

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

JÉSSIKA D'ARC FERNANDES ZIMERMANN

**CULTIVO DA MICROALGA *Galdieria sulphuraria* EM PERMEADO DE
SORO DE LEITE**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2019

JÉSSIKA D'ARC FERNANDES ZIMERMANN

**CULTIVO DA MICROALGA *Galdieria sulphuraria* EM PERMEADO DE
SORO DE LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt
Sydney

PONTA GROSSA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa
n.60/19

Z71 Zimermann, Jéssika D'arc Fernandes

Cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* em permeado de soro de leite. / Jéssika D'arc Fernandes Zimermann, 2019.

75 f.; il. 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

1. Algas. 2. Resíduos industriais. 3. Indústria de laticínios. 4. Biotecnologia. 5. Carotenóides. 6. Fenóis. I. Demiate, Ivo Mottin. II. Sydney, Eduardo Bittencourt. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 660.6



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS PONTA GROSSA
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 4 /2019

CULTIVO DA MICROALGA *Galdieria sulphuraria* EM PERMEADO DE SORO DE LEITE
Por

Jéssika D'Arc Fernandes Zimmermann

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas de 28 de junho de 2019, no Miniauditório do bloco C, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

**Prof^a. Dr^a. Alessandra Cristine Novak
Sydney (UTFPR)**

**Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho
(UFPR)**

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate (UEPG)
Orientador e presidente da banca



Visto do Coordenador:

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

Coordenador do PPGBIOTEC
UTFPR – Câmpus Ponta Grossa

- A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE ARQUIVADA NA SECRETARIA DO CURSO -

Dedico este trabalho aos meus filhos
Marinna e Samuel, para que no futuro
nunca desistam de seus sonhos e lutem
até o fim para alcançá-los, cientes de que
tudo que é conquistado através de
trabalho sério e honesto é honrado aos
olhos de Deus.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelas oportunidades que tive durante a pesquisa, pela saúde e lucidez para a condução do trabalho e pelas bênçãos derramadas diariamente em minha vida.

A minha filha Marinna e meu marido Moysés pela compreensão e apoio nos momentos difíceis e aos meus pais e meus sogros pelo irrestrito carinho.

Ao professor Dr. Eduardo Bittencourt Sydney pelos ensinamentos, orientação serena e incentivo constante, facilitadores do processo de confecção do trabalho.

Ao professor Dr. Ivo Mottin Demiate, grande mestre.

À professora Dr^a. Juliana Vitoria Messias Bittencourt, no auxílio prestado quando do início do trabalho e na escolha dos caminhos a serem traçados no princípio da jornada.

À professora Dr^a. Maria Helene Giovanetti Canteri, que incentivou primeiramente a sonhar com o projeto de Mestrado, acreditando no meu trabalho desde o alvorecer do projeto.

À professora Dr^a. Alessandra Cristine Novack Sydney pela disponibilidade e paciência, com ensinamentos sempre oportunos.

A todos os demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que de forma direta ou indireta colaboraram para o desenvolvimento da pesquisa.

A minha amiga Kathlyn Schafranski pelo companheirismo e grande contribuição neste trabalho.

A minha amiga Elisabeth Holub, que por diversas vezes não mediu esforços para que eu tivesse todos os meios disponíveis para meus trabalhos.

Ao mestrando Fernando Rodrigues da Silva e professor Dr. Marcus Liz (UTFPR Curitiba) que contribuíram de forma expressiva para a conclusão de análises, dispondo seus meios e tempo.

Aos amigos e colegas de laboratório que com suas companhias e auxílio facilitaram a consecução do desfecho da pesquisa.

À UTFPR Campus Ponta Grossa e Curitiba.

E todos aqueles que apesar de não nominados neste agradecimento contribuíram para o avanço do trabalho.

RESUMO

ZIMERMANN, Jéssika D'Arc Fernandes. **Cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* em permeado de soro de leite**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

O soro de leite e o permeado de soro de leite são efluentes altamente poluentes da indústria de laticínios. O soro de leite é porção aquosa remanescente da precipitação da caseína na produção de queijo. O permeado de soro de leite é uma fração diluída resultante da ultrafiltração do soro de leite. Ambos possuem alta demanda química e demanda bioquímica de oxigênio e teor elevado de lactose, responsáveis pelo impacto ambiental quando sofrem destinação incorreta na natureza. Apesar das suas diversas aplicações, esses efluentes ainda são descartados em grande volume na água e no solo. Uma das alternativas para amenizar os danos ocasionados por essas práticas é a utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é cultivar a biomassa da microalga extremófila *Galdieria sulphuraria* utilizando permeado de soro de leite como substrato. Testes preliminares foram realizados para verificar a capacidade da *G. sulphuraria* multiplicar-se em glicose e lactose, sob diferentes tipos de metabolismo. As análises subsequentes foram realizadas para avaliar o crescimento da microalga em soro de leite e permeado de soro de leite caracterizados físico-quimicamente. A biomassa resultante foi submetida à extração de carotenoides e à separação por cromatografia em camada delgada. Utilizaram-se os melhores parâmetros para o desenvolvimento da *G. sulphuraria* em permeado de soro de leite para transposição de escala em biorreator de bancada. A partir da biomassa cultivada em biorreator de bancada e em incubadora de bancada com agitação orbital realizaram-se análises para identificação de compostos fenólicos por meio da cromatografia líquida com espectrômetro de massa, para verificar a presença de carotenoides por espectrometria Raman. A capacidade de depuração da microalga foi avaliada pelas análises de demanda química de oxigênio e de demanda bioquímica de oxigênio. A *G. sulphuraria* teve um bom desenvolvimento heterotrófico em permeado de soro de leite. A maior produção de biomassa foi observada no meio com 20% de permeado de soro de leite diluído em água destilada. No entanto, maiores concentrações de permeado resultaram em melhor produção de carotenoides. A astaxantina foi um dos principais carotenoides presentes no extrato de biomassa de *G. sulphuraria* cultivada em permeado de soro de leite. Em relação aos compostos fenólicos, a catequina e o ácido elágico mostraram-se os compostos mais relevantes. Após cultivo em biorreator, houve redução de DQO e DBO de 60% e 44% do permeado do soro de leite, respectivamente. Diferenças no modo de cultivo promovem mudanças expressivas no desenvolvimento e conteúdo da *G. sulphuraria*.

Palavras-chave: Microalgas. Efluente. Bioprocessos. Carotenoides. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

ZIMERMANN, Jéssika D'Arc Fernandes. **Cultivation of the microalga *Galdieria sulphuraria* in whey permeate**. 2019. 75 p. Thesis (Master's Degree in Biotechnology) - Federal University of Technology - Paraná, Ponta Grossa, 2019.

Whey and whey permeate are highly polluting effluents from the dairy industry. Whey is the remaining aqueous portion of the casein precipitation in cheese production. The whey permeate is a diluted fraction resulting from the ultrafiltration of the whey. Both have high chemical demand and biochemical demand for oxygen and high lactose content, responsible for the environmental impact when they are destined incorrectly in nature. Despite their diverse applications, these effluents are still discarded in large volumes in water and soil. One of the alternatives to mitigate the damages caused by these practices is the use of agroindustrial residues in biotechnological processes. In this context, the objective of this work is to produce biomass of the extremity microalga *Galdieria sulphuraria* using whey permeate as substrate. Preliminary tests were performed to verify the ability of *G. sulphuraria* to multiply in glucose and lactose, under different types of metabolism. Subsequent analyses were performed to evaluate the growth of microalgae in whey permeate and physico-chemically characterized whey permeate. The resulting biomass was subjected to the extraction of carotenoids and to separation by thin layer chromatography. The best parameters for the development of *G. sulphuraria* in whey permeate were used for transposition of scale in bench bioreactor. From the biomass grown in a bench bioreactor and in an orbital shaker incubator, analyzes were performed to identify phenolic compounds by means of liquid chromatography with mass spectrometer to verify the presence of carotenoids by Raman spectrometry. The purification capacity of the microalga was evaluated by analyses of chemical oxygen demand and biochemical oxygen demand. *G. sulphuraria* had a good heterotrophic development in whey permeate. The highest production was observed in the medium with 20% permeate of whey diluted in distilled water. However, higher permeate concentrations resulted in better carotenoid production. Astaxanthin was one of the main carotenoids present in the biomass extract of *G. sulphuraria* grown in whey permeate. Regarding to phenolic compounds, catechin and ellagic acid were the most relevant compounds. After cultivation in bioreactor, COD and BOD reduction of 60% and 44% of the whey permeate were respectively reduced. Differences in mode of cultivation promote significant changes in the development and content of *G. sulphuraria*.

Keywords: Microalgae. Effluent. Bioprocesses. Carotenoids. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenças entre os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos.	23
Figura 2 - Micrografia de <i>G. sulphuraria</i>	24
Figura 3 - Estrutura química do ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxidobenzóico.	27
Figura 4 - Estrutura química do ácido elágico.	27
Figura 5 - Estrutura química da catequina e da quercetina.	28
Figura 6 - Cultivos de <i>G. sulphuraria</i>	31
Figura 7- Cultivos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico de <i>G. sulphuraria</i>	32
Figura 8 - Diagrama de produção do permeado de soro de leite.	36
Figura 9 - Representação das diluições dos meios de cultivos com permeado de soro de leite.	37
Figura 10 - Cultivo da <i>G. sulphuraria</i> em biorreator de bancada.	41
Figura 11 – Curva de crescimento da biomassa da <i>G. sulphuraria</i> em diferentes meios de cultura sintéticos em células/mL.	45
Figura 12 – Curva de crescimento da biomassa da <i>G. sulphuraria</i> em diferentes meios de cultura sintéticos em g/L.	46
Figura 13 - Curva de crescimento da <i>G. sulphuraria</i> em diferentes concentrações de permeado de soro de leite (0% - 100%).	48
Figura 14 - Curva de crescimento da <i>G. sulphuraria</i> em diferentes concentrações de permeado de soro de leite (0%- 40%).	49
Figura 15 - TLC do extrato de biomassa de <i>G. sulphuraria</i> contendo carotenoides.	51
Figura 16 - Espectro Raman da biomassa de <i>G. sulphuraria</i> cultivada em meio sintético e em permeado de soro de leite.	53
Figura 17 - Curva de crescimento da <i>G. sulphuraria</i> cultivada a 45 °C, pH 2, 1 vvm, em biorreator de bancada.	54
Figura 18 - Cromatograma das análises por LC-ESI-MS/MS em extrato de <i>G. sulphuraria</i> cultivada em permeado de soro de leite 20% em biorreator de bancada.	58
Figura 19 - Cromatograma das análises por LC-ESI-MS/MS em extrato de <i>G. sulphuraria</i> cultivada em permeado de soro de leite 20% em incubadora de bancada com agitação orbital.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de composição do soro de leite doce e soro de leite ácido.....	15
Tabela 2 - Conteúdo dos principais componentes químicos de células autotróficas e heterotróficas de <i>Chlorella protothecoides</i>	20
Tabela 3 - Composição do meio Allen's.	30
Tabela 4 - Composição do meio alternativo.	31
Tabela 5 - Analitos e fragmentos utilizados para identificação de compostos fenólicos em <i>G. sulphuraria</i>	44
Tabela 6- Produção e produtividade de <i>G. sulphuraria</i> cultivada em em meio Allen's com adição ou não de fonte de carbono.	47
Tabela 7 - Caracterização do soro de leite e do permeado do soro de leite.	47
Tabela 8 - Resultados da cinética de crescimento da <i>G. sulphuraria</i> em diferentes concentrações de permeado de soro de leite.	50
Tabela 9 - Resultados da cinética de crescimento da <i>G. sulphuraria</i> cultivada em biorreator em permeado de soro de leite 20%.	55
Tabela 10 - Concentrações de demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio no cultivo de <i>G. sulphuraria</i> em permeado de soro de leite.....	56
Tabela 11 - Faixa linear, coeficiente de determinação (R ²), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) utilizados para os compostos fenólicos identificados	57
Tabela 12 - Composição fenólica do extrato de <i>G. sulphuraria</i> cultivada em biorreator e bancada e em incubadora de bancada com agitação orbital.	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 SORO DE LEITE	14
3.1.1 Mercado do Soro de Leite	16
3.1.2 Aplicação do Soro de Leite	16
3.2 PERMEADO DE SORO DE LEITE	17
3.3 MICROALGAS	18
3.3.1 Tipos de Cultivo	20
3.3.1.1 Autotrófico	20
3.3.1.2 Heterotrófico	21
3.3.1.3 Mixotrófico	22
3.3.2 <i>Galdieria sulphuraria</i>	23
3.4 CAROTENOIDES	25
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MICROALGA	30
4.1.2 Meios de Cultivo e Condições de Cultivo	30
4.1.2.1 Meio Allen's	30
4.1.2.2 Meio alternativo	31
4.1.2.3 Cultivo em meio Allen's com adição de fonte de carbono	31
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	32
4.2.1 Determinação do Teor de Proteína	32
4.2.2 Determinação do Teor de Cinzas	33
4.2.4 Determinação do pH	34
4.2.5 Determinação de Nitrato	34
4.3 MEIO DE CULTIVO COM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS	35
4.3.1 Soro de Leite e Condições de Cultivo	35
4.3.2 Permeado de Soro de Leite e Condições de Cultivo	36

4.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO	37
4.4.1 Densidade Celular	38
4.4.2 Peso Seco	39
4.5 EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS E CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (TLC)	39
4.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN	40
4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>GALDIERIA SULPHURARIA</i> EM BIORREATOR.....	40
4.8 CARACTERIZAÇÃO do efluente do biorreator	41
4.8.1 Demanda Química De Oxigênio (DQO)	41
4.8.2 Demanda Bioquímica De Oxigênio (DBO)	42
4.9 SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTÔMETRO DE MASSA (LC-ESI-MS/MS)	43
4.9.1 Preparação da Amostra.....	43
4.9.2 Avaliação Dos Compostos Fenólicos	43
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 PROPOSTA DE MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO PARA MANUTENÇÃO DE <i>GALDIERIA SULPHURARIA</i>	45
5.2 CULTIVO EM MEIO ALLEN'S COM ADIÇÃO DE FONTE DE CARBONO.....	46
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE E DO PERMEADO DE SORO DE LEITE	47
5.4 MEIO DE CULTIVO COM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....	48
5.5 IDENTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS	50
5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada	50
5.5.2 Análise no Espectro Raman	52
5.6 Cinética de crescimento biorreator	54
5.7 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO)	55
5.7 PERFIL FENÓLICO DOS EXTRATOS.....	57
5.7.1 Parâmetros De Desempenho Analítico Para Análise	57
5.7.2 Perfil Fenólico Dos Extratos De <i>G. sulphuraria</i>	58
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

As indústrias de laticínios geram como subproduto da produção de queijo e de caseína o soro de leite, que corresponde aproximadamente 85% do leite total utilizado nesses processos (PANESAR; KENNEDY, 2012). Estão presentes no soro todos os nutrientes essenciais presentes no leite, como vitaminas e minerais, proteínas e lactose, que representa 75% dos sólidos totais (MAWSON, 1994).

A composição do soro de leite viabiliza seu processamento para obtenção de glicose e galactose através de hidrólise da lactose, por exemplo, sendo uma alternativa viável e barata como fonte de lactose e proteínas (JAYAPRAKASHA; YOON, 2005). A recuperação de alguns compostos antes do tratamento dos resíduos auxilia na redução do DBO e DQO e nos custos do tratamento, resultando em benefícios econômicos e ambientais (DAS, 2015).

Para descartar de maneira eficaz esse subproduto são necessários extensos pré-tratamentos, que elevam os custos de operação dos fabricantes de laticínios. (MARWAHA; KENNEDY, 1988). Uma das maneiras de aproveitar os efluentes da produção é separar as proteínas dos demais componentes do soro de leite através da ultrafiltração, produzindo um concentrado proteico (conhecido comercialmente como *Whey Protein*), mas gerando um novo efluente que é o permeado de soro de leite. Apesar de ser um processo dispendioso, ainda é lucrativo devido ao alto valor agregado da proteína no ramo dos suplementos alimentares.

A alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) do soro é causada pela presença massiva de lactose, tendo em vista que a extração de proteínas pouco reduz tais demandas (DOMINGUES et al., 1999a, PRAZERES et al., 2012; SISO, 1996). O permeado de soro de leite possui aproximadamente 90% dos sólidos totais e da DBO do soro, e também mantém a elevada DQO do efluente original. Dessa forma, o permeado de soro de leite também não pode ser descartado sem tratamento como esgoto (ALVES, 2015). Apesar do crescente emprego na formulação de alguns alimentos, o permeado de soro de leite tem reaproveitamento restrito pela indústria de laticínios, sendo na maioria das vezes enviado para estação de tratamento de efluentes.

A utilização de resíduos agroindustriais para a recuperação de substâncias e de materiais, aumentando assim a rentabilidade econômica dos processos de

produção, é cada vez maior. Muitas técnicas são criadas para o emprego desses materiais, originando produtos de valor agregado. A atenuação do problema de poluição nos processos de agroindustrialização pode ser efetivada com a aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos (SAITO, 2005).

Recentemente estudos têm sido realizados acerca do uso de microalgas para tratamento de águas residuais, sendo os resíduos uma alternativa que barateia o custo de produção para os cultivos de microalgas (MAHDY et al., 2015; POSADAS et al., 2015). Para o cultivo comercial de microalgas os meios de cultura significam uma parte importante dos custos, aliados aos custos de funcionamento e capital (QUERQUES et al, 2015), o que torna os substratos provenientes de resíduos mais favoráveis, assim como o soro de leite e o permeado de soro de leite.

As características únicas da microalga *G. sulphuraria*, assim como as condições extremas sob as quais essa microalga se desenvolve as tornam adequada para aplicações biotecnológicas e com enorme potencial para ser transferida para escala industrial. Ainda há muito para ser estudado acerca dessa microalga pois muito do que se conhece é baseado no estudo de outras *Cyanidiales*, ordem de microalgas vermelhas em que a *G. sulphuraria* está inserida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de crescimento e de produção de compostos fenólicos da microalga extremófila *Galdieria sulphuraria* utilizando permeado de soro de leite como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade da *G. sulphuraria* desenvolver-se em diferentes fontes de carbono (glicose e lactose);
- Caracterizar físico-quimicamente o soro de leite e o permeado de soro de leite;
- Quantificar o crescimento da *G. sulphuraria* em soro de leite e permeado de soro de leite;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de permeado e soro de leite na produção de biomassa da *G. sulphuraria*
- Avaliar a produção e caracterização de compostos fenólicos da biomassa de *G. sulphuraria*.

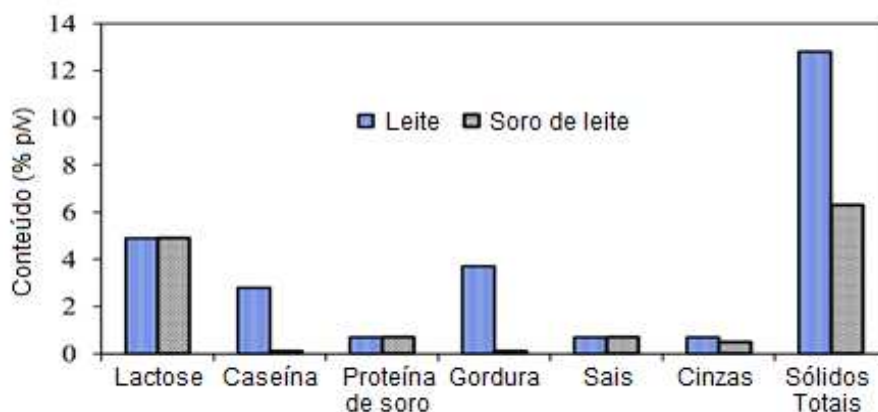
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SORO DE LEITE

O soro de leite, denominado também como soro de queijo, é porção aquosa remanescente da precipitação da caseína na produção de queijo. De um modo geral, os queijos são produzidos pela adição de uma cultura láctica (fermento) composta de bactérias que produzem ácido láctico e uma enzima (coalho) capaz de coagular o leite. As proteínas que compõe as micelas de caseína são desestabilizadas pela ação enzimática e acidez produzida pelo fermento. Então, é iniciada a coagulação e a formação de um gel de caseína. Ao ser aquecida lentamente, essa massa é cozida e ocorre a contração do gel, retirando o líquido de seu interior. O soro de queijo é porção aquosa excedente após a precipitação da caseína do leite durante a fabricação do queijo (USDEC, 2004).

O soro pode ser produzido por de todos tipos de leite, como de cabra, ovelhas e até camelas, sendo mais comum o obtido do leite de vaca (BORDENAVE-JUCHEREAU et al., 2005; SMITHERS, 2008). Segundo Yadav (2015), sua cor varia do amarelo ao verde, dependendo do leite que o origina. Seu volume corresponde a 85 a 95% do volume total do leite e nele estão cerca de 55% de todos os nutrientes. O Gráfico 1 traz um comparativo entre os nutrientes presentes no leite e no soro.

Gráfico 1 - Comparação da análise do leite bovino e do soro de leite.



Fonte: Yadav (2015).

Existem dois tipos de soro de queijo, o soro doce (pH 6,5) e o soro ácido (pH inferior a 5), que diferem entre si, além da acidez, pelo conteúdo mineral e pelo conteúdo das frações de proteína do soro de leite (JELEN et al., 2003; KOSSEVA et al., 2009). Ambos os soros são compostos principalmente por lactose (70 a 72% dos sólidos totais), proteínas do soro (8 a 10%) e por minerais (12 a 15%), sobretudo por água (JELEN, 2003).

O soro doce, mais comumente encontrado, é formado pela coagulação da caseína por coalho, uma enzima industrial que contém quimosina ou outras enzimas coagulantes de caseína (FOX et al., 2000). Já o soro ácido é resultado da coagulação da caseína por meio da ação de ácidos minerais ou orgânicos. A Tabela 1 a seguir mostra os principais componentes de cada formulação de soro (JELEN et al., 2003; KOSSEVA et al., 2009).

Tabela 1 - Características de composição do soro de leite doce e soro de leite ácido.

Constituintes	Soro de leite doce (g/L)	Soro de leite ácido (g/L)
Sólidos Totais	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactose	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
Proteína	6,0 - 10,0	6,0 - 8,0
Gordura	5,0	0,4
Lactato	2,0	6,4
Cinzas	5,0	8,0
Cálcio	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
Fosfato	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Cloreto	1,1	1,1

Fonte: Yadav (2015).

A presença de resíduos de nutrientes do leite no soro como a lactose, proteínas solúveis, lipídios e sais minerais, é a grande responsável pela alta carga orgânica deste resíduo. Se por um lado esses nutrientes revelam o grande potencial para produção de derivados com alto valor agregado, eles são responsáveis pelo impacto ambiental da destinação incorreta do soro na natureza (PANESAR, 2007; YEDAV, 2015).

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e os valores de demanda química de oxigênio (DQO) do soro são cerca de 27-60 g/L e 50-102 g/L, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). Esses dados refletem as consequências para o meio ambiente nos casos de tratamento

incorreto e descarte inapropriado dos resíduos, alterando as características físico-químicas do solo e redução do rendimento dos cultivares quando do seu lançamento em terra, redução do oxigênio dissolvido e conseqüente risco para as formas de vida aquáticas quando do seu descarte na água, além do impacto para o meio ambiente e para a saúde das pessoas (GHALY et al., 2007).

Por este motivo, o soro é tido como um fator preponderante na poluição causada pela indústria de laticínios, sendo aproximadamente cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico por seu valor nutricional e altas cargas orgânicas (SILVA et al., 2006), e apesar de ser biodegradável, contribui significativamente para a poluição da terra e da água (COTANCH et al. 2006 ; KUSHWAHA et al., 2011).

3.1.1 Mercado do Soro de Leite

A economia dos países industrializados e em desenvolvimento tem como um de seus alicerces a indústria de laticínios (PANESAR et al, 2007). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o queijo é considerado um dos produtos agrícolas dentre os mais importantes do mundo. As maiores produções de queijos no mundo estão em primeiro lugar na União Européia (levando em conta todos os países membros), em segundo lugar nos Estados Unidos e na terceira posição o Brasil (LENCASTRE, 2012). Ainda segundo a FAO, a projeção para 2018 da produção mundial de queijo será de 23,7 milhares de toneladas, um aumento de aproximadamente 1% em relação ao produzido em 2015, com 22.937 milhares de toneladas.

Estima-se que para cada quilo de queijo produzido são gerados 9 quilos de soro. A produção anual total de soro no mundo é cerca de 180 a 190 milhões de toneladas (MOLLEA et al., 2013) e se for considerada a projeção da produção de queijo para o ano de 2018, este valor aproxima-se de 213 milhões de toneladas. Essas projeções podem ser ainda maiores se levados em conta os pequenos produtores que não possuem registro nos órgãos de fiscalização (LENCASTRE, 2012).

3.1.2 Aplicação do Soro de Leite

De todo o soro produzido mundialmente, parte é revertido em produtos alimentares, como para consumo direto na forma líquida, como soro em pó e em

concentrados de proteína de soro (MARWAHA; KENNEDY, 1988) e outra parte tem como destino a alimentação animal.

Existem dois meios distintos para o processamento do soro do leite e sua transformação em produtos mais valiosos. O primeiro tratamento, chamado de direto, envolve processos físicos ou térmicos para obtenção do soro em pó, proteína do soro concentrada, proteína isolada do soro, lactose, dentre outros subprodutos. O segundo meio de processamento envolve o processamento biotecnológico do soro, em que este é usado como base para processos enzimáticos ou microbianos para obtenção de alimentos animais, bioproteínas, bioconservantes e bioplásticos (SISO, 1996; MOLLEA et al., 2013; PANESAR et al., 2013).

Os dois métodos tem importância na transformação do soro de leite em produtos de maior valor agregado. Entre os processos biotecnológicos utilizados pode-se destacar processos aeróbicos e anaeróbicos para chegar a biotransformação, como a fermentação. Alguns processos físicos utilizados são a precipitação térmica e precipitação auxiliada por coagulantes/floculantes. Existe a possibilidade ainda da combinação dos processos biotecnológicos e fisicoquímicos para chegar a um produto com maior valor agregado (PRAZERES et al., 2012).

Mesmo com as diversas aplicações para o soro de queijo, uma grande quantidade é descartada como efluente (SMITHERS, 2008). Vários países possuem legislação rigorosa quanto à eliminação do soro, além de diversas regiões proibirem seu lançamento em esgotos e rios, muito devido aos sérios problemas causados nos sistemas de tratamento de esgoto das cidades devido a sua alta concentração de matéria orgânica (JANCZUKOWICZ et al., 2008).

3.2 PERMEADO DE SORO DE LEITE

O resíduo proveniente da extração da proteína do soro é chamado de permeado, que continua com grande capacidade poluente uma vez que é rico em lactose, representando 70% dos sólidos totais do soro, criando tantos problemas de poluição no seu descarte quanto no descarte de soro de leite puro (ZALL, 1984).

Existe uma projeção da produção de queijo atinja 25,3 milhões de toneladas até 2023 (OCDE-FAO, 2016), o que leva a uma imensa quantidade de permeado em

condições de ser aproveitada. Essa disponibilidade gera um ambiente favorável para o desenvolvimento de processos de tratamento do permeado que utilizem a lactose para produção de produtos biotecnológicos (GONZÁLEZ-SISO, 1996).

Presente no leite da maioria dos mamíferos, a lactose é um dissacarídeo formado por galactose e glicose, possuindo solubilidade e doçura menores que outros açúcares, como frutose e sacarose, tendo a definição química O- β -D-galactopiranosil-(1-4)- β -D-glicose, C₁₂ H₂₂ O₁₁ (ADAM et al., 2004 , GÄNZLE et al. al., 2008 , YANG e SILVA, 1995, ZADOW, 1984).

Dentre os produtos originados utilizando a lactose como fonte de carbono por meio de fermentação pode-se citar produção de poli-hidroxialcanoatos, de hidrogênio, produção de ácido láctico e ácidos orgânicos e produção de *single cell protein*, além de outros produtos valiosos como biogás, aminoácidos, vitaminas, polissacarídeos, óleos, enzimas e a produção mais clássica, o etanol (WAGNER et al, 2013; GUILHERME et al, 2009; BARBOSA, 2007; YOU et al, 2017). A produção de etanol a partir da fermentação da lactose é uma das aplicações mais antigas do permeado e do soro do leite, tendo sido citado desde a década de 1940 (ROGOSA et al, 1947 , WEBB e WHITTIER, 1948; WHITTIER, 1944). A maior concentração de lactose no permeado gera um etanol com maior titulação em relação ao gerado a partir do soro, exemplificando a versatilidade de utilização desses substratos. Embora não seja economicamente viável quando comparado com outras fontes de fermentação para produção de etanol, como milho e cana, cabe ressaltar que à medida que o permeado for considerado mais como matéria prima e menos como resíduo, essa versatilidade levará ao melhor aproveitamento dentro das especificidades de cada empresa, além da diminuição do risco ambiental.

Além dos processos já descritos, o permeado pode ser usado como meio de cultura para fitorremediação por microalgas, visando a redução da DQO, valorizando também sua biomassa e sendo boa fonte para produção de proteínas de alta qualidade.

3.3 MICROALGAS

A expressão “microalga” não é dotada de valor taxonômico, no entanto pode ser empregada para designar organismos algais com pigmentos fotossintéticos e

clorofila, capazes de realizar fotossíntese utilizando a água como agente redutor (fotossíntese oxigênica). A classificação das algas está condicionada a vários critérios, como ao tipo de pigmento, à natureza química de seus produtos de reserva e aos constituintes da parede celular. Dependendo da estrutura celular, as microalgas podem ser divididas em dois grupos, procarióticas e eucarióticas (DERNER, 2006).

As microalgas procarióticas possuem representantes das divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*, as quais não possuem as organelas delimitadas por membranas. Os grupos algais eucarióticos (*Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Chlorophyta*) possuem organelas, membrana celular composta de polissacarídeos, membrana plasmática responsável pela entrada e saída de substâncias no protoplasma e núcleo circundando por dupla membrana porosa (LEE, 1989; WALTER, 2011).

Os estudos acerca de microalgas começaram a ser desenvolvidos recentemente, apesar da sua existência ser conhecida há bastante tempo. No final dos anos 40 e início dos anos 50 as microalgas começaram a ser elucidadas como uma possível fonte de alimentos. Já nos anos 60, a poluição das águas serviu como um incentivo para o aumento da investigação desses microrganismos, verificando a possibilidade da sua aplicação no tratamento das águas. As microalgas passaram a ser vistas como uma potencial fonte renovável de combustível na década de 1970. Na década seguinte, foram utilizadas como fontes de produtos de valor, sobretudo os nutracêuticos. As preocupações com o aquecimento global fizeram com que as microalgas fossem focalizadas como uma alternativa para esse problema (SYDNEY et al., 2009).

Considerando os princípios fisiológicos, as microalgas são bastante similares entre si, ainda que apresentem diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão (ABALDE et al., 1995). Estima-se que quantidade de espécies de microalgas esteja na ordem de milhões. Seu habitat natural é heterogêneo, podendo ser encontradas em água doce, no meio marinho e no solo (CHISTI, 2004). Algumas espécies produzem compostos altamente tóxicos para os humanos e para outras espécies de microrganismos (NORTON et al., 1996; TEIXEIRA, 2002; PULZ; GROSS, 2004).

As microalgas são cultivadas de maneira contínua, não sendo necessárias grandes áreas para seu cultivo. Os cuidados adotados durante essa fase são

relativamente simples, sendo necessário, por exemplo, reposição mineral, controle do pH e da luminosidade. Esse tipo de cultivo tem como uma das principais vantagens a ausência da utilização de agrotóxicos (BERTOLDI *et al.* 2008). As microalgas também auxiliam na redução dos níveis de dióxido de carbono, uma vez que o utiliza como fonte de carbono para produzirem diferentes compostos de interesse (biomassa ou biocompostos) (RADMANN; COSTA, 2008).

O tamanho das microalgas está situado entre de 5 a 50 μm , podendo ter uma composição bioquímica variada com uma grande quantidade de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos saturados e insaturados, vitaminas e pigmentos. Além da espécie da microalga, fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado e o meio de cultura utilizado podem influenciar essa composição (MIAO; WU 2006, ZAMALLOA *et al.* 2011 SPOLAORE *et al.* 2006). A microalga *Chlorella protothecoides* estudada por Xu *et al.* (2006) apresentou composição diferenciada quando submetida a distintos meios de cultivo (Tabela 2).

Tabela 2 - Conteúdo dos principais componentes químicos de células autotróficas e heterotróficas de *Chlorella protothecoides*.

Componente (%)	Autotrófico	Heterotrófico
Proteína	52,64 \pm 0,26	10,28 \pm 0,10
Lipídio	14,57 \pm 0,16	55,22 \pm 0,28
Carboidrato	10,62 \pm 0,14	15,43 \pm 0,17
Cinzas	6,36 \pm 0,05	5,93 \pm 0,04
Umidade	5,39 \pm 0,04	1,93 \pm 0,02
Outros	10,42 \pm 0,65	11,20 \pm 0,61

Fonte: Xu *et al.* (2006).

3.3.1 Tipos de Cultivo

3.3.1.1 Autotrófico

O cultivo onde há o uso de luz, tanto natural quanto artificial, chama-se autotrófico ou fotoautotrófico, onde as células utilizam exclusivamente a luz para fixar CO_2 , sua fonte de carbono e liberam O_2 . A luz deve ser introduzida de maneira suficiente para permitir o máximo crescimento das populações, sendo ela um limitante

para cada espécie. Este tipo de produção é o único economicamente viável em larga escala (PEREZ-GARCIA, 2011).

Por depender exclusivamente da luz, esse regime de cultivo apresenta alguns empecilhos. A turbidez das águas residuais, característica comum nos resíduos agroindustriais, impede a chegada da luz de forma igual no cultivo (HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

Uma das preocupações está voltada à geometria do recipiente de modo que a luz seja distribuída de forma uniforme em toda a cultura. Geralmente são utilizados reatores com grande área superficial e, naqueles que utilizam sistema fechado, há a preocupação de seu material ser translúcido, para possibilitar a chegada da luz no meio (CHISTI, 2007; BRENNAN; OWENDE, 2010).

3.3.1.2 Heterotrófico

Os cultivos heterotróficos são caracterizados pela ausência de luz e adição de compostos orgânicos como fonte de carbono. São utilizadas como fontes de carbono substâncias como glicose, frutose, lactose, galactose e manose, ou seja, essencialmente açúcares, o que causa problemas recorrentes de contaminação (CHEN et al., 2011). O uso exclusivo de compostos orgânicos como fonte de energia e carbono torna possível maior rendimento da biomassa e também melhora sua produtividade (DE ALBUQUERQUE; BASTOS, 2013).

Esses cultivos ainda não são amplamente utilizados no meio industrial pois apresentam limitações quanto ao número de espécies de microalgas heterotróficas encontradas, maior incidência de contaminação, baixa taxa de desenvolvimento em compostos orgânicos pobres e incapacidade de alcançar produtos que necessitam da luz, como pigmentos (CERÓN GARCÍA et al., 2000).

Apesar do acetato e glicose serem as fontes mais comuns para os cultivos, tanto no campo científico quanto no comercial, ainda não existem dados compilados da concentração inicial necessária para o crescimento ideal das culturas (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Os cultivos heterotróficos podem ser desenvolvidos em fermentadores comuns, onde o crescimento é melhor bem controlado e há esterilização eficaz. Como não há necessidade de iluminação, as culturas são mais densas e a colheita mais barata. Para diminuir a limitação da cultura pela concentração de oxigênio dissolvido, esta

deve apresentar boa agitação e aeração, além de ser possível modular o uso da fonte de carbono para controlar as concentrações de lipídeos, que podem ser elevadas (DE ALBUQUERQUE, 2013).

Os aspectos necessários para microalgas desenvolverem-se em meio heterotrófico são, segundo Perez-Garcia et al (2011):

- Capacidade de divisão celular e metabolismo ativo em ausência de luz;
- Aceitar substratos orgânicos facilmente esterilizáveis no meio de cultivo;
- Rápida adaptação a mudanças de ambientes;
- Boa resistência mecânica a agitação e cisalhamento.

3.3.1.3 Mixotrófico

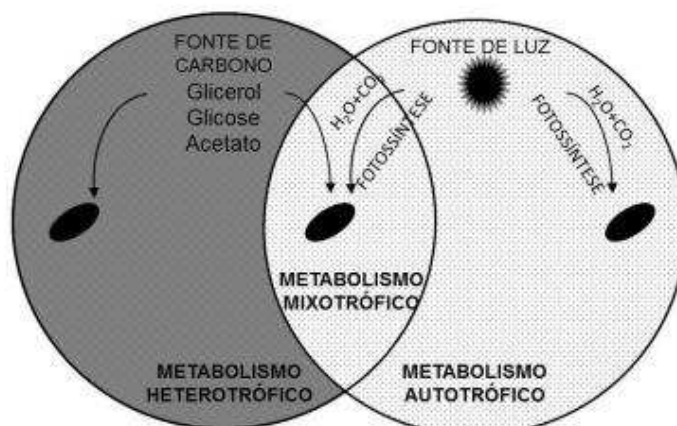
Cultivos mixotróficos são aqueles em que há atuação de metabolismo autotrófico e heterotrófico, utilizando ao mesmo tempo uma fonte luminosa e um substrato orgânico como fonte de carbono (DERNER, 2006). Alguns estudos apontam que determinadas microalgas apresentam maior produtividade quando cultivadas nesse regime (MORAIS, 2011).

O processo metabólico que fornece a principal fonte de energia é ainda a fotossíntese, sendo indispensável a presença de compostos orgânicos para que o organismo os assimile como fonte de carbono, enquanto usa compostos inorgânicos como doadores de elétrons (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Quando relacionado com o cultivo autotrófico, o cultivo mixotrófico se sobressai como fonte para produção de biomassa, uma vez que as taxas de crescimento e uma maior concentração de biomassa tem uma possível associação com os efeitos combinados da luz e do substrato orgânico. Esses cultivos ainda se destacam pela produção de clorofilas, carotenoides e ácidos graxos, sendo possível o estímulo da produção destes subprodutos por meio de substratos como o glicerol (CERÓN GARCÍA et al., 2005). A fase escura não tem tanta influência nesse cultivo, não gerando grandes perdas de biomassa em decorrência do substrato orgânico adicionado ao meio de cultivo (BRENNAN; OWENDE, 2010).

As diferenças entre as três formas de cultivo apresentados estão representadas na Figura 1.

Figura 1 - Diferenças entre os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos.



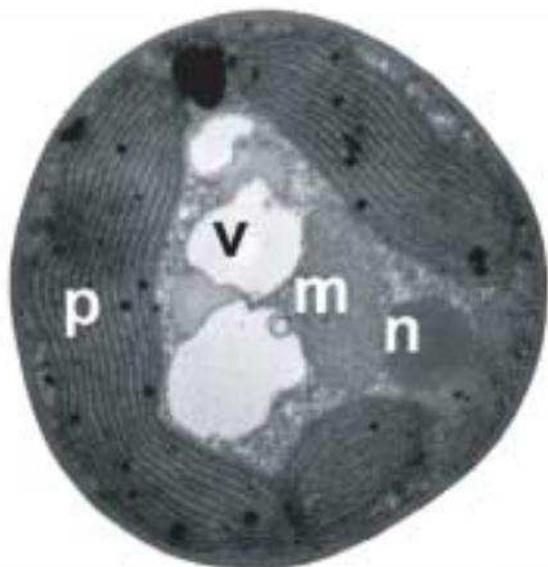
Fonte: Adaptado de Mariano et al. (2010).

3.3.2 *Galdieria sulphuraria*

A *Galdieria sulphuraria* (*G. sulphuraria*) é uma microalga unicelular, acidófila, e pertence à família das *Cyanidiales*. Desde o século XIX, foi designada por vários autores como *Cyanidium caldarium* (*C. caldarium*), ou seja, espécies diferentes de microalgas eram conhecidas pelo mesmo binômio (ALBERTANO et al., 2000). No entanto, Merola (1981) e colaboradores descreveram pela primeira vez a *G. sulphuraria*, esclarecendo sua posição taxonômica e coexistência de *C. caldarium* e *G. sulphuraria* nos mesmos ambientes.

As *Cyanidiales* são um grupo de algas vermelhas (*Rhodophyta*), sendo atribuídas por estudos filogenéticos como a mais antiga ordem das algas (MÜLLER et al., 2001; YOON et al., 2002). Atualmente são representadas por seis espécies de três gêneros diferentes, a saber: *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita*, *Galdieria daedala*, e *Galdieria sulphuraria* (PINTO et al., 2003). A estrutura dessas microalgas (Figura 2) consiste de um plastídio (cloroplasto) contido em células esféricas de paredes grossas, uma a três mitocôndrias, um núcleo, um vacúolo e produtos de armazenamento (CINIGLIA et al., 2004).

Figura 2 - Micrografia de *G. sulphuraria*.



p = plastídio, v = vacúolo, m = mitocôndria, n = núcleo.

Fonte: Adaptado de Ciniglia et al. (2004).

O habitat natural da *G. sulphuraria* são fontes ácidas e quentes, por isso são intituladas termoacidófilas (SLOTH et al., 2006). É considerada uma espécie cosmopolita, sendo relatada sua presença em diversos países, como na Itália, nos Estados Unidos, no México, na Indonésia e na Rússia (CINIGLIA et al., 2004). Dessa forma, é uma microalga extremófila capaz de se desenvolver a pH 0,5-4 e temperaturas até 56 ° C, condições que muitos microrganismos não toleraram (SELVARATNAM et al., 2014). Além disso, essa microalga pode crescer autotroficamente, mixotroficamente e heterotroficamente (HENKANATTE-GEDERA et al., 2017).

Além das características supracitadas, a *G. sulphuraria* possui algumas propriedades que a diferenciam das demais *Cyanidiales*, como o crescimento em mais de 50 fontes de carbono, o desenvolvimento em diferentes tipos de ambientes, inclusive em locais secos (YOON et al., 2006).

Existe semelhança entre a estrutura dos cloroplastos das algas vermelhas e das cianobactérias devido à presença de ficobilissomas, formado pelas ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) (MUSTÁRDY; GARAB, 2003). As ficobiliproteínas são pigmentos integrantes do processo de fotossíntese de algas vermelhas e cianobactérias, complementares às clorofilas e carotenoides (HOLLAR et al., 2011; PANGESTUTI; KIM, 2011). Esses pigmentos podem ser azuis

ou vermelhos, e são solúveis em água. A coloração avermelhada presente nesse tipo de alga é devida ao mascaramento da clorofila pelas ficobiliproteínas (PINTO et al., 2003). A elevada solubilidade em água, estabilidade e bioatividade desses pigmentos atraem o interesse de diferentes segmentos industriais, como o de alimentos, o farmacêutico e o de cosméticos (HOLLAR et al., 2011).

A *G. sulphuraria* possui ficocianina e pequenas quantidades de aloficocianina. A produção de ficocianina por essa microalga pode ser realizada heterotroficamente, isto é, sem a necessidade de fontes de luz externas, e mixotroficamente, com aplicação de baixa intensidade de luz (GROSS; SCHNARRENBERGER, 1995; MARQUARDT, 1998; SCHMIDT et al. 2005).

3.4 CAROTENOIDES

A procura por alimentos funcionais vem aumentando, sendo funcional o ingrediente alimentar que comprovadamente reduza o risco de doenças ou melhore a saúde de quem o consome. No escopo desta categoria de alimentos, destacam-se os carotenoides, compostos sintetizados por plantas e microrganismos que lhes conferem as cores amarela, laranja ou vermelha devido à absorção da luz visível. A principal fonte de carotenoides na dieta humana são as frutas e vegetais e seus principais benefícios são sua capacidade antioxidante, que combate o estresse oxidativo (GUEDES et al., 2011), a imunomodulação, atividade anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana, além de prevenir doenças degenerativas como as cardiovasculares, o diabetes e alguns tipos de câncer (BERNAL, et al, 2011; CHRISTAKI, et al, 2013; BUONO et al, 2014).

Por sua elevada procura como compostos bioativos, os carotenoides têm alto valor comercial, tendo os pigmentos antioxidantes produzidos a partir de microalgas papel principal no comércio, fomentando a pesquisa e desenvolvimento de sua produção na biomassa de microalgas (POOJARY et al., 2016). Em 2010 o mercado de carotenoides movimentou US \$ 1,2 bilhão e a previsão é de que até 2018 este valor chegue a US \$ 1,4 bilhão, sendo o carro chefe no mercado o β -caroteno e a astaxantina, com preço médio de US\$ 2.500 / kg (SUGANYA et al, 2016).

A preferência da sociedade por alimentos saudáveis, orgânicos ou aqueles produzidos com aditivos naturais desperta o interesse da indústria para a extração dos carotenoides visando ganhos sociais e econômicos. Estima-se que aproximadamente 1167 tipos de carotenoides tenham sido totalmente caracterizados, incluídos nesse montante aqueles produzidos pelas microalgas (BRITTON et al, 2004; YABUZAKI, 2017). Os carotenoides são compostos lipofílicos e a maioria apresenta uma estrutura C40 comum do isopreno, chamada terpenoide, sendo divididos em dois grupos, carotenos e xantofilas. Cada grupo consiste em diferentes isômeros trans e cis, sendo as xantofilas derivados oxigenados dos carotenos, que são basicamente hidrocarbonetos, sendo relativamente hidrofílicos graças à presença de grupos hidroxila e grupos ceto em seus últimos anéis.

A preferência por carotenoides naturais em detrimento aos sintéticos deve-se à mistura de isômeros trans e cis que conferem atividade anticancerígena aos primeiros, enquanto, os sintéticos são comumente isômeros all-trans. Em comparação com o composto sintético all-trans-beta-caroteno, a concentração natural de beta-caroteno é dez vezes maior nas algas (BEN-AMOTZ et al, 1989).

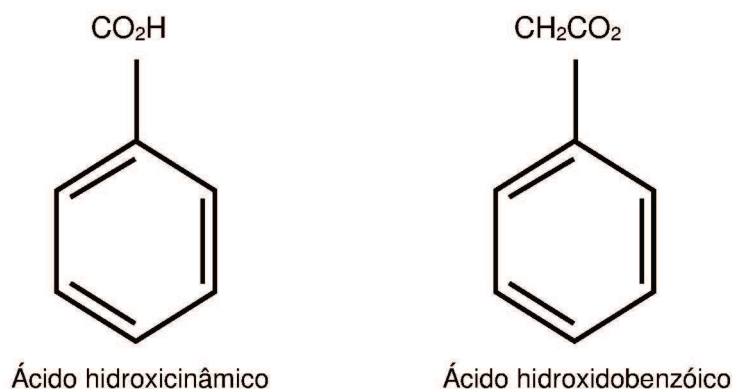
A estrutura dos carotenoides microalgais é diferente daqueles encontrados em frutas e vegetais, especialmente os carotenoides acetilênicos, glicosados e os cetocarotenoides (POOJARY et al., 2016; RODRIGUES, et al, 2015; CRUPI et al., 2013; HAUGAN, LIAAEN-JENSEN, 1994; HERTZBERG et al, 1971). Portanto, dentre as fontes naturais de carotenoides, as microalgas surgem como os maiores potenciais (FERNÁNDEZ-SEVILLA et al, 2010).

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos formados por apenas um anel benzênico com pelo menos uma substituinte hidroxila são chamados compostos fenólicos ou fenóis (ESCARPA e GONZALES, 2001). São denominados polifenóis os agrupamentos de vários anéis aromáticos inclusive os grupos funcionais que os formam além da função hidroxilo, como por exemplo glicosídios e ésteres, sendo metabólitos secundários encontrados amplamente na natureza. De acordo com a estrutura, podem ser classificados de diferentes formas, sendo os fenóis simples representados principalmente pelos ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, (Figura 3) e os

polifenóis representados pelos taninos e flavonoides. Por serem moléculas resultantes de várias polimerizações os taninos possuem peso molecular elevado ao passo que os flavonoides possuem baixo peso molecular (ANGELO e JORGE, 2007; NÚÑEZ-LÓPEZ et al., 2019).

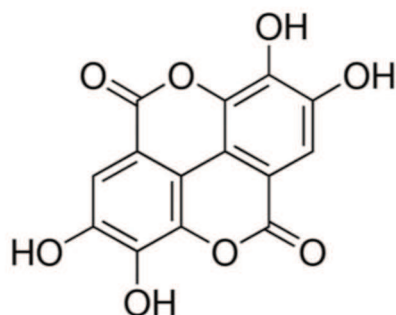
Figura 3 - Estrutura química do ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxidobenzóico.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2010) e Moura et al. (2011).

Além do tamanho, outras propriedades dos taninos são as atividades antioxidantes, capacidade de pigmentação e de ligar-se com proteínas. Existem três grupos de taninos, que são distintos pelas suas estruturas, sendo um desses grupos os taninos hidrolizáveis, formados a partir de ácidos como o gálico e elágico (OKUDA e ITO, 2011). O ácido elágico é um composto fenólico formado por quatro anéis benzênicos (Figura. 4) e está presente principalmente em frutas vermelhas e bagas e em alguns tipos de nozes (PHYTOCHEMICALS, 2019).

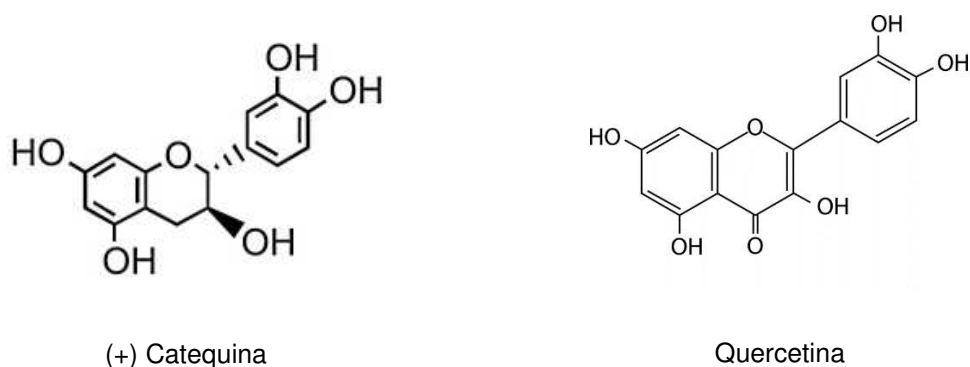
Figura 4 - Estrutura química do ácido elágico.



Fonte: Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com)

Os flavonoides, por sua vez, representam a parte majoritária dos compostos fenólicos naturais conhecidos (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Apesar de haver estudos em quantidade sobre flavonóides em plantas, seu estudo em algas é parco. Recentemente, estudos compararam a composição flavonóide entre algas marinhas e legumes e frutas, detectando que suas estruturas diferem (YOSHIE-STARK et al., 2003). Nesse viés, as macroalgas foram estudadas e revelaram grandes quantidades de catequinas e flavonóis (HEO et al., 2005). A estrutura química desses compostos pode ser verificada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química da catequina e da quercetina.



Fonte: Adaptado de Pecivová et al., (2012); Del Rio (2013).

As múltiplas variantes de ligação entre os anéis aromáticos conferem uma grande diversidade de compostos, sendo conhecidos mais de 8000 (DAI e MUMPER, 2010). Fatores como a época de colheita, ambientais, de processamento e armazenamento podem alterar sua composição nos alimentos de origem vegetal (MANACH et al., 2004). Sua principal função está ligada a ativação ou inibição de variados sistemas enzimáticos, tais como quelantes de metais ou sequestrando radicais livres (GARBISA *et al.*, 2001). Algumas das características desses compostos envolvem sua acidez e sua solubilidade, restrita em água, porém altamente solúvel em solventes orgânicos tal como éter, etanol ou benzeno (RAZA et al., 2018).

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são produzidos de maneira ordinária durante seu desenvolvimento para autodefesa, proporcionando proteção contra danos aos tecidos, a subprodutos nocivos oriundos da fotossíntese, radiação ultravioleta, entre outros (SHAIHIDI, 1996).

A capacidade de atuarem como sequestradores de radicais livres advêm da composição química dos fenóis, o que chamou a atenção de pesquisadores na utilização e influência destes compostos na dieta humana, atuando na prevenção de diversas doenças, como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças decorrentes da oxidação celular (GAMELLA et al., 2006; ELISIA et al., 2007; FUSCO et al., 2010). Paralelamente, os compostos fenólicos são utilizados nas indústrias farmacêuticas e de embalagens de alimentos, como germicidas e prolongadores da vida de prateleira e manutenção de aspectos sensoriais e de segurança, respectivamente (RAZA et al., 2018). Pela sua versatilidade, tais compostos têm relevância bioquímica, farmacológica e medicinal (FREILE-PELEGRÍN e ROBLEDO, 2013; RICO et al., 2017).

Nos alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis por atribuir a coloração, o odor e o sabor de vegetais, sendo utilizados para estes fins pela indústria alimentícia (ANGELO e JORGE, 2007). A dieta humana é provida de fenóis através do consumo de frutas cítricas, frutas vermelhas e diversos legumes e, além do acima exposto, atividades biológicas importantes são desempenhadas dentre as quais se destacam as anti-inflamatórias, anti-alérgicas e anti-microbianas (MIDDLETON, KANDASWAMI, e THEOHARIS, 2000; SHAHIDI e NACZK, 2004; CLAUDINE, ANDRZEJ, e AUGUSTIN, 2005; BALASUNDRAM, SUNDRAM, e SAMMAN, 2006).

Apesar da existência de diversos estudos sobre a existência de compostos fenólicos em fontes vegetais e microbianas, de haver pesquisas sobre a utilização de biocompostos microalgais (ZEPKA et al., 2008; JACOB-LOPES et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; MARONEZE et al., 2016), de testar-se amplamente as propriedades de propriedades antioxidantes de variadas espécies de microalgas e de recorrentes estudos sobre aqueles compostos em macroalgas, existem poucas publicações que levem em conta a presença de fenóis em microalgas (HERRERO et al., 2006 ; JAIME et al. 2005 ; KLEJDUS et al., 2009 ; CHAUDHURI et al., 2014), não havendo especificidade nas informações por falta de exame minucioso, mesmo sendo sabido há certo tempo que os fenóis estão presentes na biomassa microalgal (KLEJDUS et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICROALGA

A microalga utilizada neste estudo, *Galdieria sulphuraria* (SAG107.79), foi adquirida da Coleção de Culturas de Algas da Universidade de Göttingen (SAG).

4.1.2 Meios de Cultivo e Condições de Cultivo

4.1.2.1 Meio Allen's

A manutenção da microalga foi realizada em meio Allen's (Tabela 3). O pH do meio de cultivo foi ajustado a 2,0 com adição de H_3PO_4 (85% de pureza). A *G. sulphuraria* foi cultivada em Erlenmeyer, mantida durante 15 dias em estufa incubadora, sob a temperatura de 45 °C com iluminação constante (3500 lux). Para otimizar a absorção de CO_2 , foi utilizada bomba de aquário promovendo a aeração.

Tabela 3 - Composição do meio Allen's.

REAGENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO
Sulfato de Amônio	$(NH_4)_2 SO_4$	1,32 g/L
Fosfato de Potássio	$KH_2 PO_4$	0,27 g/L
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g/L
Cloreto de Cálcio Dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,074 g/L
Cloreto de Ferro	$FeCl_3$	11 mg/L
Ácido Bórico	H_3BO_3	2,8 mg/L
Cloreto de Manganês	$MnCl_2$	1,8 mg/L
Sulfato de Zinco Heptahidratado	$Zn SO_4 \cdot 7H_2O$	0,218 mg/L
Sulfato de Cobre	$CuSO_4$	0,05 mg/L
Metavanadato de Amônio	NH_4VO_3	0,023 mg/L
Molibdato de Sódio	Na_2MoO_4	0,024 mg/L

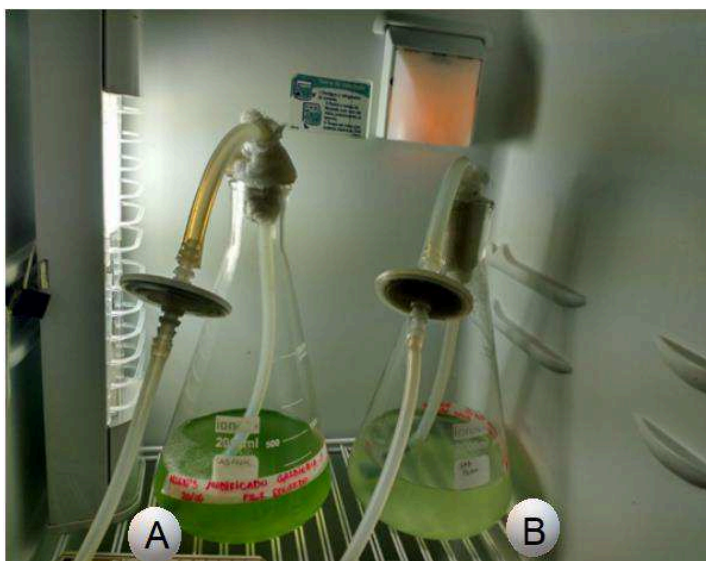
Fonte: SAG (2018).

Os materiais e os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C e os procedimentos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar.

4.1.2.2 Meio alternativo

Tendo em vista que o meio Allen's promove o crescimento lento e reduzido das células, um novo meio foi desenvolvido para realizar a manutenção da *G. sulphuraria* (Figura 6). À exceção da composição do meio de cultivo (Tabela 4), as demais condições de cultivo (pH, iluminação, tempo e temperatura) foram as mesmas utilizadas no cultivo com meio Allen's.

Figura 6 - Cultivos de *G. sulphuraria*.



Cultivo A: meio modificado; Cultivo B: meio Allen's

Fonte: a autora.

Tabela 4 - Composição do meio alternativo.

REAGENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO
Sulfato de Amônio	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1,00 g/L
Fosfato de Potássio	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0,02 g/L
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
Extrato de Levedura	-	0,5 g/L
Extrato de Malte	-	0,5 g/L

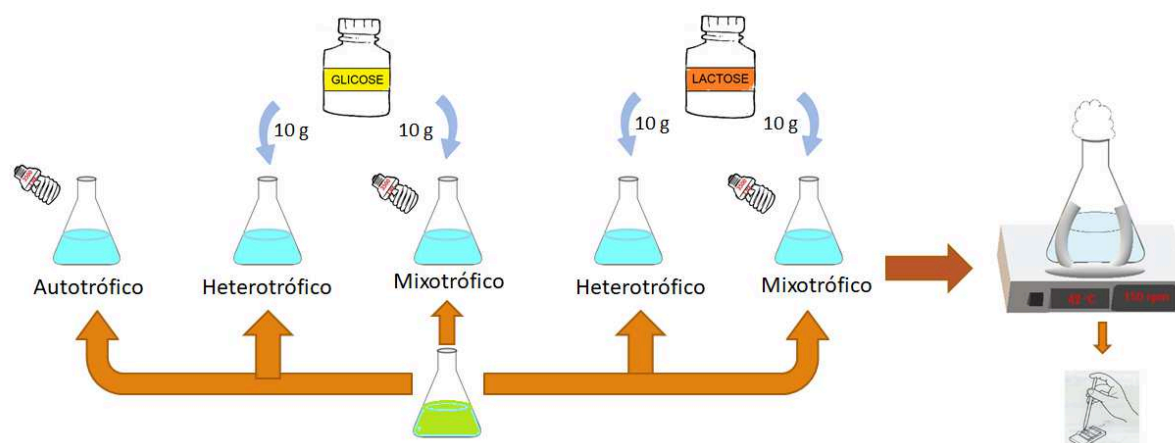
Fonte: a autora.

4.1.2.3 Cultivo em meio Allen's com adição de fonte de carbono

Testes preliminares foram realizados para averiguar a capacidade da *G. sulphuraria* desenvolver-se heterotrofica e mixotroficamente utilizando glicose e lactose como fontes de carbono (Figura 7). Os ensaios foram conduzidos

empregando-se meio Allen's no cultivo autotrófico (sem fonte de carbono orgânico) e nos demais meios. Nas culturas heterotróficas e mixotróficas, foram adicionados ao meio 10g L^{-1} de fonte de carbono, glicose e lactose. Depois da adição de 20% de inóculo aos meios, os cultivos foram mantidos em incubadora de bancada com agitação orbital (Tecnal, TE- 420) a 150 rpm, temperatura de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 dias. Os cultivos autotróficos e mixotróficos receberam iluminação constante (3500 lux). O cultivo heterotrófico recebeu uma película protetora contra a luminosidade. A concentração celular (células. mL^{-1}) do inóculo e do meio de cultivo no seu último dia foi determinada em câmara de Neubauer.

Figura 7- Cultivos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico de *G. sulphuraria*.



Fonte: a autora.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A caracterização físico-química do soro de leite e do permeado do soro de leite foi realizada em triplicata: teor de proteína, teor de cinzas, açúcares totais, pH e nitrato.

4.2.1 Determinação do Teor de Proteína

O teor de proteína do permeado de soro foi determinado de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (2008). Fundamentou-se na determinação de nitrogênio, feita pelo processo de digestão Kjeldahl sendo que a porcentagem

proteica foi encontrada multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelo fator de conversão 6,38.

Para realizar a digestão, a qual transforma o nitrogênio em sal amoniacal, foram adicionados a 5 mL de amostra, 25 mL de ácido sulfúrico e 6 g de uma mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). A destilação foi realizada com solução de hidróxido de sódio (30% m/v) até atingir um ligeiro excesso de base. Essa etapa foi finalizada até a obtenção aproximadamente de 100 mL do destilado. O excesso de ácido sulfúrico foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1M, usando vermelho de metila.

O teor de proteínas foi calculado pela Equação 1:

$$Proteína (\%) = \frac{V \times 0,14 \times f}{P} \quad (1)$$

Onde,

V = diferença entre o número de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o n^o de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação

P = amostra (g)

f = fator de conversão (6,38)

4.2.2 Determinação do Teor de Cinzas

O conteúdo de cinzas foi determinado por meio da incineração da amostra (ADOLF LUTZ, 2008). Em uma capsula previamente aquecida em mufla a 550 °C, resfriada em dessecador e pesada, foram adicionados 5 mL de permeado de soro de leite. A amostra foi evaporada em banho-maria, seca em chapa elétrica e incinerada em mufla a 550 °C. O cálculo do teor de cinzas foi realizado a partir da seguinte Equação 2:

$$Cinzas (\%) = \frac{100 \times N}{P} \quad (2)$$

Onde,

N= cinzas (g)

P = amostra (g)

4.2.3 Determinação de Açúcares Totais

Foi utilizada a técnica Fenol-sulfúrico para a análise de açúcares totais conforme Dubois et al. (1956) com algumas modificações. Uma curva de calibração foi gerada usando glicose como padrão, possibilitando posteriormente estimar a quantidade de açúcares totais na amostra. Diluições seriadas foram realizadas com solução padrão de glicose em concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mg/L.

Para a realização das análises, 2 mL da amostra e 1 mL de solução de fenol 5% foram transferidos para tubos de ensaio sofrendo uma leve agitação. Logo após adicionou-se 5 mL de H₂SO₄ concentrado, homogeneizando cuidadosamente. A mistura ficou resfriando em temperatura ambiente durante 10 minutos. Um branco com 2 mL de água destilada como amostra foi utilizado como controle.

Com os padrões e as amostras devidamente preparadas, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (FEMTO 800 XI, Brasil) no comprimento de onda de 490 nm.

A lactose foi determinada a partir dos açúcares totais considerando a proporção entre os pesos moleculares da glicose e da lactose.

4.2.4 Determinação do pH

O pH foi determinado segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (2008). A leitura da amostra foi realizada em pHmetro de bancada (Even, modelo PHS-3E) previamente calibrado com as soluções tampões (4,00 e 6,86).

4.2.5 Determinação de Nitrato

O conteúdo de nitrato foi estimado através do método ácido salicílico por meio de uma curva de calibração ($R^2 = 0,9981$) construída pela diluição de uma solução de KNO₃ (500 mg/L) nas seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 120 mg / L. Uma alíquota de 0,4 de solução de ácido salicílico ácido sulfúrico 5% (p / v) foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 0,1 mL da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 9,5 ml de solução de NaOH a 8% (p / v), ocorrendo o arrefecimento em

temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. A absorvância foi medida a 410 nm (ZHAO; WANG, 2016).

O teor de nitrato foi calculado a partir da seguinte Equação 3:

$$Y = \frac{CxV}{W} \quad (3)$$

Onde,

Y: teor de nitrato (g/L),

C: concentração de nitrato calculada com OD₄₁₀ na equação de regressão,

V: o total volume da amostra extraída (mL),

W: peso da amostra (g)

4.3 MEIO DE CULTIVO COM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

Com base nos resultados dos ensaios preliminares utilizou-se resíduos da indústria de laticínios que possuem lactose na sua composição para realizar cultivos heterotróficos.

4.3.1 Soro de Leite e Condições de Cultivo

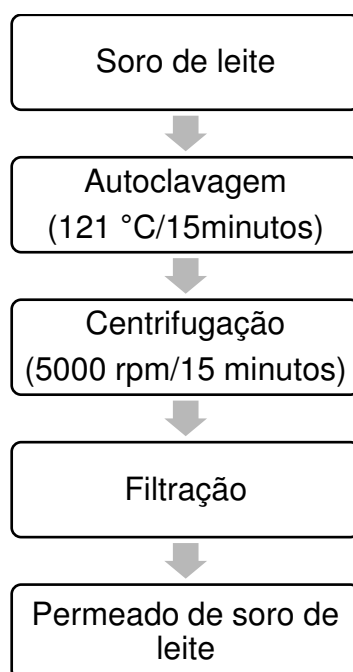
Para esta pesquisa, foi utilizado soro de leite oriundo da produção de queijo *camembert* produzido por uma cooperativa localizada no município de Palmeira, PR. O soro foi estocado à temperatura de -18 °C no Laboratório de Fermentações da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa, e descongelado conforme a quantidade necessária para cada experimento.

O soro de leite foi utilizado como substrato para o crescimento da *G. sulphuraria*. Diferentes concentrações de soro foram empregadas (0% - 100%). A diluição do meio foi realizada com água destilada e o pH ajustado a 4,0 com HCl. Os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Foram inoculados 20 mL de microalga em 100 mL de meio de cultivo. As culturas foram incubadas em estufa (Fanem, modelo 320-SE), sem agitação e temperatura de 42 °C, na ausência de luminosidade.

4.3.2 Permeado de Soro de Leite e Condições de Cultivo

O permeado de soro de leite produzido em laboratório foi utilizado para substituir o meio sintético. Sua obtenção ocorreu por meio de três etapas. Na primeira etapa, o soro de leite foi autoclavado (121 °C - 15 minutos) para que houvesse a precipitação das proteínas. Na segunda etapa, para ocorrer a separação das proteínas precipitadas, o soro de leite depois de atingir temperatura ambiente foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. Por fim, filtrou-se o sobrenadante para reduzir o teor proteico (Figura 8).

Figura 8 - Diagrama de produção do permeado de soro de leite.



Fonte: a autora.

Diferentes concentrações (0% a 100%) de permeado de soro de leite diluído em água destilada foram utilizadas para verificar o crescimento da *G. sulphuraria* nesse efluente. A diluição de 80% foi realizada em triplicata, uma vez que o ensaio realizado anteriormente com o soro de leite demonstrou que essa foi a condição mais favorável para produção de biomassa. Após realizar as diluições necessárias, os meios tiveram seu pH ajustado a 2 com ácido fosfórico. Em seguida, foram autoclavados a 121° C durante 15 minutos. Os experimentos foram realizados em frascos de erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 120 mL de meio de

cultivo e 15% de inóculo, permanecendo em incubadora de bancada com agitação orbital (Tecnal, TE- 420) durante 12 dias, sem iluminação, a 120 rpm e a 45 °C.

Considerando que a melhor condição de cultivo para produção de biomassa foi observada na diluição de 20% de permeado de soro de leite, realizou-se um novo ensaio submetido às mesmas condições de cultivo com diluições variando de 0% a 40% de permeado de soro de leite, diluições próximas a 20% não testadas nas análises anteriores (Figura 9).

Figura 9 - Representação das diluições dos meios de cultivos com permeado de soro de leite.



Fonte: a autora.

4.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Diariamente foi realizada contagem das células em câmara de Neubauer (células.mL⁻¹) para determinação da concentração celular. O peso seco (g.L⁻¹) foi utilizado para determinar a concentração de biomassa celular do inóculo e ao término dos cultivos. Por meio dessas análises foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}), produtividade celular (P), tempo de geração celular (G) e produção máxima (R).

Segundo Bastos (2010), a Equação 4 que descreve a velocidade máxima de crescimento é a seguinte:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(X/X_0)}{t-t_0} \quad (4)$$

Onde,

μ_{\max} = velocidade máxima de crescimento (h⁻¹)

X_0 = é a concentração celular no início da fase exponencial de crescimento

X = concentração celular no final da fase exponencial de crescimento

$t - t_0$ = intervalo de tempo correspondente apenas à fase exponencial de crescimento

A relação entre a variação da concentração celular pela variação da duração de tempo do cultivo determina a produtividade celular. O cálculo, de acordo com Borzani e colaboradores (2001), é descrito pela Equação (5).

$$P = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (5)$$

Onde,

P = Produtividade celular (cél/mL.h)

X_0 = é a concentração celular inicial

X = concentração celular final

$t - t_0$ = intervalo de tempo do início ao fim do cultivo

O tempo de geração, tempo que o microrganismo leva para duplicar a sua biomassa, segundo Bastos (2010), está descrito na Equação (6).

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (6)$$

Onde,

G = tempo de geração (h)

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1})

A produção máxima das culturas (R) foi determinada a partir da subtração número máximo de células atingido ao final do cultivo pelo número de células no inóculo inicial.

4.4.1 Densidade Celular

A densidade celular foi determinada por contagem direta com aumento de 40 vezes em microscópio ótico (Opton, TIM- 2008), com auxílio de uma câmara de Neubauer. A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (cel.mL^{-1}).

4.4.2 Peso Seco

A concentração de biomassa em peso seco foi determinada a partir da centrifugação de uma alíquota do meio de cultivo durante 15 minutos a 5000 rpm (Centrífuga Excelsa 4, modelo 280 R) em tubos previamente pesados, descartando-se o sobrenadante. A biomassa foi seca em estufa a 80 °C por 24 horas. Transcorrido o período da secagem, os tubos contendo a biomassa seca foram alocados em dessecador para o resfriamento, evitando assim a absorção de umidade. Em seguida os tubos foram retirados do dessecador e pesados imediatamente para a determinação da biomassa.

Conhecido o volume do meio centrifugado e determinada a biomassa contida no tubo foi possível determinar a concentração de biomassa (g/L).

4.5 EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS E CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (TLC)

A fim de realizar a TLC para determinar os carotenoides da biomassa de cada uma das diluições ao término dos cultivos, primeiramente foi necessário fazer a extração desses pigmentos. Em um tubo para centrífuga, foi colocado 15 g de biomassa úmida, 5 gramas de esferas de vidro e 2 mL de acetona, submetidos a agitador vortex por 5 minutos. Uma alíquota de 5 mL de acetona foi adicionada ao tubo, sofrendo novamente uma breve agitação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes (extratos) foram transferidos para um novo tubo e secos com nitrogênio gasoso.

A TLC foi realizada com placas de alumínio com sílica-gel (ALUGRAM®, 0,20mm). Nas placas, foram aplicadas, com auxílio de capilares, amostras dos extratos ressuspensos em 0,5 mL de éter de petróleo. As placas foram colocadas em câmara de eluição contendo uma solução de 25% de acetona em hexano até que houvesse a separação dos carotenoides (Cyanotech Corporation, 1998).

4.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os estudos de caracterização de carotenoides foram realizados pela técnica de espectrometria Raman. As análises foram conduzidas no Complexo de Multiusuários (C-Labmu) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), utilizando um espectrômetro Brüker modelo Senterra. O equipamento possui um microscópio óptico acoplado com objetiva com abertura numérica de 50 μm . Dispõe de um laser com luz verde de He-Ne gasoso de 532 nm com potência de 0,2 mW. O tempo de integração de aquisição utilizado foi de 15 segundos na região de 800 a 2000 cm^{-1} .

Os espectros foram obtidos da *G. sulphuraria* seca cultivada em permeado de soro de leite e em meio sintético (*Meio Allen's*) e úmida cultivada no mesmo meio. A preparação das amostras deu-se por meio da centrifugação de 50 mL dos cultivos durante 15 minutos a 3577 $\times g$, descartando-se o sobrenadante. A biomassa foi seca em estufa durante 24 horas a 80 °C.

4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Galdieria sulphuraria* EM BIORREATOR

Conforme resultados obtidos previamente, a diluição de 20% de permeado de soro de leite, utilizada nas fases subsequentes da pesquisa, proporcionou melhores condições para o desenvolvimento da *G. sulphuraria*. Dessa forma, a microalga foi cultivada em biorreator de bancada (Tecnal, Bio-Pro-Tec), com 2,0 L de volume útil, com controle de pH, de temperatura (45 °C) e de oxigênio dissolvido (1 vvm). O pH do permeado de soro de leite 20% foi ajustado a 2 com ácido fosfórico. O meio de cultivo foi autoclavado em vaso de reação durante 15 minutos a 121 °C (Figura 7). A microalga foi inoculada após o resfriamento do meio até temperatura ambiente. Para fins de monitoramento da densidade celular, foi realizada contagem em câmara de Neubauer e peso seco, diariamente, durante os 8 dias de cultivo.

Figura 10. Cultivo da *G. sulphuraria* em biorreator de bancada.



Fonte: a autora.

Simultaneamente, realizou-se um ensaio com permeado de soro de leite 20% em incubadora de bancada com agitação orbital (Tecnal, TE- 420) com as mesmas condições apresentadas no item 4.3.2. O cultivo teve duração de 8 dias.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DO BIORREATOR

4.8.1 Demanda Química De Oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio (DQO) do permeado de soro de leite e do efluente remanescente do cultivo em biorreator foi determinada através do Método de Refluxo Fechado. Esta técnica baseia-se em uma reação de oxidação da matéria orgânica e inorgânica da amostra por quantidade determinada de dicromato de potássio na presença de catalizador em meio ácido e temperatura elevada (APHA, 2012).

A DQO foi realizada a partir da curva de calibração para alta concentração ($R^2 = 0,991$) pela diluição de uma solução padrão de biftalato de potássio. As amostras foram filtradas com uma membrana de 0,45 μm com o auxílio de uma bomba à vácuo. Em tubos de DQO, foram adicionados 2 mL do efluente, 2

mL de uma solução digestora e 2 mL de uma solução catalítica. O branco foi produzido a partir de água destilada. Os frascos contendo as amostras foram levados à digestão por duas horas à 148 °C. Após o resfriamento, foi feita leitura em espectrofotômetro a 600nm (APHA, 2012).

4.8.2 Demanda Bioquímica De Oxigênio (DBO)

A demanda bioquímica de oxigênio do efluente e do permeado de soro de leite foi determinada pelo método de incubação a 20 °C por 5 dias. Em frascos de Winkler foi adicionado 0,3 mL de solução de tampão fosfato, 0,3 mL de solução de sulfato de magnésio, 0,3 mL de cloreto de cálcio, 0,3 mL de cloreto férrico e 2 mL da amostra. O frasco foi completado com água aerada e agitado cuidadosamente. Os frascos contendo as amostras foram embalados em papel alumínio e incubados por 5 dias a 20 °C. Aos frascos que foram titulados no dia foi adicionado 1 mL de solução de manganês, 1 mL de iodeto azida alcalina e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para titulação com tiosulfato de sódio 0,0125 M, adicionou-se 3 gotas de solução de amido em 100 mL de amostra preparada. O ponto de viragem observado foi quando a solução passou de azul para incolor. Esse mesmo procedimento foi feito com os frascos que foram para incubadora a 20 °C durante 5 dias.

O cálculo da DBO foi realizado aplicando-se as Equações 6 e 7:

$$OD \text{ (mg O}_2\text{/L)} = \frac{V * 0,00125 * Fc * 8000 * 300}{(100 * Vu)} \quad (6)$$

$$DBO \text{ (mg O}_2\text{/L)} = OD_{\text{inicial}} - OD_{\text{final}} \quad (7)$$

Onde:

OD= O₂ dissolvido

V= volume gasto de tiosulfato (mL)

Fc= fator de correção da solução de tiosulfato 0,0125M

V_u= volume de amostra utilizado

4.9 SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTÔMETRO DE MASSA (LC-ESI-MS/MS)

4.9.1 Preparação da Amostra

O cultivo do biorreator e da incubadora de bancada com agitação orbital foram centrifugados durante 15 minutos a 5000 rpm para separação da biomassa do efluente. A biomassa foi seca em estufa a 80 °C durante 24 horas antes do processo de extração dos compostos fenólicos e o efluente foi congelado e permanecendo assim até o momento das análises. A extração dos compostos fenólicos da biomassa decorrente do cultivo em incubadora de bancada com agitação orbital ocorreu com a microalga *in vivo*.

Para a extração dos compostos fenólicos, a biomassa de 50 mL de cultivo foi colocada em um tubo para centrífuga, 5 gramas de esferas de vidro e 2 mL de acetona, submetidos a agitador vortex por 5 minutos. Uma alíquota de 5 mL de acetona foi adicionada ao tubo, sofrendo novamente uma breve agitação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3577xg durante 5 minutos. Os sobrenadantes (extratos) foram transferidos para um novo tubo e secos com nitrogênio gasoso.

Adicionou-se metanol aos extratos, avolumando a 1mL. A solução foi centrifugada durante 4 minutos a 14000 rpm, diluída 10 vezes em metanol: água (70:30) e injetada em cromatógrafo acoplado ao detector de massas em tandem LC-ESI-MS/MS.

4.9.2 Avaliação Dos Compostos Fenólicos

As análises foram realizadas em sistema cromatográfico acoplado a espectrômetro de massas com íon trap linear. Utilizou-se coluna Synergi TM (4.0 µm, 2.0 x 150 mm d.i.; Phenomenex, USA) para separação dos compostos. Para fase móvel, foi utilizada uma solução de solução de metanol 95 % e água 5 % e ácido fórmico 0,1 % , a um fluxo de 250 µl min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL e temperatura de 30 °C. Tempo de retenção, íon precursor e seus fragmentos embasaram a identificação dos compostos. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram

otimizados pela infusão de soluções constituída de compostos de interesse (Tabela 5). As curvas de calibração e íon quantitativo selecionado para cada composto foram utilizados para a quantificação dos compostos.

Tabela 5 - Analitos e fragmentos utilizados para identificação de compostos fenólicos em *G. sulphuraria*.

Composto	Íon precursor (m/z) Q1	Íon precursor (m/z) Q3	Tempo de retenção (min)
4- aminobenzóico	135.85	90.5	10.47
Ácido salicílico	136.9	91.1	10.99
Quercetina	301.010	149.30	10.84
Acido elagico	300.813	142.50	11.71
Catequina	288.853	120.30	8,82

Fonte: a autora.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

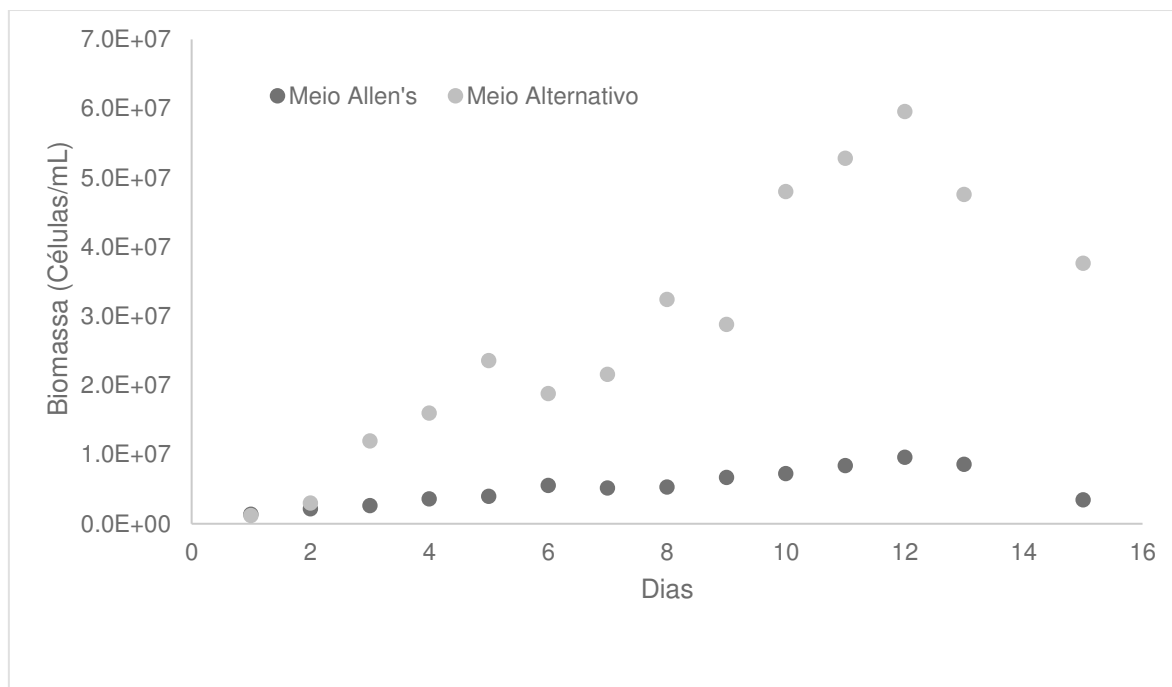
Os experimentos realizados em triplicata tiveram seus resultados expressos pela média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), assumindo $p < 0,05$ (5%) seguida de comparação de médias pelo teste Tukey. O software Past versão 3.20 foi utilizado para a realização das análises estatísticas. Os espectros foram construídos no software Origin® 8.

5 RESULTADOS

5.1 PROPOSTA DE MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO PARA MANUTENÇÃO DE *GALDIERIA SULPHURARIA*

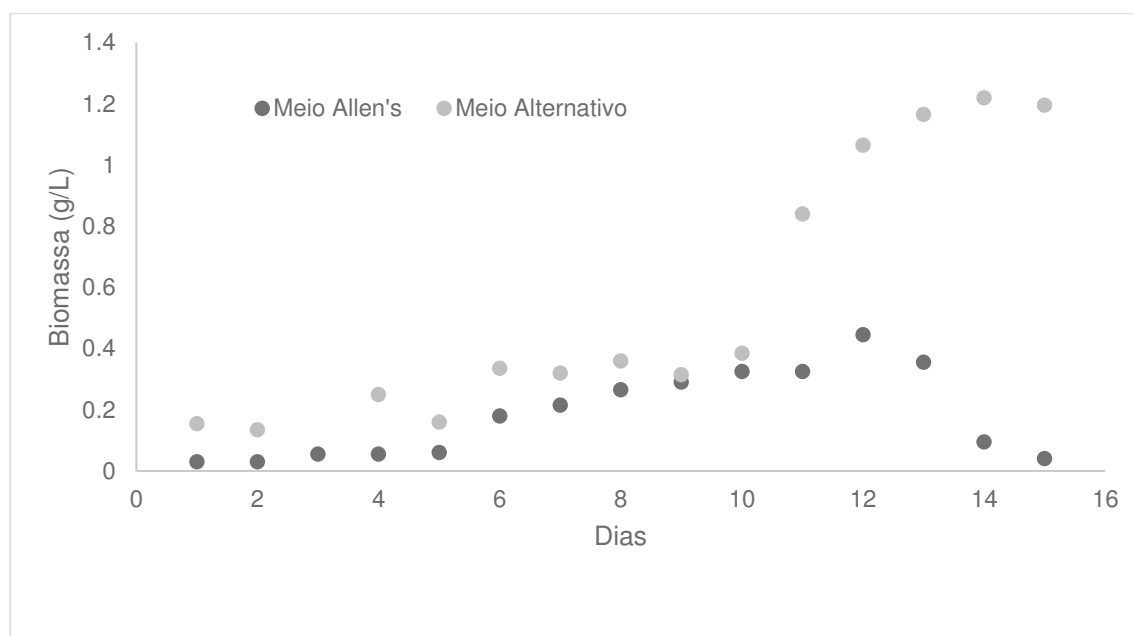
Durante a realização dos experimentos, foi averiguada a necessidade de um meio sintético que aumentasse a produção de biomassa. Foi então desenvolvido um meio alternativo composto por uma menor quantidade de reagentes, tornando sua preparação mais rápida e simples. Diferentemente do meio Allen's, nesse meio, por exemplo, não há a necessidade de autoclavar reagente separadamente, visto que os reagentes utilizados não promovem o escurecimento do meio quando esterilizados conjuntamente. A Figura 11 e 12 representam a curva de crescimento da *G. sulphuraria* em um dos meios sintéticos mais utilizados para o cultivo dessa espécie de microalga, o meio Allen's, e o novo meio proposto.

Figura 11 – Curva de crescimento da biomassa da *G. sulphuraria* em diferentes meios de cultura sintéticos em células/mL.



Fonte: a autora.

Figura 12 – Curva de crescimento da biomassa da *G. sulphuraria* em diferentes meios de cultura sintéticos em g/L



Fonte: a autora.

A maior produção de biomassa da *G. sulphuraria*, foi observada no novo meio proposto. A concentração máxima de células no meio Allen's e no meio alternativo ocorreu no 12º dia e no 14º, respectivamente. A produção de biomassa no novo meio, em células/L, foi aproximadamente dez vezes maior, enquanto que em g/L foi mais que o dobro, quando comparado ao meio Allen's.

A discrepância observada no comportamento entre os gráficos de contagem celular e massa celular pode ser atribuída à massa celular individual. O aumento expressivo da massa celular do meio alternativo ocorreu no 11º dia. Por outro lado, a contagem celular demonstrou que o número de células já havia aumentado consideravelmente antes desse período. Assim, as células apresentaram variação nos seus tamanhos ao longo do cultivo.

5.2 CULTIVO EM MEIO ALLEN'S COM ADIÇÃO DE FONTE DE CARBONO

O cultivo da *G. sulphuraria* em meio Allen's com adição de fonte de carbono serviu como um ensaio preliminar para verificar o comportamento da microalga diante de diferentes açúcares e tipos de metabolismo. Os resultados da produtividade celular e da produção máximo calculados a partir da contagem celular estão na Tabela 6.

Tabela 6- Produção e produtividade de *G. sulphuraria* cultivada em em meio Allen's com adição ou não de fonte de carbono.

Meios de cultivo sintéticos	Produtividade (10 ⁴ cél/mL.h)	Produção (10 ⁶ cél/mL)
Autotrófico	0,71	0,40
Heterotrófico com glicose	4,55	6,84
Heterotrófico com lactose	6,62	10,32
Mixotrófico com glicose	3,52	5,12
Mixotrófico com lactose	0,09	-0,64

Fonte: a autora.

A fonte de carbono lactose combinada com o metabolismo heterotrófico produziu os melhores resultados de produtividade e produção. O metabolismo mixotrófico, mesmo com a presença de lactose apresentou produção negativa.

A partir desses resultados pode-se verificar a possível viabilidade da utilização de efluentes da indústria de laticínios como substrato para o desenvolvimento da *G. sulphuraria*, uma vez que o principal açúcar contido nesse meio é a lactose.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE E DO PERMEADO DE SORO DE LEITE

Os resultados das análises físico-químicas do soro de leite e do permeado de soro de leite estão representados pela Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização do soro de leite e do permeado do soro de leite.

Substrato	Proteína (%)	Cinzas (%)	Açúcares Totais (g/L)	Lactose (g/L)	pH	Nitrato (g/L)
Soro de leite	1,22 ± 0,05	0,58 ± 0,06 ^a	68,06 ± 2,80 ^a	3,58 ± 1,47 ^a	5,70 ± 0,05 ^a	1,28 ± 0,21 ^a
Permeado de soro de leite	ND*	0,47 ± 0,08 ^b	20,32 ± 1,43 ^b	10,70 ± 0,75 ^b	4,65 ± 0,03 ^b	1,54 ± 0,19 ^a

*Não detectado nas condições analisadas.

Médias ± desvio padrão seguidos pela mesma letra, numa mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

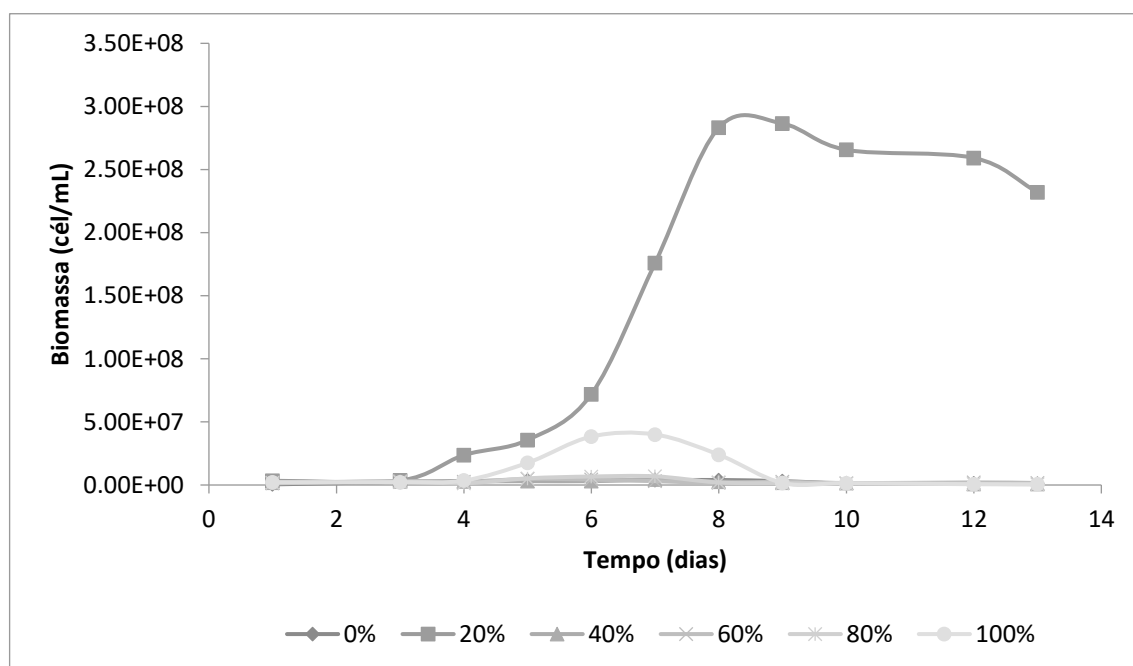
Todos os parâmetros analisados no soro de leite e no permeado de soro de leite diferiram estatisticamente, exceto o conteúdo de nitrato. A quantidade de lactose no permeado de soro de leite foi quase três vezes superior ao encontrado soro de leite.

Na literatura são verificados valores muito distintos de conteúdo de lactose no soro e no permeado de leite. Segundo Song e colaboradores (2007), o teor de lactose no permeado de soro de é de aproximadamente 40mg/L. Lavari e colaboradores (2015) obtiveram um teor de lactose mais semelhante ao presente estudo. Por meio de uma análise enzimática, detectaram 26,8g/L de lactose no permeado de soro de leite.

5.4 MEIO DE CULTIVO COM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

As figuras 13 e 14 demonstram o perfil de crescimento da *G. sulphuraria* em diferentes condições de cultivo com concentrações de permeado de soro de leite variando entre 0% e 100%. As cepas da microalga não foram previamente adaptadas ao cultivo contendo lactose, no entanto não houve fase de adaptação das concentrações de 30%, 35% e 40%. As demais diluições passaram por esta fase por tempos variados.

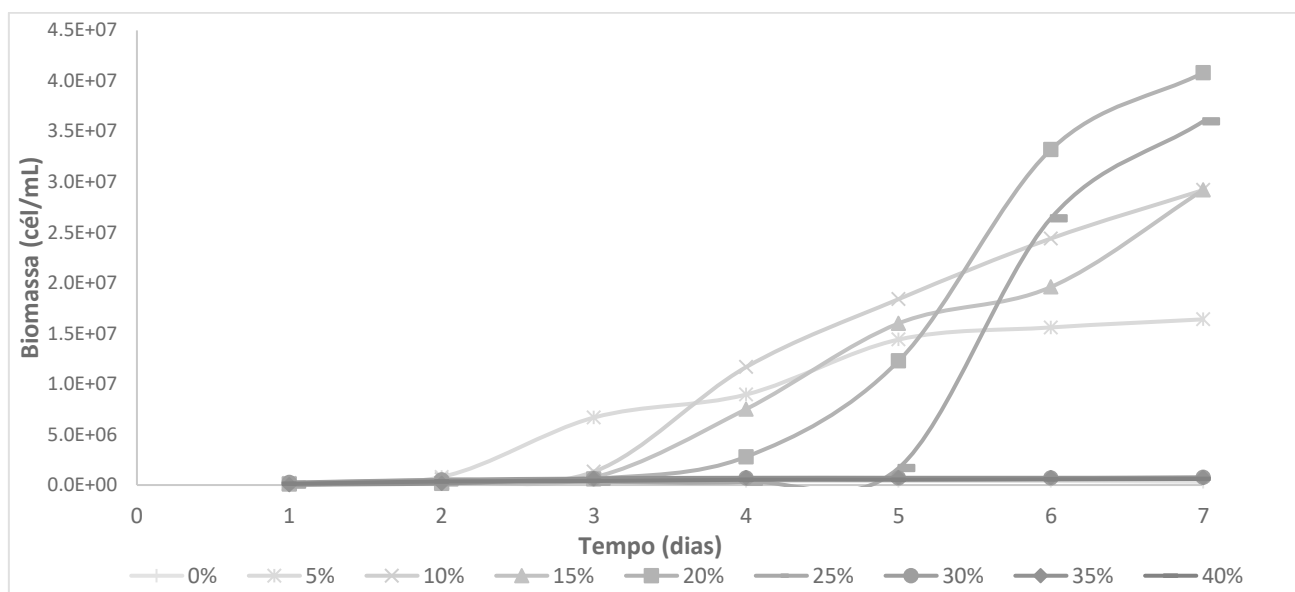
Figura 13 - Curva de crescimento da *G. sulphuraria* em diferentes concentrações de permeado de soro de leite (0% - 100%)



Fonte: a autora.

A partir dos dois gráficos é possível prever que o cultivo com adição de 20% de permeado de soro de leite tem a capacidade de produzir biomassa de *G. sulphuraria* em maior quantidade.

Figura 14 - Curva de crescimento da *G. sulphuraria* em diferentes concentrações de permeado de soro de leite (0%- 40%).



Fonte: a autora.

Como pode ser observado na Figura 13, a microalga, em todas as concentrações, houve uma redução da fase exponencial de crescimento até o sétimo dia de cultivo. Segundo Coelho (2013), normalmente o esgotamento de nutrientes ou o sombreamento celular são as causas para o início da fase estacionária. Este experimento fundamentou os ensaios subsequentes, por isso os cultivos com concentrações de permeado de soro de leite variando de 0% a 40% foram encerrados no sétimo dia.

A microalga cultivada em 25% de permeado de soro de leite apresentou o comportamento de crescimento mais próximo ao verificado na concentração de 20%. As demais concentrações apresentaram crescimento menos expressivo, sobretudo nos cultivos com maior teor de permeado de soro de leite (30%, 35% e 40%).

A Tabela 8 apresenta os valores da velocidade máxima de crescimento, produtividade celular, tempo de geração e produção dos ensaios com a *G. sulphuraria* em permeado de soro de leite.

Tabela 8 - Resultados da cinética de crescimento da *G. sulphuraria* em diferentes concentrações de permeado de soro de leite.

Permeado de soro de leite (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Produtividade máxima (10 ⁵ cél/mL.h)	Tempo de geração (h)	Produção (10 ⁷ cél/mL)
0	0,27	0,04	2,56	0,003
5	0,23	1,33	3,04	1,60
10	0,18	3,00	3,88	2,88
15	0,18	3,00	3,87	2,88
20	0,24	5,60	2,86	4,04
25	0,36	7,41	1,92	3,56
30	0,27	0,43	2,58	0,31
35	0,27	0,38	2,50	0,27
40	0,52	0,09	1,34	0,15

Fonte: a autora.

As concentrações de permeado de soro de leite que apresentaram menores resultados de produtividade foram aquelas com maior teor de fonte de carbono, 30%, 35% e 40%. Também apresentou produtividade quase nula o cultivo de 0% de permeado de soro de leite, que foi constituído apenas por água destilada. Em contrapartida, os cultivos com adição de 20% e 25% de permeado de soro de leite apresentaram os melhores resultados de produtividade.

Resultados semelhantes ao deste estudo foram encontrados por Bracher e colaboradores (2015). Eles avaliaram o crescimento de *Chlorella minutissima* e *Spirulina sp.* utilizando soro de leite como fonte de carbono. A melhor condição de cultivo verificada foi com a *Spirulina sp.*, produzindo 1,96g/L de biomassa a partir de 25% de soro de leite diluído em Meio Zarrouk modificado. A *Chlorella minutissima* desenvolveu-se melhor em 20% de soro de leite diluído em Meio Bristol modificado.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

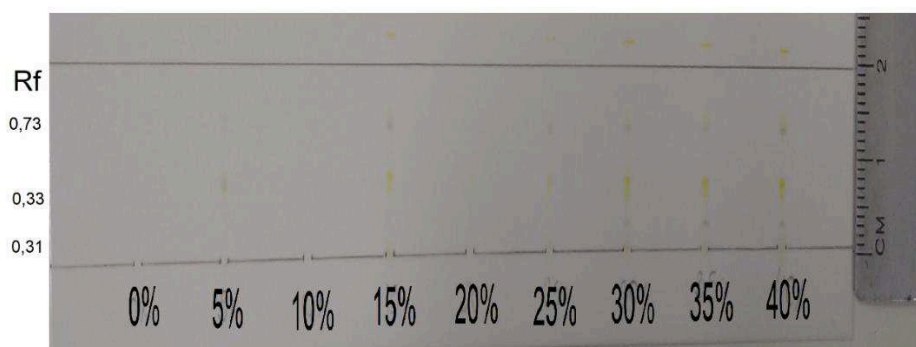
5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada

De acordo com a literatura científica, a *G. sulphuraria* produz ficocianina mesmo em condições heterotróficas (SLOTH et al, 2006; SLOTH, 2017; WAN et al, 2016).

Neste sentido, era esperado que o cultivo com permeado de soro de leite apresentasse biomassa com coloração esverdeada ou azulada, no entanto desenvolveu uma biomassa amarela. A TLC foi realizada com objetivo de realizar uma análise preliminar do perfil de carotenoides da *G. sulphuraria* cultivada em permeado de soro de leite.

A TLC é uma técnica barata e pouco complexa, largamente utilizada para separar e purificar carotenoides. Os extratos de biomassa de *G. sulphuraria* cultivadas em concentrações distintas de permeado de soro foram separados em 3 bandas diferentes pela TLC. Segundo Grung e colaboradores (1992), o valor do fator de retenção (Rf) 0,31 e 0,33, como pode ser verificado na Figura 15, corresponde ao carotenoide astaxantina, sendo encontrado em grande parte das diluições de permeado de soro de leite (5%, 15%, 25%, 30%, 35% e 40%). A banda com Rf de 0,73 equivale à astaxantina diester, observada nas diluições de 15%, 25%, 30%, 35% e 40%. Diferentemente do esperado, não foi confirmada a presença do pigmento azul ficocianina em nenhum dos tratamentos.

Figura 15 - TLC do extrato de biomassa de *G. sulphuraria* contendo carotenoides.



Fonte: a autora.

As condições nutricionais e físicas da cultura afetam não só o desenvolvimento celular, mas também a produção de pigmentos em microalgas. Alguns fatores como pH, temperatura, fornecimento de oxigênio, luminosidade, traços de metais e nível e atividade das enzimas biossintéticas estão diretamente ligados ao tipo e quantidade de carotenoide produzido (BHOSALE, 2004; LIU; WU 2007; BUZZINI et al, 2005). Outra condição importante na produção de carotenoides é a fonte de carbono utilizada. Quando cultivada em condições heterotróficas, a *G. sulphuraria* perde

gradualmente sua pigmentação, a qual está relacionada à linhagem da microalga e o tipo de substrato utilizado (GROSS; SCHNARRENBARGER, 1995; STADNICHUK et al., 1998). Tischendorf e colaboradores (2007) revelaram que o crescimento heterotrófico da *G. sulphuraria* em lactose causou o branqueamento da estirpe 107.79. Este efeito pode justificar a ausência de ficocianina na microalga do presente estudo, já que os trabalhos que relataram a presença de ficocianina utilizaram outras fontes de carbono (GRAVERHOLT; ERIKSEN, 2007; SCHMIDT et al., 2005; SLOTH et al., 2006).

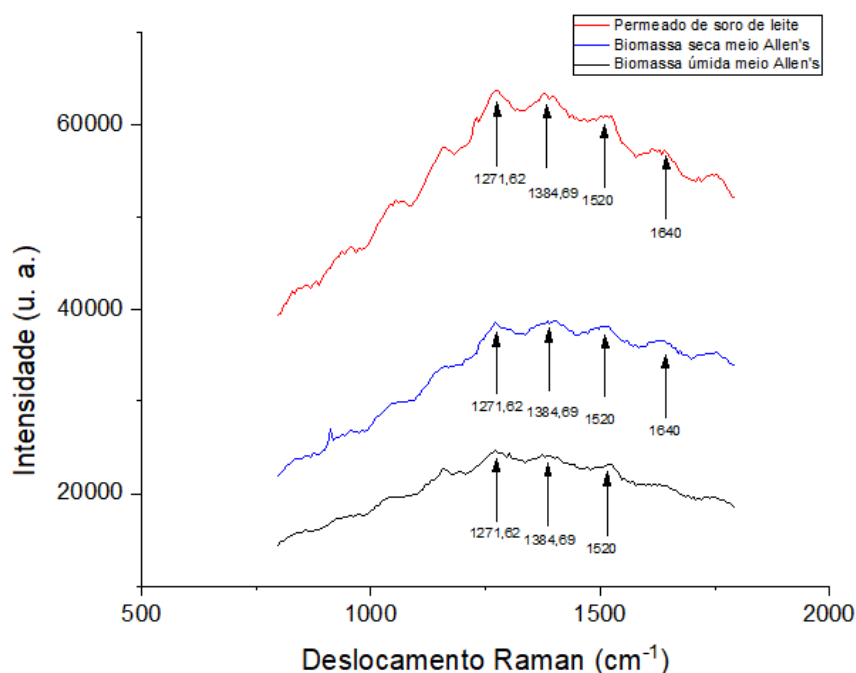
Até o presente momento não há relatos sobre a produção de astaxantina por *G. sulphuraria*, mas sim, por outras espécies de microalgas, como por exemplo, *Haematococcus sp.* e *Chlorella sp.* Esses resultados devem ser confirmados em trabalhos futuros, utilizando técnicas analíticas mais precisas (HPLC).

5.5.2 Análise no Espectro Raman

A Figura 16 representa o espectro Raman com faixa espectral de 800 a 2000 cm^{-1} da biomassa de *G. sulphuraria* cultivada em meio sintético (Allen's) e em permeado de soro de leite. Os sinais foram identificados com o auxílio da literatura.

Observando o espectro da biomassa originária de meio de cultivo sintético (Allen's), verifica-se a presença de quatro picos distintos característicos de carotenoides. Segundo Tschirner (2011), essa classe de compostos apresenta sinal no espectro Raman entre 1005 e 1524 cm^{-1} . A banda em 1006 cm^{-1} está relacionada aos modos de balanço do plano do grupo metil na cadeia de polieno de carotenoides. Atribui-se aos picos 1520 e 1156 cm^{-1} os alongamentos simétricos C = C e C – C da cadeia de polienos dos carotenoides, respectivamente (CARVALHO, 2019; CINTĂ PINZARU et al., 2015; HUO et al., 2011; KILLEEN et al., 2013; SEBBEN et al., 2018).

Figura 16 - Espectro Raman da biomassa de *G. sulphuraria* cultivada em meio sintético e em permeado de soro de leite.



Fonte: a autora.

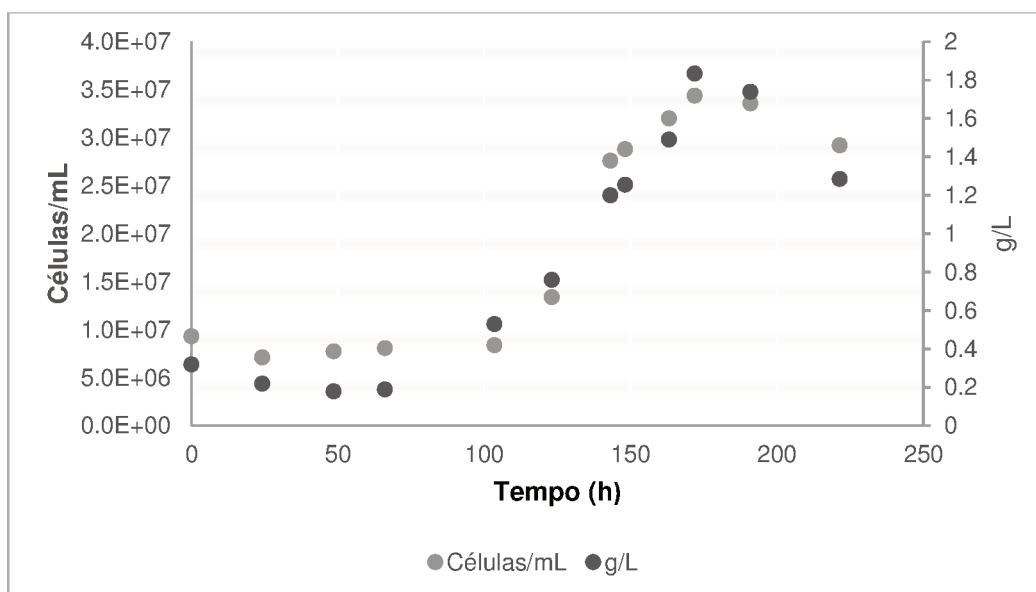
O espectro Raman da microalga cultivada em permeado de soro de leite apresentou mais picos do que o verificado na biomassa do meio sintético. Três bandas estiveram presentes em todas as amostras analisadas (1271,62, 1384,69 e 1520), todas típicas de carotenoides. A banda 1520 cm^{-1} é atribuída à astaxantina (FAGERER et al., 2013; KACZOR et al., 2011). O pico 1640 cm^{-1} corresponde às vibrações das ligações C = C e C = N na molécula de ficocianina (LEU et al, 2013) e pode ser observado na biomassa seca cultivada em meio Allen's e em permeado de soro de leite.

Graziani e colaboradores (2012) caracterizaram *G. sulphuraria* cultivada em condições autotróficas e heterotróficas. Investigaram a presença de β -caroteno, astaxantina, luteína e criptoxantina. O conteúdo de carotenoides apresentou uma grande diferença entre as células dos diferentes cultivos, apenas as células autotróficas apresentaram dois dos carotenoides avaliados, luteína e astaxantina. Os demais carotenoides não foram detectados em nenhuma das condições de cultivo, ou seja, as células heterotróficas não foram capazes de sintetizar carotenoides.

5.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO BIORREATOR

A concentração celular da *G. sulphuraria* cultivada em biorreator de bancada ao longo de 8 dias pode ser verificada na Figura 17. Durante o cultivo, houve controle de ph, temperatura e oxigênio dissolvido.

Figura 17 - Curva de crescimento da *G. sulphuraria* cultivada a 45 °C, pH 2, 1 vvm, em biorreator de bancada



Fonte: a autora.

As curvas de crescimento baseadas nos resultados da contagem de células (células/mL) e peso seco (g/L) apresentaram comportamento semelhante. De acordo com a contagem celular, a fase de adaptação da microalga ao cultivo durou 5 dias. Por outro lado, a análise do peso seco demonstrou que essa mesma fase perdurou por 4 dias. A concentração máxima de biomassa (1,85 g/L e $3,4 \cdot 10^7$ células/mL) foi obtida no sétimo dia de cultivo. A fase de declínio foi verificada no penúltimo dia de cultivo. Da mesma maneira, González e colaboradores (2014) verificou o desempenho da microalga *Chlorella vulgaris* em permeado de soro de leite e no sétimo dia de cultivo foi possível identificar a maior densidade celular da microalga.

Suwal e colaboradores (2019) investigaram a capacidade da microalga *Tetrademus obliquus* desenvolver-se em soro de leite e produzir galactooligossacarídeo. A concentração celular máxima encontrada foi 2,28 g/L,

atingida aos 21 dias de cultivo. Outro estudo revelou a incapacidade da microalga *Chlorella spp* crescer mediante presença de lactose. Contudo, a microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou bom desenvolvimento em condição mixotrófica em permeado de soro de leite acrescido de água de lago ou de meio basal, alcançando densidade celular de 4,9 g/L (GIRARD et al.,2014). Existem trabalhos relevantes sobre microalgas capazes de consumir lactose de permeado de soro de leite na literatura científica (GIRARD et al, 2017; GONZÁLEZ et al, 2014; BORGES, 2016), porém nenhum com a *G. sulphuraria*.

A velocidade máxima de crescimento, produtividade máxima e tempo de geração estão representados na Tabela 9. O cálculo da produtividade máxima foi realizado considerando o peso seco, as demais determinações foram fundamentadas na contagem celular.

Tabela 9 - Resultados da cinética de crescimento da *G. sulphuraria* cultivada em biorreator em permeado de soro de leite 20%.

$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Produtividade máxima (g/L.h)	Tempo de geração (h)
0,25	0,02	2,78

Fonte: a autora.

Os valores da velocidade específica de crescimento (0,25 h⁻¹) e produtividade máxima da *G. sulphuraria* em permeado de soro de leite são superiores ao reportado pela literatura. O desenvolvimento da *G. sulphuraria* em resíduos de padaria e restaurante foi alvo de estudos de Sloth 2017 e colaboradores que verificaram a velocidade específica de crescimento entre 0,36 e 1,22 dia⁻¹. Em trabalho análogo, a microalga cultivada heterotroficamente em glicose, frutose ou glicerol atingiu 1,2 dia⁻¹ (SLOTH et al., 2006). Graverholt e Eriksen (2007) cultivaram *G. sulphuraria* em fluxo contínuo, encontrando produtividade máxima de 50 g L⁻¹ dia⁻¹.

5.7 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO)

Na Tabela 10 são apresentados os resultados das concentrações de DQO e DBO do permeado do soro de leite e do efluente gerado após cultivo de *G. sulphuraria*

em biorreator. A concentração de DQO e DBO foi maior no permeado de soro de leite havendo uma redução de 60% de DQO e 44% DBO no efluente resultante do cultivo de *G. sulphuraria* em permeado de soro de leite 20% em biorreator de bancada. A DBO e DQO inicial relatado por Janczukowicz e colaboradores (2008) em soro de queijo duro e queijo cotagge foi de 26766 mg e 58549.6 mg, respectivamente, enquanto no soro de queijo duro a DBO e DQO obtiveram uma média de 29480 mg e 73445 mg, respectivamente. Ainda, no mesmo estudo, relataram a dificuldade da biodegradação do soro de leite quando comparado a outros efluentes da indústria de laticínios analisados. No entanto, considerando que a razão entre DBO e DQO estima a biodegradabilidade e que valores inferiores a 0,60 indica baixa biodegradação, Danalewich et al. (1998) demonstrou que a maioria dos componentes do leite são biodegradáveis, uma vez que em seu trabalho, efluentes da indústria de laticínios após tratamento apresentaram relação DBO/DQO igual a 0,63.

Tabela 10 - Concentrações de demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio no cultivo de *G. sulphuraria* em permeado de soro de leite.

Material	Concentração (mg O ₂ L ⁻¹)		DQO/DBO
	DQO	DBO	
Permeado de soro de leite 20%	19746,66 ± 653,20	12978,00 ± 4369,92	1,52
Efluente	7906,67 ± 81,10	7261,50 ± 218,50	1,09

Fonte: a autora.

O resultado da relação DQO e DBO indica uma pequena redução desse parâmetro no efluente (1,52 para 1,09), demonstrando que a *G. sulphuraria* utilizou parte dos compostos biodegradáveis para incremento celular. Efluentes com baixos valores de DQO/DBO inferem na presença de elevada fração biodegradável sendo indicado a utilização de tratamento biológico, como o verificado no presente estudo. Salati e colaboradores (2017) avaliaram o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em diferentes tipos de substratos, inclusive em permeado soro de queijo. A relação DQO/DBO verificada no soro de queijo (1,51) assemelha-se a quantidade relata pelo presente estudo.

A literatura expõe a dificuldade em tratar o soro de leite devido à sua baixa alcalinidade, a qual contribui para sua rápida acidificação (MALASPINA et al., 1995). Tal condição não é um obstáculo para o desenvolvimento da *G. sulphuraria* nesse tipo

de substrato, pelo contrário, ela fornece um ambiente favorável para o crescimento dessa microalga.

Atualmente no Brasil, não há legislação específica para disposição final do permeado de soro de leite e não existe padrão de DQO. A Resolução do CONAMA 357/05, em seu Art. 16, determina a remoção mínima de 60% da DBO de efluentes de qualquer fonte poluidora lançado diretamente em corpo receptor, salvo exceções. Nesse sentido, apesar do permeado de soro de leite tratado por *G. sulphuraria* ainda não ter atendido os padrões legais vigentes, a DBO foi reduzida em 44%.

5.7 PERFIL FENÓLICO DOS EXTRATOS

5.7.1 Parâmetros De Desempenho Analítico Para Análise

Os parâmetros de mérito referentes à determinação de compostos fenólicos na microalga *G. sulphuraria* cultivada em biorreator de bancada e em incubadora de bancada com agitação orbital utilizados nas análises por LC-ESI-MS/MS estão representados na Tabela 12. As faixas de calibração do 4- aminobenzóico, ácido salicílico, da quercetina, do ácido elágico e da catequina foram, respectivamente, 0,01 a 5,0, 0,1 a 4,0, 0,08 a 3,21, 0,3 a 4,0 e 0,27 a 5,4.

Tabela 11 - Faixa linear, coeficiente de determinação (R^2), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) utilizados para os compostos fenólicos identificados

Composto fenólico	Faixa linear(mg L^{-1})	R^2	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})	RSD (%)
4- aminobenzóico	0,01 - 5,0	0,993	0,021	0,068	6,734
Ácido salicílico	0,1 - 4,0	0,993	0,004	0,013	1,559
Quercetina	0,08 - 3,21	0,997	0,011	0,036	0,819
Ácido elágico	0,3 - 4,0	0,999	0,121	0,402	4,257
Catequina	0,27 - 5,4	0,999	0,039	0,13	6,88

Fonte: a autora.

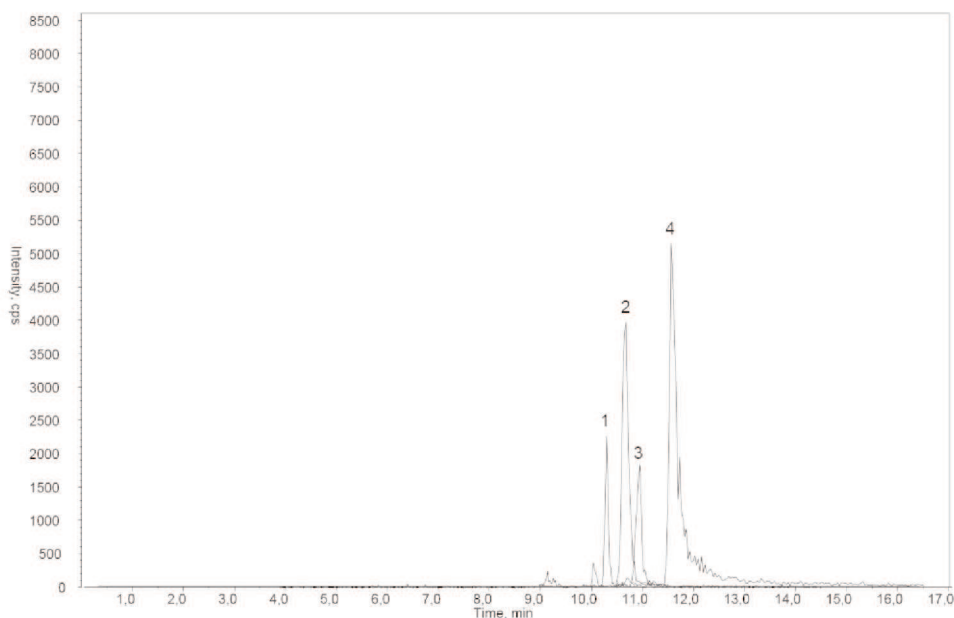
Os coeficientes de correlação apresentaram resultados satisfatórios, acima de 0,99. Isso demonstra uma relação adequada entre a concentração dos composto e as áreas das bandas, considerando a curva de calibração.

Os cálculos para os limites de detecção (LOD) na ordem de mg/g foram realizados levando em conta três vezes o desvio padrão de dez leituras do branco da amostra pelo valor de inclinação da curva. Os valores encontrados indicam que a sensibilidade do método proposto foi satisfatória. Os cálculos dos limites de quantificação (LOQ) consideraram 3,3 o valor do LOD. O desvio padrão relativo (RSD) foi o parâmetro utilizado para determinar a precisão do método. De acordo com o resultado, o qual variou de 0,819% a 6,88%, a técnica empregada demonstrou boa precisão.

5.7.2 Perfil Fenólico Dos Extratos De *G. sulphuraria*

As Figuras 18 e 19 representam o resultado das análises por LC-ESI-MS/MS dos constituintes fenólicos do extrato de *G. sulphuraria* cultivada em diferentes condições. O número de picos do espectro representa a quantidade de compostos fenólicos detectada.

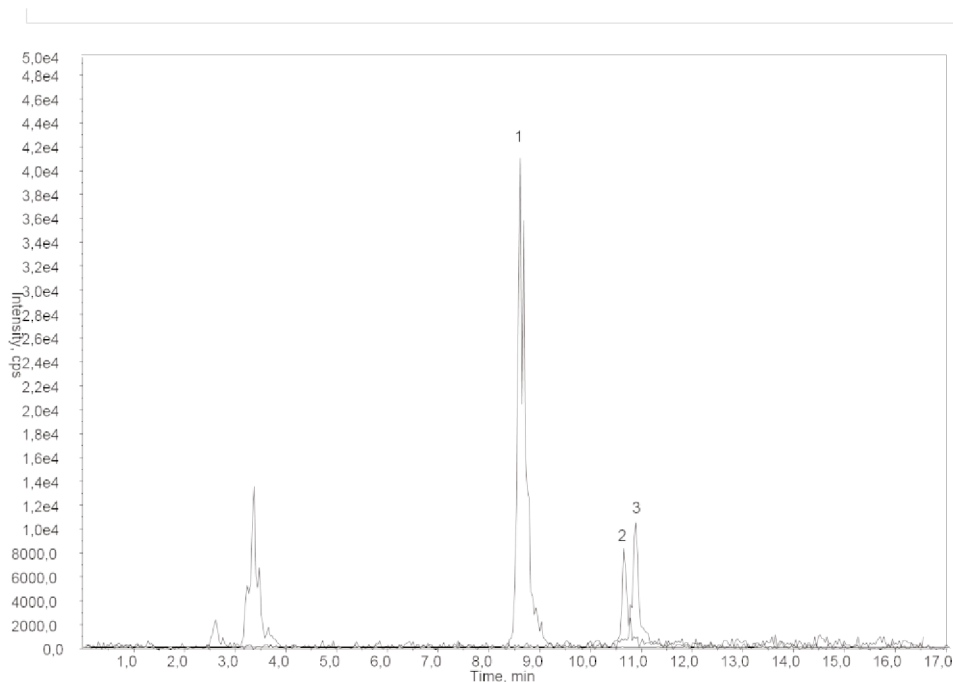
Figura 18- Cromatograma das análises por LC-ESI-MS/MS em extrato de *G. sulphuraria* cultivada em permeado de soro de leite 20% em biorreator de bancada.



Numeração dos picos: (1) 4 aminobenzoico; (2) quercetina; (3) ácido salicílico; (4) ácido elágico.

Fonte: a autora.

Figura 19 - Cromatograma das análises por LC-ESI-MS/MS em extrato de *G. sulphuraria* cultivada em permeado de soro de leite 20% em incubadora de bancada com agitação orbital.



Numeração dos picos: (1) catequina; (2) quercetina; (3) ácido salicílico.

Fonte: a autora.

O perfil do extrato fenólico de *G. sulphuraria* (Tabela 12) analisado por LC-ESI-MS/MS demonstrou a separação dos compostos 4 aminobenzoico, ácido salicílico, quercetina, ácido elágico e catequina. O flavonoide catequina do extrato da biomassa cultivada na incubadora de bancada com agitação orbital foi o composto mais abundante entre os compostos quantificados, aproximadamente $3,558 \text{ mg g}^{-1}$ por peso seco da amostra. Em contrapartida, o mesmo elemento não estava presente em quantidade detectável na biomassa resultante do biorreator de bancada. É importante ressaltar que os extratos fenólicos foram extraídos de amostras com uma pequena distinção em sua preparação. Antes de realizar a extração dos compostos da biomassa do biorreator, foi realizada a secagem da mesma em estufa. O extrato da biomassa cultivada em incubadora de bancada com agitação orbital foi obtido microalga *in vivo*. As diferenças na composição dos compostos fenólicos também pode ser consequência das condições de cultivo. No biorreator foi realizado o controle de pH ou oxigênio dissolvido (aeração forçada e agitação mecânica), enquanto a temperatura, pH inicial do cultivo e a composição do meio de cultivo foram comuns nos cultivos em agitador orbital e em biorreator.

Tabela 12 - Composição fenólica do extrato de *G. sulphuraria* cultivada em biorreator e bancada e em incubadora de bancada com agitação orbital.

Composto	Concentração (mg g ⁻¹)		Íon precursor (m/z) Q1	Íon precursor (m/z) Q3	Tempo de retenção (min)
	Extrato Biorretor	Extrato Incubadora			
4 aminobenzoico	0,096 ± 0,004	0	135.85	90.5	10.47
Ácido salicílico	0,080 ± 0,001	0,014 ± 0,001	136.9	91.1	10.99
Quercetina	0,137 ± 0,003	0,153 ± 0,009	301.010	149.30	10.84
Acido elágico	0,866 ± 0,050	0	300.813	142.50	11.71
Catequina	0	3,558 ± 0,019	288.853	120.30	8,82

*Valores expressos em média ± desvio padrão.

Fonte: a autora.

Silva e colaboradores (2017) testaram diferentes métodos de extração de compostos fenólicos na cianobactéria *Arthrospira platensis*. A técnica a alta pressão/temperatura proposta como um método alternativo pelos autores realiza a extração a 90 °C, 2,5 bar, utilizando etanol como solvente. Verificou-se que a catequina esteve presente em baixas concentrações nas extrações sólido-líquido (não detectada pela técnica HPLC), na extração assistida por micro-ondas (0,03 mg.100g⁻¹) e assistida por ultrassom (não detectada pela técnica HPLC). Por outro lado, a metodologia a alta pressão/temperatura alcançou 3,61 mg.100g⁻¹ de catequina, concentração 100x inferior à verificada na *G. sulphuraria* cultivada em incubadora com agitação orbital.

De acordo com a literatura científica, o cacau é um alimento que possui alto teor de catequina. A máxima concentração desse flavonoide encontrado por Quiroz-Reyes e Fogliano (2018) em sementes de cacau crua e fermentada, foi de 0,2 e 1,1 mg g⁻¹, respectivamente. O conteúdo de catequina da *G. sulphuraria* verificado no presente estudo é aproximadamente 17 vezes superior à concentração de catequina da semente de cacau crua e quase três vezes o teor da semente de cacau fermentada a 150° C. Esta descoberta, inédita na literatura científica, mostra que a *G. sulphuraria* pode ser considerada a principal fonte natural de catequina e abre possibilidade de explorar a aplicação de extratos de *G. sulphuraria* no desenvolvimento de produtos antimicrobianos: embalagens, cosméticos, alimentos, entre outros.

A catequina é um poderoso antioxidante e também capaz de inibir a proliferação celular (SOARES et al., 2008). Filme comestível de polietilenoglicol e glicerol contendo extrato da alga vermelha *Gelidium corneum* e catequina foi utilizado para revestir salsichas. Nesse estudo, avaliou-se a vida de prateleira de salsichas

embaladas com o filme. A resistência à tração e a permeabilidade ao vapor de água foram melhoradas com a incorporação da catequina ao filme. O aumento da catequina no filme elevou sua atividade microbiana contra a bactéria *Escherichia coli*. A catequina demonstrou ser eficaz contra a inibição de microrganismos ao longo de 12 dias de armazenamento. Além da catequina, outros compostos estiveram presentes em apenas uma das condições de cultivo. O 4-aminobenzoico, mesmo que em quantidade pouco expressiva, e o ácido elágico foram observados apenas no extrato do biorreator. Em termos quantitativos, o ácido salicílico e a quercetina diferiram ligeiramente entre os tratamentos empregados.

O ácido elágico foi o segundo constituinte mais profuso dentre os compostos analisados. Segundo Abe (2007), em geral, o teor de ácido elágico livre nos alimentos é baixo. Pinto e colaboradores (2008) relataram que o conteúdo de ácido elágico em diferentes cultivares de morangos, principal fonte do composto na dieta brasileira, variou de 17 a 47 mg 100g⁻¹. As framboesas contêm aproximadamente 400 mg 100 g⁻¹ e são consideradas a maior fonte deste composto fenólico. Este trabalho mostra que a *G. sulphuraria* (0,866 mg g⁻¹) possui o dobro do conteúdo de ácido elágico do que a framboesa e pode, portanto, ser considerada a mais nova principal fonte deste composto fenólico.

O ácido elágico é um composto fitoterápico com propriedades antimutagênica e anticarcinogênica. Pode impedir o surgimento de câncer ou tumores, uma vez que induz a interrupção do ciclo celular e apoptose e a prevenção da ligação de carcinogêneos ao DNA (FALSAPERLA, 2005; NARAYANAN, 1999). Aiyer e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade de uma dieta suplementada com extratos de amora, de framboesa e ácido elágico suprimir o volume e a incidência tumorigênese mamária em ratos. A dieta com ácido elágico foi capaz de reduzir o tamanho do tumor em 75%.

A quercetina é um dos flavonoides mais presentes em vegetais e alimentos tais como chá, maçã e cebola (WACH et al., 2007; USOLTSEVA et al., 2016). A quercetina apresentou-se de maneira moderada nos extratos em ambos tratamentos. Vários trabalhos demonstraram a capacidade antioxidante desse composto, bem como seu poder inibitório em muitos tipos de câncer (BAGHEL et al., 2016). Estudos recentes descrevem o conteúdo de quercetina em fontes vegetais e em alimentos (KHANI et al., 2019; KANBEROGLU et al., 2019). Jiménez-López e colaboradores (2018) estudaram o perfil fitoquímico de alcaparras, um dos vegetais mais ricos em

quercetina e constataram que as bagas possuíam aproximadamente $0,31 \text{ g mg}^{-1}$ desse composto fenólico, pouco mais que o dobro do contido na *G. sulphuraria*.

Até o presente momento não há relatos da caracterização da *Galdieria sulphuraria* em relação à sua composição fenólica. A identificação desses compostos é de extrema importância para compreender sua atividade biológica. Segundo Gallego e colaboradores (2019) a pesquisa dos compostos bioativos das microalgas é focada principalmente em carotenoides e lipídeos, enquanto os estudos das macroalgas estão direcionados sobretudo em compostos fenólicos e polissacarídeos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo, verificou-se que é possível produzir biomassa e bioprodutos da microalga extremófila *G. sulphuraria* cultivada de forma heterotrófica em permeado de soro de leite, um meio de cultivo de baixo custo. A concentração de permeado de soro de leite possui grande influência no desenvolvimento da microalga, desse modo a concentração de 20% do efluente mostrou-se mais adequada para produção de biomassa.

Nesta condição heterotrófica não foi observada produção de ficocianina, mas de pigmentos carotenoides (cromatografia de camada delgada e espectroscopia RAMAN). Por TLC foi identificada a presença de astaxantina como um dos principais carotenoides presente no extrato de biomassa de *G. sulphuraria* cultivada em permeado de soro de leite, porém este resultado ainda ser confirmado utilizando outras técnicas analíticas.

Em meio de cultivo constituído por 20% de permeado de soro de leite foi observada produção significativa de compostos fenólicos. Foi observada grande influência das condições de cultivo (oxigênio dissolvido e/ou controle de pH) no perfil de compostos fenólicos produzidos. A *G. sulphuraria* demonstrou ser uma fonte promissora de catequina e ácido elágico, apresentando conteúdo maior do que as principais fontes vegetais.

Fica como sugestão para trabalhos futuros, a continuação da investigação dos carotenoides e dos compostos fenólicos presentes na *G. sulphuraria*. A aplicação de diferentes métodos de identificação e quantificação desses compostos podem ajudar a elucidar a constituição dessa microalga que ainda carece de estudos nesse sentido. Outra abordagem interessante é a aplicação desses elementos em cosméticos, em produtos alimentícios e fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J. et al. **Microalgas: cultivo y aplicaciones**. Monografía, v. 26, 1995.
- ABE, L.T. **Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição, São Paulo, 2007.
- AIYER, H S.; SRINIVASAN, Cidambi; GUPTA, Ramesh C. Dietary berries and ellagic acid diminish estrogen-mediated mammary tumorigenesis in ACI rats. **Nutrition and cancer**, v. 60, n. 2, p. 227-234, 2008.
- ALBERTANO, P. et al. The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. **Hydrobiologia**, v. 433, n. 1-3, p. 137-143, 2000.
- ALVES, R. L. D. **Projeto da rede de captação logística do soro de queijo produzido no Estado de Minas Gerais**. 33f. 2005. Monografia (Conclusão do curso de Engenharia de Produção)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd edition, American Public Health Association, Washington, D.C. 2012.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de compostos fenólicos em vinho: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.
- BAGHEL, S. S.; et al. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 146-160, 2016.
- BALASUNDRAM, N. et al. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99(1), p.191–203, 2006.
- BARBOSA, M. R. Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentoso *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.
- BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos: EdUFSCar, 2010.
- BERTOLDI, F. C., et al. Revisão: Biotecnologia. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, 2008.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63 p.351–361, 2004.

BORDENAVE-JUCHEREAU, S. et al. Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. **Journal of dairy research**, v. 72, n. 1, p. 34-38, 2005.

BORGES, W. S. Bio-oil production and removal of organic load by microalga *Scenedesmus* sp. using culture medium contaminated with different sugars, cheese whey and whey permeate. **Journal of Environmental Management**, v. 173, p. 134-140, 2016.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. Volume 2, São Paulo: Edgar Bülcher, 2001.

BUZZINI, P. et al. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 687, 2005.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

CARVALHO, D. G. et al. Raman spectroscopy for monitoring carotenoids in processed *Bunchosia glandulifera* pulps. **Food Chemistry**, v.294, p.565-571, 2019.

CARVALHO, F. et al. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445, p. 385-396, 2013.

CERÓN GARCÍA, M. C et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: Growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 239 - 248, 2000.

CERÓN GARCÍA, M. C.; et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297 - 305, 2005.

CHAUDHURI, D. et al. Assessment of the phytochemical constituents and antioxidant activity of a bloom forming microalgae *Euglena tuba*. **Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 24, 2014.

CHEN, C.; et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 71 - 81, 2011.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology, Dickson**, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

CINIGLIA, C. et al. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 7, p. 1827-1838, 2004.

CINTĂ PINZARU, S. et al. New SERS feature of β -carotene: consequences for quantitative SERS analysis. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 7, p. 597-604, 2015.

CLAUDINE, M. et al. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v.16(1), p. 77–84, 2005.

CLIFFORD, M. N., SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p. 1118–1125, 2000.

COELHO, V.C.; **Síntese de Biopolímeros pela Microalga *Spirulina sp.* LEB-18 cultivada em Diferentes Concentrações de Nutrientes**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DANALEWICH, J. R. et al. Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3555-3568, 1998.

DAS, B. et al. Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: a step towards green waste management. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 101, p. 27-33, 2016.

DE ALBUQUERQUE, M.; BASTOS, R. G. **Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de glicose**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 33, n. 2, p. 151-160, 2013.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, p. 1818-1892, 2013.

DERNER, R. B. et al. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DINIZ, R. H.S et al. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 111-117, 2014.

ELISIA, I.; HU, C.; POPOVICH, D.G.; KITTS, D.D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. **Food Chemistry**, 101, 1052-1058. 2007.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

FAGERER, S. R. et al. Analysis of single algal cells by combining mass spectrometry with Raman and fluorescence mapping. **Analyst**, v. 138, n. 22, p. 6732-6736, 2013.

FALSAPERLA, M. et al. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. **European Urology**, v. 47, n. 4, p. 449-454, 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization) OECD/FAO (2016), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025*, OECD Publishing, Paris. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en>

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. 587 p., 2000.

FREILE-PELEGRÍN, Yolanda; ROBLEDO, Daniel. Bioactive phenolic compounds from algae. Bioactive compounds from marine foods: **Plant and animal sources**, p. 113-129, 2013.

FUSCO, M. et al. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. **Talanta, Oxford**, v. 81, n. 1/2, p. 235-240, 2010.

GALLEGO, R.; et al, Sub-and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae—an update. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

GAMELLA, M. Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7960-7967, 2006.

GARBISA, S. et al. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. **Cancer**, v. 91, n. 4, p. 822-832, 2001.

GHALY, A. E. et al. Potential environmental and health impacts of high land application of cheese whey. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 2, n. 2, p. 106-117, 2007.

GIRARD, JMI et al. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research**, v. 5, p. 241-248, 2014.

GIRARD, J.M. et al. Phycoremediation of cheese whey permeate using directed commensalism between *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides*. **Algal research**, v. 22, p. 122-126, 2017.

GONZÁLEZ, I. E. et al. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 170-176, 2014.

GRAVERHOLT, O.S, ERIKSEN. N.T. Heterotrophic high-celldensity fedbatch and continuous-flZ cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 77, p. 69–75, 2007.

GRAZIANI, G. et al. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. **Food & Function**, v. 4, n. 1, p. 144-152, 2013.

GROSS, W., SCHNARRENBERGER, C. Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 4, p. 633-638, 1995.

GRUNG M et al. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. **Journal of Applied Phycology**, p. 165-171, 1992.

GUILHERME, A. de A et al. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2009.

GUIMARÃES, P. MR; et al. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HENKANATTE-GEDERA, S. M. et al. Removal of dissolved organic carbon and nutrients from urban wastewaters by *Galdieria sulphuraria*: Laboratory to field scale demonstration. **Algal Research**, v. 24, p. 450-456, 2017. HEREDIA-ARROYO, T. et al.

Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245-2253, 2011.

HERRERO, M. et al. Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5597-5603, 2006.

HOLLAR, S. et al. (Ed.). **A closer look at bacteria, algae, and protozoa**. Britannica Educational Publishing, 2011.

HUO, Ming-Ming et al. Effect of end groups on the Raman spectra of lycopene and β -carotene under high pressure. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 1973-1980, 2011.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M.I. Characteristics of thinlayer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering Processing**, v. 46, p. 63–69, 2007.

JAIME, L. et al. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. **Journal of separation science**, v. 28, n. 16, p. 2111-2119, 2005.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4199-4205, 2008.

JAYAPRAKASHA, H. M.; YOON, Y. C. Production of functional whey protein concentrate by monitoring the process of ultrafiltration. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 3, p. 433-438, 2005.

JELLEN, P. **Whey Processing - Utilization and Products**. 2003.

JIN, Y. et al. Simultaneous hydrolysis and co-fermentation of whey lactose with wheat for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 616-624, 2016.

KACZOR, A.; TURNAU, K.; BARANSKA, M. In situ Raman imaging of astaxanthin in a single microalgal cell. **Analyst**, v. 136, n. 6, p. 1109-1112, 2011.

KANBEROGLU, G. S et al. Application of deep eutectic solvent in ultrasound-assisted emulsification microextraction of quercetin from some fruits and vegetables. **Journal of Molecular Liquids**, v. 279, p. 571-577, 2019.

KHANI, R. et al. An environmentally friendly method based on micro-cloud point extraction for determination of trace amount of quercetin in food and fruit juice samples. **Food Chemistry**, v. 293, p. 220-225, 2019.

KLEJDUS, B. et al. Solid-phase/supercriticalfluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal Chromatografic**, v.1216, n.5, p.763–771, 2009.

LAVARI, L., et al. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT - Food Sci. Technol**, 2015.

LENCASTRE, K. G. S. S.. **Mapeamento da produção de soro de queijo no Estado do Rio de Janeiro: Potencial para Produção de Etanol**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal**, p.182-189, 2007.

KOSSEVA, M. R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.

KILLEEN, D. P. et al. Quantitative raman spectroscopy for the analysis of carrot bioactives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 2013.

LEE, R. E. **Phycology**. 2nd ed. Cambridge University Press. EUA. 645 p. 1989.
MAHDY, A. et al. Algal culture integration in conventional wastewater treatment plants: anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. **Bioresour. Technology**, v. 184, p. 236-244, 2015.

MALASPINA, F. et al. Cheese whey and cheese factory wastewater treatment with a biological anaerobic—Aerobic process. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 59-72, 1995.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARIANO, A. B. et al. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos**. In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia. 2009.

MARONEZE, M. M. et al. A potential strategy to reduce costs. **Bioresour. Technol.**, v.219, p.493–499, 2016.

MARQUARDT, J. Effects of carotenoid-depletion on the photosynthetic apparatus of a *Galdieria sulphuraria* (*Rhodophyta*) strain that retains its photosynthetic apparatus in the dark. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 4-5, p. 372-380, 1998.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Whey—pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 23, n. 4, p. 323-336, 1988.

MEROLA, A et al. Revision of *Cyanidium caldarium*. Three species of acidophilic algae. **Plant Biosystem**, v. 115, n. 4-5, p. 189-195, 1981.

MIAO, Xiaoling; WU, Qingyu. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresour. Technology**, v. 97, n. 6, p. 841-846, 2006.

MIDDLETON, E. et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 673–751, 2000.

MOLLEA, et al. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: **Food Industry**. InTech, 2013.

MORAIS, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da *microalga Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos materiais) Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2011.

MOURA, D. et al. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

MÜLLER, K. M. et al. Ribosomal DNA phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. **American Journal of Botany**, v. 88, n.8, p. 1390-1400, 2001.

MUSTÁRDY, L.; GARAB, G. Granum revisited. A three-dimensional model—where things fall into place. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 3, p. 117-122, 2003.

NARAYANAN, B. A. et al. “p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells,” **Cancer Letters**, v. 136, n. 2, p. 215-221, 1999.

NORTON, T. A et al. Algal biodiversity. **Phycologia**, v. 35, n. 4, p. 308-326, 1996.

NÚÑEZ-LÓPEZ, G. et al. Fructosylation of phenolic compounds by levansucrase from *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 122, p. 19-25, 2019.

OKUDA, T., ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2191-2217, 2011.

PALUDO, M. P. **Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2012.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255-266, 2011.

PARASHAR, A. et al. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1859-1867, 2016.

PECIVOVÁ, J. et al., Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. **Interdiscip Toxicol**, v. 5, n. 2, p. 81- 83, 2012.
PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PHYTOCHEMICALS, c2019. Disponível em:

[≤https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/ellagic-acid.php>](https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/ellagic-acid.php) Acesso em: 12 de maio de 2019.

PINTO, G. et al. Comparative approaches to the taxonomy of the genus *Galdieria merola* (Cyanidiales, Rhodophyta). **Cryptogamie-Algologie**, v. 24, n. 1, p. 13-32, 2003.

PINTO, M.S. et al. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa Duch*). **Food Chemistry**, v. 107 (4), p. 1629-1635, 2008.

POSADAS, E. et al. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 239-248, 2015.

PRAZERES, A. R. et al. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

QUEIROZ, M. I. et al. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2163-2169, 2007.

QUEIROZ, M. I. et al. Singlecell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v.88, n.10, p.3438–3443, 2011.

QUIROZ-REYES, C.N.; FOGLIANO, V. Design cocoa processing towards healthy cocoa products: The role of phenolics and melanoidins. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 480-490, 2018.

QUERQUES, N. et al. Microalgal phycocyanin productivity: strategies for phycovalorization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 11, p. 1968-1982, 2015.

RADMANN, E. M.; et al. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, 1609-1612, 2008.

RAZA, W. et al. Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2018.

RICO, D. et al. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 18, n. 7, p. 373-386, 2007.

RODRIGUES, D. B. et al Bioactive pigments from microalgae **Phormidium autumnale**. *Food Res Int*, v.77, n.2, p.273–279, 2015.

RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Res Int**, v.65, p.144–148, 2014.

SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico**. 2005. xii, 97 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/101732>>.

SALATI, S. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 82-89, 2017.

SCHMIDT, R. A. et al. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 77-84, 2005.

SEBBEN, J. et al. Development of a quantitative approach using Raman spectroscopy for carotenoids determination in processed sweet potato. **Food chemistry**, v. 245, p. 1224-1231, 2018.

SELVARATNAM, T. et al. Evaluation of a thermo-tolerant acidophilic alga, *Galdieria sulphuraria*, for nutrient removal from urban wastewaters. **Bioresource technology**, v. 156, p. 395-399, 2014.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: Shahidi F. Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. **Newfoundland: Aocs**; 1996. p.1-11.

SHAHIDI, F. e NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. **Boca Raton: CRC Press**, 2004.

SILVA, M. L. C. et al. **Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVA, M. F. et al. Recovery of phenolic compounds of food concern from *Arthrospira platensis* by green extraction techniques. **Algal Research** v. 25, p. 391 – 401, 2017.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 199

SLOTH, J. K et al. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1, p. 168-175, 2006.

SLOTH, J. K. et al. Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 296-305, 2017.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, 2008.

SONG, M. et al. Use of whey permeate for cultivating *Ganoderma lucidum mycelia*. **Journal of Dairy Science** 90: 2141–2146, 2007.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STADNICHUK, I., et al. Inhibition by glucose of chlorophyll a and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation. **Plant Science**, v.136, p. 11–23, 1998.

SUWAL. S et al. Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetradismus obliquus*. **Algal Research**, v.39, 2019.

SYDNEY, E. B. **Respirometric Balance and Analysis of four microalgae: *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* and *Botryococcus braunii***. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2009.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais marinhos. *Biologia Marinha*, v. 1, p. 311-330, 2002.

TISCHENDORF, G. et al. Ultrastructure and enzyme complement of proplastids from heterotrophically grown cells of the red alga *Galdieria sulphuraria*. **European Journal of Phycology**, p. 243-251, 2007.

TRIGUEROS, D. E. G. et al. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 71-83, 2016.

SALATI, S. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 82-89, 2017.

SUWAL. S et al. Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetradismus obliquus*. **Algal Research**, v.39, 2019.

U.S DAIRY EXPORT COUNCIL – USDEC. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos**. Arlington: USDEC News, 135 p, 2004.

USOLTSEVA, L. O. et al. Selective Rayleigh light scattering determination of trace quercetin with silver nanoparticles. **Journal of Luminescence**, v. 179, p. 438-444, 2016.

WACH, A. et al. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 699-704, 2007.

WAGNER, A. O. et al. Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. **Science of the Total Environment**, p. 256-266, 2013

WALTER, A. **Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2011.

WAN, M. et al. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. **Bioresource Technology**, p.272 – 278, 2016.

Yabuzaki, J. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms, **Database**, v. 2017, 2017. YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756-774, 2015.

YOON, H. S. al. A single origin of the peridinin-and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11724-11729, 2002. YOSHIE-STARK, Y. et al. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. **Journal-Tokyo University of Fisheries**, v. 89, p. 1-6, 2003.

YOU, S. et al. Development of a novel integrated process for co-production of β -galactosidase and ethanol using lactose as substrate. **Bioresource Technology**, v. 230, p.15-23, 2017.

ZAMALLOA, C. et al. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1149-1158, 2011.

ZHAO, L.; Wang, Y. Nitrate assay for plant tissues. **The Plant Cell**, 2016.