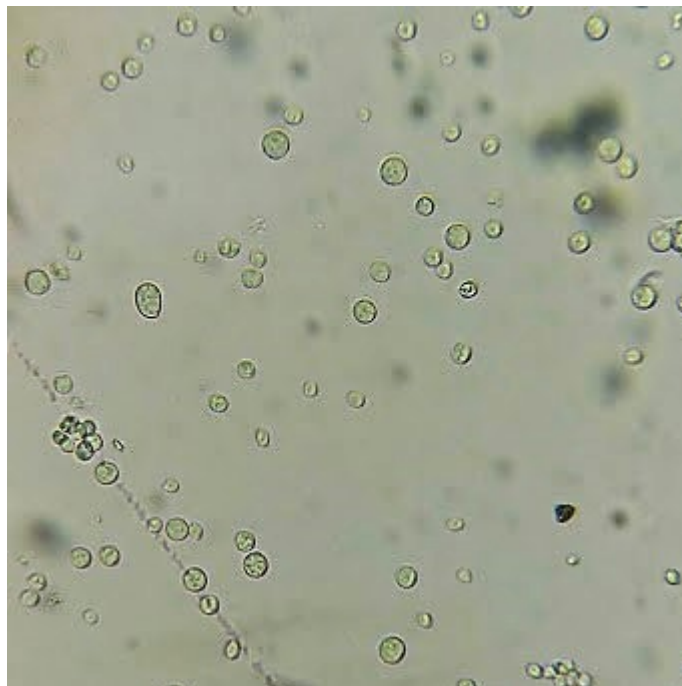
As aplicações das microalgas estão voltadas à nutrição humana e animal, indústria farmacêutica e cosmética, agricultura e existem até mesmo pesquisas sobre combustíveis de microalgas, já que por meio da fotossíntese elas podem transformar o gás carbônico em biomassa e, posteriormente, em energia (DERNER *et al.*, 2006; RICHMOND; HU, 2013; TRIPATHI; SINGH; THAKUR, 2015). Assim, diante das inovações constantes do mercado e de diversos setores, reconhece-se a importância dos estudos relacionados às microalgas e às propriedades de interesse produzidas por elas para possíveis aplicações em diferentes ramos comerciais ou industriais.

## 2.2 *Galdieria sulphuraria*

As chamadas algas vermelhas fazem parte do filo Rhodophyta, apesar do nome elas podem apresentar diversas outras colorações além do vermelho. Como Oliveira (2003, p. 144) ressalta “isto se deve aos numerosos pigmentos que apresentam, e que em sua essência são os mesmos que encontramos nas Cyanobacteria, isto é, clorofila a (verde), ficobilinas azuis (ficocianinas) e vermelhas (ficoeritrinas), e pigmentos amarelados e alaranjados (carotenoides)”.

A microalga *Galdieria sulphuraria* faz parte do grupo das algas vermelhas, da ordem Cyanidiales, sendo encontrada em águas termais sulfurosas, as quais possuem pH menor que 5, portanto, é um microrganismo adaptável à meios ácidos (JU *et al.*, 2016). O estudo feito por Barcyté *et al.* (2018) demonstra a característica morfológica da microalga em questão, identificando uma parede celular espessa e a presença de cloroplastos azuis-esverdeados. Além disso, as algas desse gênero se reproduzem apenas de maneira assexuada (EREN *et al.*, 2018) por mitose. Na Figura 1, pode-se ver uma imagem real das células de *G. sulphuraria* vistas em microscópio.

**Figura 1 – *Galdieria sulphuraria* vista em microscópio**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

Uma característica importante que chama a atenção dos pesquisadores é que as algas comercializadas, como as já mencionadas anteriormente (*Spirulina spp.* e *Chlorella spp.*), conseguem crescer em condições extremas. A *Spirulina* cresce em pH muito alcalino e com alta concentração de bicarbonatos, já a *Chlorella* cresce em meios ricos em nutrientes diversos. Esse fator permite que elas sejam cultivadas em espaços ao ar livre porque outros microrganismos não resistem às mesmas circunstâncias e não contaminam as culturas dessas microalgas



(BARSANTI; GUALTIERI, 2014). Desse modo, podemos denomina-las microalgas extremófilas ou poliextremófilas, em caso de suportar mais de uma condição incomum.

A *G. sulphuraria* se enquadra nesse padrão e segundo Sydney *et al.* (2019) as condições extremas que elas suportam são:

- I. pH extremamente ácido, de 0 a 4;
- II. temperaturas altas de até 56 °C.

## 2.3 Meios e parâmetros de cultivo

### 2.3.1 Meio Heterotrófico e Autotrófico

Meios de cultura para microrganismos variam muito em composição de acordo com seus objetivos e com o ser vivo a ser cultivado, portanto, não existe uma fórmula universal. Existem substâncias que podem inibir o crescimento de um determinado microrganismo (ALTERTHUMM, 2001). As principais moléculas que os nutrientes de um meio de cultivo devem conter são: oxigênio, carbono, hidrogênio e nitrogênio. O carbono é um elemento essencial presente em todas as moléculas orgânicas e o oxigênio é importante para organismos aeróbicos (BETSY; KEOGH, 2005).

Também é importante definir se o microrganismo consegue crescer em condições heterotróficas ou autotróficas. Seres heterotróficos se alimentam de compostos produzidos por outros seres, desse modo adquirem carbono de proteínas, ácidos graxos, carboidratos ou de outros nutrientes (BETSY; KEOGH, 2005). E os autotróficos utilizam a energia solar e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para suprir suas necessidades, produzindo seu próprio alimento ou outros compostos de interesse.

Se tratando de algas, identificá-las apenas como seres autotróficos não é correto. Muitas das divisões já mencionadas possuem espécies que não contêm os pigmentos fotossintetizantes para realizar fotossíntese, outras não conseguem sintetizar determinados compostos essenciais e devem utilizar o mecanismo heterotrófico para se alimentar. No geral, existem microalgas que misturam os dois mecanismos ou então utilizam de um deles como o principal ou exclusivo para se manter viva. Seres que utilizam o meio heterotrófico e autotrófico para sobreviver podem ser chamados de organismos mixotróficos (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Para realizar um cultivo heterotrófico deve-se fornecer fontes de carbono como substrato e para o cultivo autotrófico é necessário de iluminação para que os microrganismos realizem fotossíntese.

### 2.3.2 Efeito do pH no crescimento

O pH é um dos grandes fatores a modificar o crescimento de uma biomassa de microalgas. Isso porque influencia na fixação de  $\text{CO}_2$  por esses organismos fotossintetizantes, que transformam o  $\text{CO}_2$  em biomassa (TRIPATHI; SINGH; THAKUR, 2015). Algumas algas podem possuir uma faixa de pH que favorece seu crescimento (JUTSON; PIPE; TOMAS, 2016).

Muitos microrganismos não suportam valores de pH muito afastados do neutro (pH 7). O pH afeta o metabolismo das algas, pois ele pode modificar a solubilidade de um meio, a presença de  $\text{CO}_2$  e de outros nutrientes. O aumento do pH diminui a disponibilidade de carbono que provém do  $\text{CO}_2$ , isso afeta o crescimento da alga. Assim como uma diminuição também altera o meio, podendo instigar a formação de metais e inibir a de nutrientes. Portanto, deve-se ter o cuidado com controle do pH para não provocar mudanças bruscas, que são muito prejudiciais ao crescimento das microalgas (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013; KHAN; SHIN; KIM, 2018).

Para meios alcalinos as células devem contar com a presença de carbonatos, como o íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), sendo a fonte de carbono no lugar do  $\text{CO}_2$  (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013). O íon  $\text{HCO}_3^-$  pode se dissociar e formar  $\text{CO}_2$  e íon hidróxido ou hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). O  $\text{CO}_2$  formado também poderá ser utilizado na atividade fotossintética das algas e o íon de caráter alcalino,  $\text{OH}^-$ , nos leva a um aumento do pH da solução durante esse processo (GROBBELAAR, 2013).

O pH no interior da célula deve ser menor do que o do meio alcalino, como é explicado a seguir:

[...] para crescer bem em um meio ácido ou básico, um microrganismo deve ser capaz de manter seu pH intracelular em torno de 7,5, não importando qual o valor do pH externo. Uma célula viva tem a habilidade dentro de limites próprios, de manter o pH interno constante pela expulsão ou absorção de íons hidrogênio pela célula. (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996, p. 173)

No caso do meio com íons  $\text{HCO}_3^-$  dominando, a fotossíntese é menos efetiva, já que as algas têm mais dificuldade de aproveitar o carbono nesse formato e manter suas atividades (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013).

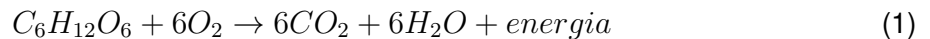
### 2.3.3 Efeito do Oxigênio Dissolvido no Crescimento

A aeração pode ser realizada através de uma leve agitação manual ou automática do frasco ou então fornecendo uma vazão de ar para o meio. Para diversas microalgas esse processo pode ser prejudicial e impedi-las de crescer, mas para alguns organismos heterotróficos é importante, também evita que grandes concentrações de células se aglomerem em um espaço e esgotem os nutrientes dele (JUTSON; PIPE; TOMAS, 2016). Para esse trabalho, define-se a

agitação em shaker, equipamento que fornece uma leve agitação automática do frasco, como agitação mecânica (orbital) e a injeção da vazão de ar como agitação pneumática.

O objetivo da aeração é fornecer oxigênio dissolvido ( $dO_2$ ) ao meio de cultivo. No fim do ciclo respiratório, em células aeróbicas, elétrons liberados durante o processo de oxidação da fonte de carbono se combinam com o oxigênio e formam moléculas de água ao se juntar com prótons ( $H^+$ ). No ciclo também há a formação de moléculas Adenosina Trifosfato (ATP) pelas moléculas Adenosina Difosfato (ADP), que armazenam energia. Ambas irão colaborar na produção de biomassa das microalgas, sintetizando moléculas de interesse para a sobrevivência dos organismos, onde a energia será necessária. Por fim, para que ocorra o crescimento da biomassa é necessário o consumo de fontes de carbono, como a glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e então deve-se ter o oxigênio dissolvido para realizar a oxidação (SCHMIDELL, 2001).

A reação resumida do ciclo respiratório se dá pela Equação (1).



Devido a esse papel do oxigênio no processo fermentativo da biomassa, ele geralmente será um fator limitante nos processos. Por esse motivo, não adianta fornecer grandes quantidades de nutrientes (como a glicose) se não houver oxigênio dissolvido suficiente; ainda, o oxigênio não é muito solúvel em água e terá um limite de concentração suportável para se dissolver no meio (SCHMIDELL, 2001).

## 2.4 Compostos fenólicos e antioxidantes

Compostos fenólicos são estruturas que compõem uma classe de antioxidantes naturais. Eles geralmente são encontrados em plantas, atuando no seu crescimento e reprodução. Em frutas ou vegetais também podem proporcionar algumas características ou propriedades, como coloração, aroma, estabilidade oxidativa, ação antimicrobiana e antifúngica (ANGELO; JORGE, 2007; BIERHALS *et al.*, 2009).

Há uma grande abrangência de compostos que podem ser classificados como compostos fenólicos, como: ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas, fenóis simples e cumarinas. E suas moléculas, justificando o nome dado ao grupo, contam com ao menos um anel aromático e hidroxilas. A Tabela 1 nos mostra alguns exemplos de classes de compostos fenólicos e suas respectivas fórmulas moleculares.

A importância dessas moléculas é destacada pelo seu potencial uso como conservantes e antioxidantes (ANGELO; JORGE, 2007). Desse modo, pesquisadores buscam encontrar aplicações dos compostos fenólicos em alimentos e cosméticos. Antioxidantes possuem a função de impedir a oxidação de substratos, sendo que os antioxidantes de compostos fenólicos atuam sequestrando radicais livres (SOARES, 2002). Radicais livres são moléculas muito reativas, res-

**Tabela 1 – Classe de compostos fenólicos em plantas**

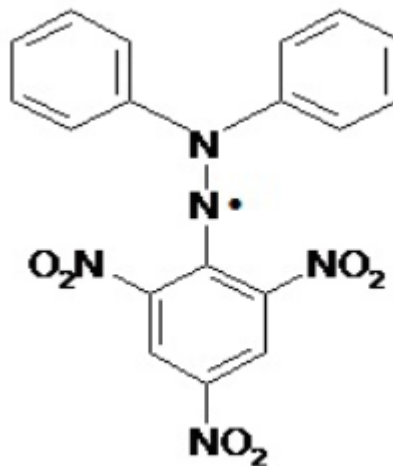
Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzoicos	C6-C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6-C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6-C3
Nafitoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilbenos, antoquinonas	C6-C2-C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6-C3-C6
Lignananas, neolignananas	(C6-C3) <sub>2</sub>
Biflavonóides	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>
Ligninas	(C6-C3) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>

**Fonte: (ANGELO; JORGE, 2007).**

ponsáveis pelo envelhecimento das células e relacionados a doenças como o câncer, diabetes, úlceras e arteriosclerose (BIERHALS *et al.*, 2009; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Para determinar a quantidade de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e do potencial antioxidante, métodos espectrofotométricos de detecção da faixa de luz ultravioleta e luz visível (UV/VIS) são utilizados. Para determinar o CFT, pode-se aplicar o método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton e Rossi (1965), que utiliza o ácido gálico como padrão e o resultado é expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (XU; CHANG, 2009).

Por outro lado, a determinação da atividade ou potencial antioxidante pode ser realizada através do reagente 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). O princípio do método é monitorar a capacidade de uma amostra reduzir ou neutralizar o radical da molécula DPPH, a qual possui um radical livre orgânico e estável, conforme observa-se na Figura 2.

**Figura 2 – Estrutura do radical livre estável DPPH**

**Fonte: Oliveira (2015).**

Assim, ela recebe um hidrogênio ou um elétron da substância antioxidante, passando de uma coloração violeta para uma coloração mais clara. Por fim, a absorbância é medida em espectrofotômetro UV/VIS e a capacidade antioxidante é calculada (OLIVEIRA, 2015). Essa capacidade é determinada pela Concentração Efetiva 50% (EC<sub>50</sub>), que corresponde à concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH (PIRES *et al.*, 2017; RUFINO *et al.*, 2007).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, são apresentados o local, os materiais e os métodos utilizados nessa pesquisa.

#### 3.1 Local

Os ensaios foram realizados nos laboratórios D002 e D003 da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa.

#### 3.2 Material

Foi utilizada uma suspensão isolada da microalga *Galdieria sulphuraria*, (SAG 107.79), adquirida de uma Coleção de Culturas de Algas da Universidade de Göttingen (SAG - The Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen). Para preparar o cultivo-mãe, a amostra isolada da microalga é recolhida com uma alça de metal esterilizada através da flambagem (passagem pelo bico de Bunsen) e inoculada em meio de cultivo ácido. Essa suspensão é mantida em estufa BOD para utilização em experimentos.

#### 3.3 Planejamento estatístico

Foi realizado um processo de otimização utilizando a Metodologia de Superfície de Respostas (RSM), uma técnica amplamente usada para modelar processos em que a resposta de interesse (nesse caso, CFT e DPPH) é influenciada pelas variáveis pH e oxigenação. Como modelos de primeira ordem não são suficientes, um Planejamento Composto Central (CCD) foi gerado a fim de estimar com mais precisão o comportamento matemático do acúmulo de biocompostos antioxidantes.

Cada cultivo realizado varia em valores de pH e condição de oxigênio dissolvido. A metodologia a seguir definiu o número de experimentos e os valores de pH e  $dO_2$  utilizados para formar o gráfico de superfície de resposta a ser analisado.

Para aplicar a RSM foi necessário utilizar uma ferramenta de extensão para Excel: *Design of Experiment* (DOE). O programa estatístico faz a combinação dos fatores a serem analisados (pH e  $dO_2$ ) que, somados aos 3 pontos centrais, geraram 7 experimentos (Tabela 2). As variáveis Resposta 1 e Resposta 2 são, respectivamente CFT e atividade antioxidante DPPH, e o nível de significância considerado foi de 5%.

Os valores de  $dO_2$  foram codificados de tal maneira: -1 para cultivo estático, 0 para shaker e +1 para cultivo aerado. Posteriormente, os valores de pH, que variam de 1 a 5, também foram codificados para a geração dos gráficos em valores de -1 a +1: sendo -1 para pH 1 (mais ácido), 0 para pH 3 (ponto central) e +1 para pH 5 (menos ácido). Na Tabela 2, a variável pH

**Tabela 2 – Metodologia de Superfície de Resposta**

Experimento	pH	dO <sub>2</sub>	Resposta 1	Resposta 2
1	5	-1		
2	3	0		
3	5	1		
4	3	0		
5	1	-1		
6	1	1		
7	3	0		

Fonte: Autoria própria (2019).

está indicada com seus valores reais e o dO<sub>2</sub> em forma codificada. A partir de todos os valores, a ferramenta definiu o modelo de uma equação matemática (Equação (2)) para cada variável resposta, capaz de prever o comportamento das variáveis respostas de acordo com os fatores avaliados.

$$Resposta = b_0 + b_1[pH] + b_2[dO_2] + b_3[pH][dO_2] \quad (2)$$

Nessa equação,  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  são os coeficientes, os quais são definidos para cada resposta e os fatores pH e dO<sub>2</sub> estão na forma codificada. Essa equação gera um modelo de superfície de resposta, isto é, um gráfico em 3D com curvaturas. Por meio dele podemos indicar as faixas dos melhores valores de pH e dO<sub>2</sub> para fornecer um resultado que maximize o teor de CFT e o potencial antioxidante, os quais são os pontos mais altos ou mais baixos da curva.

### 3.4 Métodos de determinação de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante

As amostras foram inoculadas no meio de cultivo (descrito na subseção 3.4.1), o qual foi distribuído em frascos de Erlenmeyer, e todos os procedimentos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar para garantir que todos os elementos se mantivessem esterilizados.

#### 3.4.1 Meio de cultivo

O meio padrão utilizado para cultivo da microalga foi o Allen's com adição de glicose (Tabela 3). O pH do meio de cultivo foi ajustado conforme planejamento estatístico (seção 3.3) com a utilização de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e NaOH de concentração 1M. A *G. sulphuraria* foi cultivada em Erlenmeyer, mantida durante 10 dias sob a temperatura de 45 °C.

Foram realizados 3 tipos de cultivos: em shaker, estático e com aeração forçada. O cultivo estático foi realizado em estufa BOD; o cultivo em shaker foi realizado em agitadora orbital; o cultivo aerado foi realizado em estufa BOD com aeração forçada por compressor de ar.

**Tabela 3 – Composição do meio Allen's com adição de glicose (fonte de carbono)**

Reagente	Fórmula	Concentração
Sulfato de Amônio	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1,32 g. L <sup>-1</sup>
Fosfato de Potássio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,27 g. L <sup>-1</sup>
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g. L <sup>-1</sup>
Cloreto de Cálcio Dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,074 g. L <sup>-1</sup>
Cloreto de Ferro	$\text{FeCl}_3$	11 mg. L <sup>-1</sup>
Ácido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,8 mg. L <sup>-1</sup>
Cloreto de Manganês	$\text{MnCl}_2$	1,8 mg. L <sup>-1</sup>
Sulfato de Zinco Heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,218 mg. L <sup>-1</sup>
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4$	0,05 mg. L <sup>-1</sup>
Metavanadato de Amônio	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,023 mg. L <sup>-1</sup>
Molibdato de Sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,024 mg. L <sup>-1</sup>
Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	10 g. L <sup>-1</sup>

Fonte: adaptado de Kawachi *et al.* (2013).

Os materiais e os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

### 3.4.2 Metodologia

Na Figura 3 está resumida a metodologia utilizada nesse trabalho, desde a preparação de cada um dos 7 cultivos planejados até a preparação do extrato para a execução das análises de CFT e DPPH.

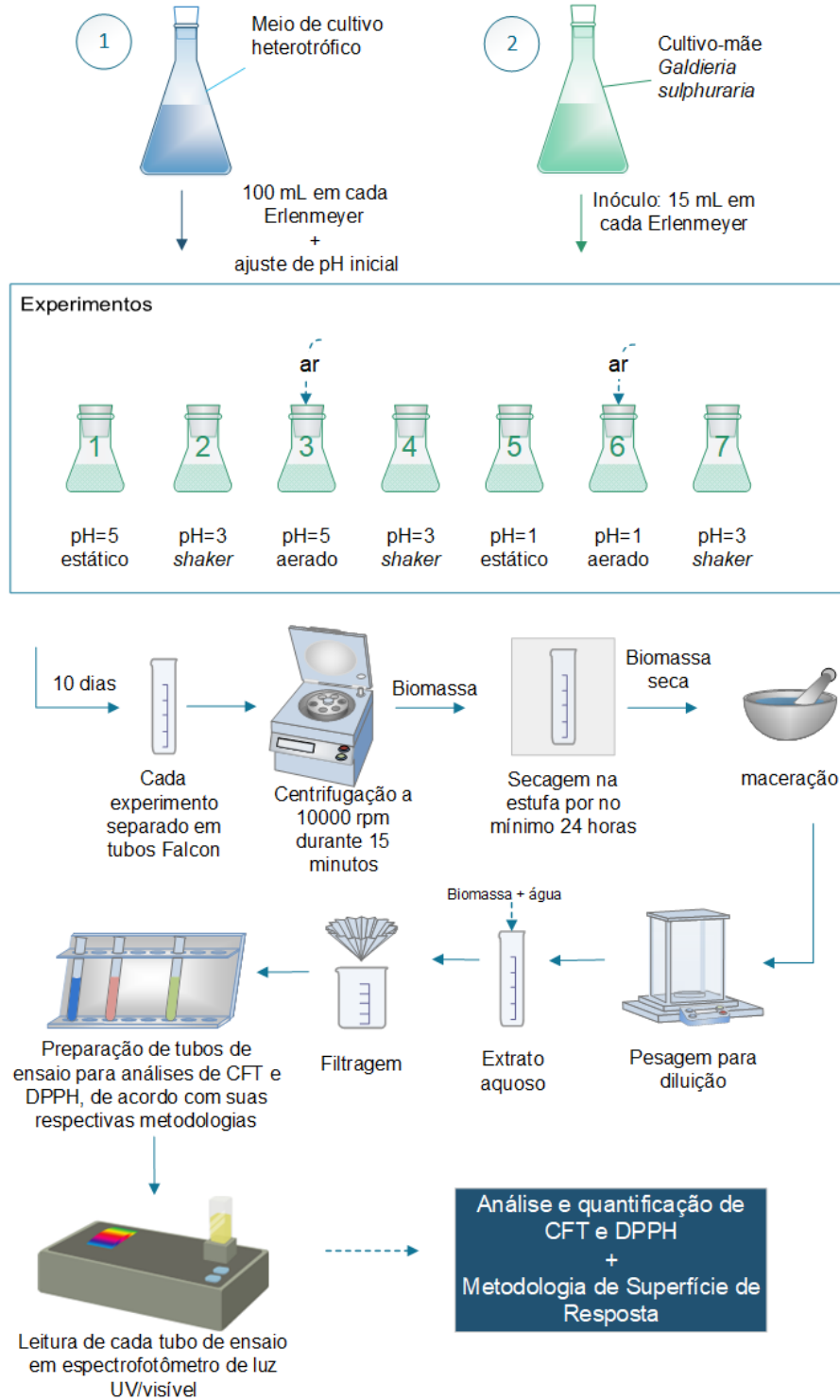
Os cultivos, mencionados no Planejamento estatístico (seção 3.3) e ilustrados na Figura 3, tiveram seus pHs iniciais definidos entre 1 e 5. O pH ajustado de cada meio de cultivo foi apenas o inicial, antes de inocular a microalga, e não houve acompanhamento ou ajuste de pH durante o cultivo ou no final do experimento. Após 10 dias de crescimento das células, centrifugou-se cada amostra para obtenção da biomassa úmida, a fração líquida foi descartada e a fração sólida (biomassa) passou por um processo de secagem em estufa.

A trituração foi o método escolhido para a extração dos compostos fenólicos e antioxidantes, portanto, as amostras secas ou biomassas secas foram maceradas com a utilização de um almofariz e pistilo. Essa etapa se faz importante para que ocorra o aumento da superfície de contato entre as moléculas presentes no extrato e os reagentes dos métodos de quantificação desse estudo, o que possibilita a ocorrência das reações de interesse. O solvente utilizado para a preparação de cada extrato foi a água e, após 3 horas de repouso e protegidos da luz, foi realizada a filtragem, através de filtros descartáveis de seringa, para remover os resíduos sólidos que afetariam a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV/VIS.

Na Figura 4, é possível verificar a aparências dos experimentos nas fases finais do cultivo.



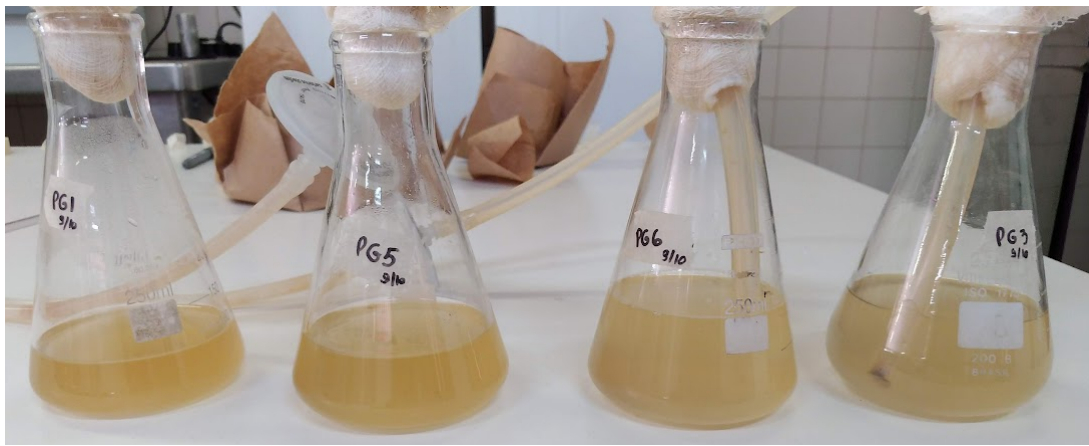
**Figura 3 – Fluxograma da metodologia**



Fonte: Autoria própria (2022).

**Figura 4 – Cultivos de *G. sulphuraria* em diferentes pHs e oxigenação**

**(a) Experimentos 1 (estático), 5 (estático) e 6 e 7 (aerado)**



**(b) Experimento 3 (aerado)**



**(c) Experimentos 2, 4 e 7 (em shaker)**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação de compostos fenólicos totais

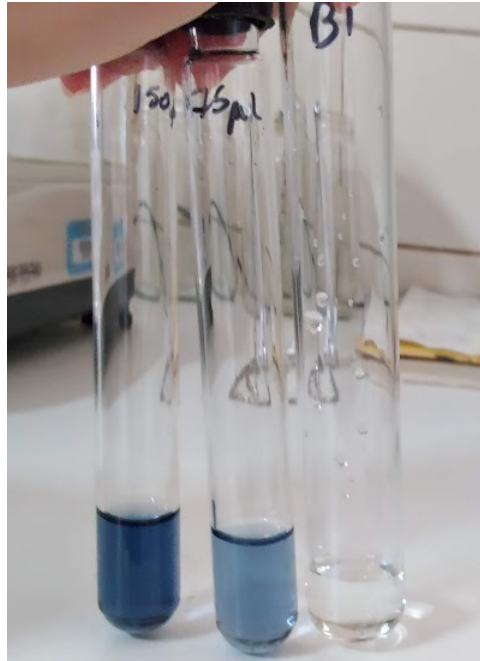
A quantificação de CFT se deu pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton e Rossi (1965), em que é utilizado o ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (reagente Folin-Ciocalteu), o qual reduz as hidroxilas dos compostos fenólicos presente na biomassa e uma coloração azul entre 620 e 740 nm é absorvida. O método exige a preparação de um padrão de algum composto fenólico, a fim de comparar com os resultados da amostra analisada (ANGELO; JORGE, 2007). Nesse experimento, foi utilizada a solução padrão de ácido gálico de concentração 200 mg/L. A curva de calibração para o ácido gálico foi plotada com concentrações variando de 0 a 10 mg de ácido gálico/L. A composição do tubo de ensaio para cada ponto da curva, realizados em triplicata, foi: 150 µL de ácido gálico diluído (regulado com água para atingir a concentração de cada ponto), 2400 µL de água destilada, 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,25 N e 300 µL da solução de carbonato de sódio 10%. Sem exposição à luz, os tubos de ensaio reagiram por 1 hora antes da medição da absorbância a 725 nm em espectrofotômetro de luz. A equação da curva de calibração foi:  $y = 12,5x - 0,3824$ , sendo y o valor da concentração de ácido gálico (AG) e x o valor da absorbância.

Para as amostras de cultivo aerado e em shaker foram preparados extratos aquosos 1:10, em que a concentração é de 0,1 g de biomassa seca/g de água, e para as amostras de cultivo estático foram preparados extratos de 1:100, devido à menor quantidade de biomassa obtida nos experimentos 1 e 5. Os 7 tubos de ensaios preparados para leitura de absorbância, seguindo a lógica da curva de AG, tiveram a seguinte composição: 150 µL de extrato preparado, 2400 µL de água destilada, 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,25 N e 300 µL da solução de carbonato de sódio 10%. Para zerar o espectrofotômetro foi preparada a amostra “branco”, substituindo os 150 µL de extrato por uma mesma quantidade de água, a qual não reage com o reagente utilizado. Nesse método, a coloração durante a reação passa de transparente para azul, com a intensidade da cor proporcional à quantidade de compostos fenólicos no extrato. A Figura 5 mostra um exemplo, com a comparação da reação dos extratos da amostra 2 com reagente de Folin-Ciocalteu, visto da esquerda para a direita: solução mais concentrada (com 150 µL de extrato 1:10), solução menos concentrada (com 75 µL de extrato 1:10 e 75 µL de água) e amostra branco.

A leitura da absorbância foi realizada após 1 hora e, com a equação da curva de calibração, foi possível determinar o CFT das amostras da microalga, expressos em mg Equivalente de ácido gálico (EAG) a cada 100 mL de extrato seco, conforme mostrado na Tabela 4.

Com os dados obtidos e com os valores dos fatores pH e  $dO_2$  na forma codificada, conforme mencionado na seção 3.3, foi possível gerar o modelo matemático (Equação (3)) referente à resposta de CFT através do software estatístico *Minitab 14*.

**Figura 5 – Reação dos extratos da amostra 2, cultivo em *shaker* e pH inicial igual a 3, de *G. sulphuraria* no método Folin-Ciocalteu e amostra branco**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

**Tabela 4 – Determinação de compostos fenólicos totais**

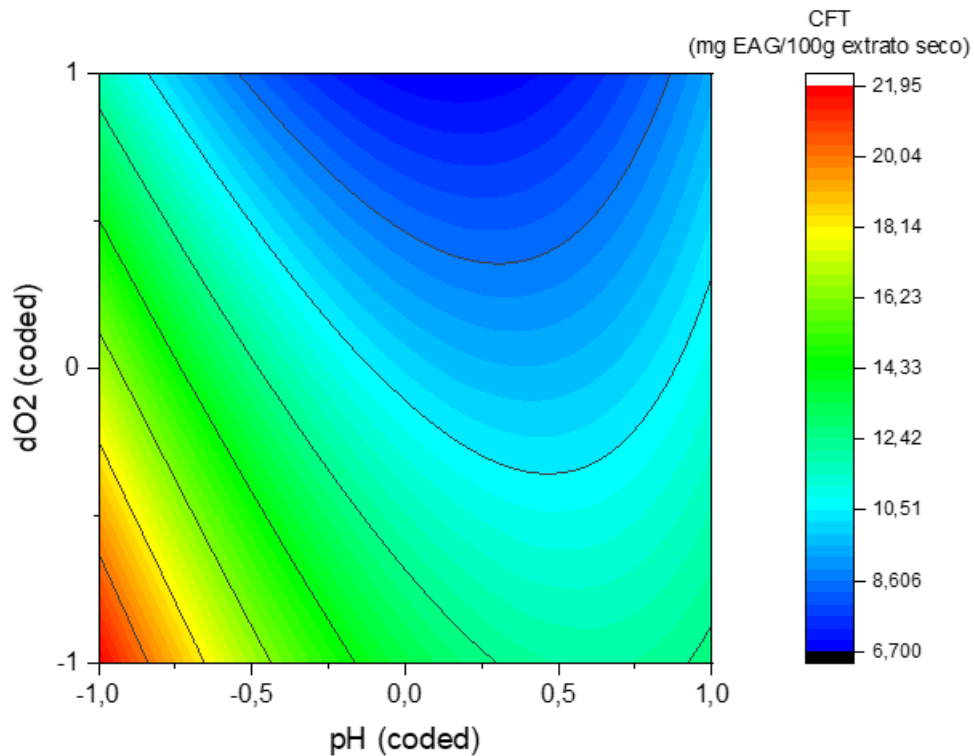
Experimento	Diluição do extrato aquoso	Absorbância a 725 nm	Concentração de AG (mg de AG/L)	CFT (mg EAG/100g extrato seco)
1	1%	0,132	1,263	12,634
2	10%	0,869	10,480	10,480
3	10%	0,783	9,405	9,405
4	10%	0,813	9,780	9,780
5	1%	0,206	2,193	21,926
6	10%	0,978	11,843	11,843
7	10%	0,845	10,180	10,180

**Fonte: Autoria própria (2022).**

$$\begin{aligned}
 \text{Resposta1} = & 10,1468 - 2,93230[pH] \\
 & -3,32815[dO_2] + 3,80523[pH][pH] + 1,71355[pH][dO_2]
 \end{aligned} \quad (3)$$

Através desse modelo da Equação (3), utilizando o software *OriginPro 2019b*, o contorno de resposta (Gráfico 1) e a superfície de resposta de CFT (Gráfico 2) foram plotados. Analisando os gráficos de forma qualitativa, pode-se observar que a formação de compostos fenólicos é otimizada quando o pH é mais ácido e possui menos oxigenação, que foi o caso do experimento 5 (cultivo estático e pH 1). No gráficos 1 e 2, esse ponto está representado na cor vermelha.

Gráfico 1 – Contorno da superfície de resposta CFT



Fonte: Autoria própria (2022).

A escala de cor em ambos gráficos demonstra quais outros pontos se aproximam ou se afastam do ponto mais alto da superfície de resposta, o qual é o ponto de otimização.

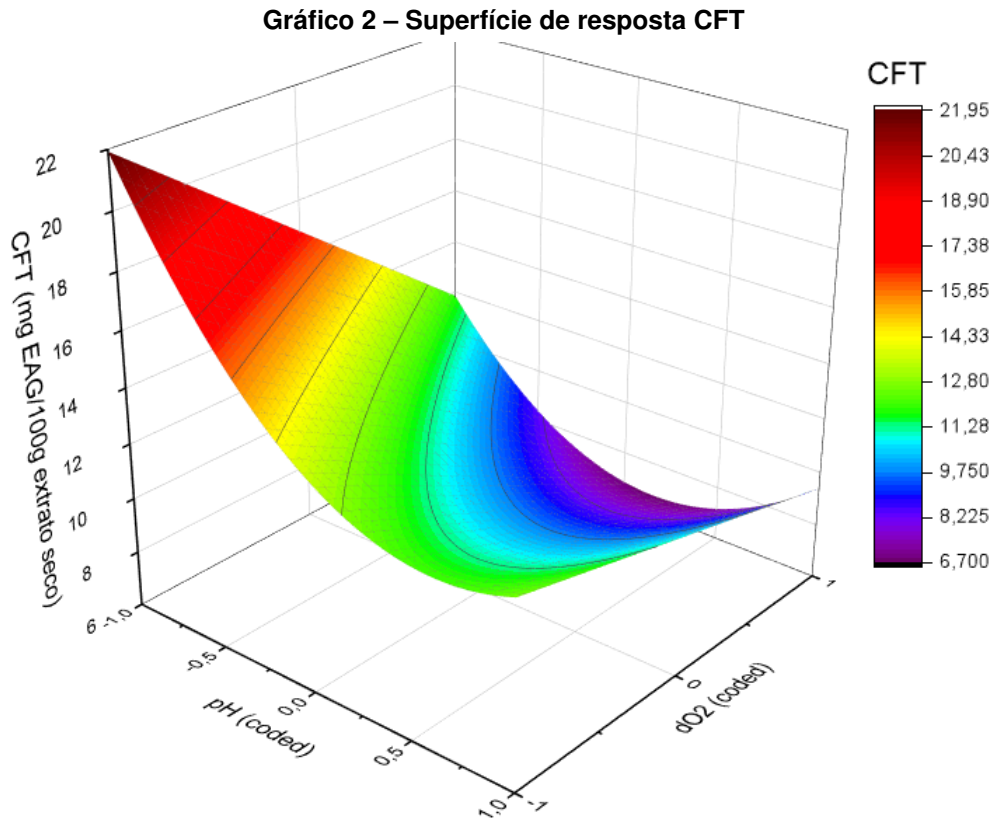
## 4.2 Determinação do potencial antioxidante com o método DPPH

Para determinar a capacidade antioxidante dos 7 experimentos, foram considerados dois métodos diferentes de DPPH.

### 4.2.1 Concentração efetiva 50% (EC<sub>50</sub>)

Para determinar o potencial antioxidante utilizou-se o método DPPH, adaptado de Rufino *et al.* (2007), em que é empregada uma solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), misturando-a com cada amostra a ser analisada em espectrofotômetro UV/VIS (BIERHALS *et al.*, 2009).

Foi preparada uma solução de DPPH de concentração 24 µg/mL, utilizada para determinar o potencial antioxidante dos 7 experimentos realizados. Os extratos utilizados foram os mesmos preparados para a análise de CFT, portanto, extratos aquosos de 1:10 para cultivos aerados e em shaker e de 1:100 para os cultivos estáticos. Para cada experimento, foram preparados 5 tubos de ensaio com concentrações diferentes de extrato, conforme a Tabela 5.



Fonte: Autoria própria (2022).

**Tabela 5 – Concentração do extrato e alíquotas do método DPPH**

Amostra	Concentração			
	do extrato ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	DPPH (mL)	Metanol ( $\mu\text{L}$ )	Extrato ( $\mu\text{L}$ )
a	5	3,9	80	20
b	10	3,9	60	40
c	15	3,9	40	60
d	20	3,9	20	80
e	25	3,9	0	100

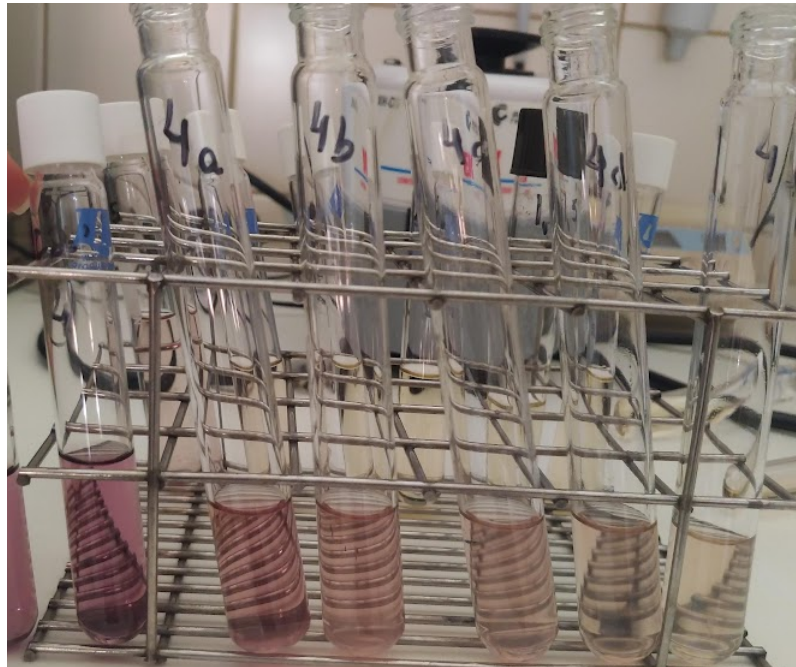
Fonte: Autoria própria (2022).

As amostras foram protegidas da luz e ficaram em repouso durante 24 horas para a reagir com a molécula de DPPH. Com a medição da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 517 nm, zerado com metanol puro, pôde-se plotar os gráficos relacionando o percentual de atividade antioxidante e a concentração de biomassa. Para calcular essa concentração de cada ponto para o experimento 1, por exemplo, em que a diluição do extrato preparado foi de 10%, relacionou-se tal valor de diluição com as concentrações de extrato desejadas (indicadas na Tabela 5), resultando em concentrações de 5 a 25  $\mu\text{L}$  de biomassa/mL. A coloração durante a reação dos antioxidantes da amostra com o reagente DPPH passa de roxo para lilás ou amarelo, dependendo do potencial de antioxidação da amostra. A Figura 6 mostra um exemplo de reação dos extratos da amostra 4 em diferentes concentrações, em ordem decrescente no sentido da direita para a esquerda, sendo o tubo na extremidade esquerda a amostra controle



(apenas metanol e solução DPPH) utilizada como comparativo, já que não ocorre a reação de redução do radical livre DPPH.

**Figura 6 – Análise de DPPH da amostra 4, cultivo em *shaker* com pH inicial igual a 3, e da amostra controle**



**Fonte: Autoria própria (2020).**

A porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) foi calculada, para cada concentração de cada um dos extratos, da maneira descrita na Equação (4), em que “Abs Controle DPPH” é a absorbância da amostra constituída apenas pela solução DPPH e metanol e “Abs amostra” é constituída pela solução DPPH, metanol e extrato de biomassa.

$$\%AAO = \frac{(Abs_{ControleDPPH} - Abs_{amostra})100}{(Abs_{ControleDPPH})} \quad (4)$$

Plotou-se os gráficos de concentração de biomassa x %AAO e, dessa forma, foi determinada a equação da reta ( $y = ax + b$ ) de cada experimento, com as quais determinaram-se os valores de  $EC_{50}$ , que é a concentração efetiva 50%. Nesse caso, quando  $y = 50$ ,  $x$  é a  $EC_{50}$ , que é a concentração mínima do extrato para reduzir a concentração de DPPH em 50%. Desse modo, quanto menor a concentração necessária, maior será o potencial antioxidante da amostra estudada. Na Tabela 6, estão apresentados os dados finais dessa análise, que foram utilizados para plotar o gráfico da metodologia de superfície de resposta.

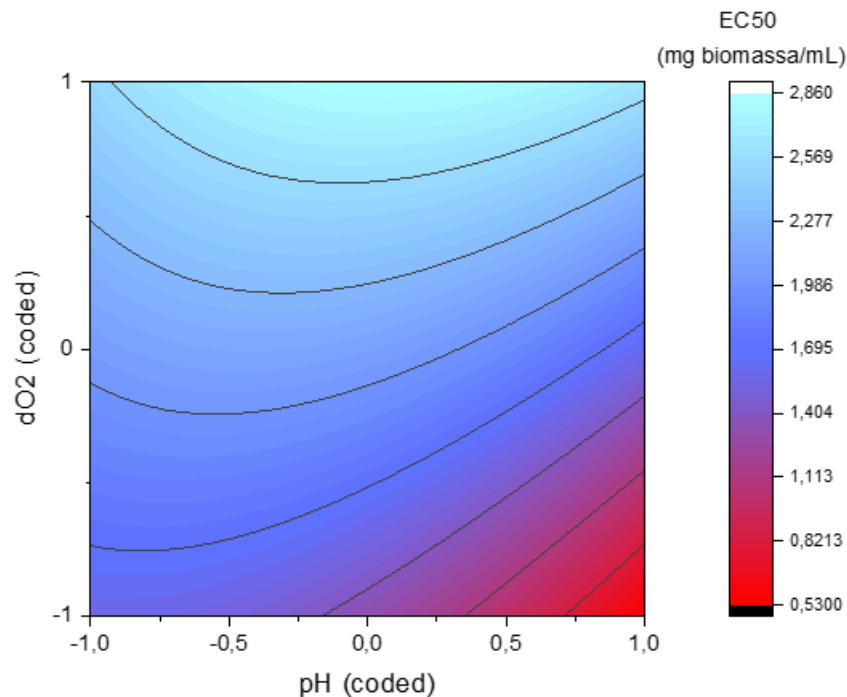
Como na análise de CFT, utilizando os softwares *Minitab* e *OriginPro 2019b* foram gerados o modelo matemático (Equação (5)), o contorno de resposta (Gráfico 3) e a superfície de resposta de  $EC_{50}$  (Gráfico 4).

Tabela 6 – Determinação de EC<sub>50</sub>

Experimento	pH	dO <sub>2</sub>	Diluição do extrato aquoso	EC <sub>50</sub> (mg biomassa/L)
1	5	estático	1:100	0,5381
2	3	shaker	1:10	1,9957
3	5	aerado	1:10	2,6373
4	3	shaker	1:10	1,1815
5	1	estático	1:100	1,5694
6	1	aerado	1:10	2,5248
7	3	shaker	1:10	3,0941

Fonte: Autoria própria (2022).

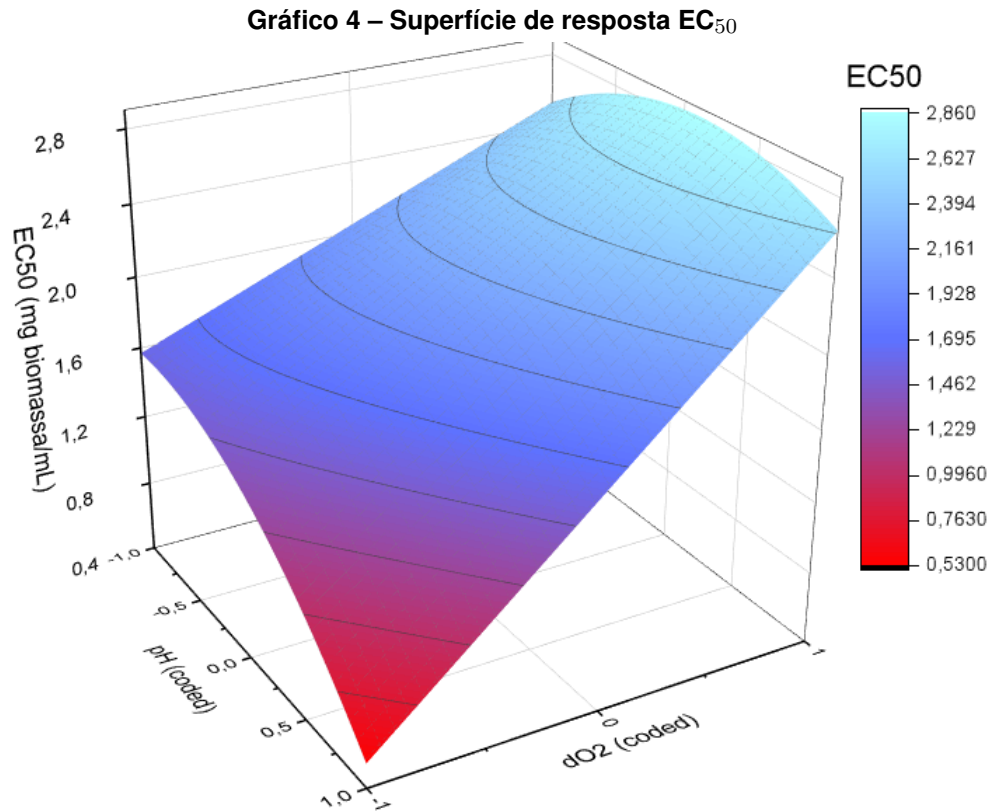
$$\begin{aligned}
 \text{Resposta2} = & 2,09043 - 0,229700[\text{pH}] + 0,763650[\text{dO}_2] \\
 & -0,273033[\text{pH}][\text{pH}] + 0,285950[\text{pH}][\text{dO}_2]
 \end{aligned}
 \quad (5)$$

Gráfico 3 – Contorno da superfície de resposta EC<sub>50</sub>

Fonte: Autoria própria (2022).

Nesse caso, quanto menor a EC<sub>50</sub>, maior é a capacidade antioxidante, já que significa que uma menor concentração de biomassa foi capaz de reduzir a concentração do radical DPPH em 50%. Portanto, o ponto de otimização para a atividade antioxidante da *Galdieria sulphuraria* é o ponto mais baixo do Gráfico 4 e está representado em vermelho, sendo que o pH descodificado é 5 e a oxigenação é baixa (cultivo estático), como é o caso do experimento 1.





**Fonte: Autoria própria (2022).**

#### 4.2.2 Atividade antioxidante (AA) equivalente de ácido gálico (EAG)

Para esse trabalho, também foi utilizada uma segunda opção para a determinação da capacidade antioxidante dos cultivos realizados. Esse segundo método, adaptado de Pires *et al.* (2017), para avaliar o potencial antioxidante seguiu a mesma lógica da determinação de CFT, utilizando o ácido gálico como padrão comparativo. Dessa vez, foi utilizada a solução padrão de AG 100 mg/L e os pontos da curva de calibração tiveram a concentração variando de 0 a 2,0 mg/L. Para medir a absorbância de cada ponto da curva, foram adicionados 3,9 mL da solução DPPH e 100 µL de ácido gálico e metanol somados, esses dois últimos variando o volume de acordo com a concentração do ponto. Nesse método, mediu-se a absorbância, em espectrofotômetro UV/VIS, das amostras após 30 minutos de reação ao abrigo da luz. Com o resultado, foram determinados os pontos da curva e a equação da reta de cada experimento para que, posteriormente, as absorbâncias dos extratos da microalga fossem comparadas com o padrão. Os extratos aquosos dos cultivos estáticos tiveram sua diluição de 1:100 e o restante 1:10. Foi possível determinar o potencial antioxidante em mg EAG/100g extrato seco, a partir da medição da absorbância da solução de 100µL de extrato reagindo com 3,9 mL de solução DPPH 24 µg/mL após 30 minutos.

Tabela 7 – Determinação de atividade antioxidante EAG

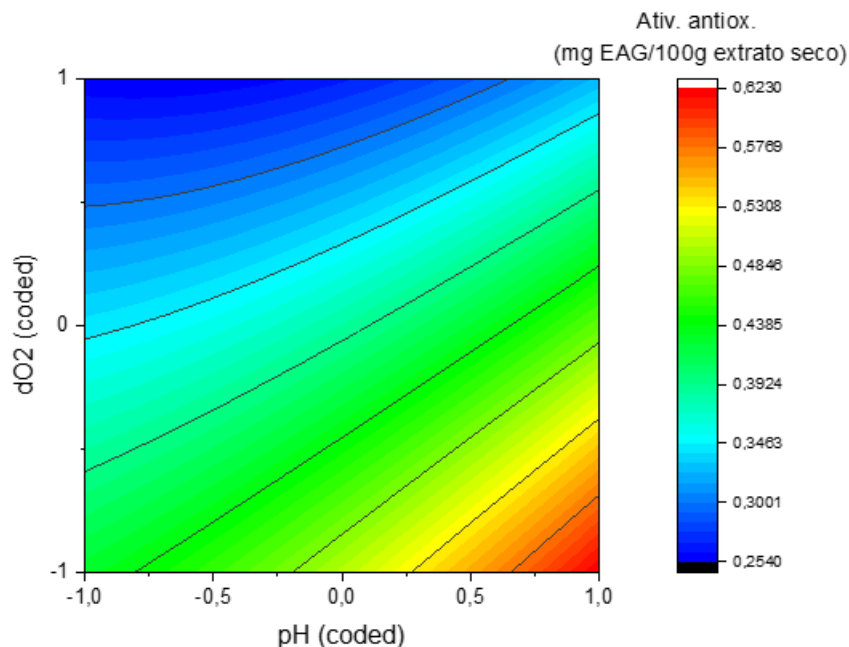
Experimento	pH	dO <sub>2</sub>	Diluição do extrato aquoso	Atividade antioxidante
				EAG (mg EAG/100g extrato seco)
1	5	estático	1:100	0,6230
2	3	shaker	1:10	0,3365
3	5	aerado	1:10	0,3250
4	3	shaker	1:10	0,4333
5	1	estático	1:100	0,4274
6	1	aerado	1:10	0,2555
7	3	shaker	1:10	0,3849

Fonte: Autoria própria (2022).

Para essa resposta de atividade antioxidante em equivalente de ácido gálico, foram gerados o modelo matemático (Equação (6)), o contorno de resposta (Gráfico 5) e a superfície de resposta (Gráfico 6).

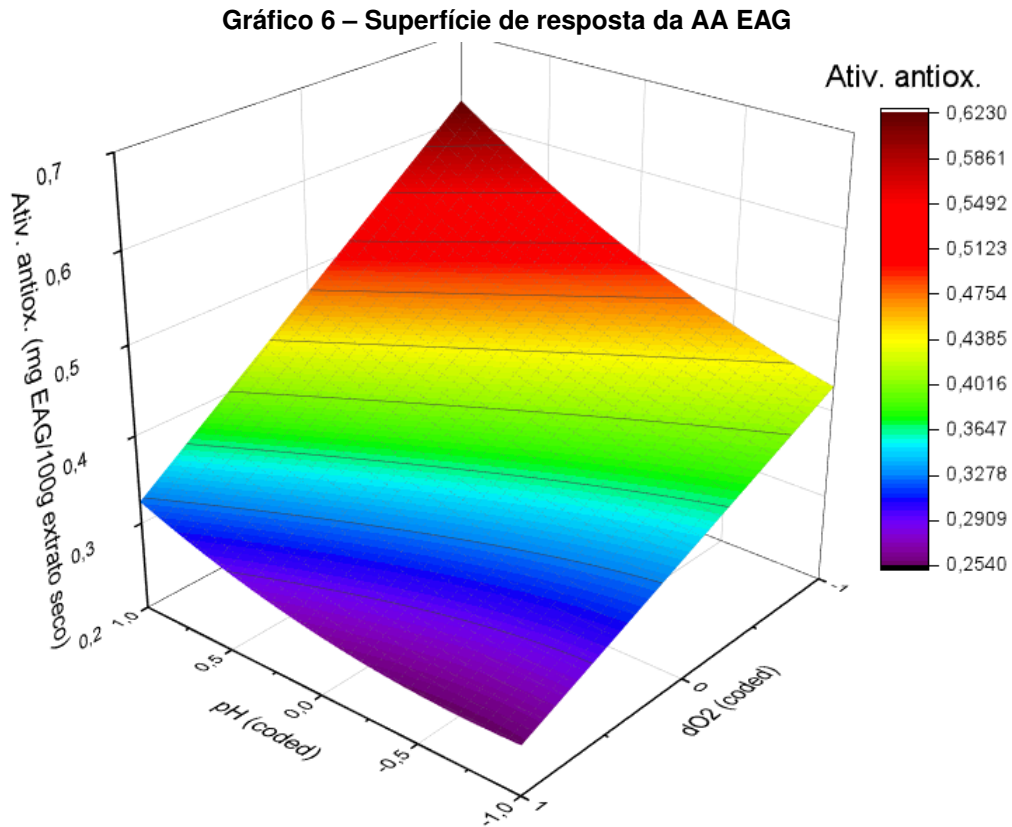
$$\begin{aligned}
 \text{Resposta2} = & 0,384900 + 0,0662750[\text{pH}] - 0,117475[\text{dO}_2] \\
 & + 0,0228250[\text{pH}][\text{pH}] - 0,0315250[\text{pH}][\text{dO}_2]
 \end{aligned} \quad (6)$$

Gráfico 5 – Contorno da superfície de resposta da AA EAG



Fonte: Autoria própria (2022).

Analogamente à resposta de CFT, a resposta do método DPPH em EAG tem seu ponto de otimização no ponto mais alto da curva, representado em vermelho em ambos gráficos. Portanto, quantitativamente, a maior atividade antioxidante é a do ponto em que o pH descodificado



é 5 e o cultivo é estático, performado no experimento 1. Esse resultado é o mesmo obtido na subseção 4.2.1, em que a capacidade antioxidante foi determinada a partir de concentrações diferentes dos extratos ao invés de utilizar uma solução padrão comparativa. Para as duas opções utilizando o método DPPH foram obtidos modelos matemáticos muito similares, demonstrando uma mesma tendência e comportamento quanto à quantificação da capacidade antioxidante dos experimentos.

#### 4.3 Resumo do resultado da RSM

Na Tabela 8 estão resumidos os valores determinados das variáveis respostas CFT e Atividade Antioxidante (AA), utilizados para plotar os gráficos de superfície de resposta conforme o planejamento estatístico.

**Tabela 8 – Resultados das determinações de CFT e capacidade antioxidante**

<b>Experimento</b>	<b>pH</b>	<b>dO<sub>2</sub></b>	<b>Resposta 1 - CFT</b>	<b>Resposta 2 - AA DPPH</b>	
	codificado	codificado	(mg EAG/100g extrato seco)	EC <sub>50</sub> (mg biomassa/L)	AA (mg EAG/100g extrato seco)
1	1	-1	12,634	0,5381	0,6230
2	0	0	10,480	1,9957	0,3365
3	1	1	9,405	2,6373	0,3250
4	0	0	9,780	1,1815	0,4333
5	-1	-1	21,926	1,5694	0,4274
6	-1	1	11,843	2,5248	0,2555
7	0	0	10,180	3,0941	0,3849

**Fonte: Autoria própria (2022).**

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho foram suficientes para determinar quantitativamente, nos 7 experimentos distintos, os compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelo método DPPH. A partir da geração de superfícies de respostas, pôde-se determinar a melhor condição de cultivo heterotrófico para a microalga *Galdieria sulphuraria*, dentro dos limites avaliados (pH 1 a 5 e oxigenação baixa, média e alta), variando o pH inicial do meio e a oxigenação durante o crescimento celular. Para otimizar a resposta de CFT, de acordo com as análises realizadas, o pH deve ser 1 e a oxigenação deve ser baixa (cultivo estático em estufa BOD). Por outro lado, se o objetivo é a aplicação da *G. sulphuraria* como uma fonte de antioxidantes, a capacidade antioxidante pode ser otimizada se o cultivo for estático, porém com pH inicial do meio igual a 5, ou seja, menos ácido do que para otimizar a resposta de CFT.

Conclui-se que para otimizar a produção de compostos fenólicos totais ou antioxidantes pela microalga *G. sulphuraria*, pode-se utilizar as condições de cultivos determinadas nessa pesquisa. Porém, a depender da aplicação desejada, para otimizar a produção de compostos fenólicos e antioxidantes específicos seria necessária uma pesquisa com métodos qualitativos de determinação para as diferentes condições de pH e oxigênio dissolvido.

## REFERÊNCIAS

- ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. *In*: BORZANI, W. *et al.* (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 1, p. 1–20.
- ANDRADE, L. M. *et al.* *Chlorella* and *Spirulina* microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview. **MOJ Food Processing Technology**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 45–48, 2018.
- ANGELO, L. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- BARCYTÉ, D. *et al.* Burning coal spoil heaps as a new habitat for the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Fottea**, Olomouc, v. 18, n. 1, p. 19–29, 2018.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 2. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2014.
- BETSY, T.; KEOGH, J. **Microbiology Demystified**. United States of America: McGraw-Hill, 2005.
- BIERHALS, V. S. *et al.* Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 42–48, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- EREN, A. *et al.* Genetic structure of *Galdieria* populations from Iceland. **Polar Biology**, Alemanha, v. 41, n. 9, p. 1681–1691, 2018.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.
- GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. *In*: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. 2. ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013. p. 123–133.
- HU, Q.; LIU, J. *Chlorella*: Industrial Production of Cell Mass and Chemicals. *In*: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. 2. ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013. p. 329–338.
- JASSBY, A. *Spirulina*: a model for microalgae as food. *In*: LEMBI, C. A.; WAALAND, J. R. (Ed.). **Algae and human affairs**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 149–179.
- JU, K. *et al.* Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfothermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria*. **Bioresource Technology**, Japan, v. 211, p. 759–764, 2016.

- JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. **Energies**, United States of America, v. 6, p. 4607–4638, 2013.
- JUTSON, M. G. S.; PIPE, R. K.; TOMAS, C. R. The Cultivation of Marine Phytoplankton. *In*: TSALOGIOU, M. N. (Ed.). **Microalgae: Current Research and Applications**. UK: Caister Academic Press, 2016. p. 11–26.
- KAWACHI, M. *et al.* **List of Strains**: Microalgae, Endangered Macroalgae and Protists. 9. ed. Tsukuba, Japan: Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies, 2013.
- KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, South Korea, v. 17, n. 1, p. 36, 2018.
- MUTANDA, T. Introduction. *In*: BUX, F. (Ed.). **Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products**. Boca Raton, Florida: CRC, 2013. p. 1–16.
- NAIDOO, T. *et al.* Value-added products from microalgae. *In*: BUX, F. (Ed.). **Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products**. Boca Raton, Florida: CRC, 2013. p. 137–160.
- OLIVEIRA, E. C. **Introdução à Biologia Vegetal**. 2 ed. rev. e aum.. ed. [S.l.]: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.
- PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. v. 1.
- PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. 2. ed. Fortaleza: Wiley-Blackwell, 2013.
- RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, 127, Fortaleza, p. 1–4, 2007.
- SCHMIDELL, W. Agitação e Aeração em Biorreatores. *In*: SCHMIDELL, W. *et al.* (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, p. 277–332.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SYDNEY, E. B. *et al.* Biomolecules from extremophile microalgae: From genetics to bioprocessing of a new candidate for large-scale production. **Process Biochemistry**, 2019.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; THAKUR, I. S. Characterization of microalga *Scenedesmus sp.* ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, India, v. 74, p. 774–781, 2015.

WANG, H. M. D. *et al.* Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, Taiwan, v. 184, p. 355–362, 2015.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 4754–4764, 2009.

ZIMERMANN, J. D. F. **Efeito do cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* em permeado de soro de leite**. 2019. 75 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.