



**PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS POR MICROALGAS:  
MAPEAMENTO TECNOLÓGICO, AVALIAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS COM EFEITO  
ANTIVIRAL SOBRE O VÍRUS *MAYARO***

**Michele Caldeira Magdalena Ribeiro**

**Dissertação de Mestrado**

Orientadoras

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Anita Ferreira do Valle**

Junho de 2019

PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS POR MICROALGAS:  
MAPEAMENTO TECNOLÓGICO, AVALIAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS COM EFEITO ANTIVIRAL  
SOBRE O VÍRUS *MAYARO*

**Michele Caldeira Magdalena Ribeiro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Processos Químicos e  
Bioquímicos, Escola de Química,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Engenharia de  
Processos Químicos e Bioquímicos

Orientadoras

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Anita Ferreira do Valle

Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Junho de 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

Magdalena-Ribeiro, Michele Caldeira.

**Produção de biofármacos por microalgas: mapeamento tecnológico, avaliação e caracterização de extratos com efeito antiviral sobre o vírus *Mayaro*** / Michele Caldeira Magdalena Ribeiro. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2019.

136 p.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2019.

Orientadores: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto e Anita Ferreira do Valle

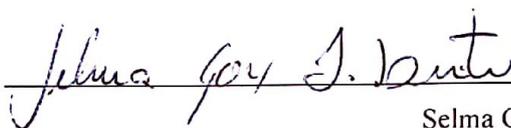
1. Microalgas. 2. Atividade antiviral. 3. *Alphavirus Mayaro*. 4. Mapeamento Tecnológico. 5. Dissertação. (Mestrado – UFRJ/EQ). 6. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto e Anita Ferreira do Valle. I. Produção de biofármacos por microalgas: mapeamento tecnológico, avaliação e caracterização de extratos com efeito antiviral sobre o vírus *Mayaro*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Michele Caldeira Magdalena Ribeiro

Dissertação de Mestrado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

  
\_\_\_\_\_

Selma Gomes Ferreira Leite, DSc

  
\_\_\_\_\_

Élcio Ribeiro Borges, DSc

  
\_\_\_\_\_

Ricardo Moreira Chaloub, DSc

Orientada por:

  
\_\_\_\_\_

Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, DSc

  
\_\_\_\_\_

Anita Ferreira do Valle, DSc

Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Junho de 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a vida e forças a cada dia para continuar. Ao Grupo de Oração Aliança que foi instrumento de transformação de momentos difíceis de minha saúde e caminhada em bênçãos.

Aos meus pais Mara Caldeira e Victor Magdalena, meu irmão Breno Caldeira e minha vó Leci Nunes por estarem sempre ao meu lado. Ao meu avô Manoel Caldeira que foi meu grande exemplo de superação, e a todos meus familiares pelo apoio.

Ao meu marido Luiz Felipe Ribeiro, por sempre ter acreditado em mim, me ajudado em mais esta etapa acadêmica, e apoiado para que eu pudesse chegar até aqui.

Às minhas orientadoras Anita Valle e Maria Antonieta Gimenes por tudo que me ensinaram e pelo carinho e atenção. Ao Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese por proporcionar toda a estrutura para o cultivo de microalgas e aos meus amigos do laboratório por fazerem meus dias de experimentos mais especiais.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores por tornar viável a realização do teste antiviral, principalmente a professora Mônica Moreira. Ao Tiago Salles por me ajudar a realizar o teste antiviral dos extratos de microalgas, e ao Laboratório de Química de Proteínas / Unidade Proteômica por ceder a sala de cultivo de células animais para a realização dos testes.

A Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar da UFF por ceder o inóculo de *H. pluvialis* para a realização deste trabalho. A professora Elisabete Barbarino e aos laboratórios ALGAMAR/UFF e LaReMN/UFF que tornaram possíveis os meus experimentos de caracterização dos extratos e RMN. A Alejandra Eismann, que me auxiliou de forma excepcional no estudo das técnicas de caracterização.

Ao CNPq pela bolsa PIBIC de iniciação científica.

Ao Programa de Integração de Pós-Graduação e Graduação da Escola de Química pelo convite para cursar o Mestrado integrado a graduação de Engenharia de Bioprocessos.

A UFRJ por me proporcionar o auxílio para participação do Congresso Brasileiro de Engenharia Química, além do ensino de alta qualidade que me proporcionou na graduação e mestrado.

*“Nada temas, pois eu te resgato,  
eu te chamo pelo nome, és meu.”*

(Isaías 43:1)

## RESUMO

Magdalena-Ribeiro, Michele Caldeira. PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS POR MICROALGAS: MAPEAMENTO TECNOLÓGICO, AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS COM EFEITO ANTIVIRAL SOBRE O VÍRUS *MAYARO*. Orientadoras: DSc. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, DSc. Anita Ferreira do Valle, Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Microalgas constituem sistemas biológicos mais eficientes na transformação da energia solar em compostos orgânicos, por meio de fotossíntese. Dentre as áreas de aplicação para esses organismos a Indústria Farmacêutica se destaca pela relevância da produção de compostos bioativos de origem microbiana. O presente trabalho objetivou realizar o mapeamento tecnológico da aplicação de microalgas na Indústria Farmacêutica, além do cultivo, da avaliação e da caracterização preliminar de extratos de microalgas na inativação do vírus *Mayaro* (MAYV). O MAYV é um arbovírus membro da família *Togaviridae* (vírus de RNA envelopado), e do gênero *Alphavirus*, assim como o vírus *Chikungunya* (CHIKV). A Febre do *Mayaro*, tipicamente atinge a população de regiões próximas à Floresta Amazônica, todavia, já foram identificados casos no Rio de Janeiro, no ano de 2016. Segundo os resultados do mapeamento tecnológico, dentre as principais aplicações farmacêuticas de microalgas, se encontram estudos no tratamento de cancer, em moléculas com atividade antioxidante e imunoestimulante, e apenas uma patente descreveu a ação antiviral contra Influenza-A por microalga, no período selecionado, indício de que estudos nesta área sejam pioneiros. Dentre os principais gêneros de microalgas se encontraram *Chlorella*, *Dunaliella*, *Mychonastes*, *Phorphyridium*, *Haematococcus* e *Naviculla*. De acordo com os resultados do mapeamento foi possível delinear os procedimentos experimentais nos quais testou-se extratos de microalgas de *Arthrospira maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, tanto na fase exponencial quanto estacionária de crescimento em condições de cultivo descritas na literatura para expressão de substâncias com atividade antiviral. O crescimento foi acompanhado por leitura da absorvância, e alíquotas foram coletadas por centrifugação. Os precipitados foram secos em estufa a 37°C e a biomassa seca foi ressuspensa em água e em DMSO, seguindo de banho de ultrassom, para obtenção dos extratos. Os dois extratos partiram de uma amostra inicial de concentrações variando entre 5-26mg (de biomassa seca em estufa à 37°C)/mL de solvente, para a realização dos testes. A citotoxicidade dos extratos foi testada em células VERO, segundo a técnica “*dye-uptake*”. Partindo da faixa de concentração de 5-100µg/mL, foram realizados testes de antivirais e a quantificação viral determinada pelo protocolo de TCID<sub>50</sub>. Extratos contendo 6,12±0,38µg/mL, até 37,11±0,81µg/mL foram capazes de inativar 50% das partículas virais (IC<sub>50</sub>). Os extratos apresentaram atividade anti-*Mayaro*, e obtiveram potência de ação superior ao antiviral comercial ribavirina o que indica a utilização de microalgas para geração de biofármacos com ação antiviral é um projeto promissor. Dados preliminares da caracterização indicam que cadeias alifáticas insaturadas fazem parte de compostos majoritários dos extratos, e dentre as possíveis moléculas se encontram os ácidos graxos e xantofilas. Palavras-chave: Microalgas, Atividade Antiviral, *Alphavirus Mayaro*, Células VERO, Mapeamento Tecnológico, Caracterização preliminar

## ABSTRACT

Magdalena-Ribeiro, Michele Caldeira. PRODUCTION OF BIOPHARMACEUTICALS FROM MICROALGAE: TECHNOLOGICAL MAPPING, EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACTS WITH ANTIVIRAL EFFECT ON THE MAYARO VIRUS. Supervisors: DSc. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, DSc. Anita Ferreira do Valle, Rio de Janeiro, 2019. Dissertation (Master's degree in Engineering of Chemical and Biochemical Processes).

Microalgae are composed of more efficient biological systems in the transformation of solar energy into organic compounds, through photosynthesis. Among the application areas for these organisms, the Pharmaceutical Industry plays an important role in the production of bioactive compounds of microbial origin. The present work aimed to carrying out the technological mapping of microalgae applications in the Pharmaceutical Industry, as well as the cultivation, evaluation and preliminary characterization of microalgae extracts in *Mayaro* virus inactivation (MAYV). The MAYV is an arbovirus member of the *Togaviridae* family (enveloped RNA virus), and of the genus *Alphavirus*, as well as the *Chikungunya* virus (CHIKV). *Mayaro* fever, a disease caused by the MAYV, typically affects the population close to the Amazon Rain Forest, however, in the year 2016, the disease was confirmed in residents of Rio de Janeiro. According to the results of the technological mapping, among the main pharmaceutical applications of microalgae are studies on the treatment of cancer, molecules with antioxidant and immunostimulating activity, and only one patent described the antiviral action against Influenza-A by microalgae, in the selected period, indicating studies in this area are pioneering. Among the main microalgae genera were found *Chlorella*, *Dunaliella*, *Mychonastes*, *Phorphyridium*, *Haematococcus* and *Naviculla*. According to the results of the mapping, it was possible to delineate the experimental procedures in which microalgae extracts of *Arthrospira maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* and *Haematococcus pluvialis* strains, both in the exponential and stationary phases of growth under culture conditions described in the literature for the expression of substances with antiviral activity. Growth was monitored by absorbance reading, and aliquots were collected by centrifugation. The precipitates were oven dried at 37°C and the dried biomass was resuspended in water and DMSO, followed by an ultrasonic bath, to obtain the extracts. The two extracts were based on an initial sample of concentrations ranging from 5-26mg (dry biomass at 37°C) / mL of solvent for the tests. The cytotoxicity of the extracts was tested in VERO cells according to the “dye-uptake” technique. Starting from the concentration range of 5-100µg / mL, antiviral tests and viral quantification were performed according to the TCID<sub>50</sub> protocol. Extracts containing 6.12±0.38µg/mL, up to 37.11±0.81µg/mL were able to inactivate 50% of the viral particles (IC<sub>50</sub>). The extracts presented anti-*Mayaro* activity and obtained higher potency than the commercial antiviral ribavirin, which indicates the use of microalgae for the generation of biopharmaceuticals with antiviral action is a promising project. Preliminary characterization data indicate that unsaturated aliphatic chains are part of the extracts' major compounds, and among the possible molecules are fatty acids and xanthophylls.

Keywords: *Microalgae*, *Antiviral Activity*, *Mayaro Alphavirus*, *VERO Cells*, *Technological Mapping*, *Preliminary Characterization*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE QUADROS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xvi
LISTA DE EQUAÇÕES .....	xix
1 APRESENTAÇÃO DO TEMA DE DISSERTAÇÃO.....	20
1.1 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS .....	21
1.1.1 Trabalho completo publicado em anais de eventos científicos .....	21
1.1.2 Resumo publicado em anais de eventos científicos .....	21
1.1.3 Premiações .....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
2.1 MICROALGAS .....	22
2.1.1 Microalgas e suas aplicações econômicas.....	22
2.1.2 Extratos com atividade antiviral.....	28
2.1.3 Produção industrial de microalgas .....	30
2.2 SAÚDE PÚBLICA: DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS <i>MAYARO</i> .....	33
2.2.1 Histórico de áreas endêmicas do MAYV .....	33
2.2.2 O vírus (MAYV) e a Febre do <i>Mayaro</i> .....	35
2.3 INDÚSTRIA FARMACÊUTICA .....	36
2.3.1 Avanços biotecnológicos.....	36
2.3.2 Testes de fármacos: <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	38
2.4 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO .....	39
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	40
3.1 JUSTIFICATIVA .....	40
3.2 OBJETIVOS .....	40
3.2.1 Objetivo Geral .....	40
3.2.2 Objetivos Específicos.....	41
4 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO .....	42

4.1 METODOLOGIA DE BUSCA E DE ANÁLISE DE ARTIGOS E DE PATENTES .....	42
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.2.1 Mapeamento de artigos relacionados a microalgas e farmacêuticos.....	44
4.2.1.1 Análise Macro .....	44
4.2.1.2 Análise Meso .....	51
4.2.1.3 Análise Micro .....	51
4.2.2 Mapeamento de patentes relacionadas a microalgas e farmacêuticos.....	58
4.2.2.1 Análise Macro .....	58
4.2.2.2 Análise Meso .....	60
4.2.2.3 Análise Micro .....	61
4.2.3 O mercado de microalgas e farmacêuticos.....	66
5 PESQUISA EXPERIMENTAL .....	69
5.1 PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS A PARTIR DO MAPEAMENTO TECNOLÓGICO .....	69
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	69
5.1.1 Seleção das cepas .....	70
5.2.2 Meios de cultura.....	71
5.2.3 Condições de cultivo e avaliação do crescimento celular.....	74
5.2.4 Preparo de amostras para testes de citotoxicidade e anti-MAYV.....	75
5.2.5 Preparo de amostras para caracterização preliminar dos extratos brutos através da Cromatografia de Camada Delgada e Ressonância Magnética Nuclear	76
5.2.6 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de microalgas em células VERO..	78
5.2.7 Teste de inativação do MAYV.....	79
5.2.8 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	81
5.2.9 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	83
5.3 CÁLCULOS DAS VARIÁVEIS DE RESPOSTA .....	83
5.3.1 Cálculo da taxa específica de crescimento.....	83
5.3.2 Cálculo de parâmetros dos testes de citotoxicidade e anti-MAYV.....	84
5.3.3 Cálculo de fator de retenção ( $R_f$ ) da CCD.....	85
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86

5.4.1 Crescimento celular.....	86
5.4.2 Citotoxicidade de células VERO em presença de extratos aquoso e orgânico de microalgas .....	88
5.4.3 Atividade antiviral de extratos de microalgas .....	92
5.4.4 Avaliação preliminar: Caracterização dos extratos.....	95
5.4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	95
5.4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN- <sup>1</sup> H) .....	99
6 FORÇAS DE PORTER NA APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE MICROALGAS NO TRATAMENTO ANTI-MAYV .....	104
6.1 O MODELO DAS CINCO FORÇAS DE PORTER.....	104
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
7.1 CONCLUSÕES .....	109
7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110
REFERÊNCIAS .....	111

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquerda: Imagem de tanque aberto para cultivo de microalgas.....	31
Figura 2. Mapa do Brasil demarcado com as regiões consideradas endêmicas para o vírus <i>Mayaro</i> , além de Estados e municípios com casos humanos notificados e confirmados entre dezembro de 2014 a outubro de 2015.....	34
Figura 3. A esquerda: Micrografia de crioléltron do MAYV. A direita: Estrutura 3D do vírus.....	35
Figura 4. Avanço de produtos farmacêuticos biotecnológicos no mercado mundial.....	37
Figura 5. Diagrama de blocos de etapas do mapeamento tecnológico de artigos e patentes envolvendo “microalgae” e “pharmaceutical”.....	42
Figura 6. Gráfico de incidência de publicações de artigos de “microalgas e farmacêuticos” por país.....	45
Figura 7. Série histórica das publicações de artigos de “microalgas e farmacêuticos”.....	46
Figura 8. <i>Ranking</i> das 19 principais Universidades e Centros de Pesquisa produtores de artigos envolvendo “microalgas e farmacêuticos”.....	47
Figura 9. Dez principais revistas científicas contendo publicações de artigos em “microalgas e farmacêuticos”.....	49
Figura 10. Áreas de conhecimento de artigos em que são aplicadas “microalgas e farmacêuticos”.....	50
Figura 11. Aplicações de substâncias bioativas em estudo de “microalgas e farmacêuticos” em artigos.....	52
Figura 12. Incidência de microalgas nos artigos envolvendo “microalgas e farmacêuticos”.....	54
Figura 13. Etapas de <i>Downstream</i> na recuperação de produtos de microalgas com atividade biológica em artigos.....	57
Figura 14. Países aos quais pertencem os inventores de patentes (concedidas e solicitadas) relacionadas à “microalga e farmacêutico” nos últimos cinco anos.....	58
Figura 15. Incidência de patentes (concedidas e solicitadas) relacionadas à “microalgas e farmacêuticos” por ano no intervalo dos cinco últimos anos.....	59
Figura 16. Áreas de aplicação verificadas na análise micro das patentes (concedidas e solicitadas) relacionadas à “microalgas e farmacêuticos”.....	62
Figura 17. Técnicas de <i>Downstream</i> na recuperação de produtos de microalgas com atividade biológica em patentes (concedidas e solicitadas).....	64
Figura 18. Gêneros de microalgas descritos nas patentes do mapeamento de “microalgas e farmacêuticos”.....	65
Figura 19. Planta industrial da empresa brasileira Algae Biotecnologia.....	66
Figura 20. Diagrama de blocos de etapas experimentais realizadas no trabalho.....	70
Figura 21. Imagens de A: <i>A. maxima</i> , B: <i>C. vulgaris</i> , C: <i>D. salina</i> , D: <i>H. phuvialis</i> .....	71
Figura 22. Sistema de extração de biomassa microalgal em funil de separação.....	78
Figura 23. Imagem ilustrativa da placa de 24 poços com as respectivas concentrações dos extratos das microalgas de 100; 50;25;10;5,0;0,0 (CV) µg/mL para testes anti-MAYV.....	80
Figura 24. Esquema ilustrativo de demarcações realizadas na placa cromatográfica para caracterização de extratos de microalgas.....	82

Figura 25. Sistema montado para cromatografia em camada delgada de extratos de microalgas.....	82
Figura 26. Esquema ilustrativo da placa de CCD cujas distâncias $D_{\text{substância}}$ e $D_{\text{solvente}}$ foram representadas para determinação do Rf de substâncias de extratos de microalgas.....	85
Figura 27. Curvas de crescimento das microalgas <i>C. vulgaris</i> (A); <i>D. salina</i> (B); <i>H. pluvialis</i> (C) e <i>A. maxima</i> (D) cultivadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , $80 \mu\text{moles de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 16:8h e aeração por borbulhamento de ar 3,5 L/min (A e C); $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , $180 \mu\text{moles de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , luz constante e aeração por borbulhamento de ar 3,5 L/min (B); $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , $120 \mu\text{moles de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 12:12h e agitação orbital de 156 rpm (D).....	87
Figura 28. Porcentagem de células VERO viáveis em função da concentração do extrato aquoso das microalgas <i>C. vulgaris</i> (A e B); <i>D. salina</i> (C e D); <i>H. pluvialis</i> (E e F) e <i>A. maxima</i> (G e H), nas fases exponencial e estacionária do crescimento.....	90
Figura 29. Porcentagem de células VERO viáveis em função da concentração do extrato orgânico das microalgas <i>C. vulgaris</i> (A e B); <i>D. salina</i> (C e D); <i>H. pluvialis</i> (E e F) e <i>A. maxima</i> (G e H), nas fases exponencial e estacionária do crescimento.....	91
Figura 30. Porcentagem de vírus ativos em função da concentração do extrato orgânico das microalgas <i>C. vulgaris</i> (A e B); <i>D. salina</i> (C e D); <i>H. pluvialis</i> (E e F) e <i>A. maxima</i> (G e H), nas fases exponencial e estacionária do crescimento.....	93
Figura 31. Perfil cromatográfico dos extratos de microalgas em revelador UV (254nm).....	98
Figura 32. Perfil cromatográfico dos extratos de microalgas em revelador químico $\text{CeSO}_4$ a 2% em $\text{H}_2\text{SO}_4$ .....	98
Figura 33. Espectros de RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) dos extratos de microalgas em diclorometano.....	100
Figura 34. Estruturas de possíveis ácidos graxos presentes nos extratos de microalgas.....	102
Figura 35. Estruturas de possíveis xantofilas presentes no extrato de <i>A. maxima</i> em fase estacionária de crescimento.....	103
Figura 36. Modelo das cinco forças de Porter.....	105
Figura 37. Imagem da planta industrial da empresa Fitoplancton Marino® .....	108

## LISTA DE QUADROS

	<b>Pág.</b>
Quadro 1. <i>Ranking</i> das dez principais empresas produtoras de medicamentos de origem biotecnológica prospectado para 2024.....	37
Quadro 2. <i>Ranking</i> de órgãos de fomento responsáveis pelas pesquisas em “microalgas e farmacêuticos”.....	50
Quadro 3a. Principais empresas que apresentam pesquisas ou produtos comerciais relacionados à “microalgas e farmacêuticos”.....	67
Quadro 3b. Principais empresas que apresentam pesquisas ou produtos comerciais relacionados à “microalgas e farmacêuticos” (Continuação).....	68
Quadro 4. <i>Ranking</i> referente à potência contra MAYV dos extratos de microalgas.....	95
Quadro 5. Análise de PORTER simplificada de extratos de microalgas com atividade anti-MAYV no mercado.....	108

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Substâncias isoladas de microalgas.....	23
Tabela 2. Compostos oriundos de microalgas aplicados industrialmente na Indústria Alimentícia.....	25
Tabela 3. Produção mundial de derivados de microalgas referente aos principais gêneros comercializados e seus respectivos produtores.....	25
Tabela 4. Comparação de parâmetros de cultivo de microalgas em sistemas aberto e fechado.....	30
Tabela 5. Listagem de taxonomias meso elaboradas e seus respectivos conceitos, a partir dos artigos selecionados para o mapeamento tecnológico de “microalgas e farmacêuticos”..	51
Tabela 6. Listagem de taxonomias meso elaboradas e o número de patentes correspondentes ao mapeamento tecnológico realizado de “microalgas e farmacêuticos”.....	61
Tabela 7. Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura AO para o cultivo de <i>A. maxima</i> .....	72
Tabela 8. Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura BBM para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> e <i>H. pluvialis</i> .....	73
Tabela 9. Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura SHAISH modificado para o cultivo de <i>D. salina</i> .....	74
Tabela 10. Condições de cultivo de microalgas para geração de biomassa.....	75
Tabela 11. Proporção de biomassa e solventes utilizados no processo de extração em funil de separação para caracterização.....	77
Tabela 12. Valores de massa dos extratos de microalgas analisados por RMN- <sup>1</sup> H.....	83
Tabela 13. Concentração citotóxica dos extratos aquoso e orgânicos das microalgas sobre as células VERO (CC <sub>50</sub> ).....	92
Tabela 14. Valores de CC <sub>50</sub> , IC <sub>50</sub> , IS e PR dos extratos orgânicos de microalgas sobre o MAYV.....	94
Tabela 15. Correlação de substância de cada R <sub>f</sub> (cm/cm) entre os extratos de microalgas analisados.....	96
Tabela 16. Atribuição dos picos do espectro de RMN- <sup>1</sup> H segundo dados de GUILLÉN E RUIZ (2001).....	101

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>Sigla</b>	<b>Definição</b>
3D	Tridimensional
AAS	Ácido acetilsalicílico
AChE	Acetilcolinesterase
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Meio de cultura de Aiba e Ogawa
ARA	Ácido Araquidônico
ATCC	American Type Culture Collection
BBM	Bold's Basal Médium
BChE	Butirilcolinesterase
CAS	Chinese Academy of Science
Ca-SP	Cálcium-spirulan
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica em que 50% das células VERO se tornaram inviáveis
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CMLEAF	Coleção de Microalgas do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese
CNRS	Centre National de La Recherche Scientifique
COBEQ	Congresso Brasileiro de Engenharia Química
CV	Controle Viral
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMEM	Meio de Cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
D <sub>solvente</sub>	Distância percorrida pelo solvente
D <sub>substância</sub>	Distância percorrida pela substância
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
EQ	Escola de Química
ESPACENET	The European Patent Office
EUA	Estados Unidos

FluV-A	Influenza tipo A
FluV-B	Influenza tipo B
HIV-1	Vírus da AIDS tipo 1
HSV-1	Vírus da herpes tipo 1
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória em que 50% dos vírus se tornaram inviáveis
IQ	Instituto de Química
IS	Índice de seletividade
KB	Células de carcinoma escamoso oral humano
LaReMN	Laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear
LEAF	Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese
ln	Logaritmo neperiano
LPCV	Laboratório de Fisiologia Celular e Vegetal
M	Concentração molar
MAYV	Vírus <i>Mayaro</i>
MMP	Metaloproteinases da matriz extracelular
MOI	Multiplicidade de Infecção
N	Densidade óptica
PBS	Tampa Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFluV-2	Parainfluenza tipo 2
p-KG03	Polissacarídeo sulfatado purificado de <i>G. impudium</i>
ppm	Parte por milhão
PR	Potência relativa
R <sub>f</sub>	“ <i>ratio to front</i> ”
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	ácido ribonucléico
RSV-A	Vírus respiratório tipo A
RSV-B	Vírus respiratório tipo B
SFB	Soro Fetal Bovino
SHAISH	Meio de cultura de Shaish e colaboradores
SH-SY5Y	Tipo de linhagem celular dopaminérgica
SIAC	Semana de Integração Acadêmica
TCID <sub>50</sub>	50% de Cultura de Tecido Dose Infectante
TMS	Tetrametilsilano

TYRO	Tirosinase
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
USPTO	United State Patent and Trademark Office
UTEX	Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin
UV	Ultravioleta
VERO	<i>Verda Reno</i> – Rim Verde
$\delta$	Deslocamento Químico
$\mu$	Taxa específica de crescimento

## LISTA DE EQUAÇÕES

	<b>Pág.</b>
Equação 1 Taxa específica de crescimento.....	83
Equação 2 Equação polinomial de 3º ordem.....	84
Equação 3 Índice de seletividade.....	84
Equação 4 Potência relativa.....	84
Equação 5 “ <i>Ratio to front</i> ”.....	85

## Capítulo 1

### 1 APRESENTAÇÃO DO TEMA DE DISSERTAÇÃO

A Indústria Farmacêutica tem apresentado uma mudança de perfil produtor ao longo dos anos, modificando a produção via rota química para rota biológica (EVALUATE PHARMA<sup>®</sup>, 2018). Esse cenário pode ser explicado pelos avanços de pesquisas na área da Biotecnologia (CASTILHO, 2015), além de conceitos propostos pela Química Verde, que dentre seus princípios preza pelo uso de substância renováveis (LENARDÃO *et al.*, 2003). As moléculas bioativas produzidas a partir de células vivas, com maior ou menor grau de modificação, são o princípio ativo de um medicamento biológico, que pode ser chamado biofármaco (BARATA, 2017). Dentre os microrganismos envolvidos no processo de produção de biofármacos encontram-se vírus, eucariontes (fungos, leveduras, protozoários, cultura de tecidos animais e vegetais, e algas) e procariontes (bactérias e cianobactérias) (VAZ, PRADO E CARVALHO, 2008).

Uma das aplicações mais nobres de microalgas é a produção de biofármacos. Nesse sentido, ABED e colaboradores (2009) verificaram que metabólitos secundários isolados de diferentes famílias de microalgas apresentavam atividades biológicas como antibacteriano, antifúngica, antiprotozoário, antialgal e antiviral. Dessa forma, a aplicação de extratos de microalgas no combate a viroses apresenta grande potencial. No Brasil, especialmente nas regiões que fazem fronteira com a Floresta Amazônica, o arbovírus *Mayaro* (MAYV) gerou relatos de casos e surtos da doença chamada Febre do *Mayaro*. A enfermidade apresenta quadros clínicos semelhantes à febre da dengue clássica, e possui alta taxa de replicação gerando casos de artralgia crônica, o que demanda estudos sobre o mesmo (DOS SANTOS *et al.*, 2014). Recentemente, a imprensa noticiou matérias sobre a disseminação do vírus pela região Sudeste, e preocupação com epidemias no período do verão já que não existem vacina ou tratamento específico até o momento (O GLOBO, 2019; EXAME, 2018).

Assim, este trabalho visou o cultivo de quatro cepas de microalgas, para produção de extratos em duas fases de crescimento, avaliação da atividade anti-*Mayaro* e caracterização preliminar do material, via cromatografia em camada delgada e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

## 1.1 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

### 1.1.1 Trabalho completo publicado em anais de eventos científicos

MAGDALENA, M.C.; SALLES, T.S.; MOREIRA, M.F.; CHALOUB, R.M.; BARBARINO, E.; VALLE, A.F.; COUTO, M.A.P.G.. “Efeito do extrato da microalga *Spirulina maxima* na replicação do vírus *Mayaro* em células VERO”. XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, v. 1, nº 5. p. 3494-3497. In: . São Paulo: Blucher, set 2018. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/cobeq2018-PT.0922

### 1.1.2 Resumo publicado em anais de eventos científicos

MAGDALENA, M.C.; SALLES, T.S.; MOREIRA, M.F.; CHALOUB, R.M.; BARBARINO, E.; VALLE, A.F.; COUTO, M.A.P.G.. “**Obtenção de biofármacos com atividade antiviral a partir do cultivo de microalgas**”. Anais da 40ª Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ – Rio de Janeiro (RJ) – 15 a 21 de outubro de 2018.

### 1.1.3 Premiações

Prêmio de Melhor Trabalho de Sessão Oral IQ-FLÚOR e Menção Honrosa na 40ª Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ – Rio de Janeiro (RJ) – 15 a 21 de outubro de 2018, conferido na apresentação do trabalho “**Obtenção de biofármacos com atividade antiviral a partir do cultivo de microalgas**”.

## **Capítulo 2**

### **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1 MICROALGAS**

##### **2.1.1 Microalgas e suas aplicações econômicas**

Algas são organismos bastante diversificados, dado que, sob esta nomeação, estão inclusos tanto microrganismos procarióticos, como as cianobactérias, quanto eucarióticos, como por exemplo, as algas verdes (HOEK, MANN E JAHNS, 1995). Microalgas podem ser consideradas como os organismos evolutivamente mais antigos já que foram encontrados microfósseis de aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 1993). A resistência evolutiva tem como principal explicação a combinação bem sucedida de vias metabólicas, visto que estão dentre os restritos grupos capazes de realizar fotossíntese e respiração celular dentro de um mesmo compartimento (VERMAAS, 2001). No que se refere ao ambiente aquático, microalgas são responsáveis pela maior parte da produtividade primária (síntese de matéria orgânica a partir de compostos inorgânicos) (LOURENÇO E MARQUES JÚNIOR, 2009). Em comparação às plantas terrestres, microalgas constituem os sistemas biológicos mais eficientes na conversão de compostos orgânicos com a energia solar, mediante processo fotossintético (HUANG *et al.*, 2010; PIENKOS E DARZINS, 2009) e, por serem unicelulares, toda a sua biomassa pode ser utilizada (CHISTI, 2007). Além disso, apresentam elevadas taxas específicas de crescimento em cultivos, condição que proporciona uma alta produção de biomassa em intervalos de tempo curtos (PULZ E GROSS, 2004).

Embora a quantidade exata de espécies de microalgas não seja conhecida, existem na literatura relatos de que podem ser encontradas aos milhares. A grande quantidade de espécies propicia uma diversificação da composição bioquímica da biomassa, possibilitando uma gama de produtos a serem obtidos de microalgas (PULZ E GROSS, 2004), como se pode observar na Tabela 1 (PRIYADARSHANI E RATH, 2012). Algas, de um modo geral, vêm sendo aplicadas há centenas de anos como suplemento alimentar, constituinte de rações e de

forragem, como fonte de princípios bioativos, fertilizantes e corantes naturais (BARSANTI E GUALTERI, 2006). Ao longo dos anos, pesquisas científicas mostraram novas áreas de aplicação, dentre as quais a Indústria Cosmética e Farmacêutica (SCHÖRKEN E KEMPERS, 2009). A aplicação de microalgas também se insere na nutrição humana e animal, como agente de atividade anti-inflamatória, ou mesmo no tratamento de efluentes (RAPOSO, MORAIS E MORAIS, 2013).

Tabela 1. Substâncias isoladas de microalgas (Adaptado de PRIYADARSHANI E RATH, 2012)

Pigmentos/Carotenóides	$\beta$ -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina, cantaxantina, clorofila, ficocianina, ficoeritrina e fucoxantina
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs)	DHA(C22:6), EPA(C20:5), ARA(C20:4), GAL(C18:3)
Vitaminas	A, B1, B6, B12, C, E, biotina, riboflavina, ácido nicotínico, pantotenato e ácido fólico
Antioxidantes	Catalases, polifenóis, superóxido dismutase, tocoferóis
Outros	Proteínas, esteróis, aminoácidos, MAAs para proteção de luz

Os pigmentos produzidos por microalgas despertam grande interesse na Indústria de Corantes, devido às propriedades como o combate a radicais livres e o estímulo ao sistema imunológico (OROSA *et al.*, 2000). Dentre os três pigmentos mais incidentes em microalgas estão clorofila, ficobilinas e carotenóides (ABALDE, 1995), podendo ser mais expressos a partir da manipulação das condições de cultivo (BOROWITSKA, 1993). A produção de astaxantina por microalgas é reconhecida como uma grande oportunidade comercial, devido ao seu alto valor agregado (MARGALITH, 1999). A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso dessa substância como aditivo em suplemento dietético, além de países europeus, desta forma surgiu outra motivação para a produção de astaxantina por microalgas (CYSEWSKI E LORENZ, 2004). A aquicultura tem sido o maior mercado para a astaxantina, no qual é empregada a fim de proporcionar a cor avermelhada à carne do salmão criado em cativeiro (TRIPATHI *et al.*, 1999). O preço da astaxantina sintética é de \$1000,00/kg (LI *et al.*, 2011), enquanto a astaxantina produzida a partir de microalgas atinge o custo de \$1740,06/kg (PANES E CARREON, 2016). Entretanto, a astaxantina sintética é derivada de petroquímicos, o que restringe seu uso apenas para alimentação em aquicultura e, além disso,

há crescente busca por produtos obtidos por fontes renováveis a nível mundial, o que torna a produção de astaxantina a partir de microalgas uma grande oportunidade (LI *et al.*, 2011; MARGALITH, 1999).

Os ácidos graxos poliinsaturados que compõem a fração lipídica da biomassa microalgal possuem diversas aplicações, dentre as quais a nutrição animal, frequentemente presente em cepas de *Isochrysis*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, *Pavlova*, *Thalassiosira*, *Phaeodactylum* e *Tetraselmis* e, representados por  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 (YAMAGUSHI, 1997; APT E BEHRENS, 1999; MÜLLER-FEUGA, 2004; BOROWITZKA, 1977). Além disso, estudos visando a produção de lipídeos vem aumentando, principalmente com foco na conversão em biodiesel. Microalgas sendo microrganismos fotossintéticos fixam o CO<sub>2</sub> convertendo em moléculas de reserva, quando submetidas à escassez de alimento, e como exemplo delas os triacilglicerídeos biossintetizados no metabolismo primário (LIU E BENNING, 2013).

As vitaminas e os minerais como vitamina A, C, B1, B2, B6, iodo, potássio, cálcio, ferro, niacina e magnésio são abundantemente encontrados em microalgas, o que as torna importantes fontes nutricionais, sendo especialmente consumidas na Ásia. Dentre as microalgas de maior relevância na Biotecnologia se encontram as algas verdes (Chlorophyceae) *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, e a cianobactéria *Arthrospira maxima* (*Spirulina maxima*), de forma que são amplamente comercializadas para nutrição humana e animal. No que tange aos compostos antioxidantes e com outras diversas atividades biológicas, microalgas tem se destacado como fonte natural de moléculas bioativas devido ao potencial de produção de compostos bioativos complexos que são difíceis de serem produzidos por síntese química (PRIYADARSHANI E RATH, 2012).

Ao longo dos anos, pesquisas científicas mostraram novas áreas de aplicação, dentre as quais as Indústrias Cosmética e Farmacêutica (SCHÖRKEN E KEMPERS, 2009). A Tabela 2 apresenta os compostos bioativos de microalgas e cianobactérias, assim como suas respectivas aplicações e a Tabela 3 indica os principais produtores e os produtos de *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella*.

Tabela 2. Compostos oriundos de microalgas aplicados industrialmente na Indústria Alimentícia (Adaptado de PRIYADARSHANI E RATH, 2012)

Espécies	Grupo	Produto	Aplicação	Sistema de cultivo
<i>A. platensis</i>	Cianobactéria	Ficocianina e Biomassa	Alimentação saudável e Cosméticos	Lagoas abertas, Lagos naturais
<i>C. vulgaris</i>	Clorófita	Biomassa e ácido ascórbico	Alimentação saudável, Suplementação alimentar e Alimento alternativo	Bacias, Tubos de vicro PBR e Lagoas abertas
<i>D. salina</i>	Clorófita	Carotenóide	Alimentação saudável e Suplementação alimentar	Lagoas abertas e Lagos
<i>H. pluvialis</i>	Clorófita	Carotenóide e astaxantina	Alimentação saudável, Farmacêuticos e Aditivos	Tubos de vicro PBR e Lagoas abertas

Tabela 3. Produção mundial de derivados de microalgas referente aos principais gêneros comercializados e seus respectivos produtores (Adaptado DE PULZ E GROSS, 2004, SPOLAORE *et al.*, 2006 E HALLMANN, 2007)

Microalga	Maiores produtores	Produtos	Produção mundial (t/ano)
<i>Arthrospira (Spirulina)</i>	Hainan Simai Pharmacy Co. (China)	Pós, Extratos	3.000
	Earthrise Nutritionals (California, USA)	Tabletes, Pós, Extratos	
	Cyanotech Corp. (Hawaii, USA)	Tabletes, Pós, Bebidas e Extratos	
	Myanmar Spirulina factory (Myanmar)	Tabletes, Salgadinhos, Massas e Extrato Líquido	
<i>Chlorella</i>	Taiwan Chlorella Manufacturing Co. (Taiwan)	Tabletes, Pós e Néctar e Massas	2.000
	Klötze (Germany)	Pós	
<i>Dunaliella</i>	Cognis Nutrition and Health (Australia)	Pós e beta-caroteno	1.200

De acordo com a condição de cultivo determinado grupo de produtos é gerado, de forma que uma mesma cepa cultivada em condições diferentes pode expressar moléculas com aplicações diferentes (ANDRIA *et al.*, 1999). O gênero *Arthrospira (Spirulina)*, além de apresentar um elevado conteúdo protéico, é considerado uma das fontes mais ricas em pró-vitamina A (beta-caroteno) e ferro absorvível, e apresenta altos níveis de vitaminas (tais como as do complexo B, C, D e E) e outros minerais (potássio, cálcio, cobre, magnésio, manganês,

fósforo, sódio e zinco), compostos fenólicos, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais, destacando-se os ácidos graxos poliinsaturados, como o  $\gamma$ -linolênico (HABIB *et al.*, 2008), além de pigmentos como a clorofila a, luteína, ficocianina e aloficocianina (LUPATINI, 2016). No que se refere ao cultivo de *A. maxima* em meio Aiba e Ogawa (1977), fotoperíodo 12/12h, a 30°C e agitação orbital, a análise proteômica revelou que, das proteínas mais expressas na biomassa algácea, 75% delas estão relacionadas à fotossíntese e 37,5% estão relacionadas especificamente à síntese do pigmento ficocianina (LARA E DEMARQUE, 2017). Estudos de caracterização de microalgas do gênero *Chlorella* indicam alto teor protéico (>55% em peso seco), sendo assim considerada uma fonte alimentícia não convencional, além de outras propriedades como grande potencial de captura de CO<sub>2</sub> no cultivo em grande escala e de acúmulo de lipídeo para produção de biodiesel (BURLEW, 1953). O consumo de *Chlorella* com finalidade terapêutica vem se tornando popular, principalmente no Japão, já que estudos indicam propriedades imunoestimulantes, anticancer, no tratamento de doenças cardiovasculares e em catarata, por exemplo (KITADA *et al.*, 2009; MORRIS *et al.*, 2009; SANO *et al.*, 1987 e 1988). No que se refere à *D. salina*, estudos indicam alta capacidade de acúmulo de lipídeos e carboidratos, sob diferentes condições de cultivo, e o aumento da proporção dessas classes de substâncias pode ser induzido por limitações no meio de cultivo e variações de intensidade de luz (CHO *et al.* 2015; CHEN *et al.* 2015; RODOLFI *et al.* 2009; SUH E LEE, 2003; UGWU *et al.* 2008). Poucos estudos da literatura relatam a síntese de carboidratos por *H. pluvialis* (DOS SANTOS, 2015). No que se refere à fração lipídica, o acúmulo de ésteres de astaxantina e de lipídeos são correlacionados com inserção de estresse no cultivo (LOMBARDI e WANGERSKY, 1991). Imamoglu e colaboradores (2009) verificaram que o estresse no cultivo ocorre quando a intensidade luminosa inicialmente de 75  $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  é aumentado no valor de 6 a 7 vezes. Além disso, o meio pobre em nitrato, também induz o estresse por privação de nutrientes ou por aumento da razão C/N (FABREGAS *et al.*, 2003; IMAMOGLU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2003; TORZILLO *et al.*, 2005).

A Ciência e a Tecnologia avançam de forma acelerada, impulsionados desde a necessidade de descoberta de novos tratamentos médicos até a otimização de processos industriais. Dessa forma, a necessidade de identificar, analisar, separar e quantificar substâncias de diferentes áreas impulsionaram o desenvolvimento de técnicas analíticas (AZEVEDO, 2004). Dentre as técnicas utilizadas para caracterização de dada amostra, a Cromatografia e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), têm sido aplicadas rotineiramente.

A técnica de cromatografia é baseada na diferença de interação das moléculas a serem separadas em relação à fase estacionária. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é utilizada para separação de substâncias em solução. O procedimento é feito tipicamente em uma placa recoberta com sílica gel,  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (fase estacionária), e uma cuba com o solvente que carreará a amostra (fase móvel). Na placa são feitos *spots* com a amostra e com um padrão, com o objetivo de identificar pelo fator de retenção ( $R_f$ ) as possíveis substâncias contidas na amostra. No caso da CCD, a fase móvel migra sobre a fase estacionária por capilaridade, e a velocidade com que a amostra percorre a placa depende da sua interação com a fase estacionária. A diferença de interação é o que provocará a separação das substâncias (AQUINO NETO, 2003). A técnica de RMN é capaz de detectar qualquer molécula que possua um ou mais átomos com momento magnético diferente de zero, desde que apresentem isótopos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{31}\text{P}$ . O espectro obtido nesta análise contém inúmeras informações através de dados de deslocamento químico, multiplicidade, intensidade e propriedades de relaxação para elucidação estrutural. Outro ponto positivo da técnica é a sua característica não destrutiva, de forma que se pode obter espectros de tecidos intatos, extratos, metabólitos purificados ou não, dentre outros (RATCLIFFE, ROSCHER E SACHAR, 2001).

Avanços importantes vêm sendo alcançados, devido aos conhecimentos adquiridos de síntese química e bioquímica de compostos antimicrobianos (HASSAN *et al.*, 2017). Vale ressaltar que a substituição de compostos de origem química pelos de origem biotecnológica, como o uso microalgas, faz parte de um dos princípios da Química Verde, conceito mundialmente defendido, que remete ao uso de substâncias renováveis (LENARDÃO *et al.*, 2003). A Química Verde visa ao desenvolvimento e à implantação de produtos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (ANASTAS E WILLIANSO, 1996 ; DEVITO *et al.*, 1996). O conceito de Tecnologia Limpa já é relativamente comum em aplicações industriais, especialmente em países com indústria química desenvolvida, as quais apresentam controle rigoroso na emissão de poluentes, e gradativamente é incorporado ao meio acadêmico, no ensino e pesquisa (ANASTAS E WARNER, 1998; SINGH, SZAFRAN E PIKE, 1999).

## 2.1.2 Extratos com atividade antiviral

Uma das aplicações mais nobres de microalgas se encontra na produção de compostos bioativos. Dentre os metabólitos secundários isolados a partir de diferentes famílias de microalgas, foram verificadas atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário, antialgal e antiviral (ABED *et al.*, 2009). No que tange às substâncias antivirais isoladas de extratos de algas, os florotaninos, polissacarídeos e lectinas possuem destaque nas pesquisas anti-HIV (KIM E CHOJNACKA, 2015). Os taninos estão presentes em grupos de substâncias fenólicas solúveis em água e atuam na polimerase e na ribonuclease do ciclo de vida do HIV-1. Os florotaninos são moléculas de tanino com unidades de floroglucinol incorporadas na cadeia, e apresentam atividades anti-inflamatória, antioxidante, anti-matriz de metaloprotease (MMP) e antibacteriana (NAGAYAMA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006). Os florotaninos 8,8'-bieckol e 8,4''-dieckol são dímeros de eckol isolados de *Ecklonia cava* que apresentaram inibição da atividade de Transcriptase Reversa (RT), enzima que cria fita de cDNA a partir de RNA, e protease do ciclo do HIV-1 eficientemente, com valores de IC<sub>50</sub> de 0,5 e 5,3 µM, respectivamente (AHN *et al.*, 2004). Os polissacarídeos segundo a literatura apresentam atividades anticoagulante, antitumoral, anti-inflamatória e antiviral (KIM E CHOJNACKA, 2015), nos quais foram relatados inibição sobre caxumba, vírus influenza e vírus da herpes simples (GERBER *et al.*, 1958, EHRESHMANN *et al.*, 1977). Estudos indicam que os polissacarídeos sejam bastante eficientes na interrupção de ligações peptídicas virais preservadas na mutação de resistência à droga (KIM E CHOJNACKA, 2015). Os polissacarídeos sulfatados de *Dictyota mertensii*, *Lobophora variegata*, *Spatoglossum schroederi* e *Fucus vesiculosus* apresentam atividade contra a RT do HIV (QUEIROZ *et al.*, 2008). As lectinas apresentam grande potencial de bloqueio da interação entre HIV-1 e a célula hospedeira, visto que as glicanas pertencentes ao envelope viral são ricas em manose, que se ligam às lectinas. A alga vermelha *Griffithsia sp.*, fonte de lectina chamada Griffithsia apresentou promissora atividade anti-HIV (MORI *et al.*, 2005).

Hasui e colaboradores (1995) demonstraram que os polissacarídeos de *Cochlodinium polykrikoides* apresentaram atividade antiviral para vírus respiratório tipo A e B (RSV-A e RSV-B), influenza tipo A e B (FluV-A e FluV-B), parainfluenza tipo 2 (PFIuV-2), vírus da AIDS tipo 1 (HIV-1) e vírus da herpes tipo 1 (HSV-1). Hayashi e colaboradores (1996) constataram que o extrato aquoso de *A. platensis* (*S. platensis*) exibiu um efeito inibitório na replicação de herpes simples do tipo 1, e a partir dele, foi isolado pela primeira vez o

polissacarídeo sulfatado denominado calcium- spirulan (Ca-SP). Polissacarídeos de microalgas vermelhas *Porphyridium* sp., *P. aerugineum* e *Rhodella reticulata* apresentaram atividade antiviral para os vírus da leucemia murina (MuLV) e do sarcoma murino (MuSV) (TALYSHINSKY, SOUPRUN E HULEIHEL, 2002).

A atividade antiviral contra herpes tipo 2 também foi investigada no mesmo ano por Hernández-Corona e colaboradores (2002) utilizando um extrato orgânico de *A. maxima* (*S. maxima*), obtido a partir da extração com hexano, clorofórmio, metanol, clorofórmio: metanol 3:1 e água em ebulição. Neste caso, a infecção viral foi reduzida em 50% na presença de do extrato metanol:água. Santoyo e colaboradores (2010; 2012) mostraram que o extrato líquido pressurizado das microalgas *H. phuvialis*, *D. salina* e *C. vulgaris* foi capaz de apresentar importante atividade antiviral para herpes simples do tipo 1. Além disso, Kim e colaboradores (2012) observaram que o polissacarídeo sulfatado p-KG03, purificado da microalga marinha *Gyrodinium impudium* apresentou atividade antiviral contra influenza A, mas não contra influenza B. Além disso, foi realizada comparação com as drogas já existentes no mercado e o p-KG03 foi avaliado como capaz de ser comercializado.

Dentre os medicamentos típicos comercialmente utilizados como antivirais se encontra a ribavirina. A ribavirina (1-b-D-ribofuranosil-1, 2, 4-triazol-3-carboxamida) é um nucleosídeo sintético que apresenta amplo espectro antiviral contra DNA e RNA de vírus (GRACIE CAMERON, 2006). A infecção viral basicamente consiste no reconhecimento e na ligação à superfície da célula hospedeira. O vírus penetra na célula e libera seu genoma de ácido nucléico que se encontra no interior do envelope lipídico ou do capsídeo protéico. De forma geral, o ácido nucléico liberado permanece complexado a algumas proteínas virais. A penetração dos vírus envelopados na célula hospedeira ocorre por meio da fusão com a membrana plasmática ou com a membrana endossomal, seguida de endocitose (ALBERTS *et al.*, 2010). A escassez de fármacos antivirais se deve principalmente ao fato de que os vírus são absolutamente dependentes das vias metabólicas da célula hospedeira para sua replicação. Assim, a maioria dos agentes que bloqueiam a replicação viral é letal ou prejudicial para as células (DE CLERCQ, 2002). No que se refere às substâncias sintéticas, os análogos de nucleosídeos e os derivados de pirimidina e pirazol são constantemente estudados. Já para as substâncias naturais, os flavonóides e as isoflavonas também inibem infecções de diversos vírus (ORHAN *et al.*, 2009; ANDRES *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Produção industrial de microalgas

A viabilização da comercialização de microalgas e de seus respectivos produtos demanda cultivos em grande escala, sejam eles abertos (lagoas) ou fechados (fotoreatores tubulares). O crescimento de microalgas e a geração de seus respectivos produtos podem ser determinados por fatores abióticos, como: temperatura, intensidade luminosa, pH e concentração de nutrientes, e por fatores bióticos: como a contaminação por outros microrganismos, como exemplo bactérias e fungos (VARFOLOMEEV e WASSERMAN, 2011). A Tabela 4 indica as vantagens e desvantagens dos dois tipos de sistema de cultivo.

Tabela 4. Comparação de parâmetros de cultivo de microalgas em sistemas aberto e fechado  
Fonte: Adaptado de OGBONNA, MASUI e TANAKA (1997)

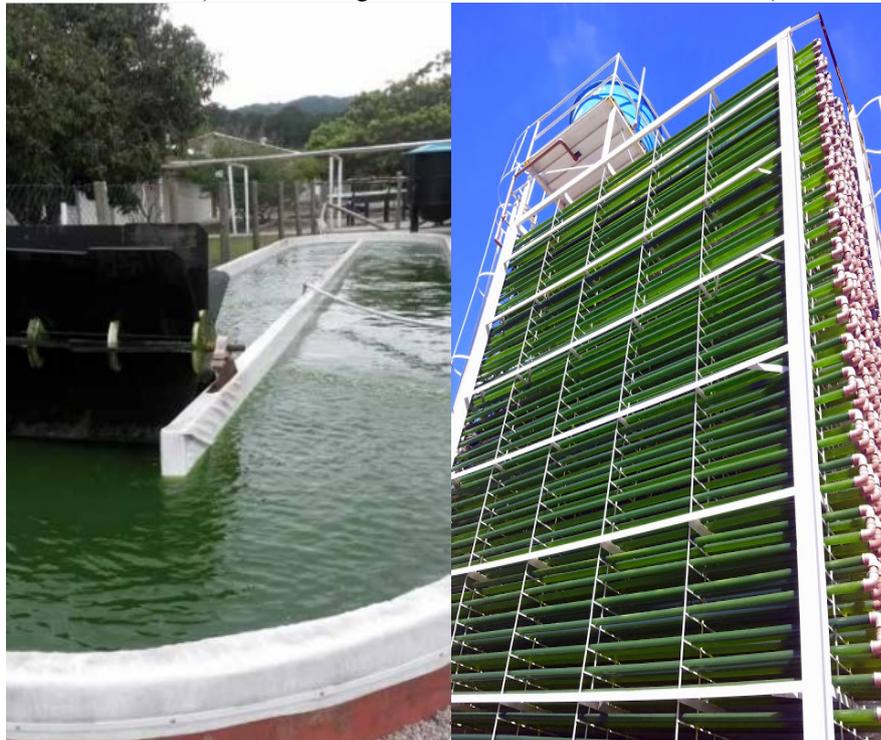
Parâmetro	Tanques ( <i>raceway</i> )	Sistemas fechados ( <i>fotobiorreatores</i> )
Espaço requerido	Muito	Pouco
Risco de contaminação	Alto	Médio a baixo
Perdas de água	Alto	Baixo
Concentração de oxigênio	Usualmente baixa	Deve ser removido continuamente
CO <sub>2</sub> – perdas	Alto	Quase nenhuma
Reprodutibilidade da produção	Variável, mas consistente	Possível dentro de determinadas tolerâncias
Controle do processo	Limitado	Possível
Desgaste do material de construção	Baixo	Usualmente alto
Dependência de condições climáticas	Alto	Menor, por ser protegido
Temperatura	Variável	Necessário resfriamento
Custo de colheita	Alto	Médio
Manutenção	Fácil	Difícil
Custos de construção	Médio	Alto
Concentrações de biomassa na colheita	Baixo	Alto

Segundo a literatura, grande parte dos cultivos de microalgas têm sido realizada em lagoas e tanques abertos que utilizam a luz solar e o CO<sub>2</sub> da atmosfera. As vantagens dessa forma de cultivo advém da possibilidade de que os tanques podem ser construídos e explorados a baixos custos, desde que sejam utilizadas espécies adequadas a esse cenário. Dessa forma, os custos de construção e desgaste do material de construção são baixos (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010). Os tanques abertos de cultivo têm uma variedade de formas e tamanhos possíveis, sendo o tipicamente utilizado o *raceway* (tipo pista de corrida) (Figura 1). A manutenção dos tanques abertos é relativamente fácil, haja visto que se tem acesso livre para realizar a limpeza do biofilme que se acumula sobre as superfícies. A principal desvantagem dos sistemas abertos é a evaporação da água a uma taxa similar às

culturas terrestres, visto que não há controle de temperatura, além da susceptibilidade à contaminação por espécies indesejáveis que vão sendo introduzidas naturalmente e podem levar a redução do rendimento ou até mesmo a superação de ocupação pelos novos microrganismos (FRANCO *et al.*, 2013). Outro fator negativo se deve à dependência de condições climáticas por parte do sistema aberto, o que torna o processo de menor reprodutibilidade quando comparado a um sistema fechado. Além disso, os custos para colheita total da biomassa gerada no cultivo aberto é superior ao fechado (OGBONNA, MASUI e TANAKA, 1997).

Os sistemas fechados tipicamente são denominados fotobiorreatores e geralmente são utilizados para produção em larga escala, gerando produtos de alto valor comercial (Figura 1). Dentre as vantagens do cultivo fechado em relação ao cultivo aberto, encontra-se a obtenção de maiores produtividades de biomassa microalgal devido ao o caminho óptico ser menor em comparação aos tanques, promovendo uma melhor distribuição da luz. Além do controle do cultivo, como pH, temperatura, agitação, aeração, esterilidade, e de ser um sistema de menor contato com o meio ambiente comparado aos tanques abertos, evitando possíveis contaminações (BOROWITZKA e HALLEGRAEFF, 2007). Além disso, como se pode observar pela Figura 1, os fotobiorreatores possibilitam o uso de menor espaço para o cultivo.

Figura 1. Esquerda: Imagem de tanque aberto para cultivo de microalgas (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016); Direita: Imagem de biorreator fototubular vertical (NPDEAS, 2018)



No que tange à produção de biofármacos a partir de microalgas, o controle das condições de cultivo é imprescindível para induzir a expressão da molécula bioativa de interesse. Dessa forma, o cultivo fechado é o mais apropriado neste tipo de produção. Como se trata de um produto de alto valor agregado, a desvantagem relacionada ao maior custo de implementação e de operação quando comparado ao cultivo aberto pode ser superada (DEMIRBAS, 2010).

Dentre as iniciativas de produção de microalgas em grande escala no Brasil, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), em parceria com a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP/PR), publicou um edital de pesquisa com o objetivo de selecionar projetos voltados para a aquicultura e uso de microalgas para a produção de biodiesel, no valor total de R\$ 4,5 milhões, em 2008, através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Como resultado foram apresentadas 63 propostas de projetos de PD&I, que abordaram o desenvolvimento de técnicas de cultivo, avaliação da viabilidade econômica do processo global, do cultivo à obtenção de biodiesel, processos mais econômicos e eficientes para a coleta da biomassa algal e a extração da fração lipídica, maximização da produtividade em óleo, avaliação das propriedades físico-químicas de biodiesel de microalgas e adoção de estratégias, de forma a garantir que se atendam às especificações de qualidade definidas nas resoluções da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (FRANCO *et al.*, 2013).

No ano de 2010, o MCTI aprovou o Projeto MCT/FINEP de “Produção de biodiesel derivado de óleos de microalgas”, cujo investimento foi de R\$ 6 milhões, e teve apoio da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel, que abrange diferentes institutos de pesquisa e universidades do País com atuação na área de aquicultura e biodiesel, como a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Universidade Federal de Goiás (UFG) e Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os fatos mostram os esforços em PD&I no Brasil, que pode resultar em avanços significativos na temática (FRANCO *et al.*, 2013).

## 2.2 SAÚDE PÚBLICA: DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS *MAYARO*

Recentemente, principalmente no ano de 2016, o Brasil foi surpreendido por inúmeros casos de viroses transmitidas por mosquito, como a ZIKA, *Chikungunya* e dengue (VALE, PIMENTA E AGUIAR, 2016). Concomitantemente, estudos indicam que outro vírus, denominado *Mayaro*, também transmitido por mosquito tem se disseminado das florestas para grandes centros urbanos, como Manaus e Cuiabá (BRASIL, 2015), além de casos isolados em Niterói, RJ (O GLOBO, 2019). Desta forma, o presente tópico trata do conhecimento deste vírus, das áreas que tem se disseminado, além dos diagnósticos e tratamentos atualmente aplicados.

### 2.2.1 Histórico de áreas endêmicas do MAYV

A primeira vez que o MAYV foi isolado ocorreu no ano de 1954, a partir de soros humanos recuperados de pacientes com febre em Trinidad (ANDERSON *et al.*, 1957). Dentre os surtos pelo mundo, em 1978 ocorreu em Belterra no Pará, Brasil, de forma que foi realizado um amplo estudo que possibilitou a descrição detalhada da epidemiologia do MAYV. Durante esse surto, os vírus foram isolados do mosquito *Haemagogus janthinomys* predominantemente da copa das árvores, todavia também encontrou-se em solo indicando assim que a transmissão pudesse ser feita para humanos. Nesse estudo, pesquisadores indicaram o *H. janthinomys* como o transmissor da epidemia pela primeira vez, e sugeriram que a doença em hospedeiro silvestre, o primata sagui, contribuiu para a amplificação do surto (LEDUC, PINHEIRO E TRAVASSOS, 1981 ; HOCH *et al.*, 1981). Outros dois pequenos surtos, também no Brasil, ocorreram em 1991, no Pará (Benevides) e em Tocantins (Peixe) nos quais identificou-se outros mosquitos como potenciais vetores (SMITH *et al.*, 1991).

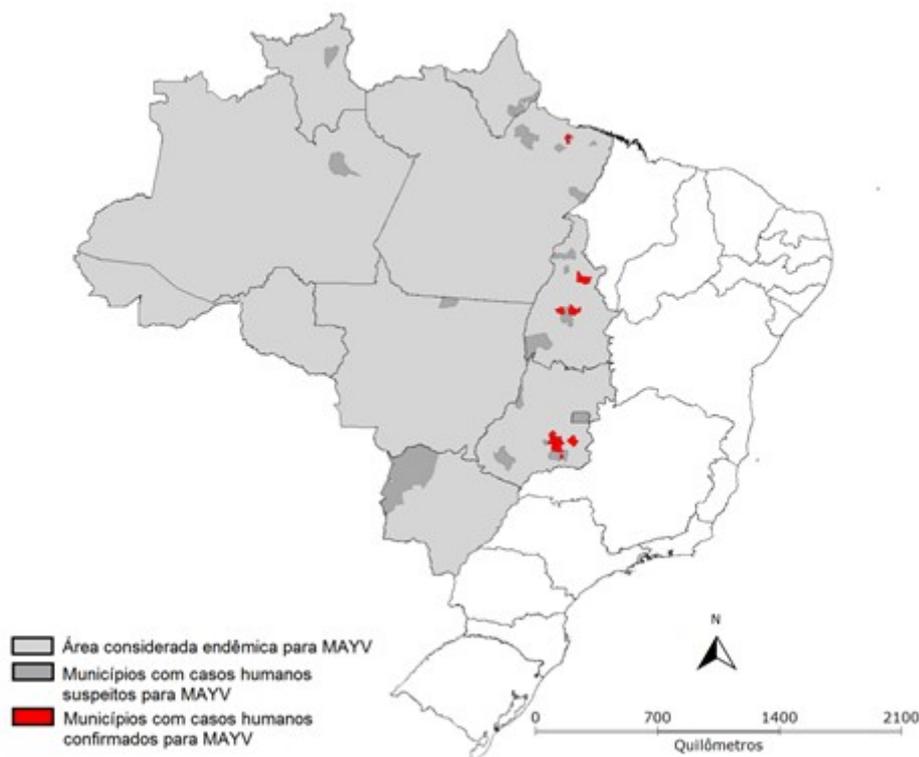
De forma geral, o que se observa ao longo da história é que as áreas mais afetadas por surtos do MAYV ocorrem em cidades que fazem fronteira com a Amazônia, ou situadas dentro da floresta Amazônica, principalmente no Norte do Brasil. Além disso, o vírus já foi detectado em países como Peru, Bolívia, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Colômbia e Venezuela (MUÑOZ E NAVARRO, 2012).

O Ministério da Saúde publicou em 2015 um estudo em que a área endêmica do vírus *Mayaro* no Brasil se concentra nas regiões Norte e Centro-Oeste, e que os Estados de

Goiás, Tocantins e Pará apresentaram casos humanos confirmados para MAYV como se pode observar na Figura 2 (BRASIL, 2015). Em 2015 foi publicado um estudo no qual foram constatados casos de transmissão do vírus em áreas de floresta degradada da Amazônia e em população humana de grandes cidades como Manaus e Cuiabá, indicando a disseminação para os grandes centros urbanos (TURINO, 2015).

A revista Exame publicou em dezembro de 2018 uma matéria na qual alertava a população sobre os riscos de epidemia provocada pelo vírus *Mayaro* no período do verão e destacou a importância de campanhas educativas para a prevenção da doença (EXAME, 2018). Em maio de 2019, o jornal O Globo publicou a descoberta da presença do vírus no Rio de Janeiro desde 2016 por parte do Laboratório de Virologia Molecular da UFRJ. Segundo a pesquisa, os pacientes infectados não viajaram para regiões endêmicas, ou seja, contraíram dentro do próprio estado, no qual já foram constatados três casos em Niterói. Além disso, o jornal alerta que cientistas indicam a possibilidade de epidemia da doença, e que não existe vacina ou tratamento específico até o momento (O GLOBO, 2019).

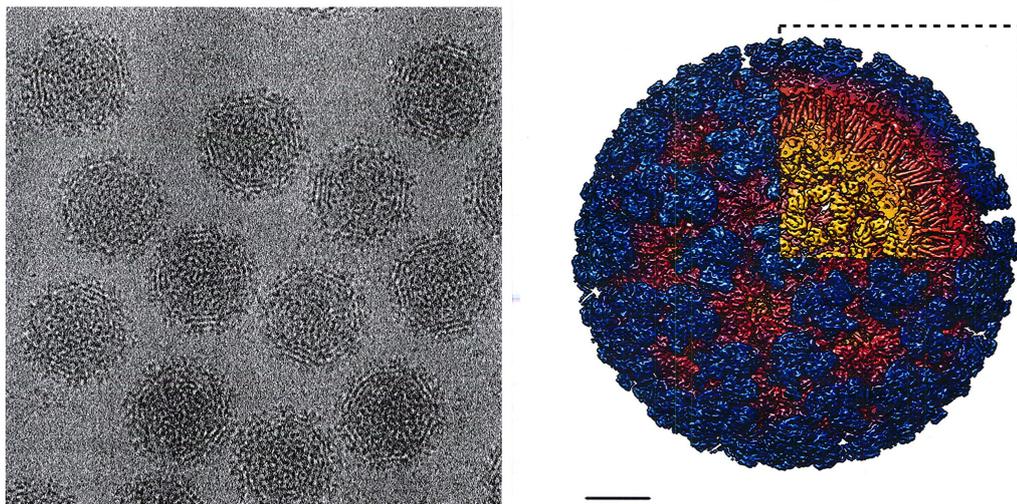
Figura 2. Mapa do Brasil demarcado com as regiões consideradas endêmicas para o vírus *Mayaro*, além de Estados e municípios com casos humanos notificados e confirmados entre dezembro de 2014 a outubro de 2015  
Fonte: BRASIL (2015)



### 2.2.2 O vírus (MAYV) e a Febre do *Mayaro*

O *Mayaro* (MAYV) é um arbovírus membro da família *Togaviridae* (vírus de RNA envelopado), e do gênero *Alphavirus*, assim como o vírus *Chikungunya* (CHIKV) ao qual é relacionado genética e antígenicamente. Estudos moleculares indicaram que existem duas linhagens do MAYV: D e L (POWERS *et al.*, 2006; BRASIL, 2015). A Figura 3 é uma micrografia de crioeletron do vírus e a sua respectiva estrutura 3D (HOTEZ E MURRAY, 2017). Os *Alphavirus* são vírus envelopados que, em sua composição, apresentam uma bicamada lipídica, oriunda da membrana plasmática da célula hospedeira, onde se encontra inserida repetições de glicoproteínas transmembranares. As proteínas se associam em dímeros de subunidades diferentes, seguida de associação em trímeros, a fim de formar uma estrutura proeminente denominada epícula, de forma que, expostas na superfície viral, participam de interações entre o vírus e os anticorpos e receptores da superfície da célula (JONHNSTON E PETERS, 1996; HARRISON *et al.*, 1971; PAREDES *et al.*, 1993). A espécie de mosquito *H. janthinomys* é o principal vetor, sendo um animal silvestre, de hábitos preferencialmente diurnos, cujo local de maior incidência são as copas das árvores de matas úmidas, de forma que a doença ocorre tradicionalmente em áreas de florestas conservadas (TURINO, 2015).

Figura 3. A esquerda: Micrografia de crioeletron do MAYV. A direita: Estrutura 3D do vírus  
Fonte: HOTEZ E MURRAY (2017)



Os sintomas da Febre do *Mayaro*, como é denominada a doença transmitida pelo MAYV, são similares aos da dengue, no sentido de que provoca febre, erupção cutânea e

artralgia severa, principalmente em países da América do Sul. A artralgia afeta preferencialmente pulsos, tornozelos e dedos dos pés, além de também em alguns casos afetar as articulações, e durar várias semanas. A febre aguda, provocada pela doença, dura de três a cinco dias, sem intercorrências de recuperação (PINHEIRO E LEDUC, 1988).

Segundo o Ministério da Saúde, em alguns casos, o MAYV pode provocar o desenvolvimento de complicações neurológicas, como Síndrome de Guillain Barré, encefalite, dentre outras doenças neurológicas. O diagnóstico do contágio pelo vírus é realizado de forma inicial através da avaliação clínica de sintomas do paciente no período dos últimos 15 dias. Caso haja indicativo da febre do *Mayaro*, o paciente deve ser submetido a exame de sangue específico para o vírus, no qual realiza-se o isolamento, a hemaglutinação, a imunofluorescência, a soroneutralização, além de testes moleculares. A realização de exames mais específicos se deve a similaridade da doença com outras arboviroses. Detectada a doença, o tratamento ainda é não-específico, já que, até o momento, não há droga capaz de cura. Desta forma, para as dores indica-se analgésicos e antitérmicos, evitando-se o uso de ácido acetil salicílico (AAS), que favorece manifestação hemorrágica. Além disso, o repouso e o consumo de água são de suma importância para a recuperação do paciente (BRASIL, 2015).

## 2.3 INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

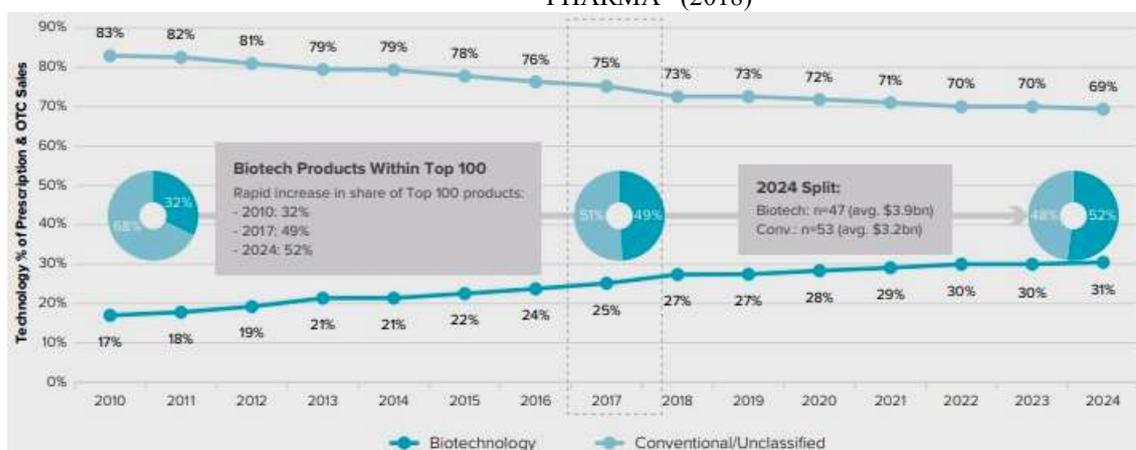
### 2.3.1 Avanços biotecnológicos

Os avanços na ciência têm forte correlação com o aprimoramento de tratamentos na medicina, principalmente estudos relacionados à Biotecnologia (DIAS e CARVALHO, 2017), que pode ser definida como a utilização de células ou componentes celulares para obtenção de produtos com determinada utilidade para o homem (CASTILHO, 2015). A Biotecnologia Farmacêutica é um campo da ciência que aplica conceitos da biotecnologia para a produção de drogas. Desta forma, faz-se necessário o estudo da doença em foco, assim como a ação das biomoléculas (biofármacos), as propostas de síntese e purificação, e os testes relacionados à atividade biológica da droga (WALSH, 2007). Os biofármacos podem ser classificados em

três grandes grupos, são eles: proteínas terapêuticas, anticorpos monoclonais e vacinas (VARGAS *et al.*, 2016).

Segundo um estudo publicado pela EVALUATE PHARMA<sup>®</sup>, em maio de 2018, há uma prospecção de aumento da participação de produtos farmacêuticos biotecnológicos no mercado, de 25% em 2017 para 31% em 2024. Como pode ser observado na Figura 4, em 2024 52% do *Top 100* de produtos em vendas serão dos advindos da Biotecnologia, ultrapassando os produtos de origem química já estabelecidos (EVALUATE PHARMA<sup>®</sup>, 2018).

Figura 4. Avanço de produtos farmacêuticos biotecnológicos no mercado mundial. Fonte: EVALUATE PHARMA<sup>®</sup> (2018)



O Quadro 1 apresenta o *ranking* previsto das principais empresas responsáveis pela venda de medicamentos de origem biotecnológica em 2024 (EVALUATE PHARMA<sup>®</sup>, 2018). A atual líder de mercado em produtos biotecnológicos, a empresa Roche, continuará nesta posição em 2024 segundo a previsão da revista EVALUATE PHARMA<sup>®</sup>. A posição tende a ser mantida devido a aquisição da Genentech<sup>®</sup>, pioneira em Biotecnologia.

Quadro 1. *Ranking* das dez principais empresas produtoras de medicamentos de origem biotecnológica prospectado para 2024. Fonte: EVALUATE PHARMA<sup>®</sup> (2018)

<b>Ranking</b>	<b>Empresa</b>
1º	Roche <sup>®</sup>
2º	Sanofi <sup>®</sup>
3º	Merck & Co <sup>®</sup>
4º	Amgen <sup>®</sup>
5º	Johnson & Johnson <sup>®</sup>
6º	AbbVie <sup>®</sup>
7º	Bristol-Myers Squibb <sup>®</sup>
8º	Eli Lilly <sup>®</sup>
9º	Novo Nordisk <sup>®</sup>
10º	Pfizer <sup>®</sup>

### 2.3.2 Testes de fármacos: *in vitro* e *in vivo*

A comercialização efetiva de um fármaco passa por diversas fases de testes. Inicialmente, na fase pré-clínica, os testes são feitos *in vitro* em laboratório, seguindo de testes em animais (*in vivo*), a fim de verificar a segurança e eficácia. Posteriormente, são realizados estudos na fase clínica, subdividida em quatro fases (ANVISA):

- Fase I: utiliza-se de um grupo reduzido de pessoas a fim de constatar a segurança em humanos;
- Fase II: diferentemente da Fase I, nesta fase são testadas diferentes doses do medicamento;
- Fase III: utiliza-se de um número maior de pacientes, a fim de obter um conhecimento mais aprofundado da dose-resposta em períodos mais longos;
- Fase IV: fase posterior a concessão do registro, cuja análise dura em média de 8 a 12 meses podendo ser maior devido a complexidade do caso, e comercialização, na qual avalia-se as reações adversas e novas estratégias de medicamento.

Na fase pré-clínica, na etapa de testes *in vitro*, busca-se avaliar a toxicidade da substância em células animais, com grande similaridade às do gênero humano, e por conseguinte, no caso do presente trabalho avaliar a capacidade de inativar o vírus e manter a célula viva. Dentre as vantagens do método *in vitro* em relação ao *in vivo*, estão a limitação de variáveis experimentais e menor período necessário de teste (ROGERO *et al.*, 2003). A viabilidade celular é o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade, de forma que o uso de corantes que transpassem a membrana da célula, como o vermelho neutro fixando-se em matriz lisossomal, é uma das formas de identificar as células viáveis e não viáveis. Este processo pode ser observado já que determinadas substâncias danificam as membranas da célula gerando um decréscimo de captura e ligação do corante, sendo assim possível avaliar, em porcentagem, o quão tóxica é para a célula (CIAPETTI *et al.*, 1996). O presente trabalho utilizou de métodos *in vitro*, incluindo a viabilidade por intermédio de uso do corante vermelho neutro, baseado nas vantagens descritas.

## 2.4 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO

A Informação Científica possibilita o entendimento universal sobre algum fato ou fenômeno, resultante de uma pesquisa científica, ou seja, de um trabalho de investigação conduzido segundo o método científico (AGUIAR, 1991). A Informação Científica e Tecnológica é encontrada em diferentes tipos de buscas visando a obtenção de conhecimento sobre tecnologias disponíveis e, por conseguinte, possibilitando a orientação em pesquisas, teses, de forma que constitui-se uma excelente base de dados para novos investimentos na indústria (QUADROS E VILHA, 2009).

Dentre as fontes de Informação, encontram-se os artigos científicos em plataformas como a SCOPUS (<http://www.scopus.com/>), um dos meios mais utilizados para disseminação e assecuridade da pesquisa desenvolvida. Além disso, as patentes, encontradas em bases como USPTO (United States Patent and Trademark Office - <http://www.uspto.gov>), figuram outra forma representativa de verificar o desenvolvimento tecnológico sobre uma determinada tecnologia. Um indicador de avanços tecnológicos de um país, segundo Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI), governos e também por estudiosos, em geral, pode ser determinado pelos pedidos de patente depositados em um determinado país (MUELLER, 2005).

Seguida da seleção dos dados em artigos e patentes, a análise dos documentos é uma fase de suma importância para o tratamento das Informações Científicas, de forma que a interpretação dos dados possa gerar um Conhecimento relativo ao tema. O mapeamento de tecnologia através da gestão de informação obtidas de diferentes fontes, como patentes e artigos, é extremamente útil para inferir o estado da arte de determinado setor, de forma a gerar informações sobre a sua trajetória passada, presente e sobre as tendências futuras de mercado (AMORIM, 2017).

## **Capítulo 3**

### **3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

#### **3.1 JUSTIFICATIVA**

A Indústria Farmacêutica tem voltado seus esforços para o desenvolvimento de fármacos de origem biológica. Desta forma, projetos envolvendo a expressão de moléculas bioativas através de células animais ou microrganismos são de suma importância para o setor. Estudos relacionados a microalgas indicam grande potencial de aplicação para produção de biofármacos, devido a sua atividade biológica identificada, baixa toxicidade e adequação ao conceito de Química Verde. O interesse por antivirais eficientes com efeitos colaterais reduzidos surge em meio a expansão do MAYV para as regiões de grandes aglomerações no Brasil, e em vista às recentes epidemias provocadas por arbovírus como a dengue, zica e *Chikungunya* em 2016. Portanto, a aplicação de microalgas como *A. maxima*, *C. vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis*, em que foi constatada atividade antiviral contra outros vírus, surge com grande potencial no combate ao MAYV.

#### **3.2 OBJETIVOS**

##### **3.2.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antiviral de extratos brutos de microalgas na replicação do MAYV em células VERO, a caracterização destes extratos e o mapeamento tecnológico relativo ao uso da combinação de microalgas e fármacos.

### 3.2.2 Objetivos Específicos

- (i) Realizar buscas de artigos e patentes, em bases de dados selecionadas;
- (ii) Realizar a análise dos documentos, em função de taxonomias definidas;
- (iii) Selecionar as quatro cepas em função dos resultados da literatura;
- (iv) Cultivar microalgas das espécies *C. vulgaris*, *D. salina*, *H. pluvialis* e *A. maxima*, em condições descritas na literatura;
- (v) Obter os extratos das microalgas para os testes de atividade antiviral e citotoxicidade;
- (vi) Realizar a caracterização preliminar dos extratos;
- (vii) Realizar a análise de Porter simplificada do projeto.

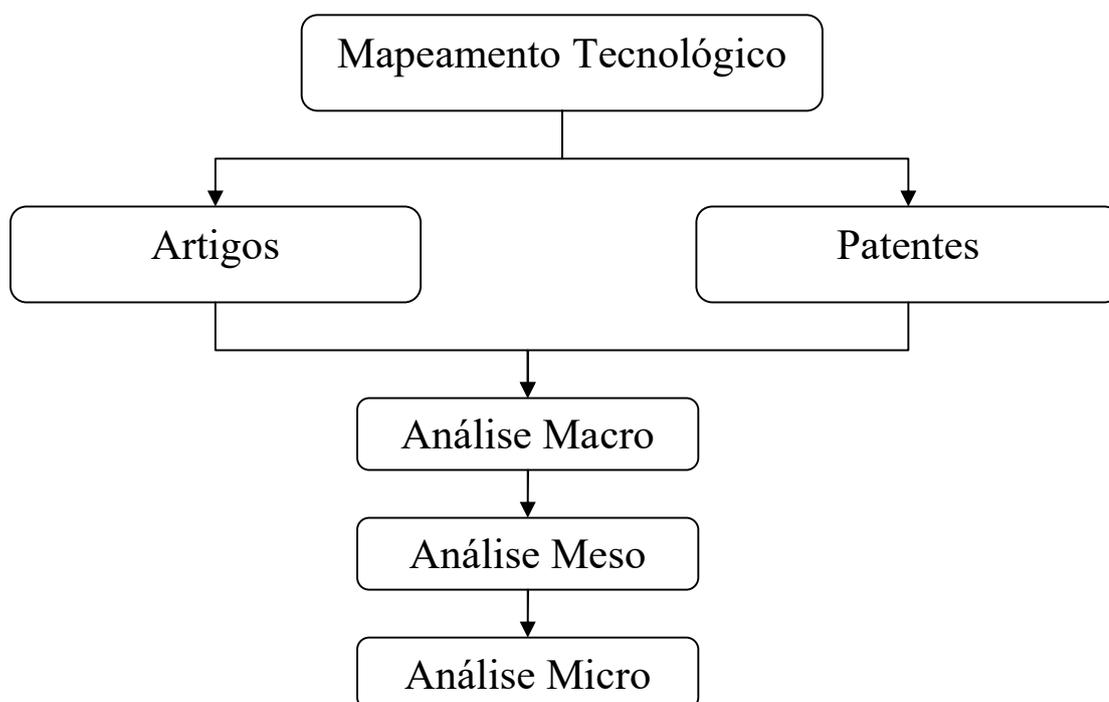
## 4 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO

A fim de nortear o presente trabalho, foi realizado, inicialmente, um mapeamento tecnológico, que consistiu na busca de artigos e patentes relacionados ao tema de interesse. Dessa forma o mapeamento foi capaz de indicar as oportunidades de pesquisa na área moldando o projeto de forma a contribuir com os meios científico e mercadológico.

### 4.1 METODOLOGIA DE BUSCA E DE ANÁLISE DE ARTIGOS E DE PATENTES

A metodologia do mapeamento tecnológico aplicada neste trabalho foi desenvolvida por Borschiver e Silva no livro “*Technology Roadmap – Planejamento Estratégico para alinhar Mercado-Produto-Tecnologia*”, em 2016. O diagrama de blocos representado na Figura 5 indica as etapas realizadas no mapeamento para geração dos resultados que serão apresentados.

Figura 5. Diagrama de blocos de etapas do mapeamento tecnológico de artigos e patentes envolvendo “microalgae” e “pharmaceutical”. Fonte: Elaboração própria



Para o mapeamento de artigos, foi aplicada a combinação de palavras-chave: “*microalgae*” e “*pharmaceutical*”, para busca em resumo, título e palavras-chave entre 2014 e abril de 2019 na plataforma SCOPUS (<http://www.scopus.com/>). Scopus<sup>®</sup> é a base referencial da Editora Elsevier. Ela é a maior fonte referencial de literatura técnica e científica revisada por pares, que permite uma visão ampla de tudo que está sendo publicado cientificamente sobre um tema. Mediante o uso dos mecanismos de busca, podem ser encontradas as informações publicadas por uma determinada instituição, ou um determinado autor. Nesse contexto, a base de dados Scopus<sup>®</sup> foi selecionada pela sua grande abrangência, facilidade de *download* de uma grande quantidade de documentos, alta relevância dos artigos científicos e análises Macro facilitadas pela própria estrutura da página eletrônica.

A partir da mesma combinação de palavras-chave “*microalgae*” e “*pharmaceutical*”, utilizada no mapeamento de artigos, foi realizada a busca de patentes concedidas na base USPTO (United States Patent and Trademark Office – <http://www.uspto.gov>) em resumos, e na base ESPACENET (The European Patent Office - <https://www.epo.org/>) em resumo e título, desde 1988 a abril de 2019. A escolha das bases de dados USPTO e ESPACENET foi baseada no fato de que a maior parte das instituições publicadoras de patentes deposita suas pesquisas nessas bases, possuindo assim, ampla abrangência e possibilitando grande diversidade de resultados. Ainda foi feito um levantamento na plataforma PATENT INSPIRATION, para uma análise preliminar das patentes.

Os artigos e documentos de patentes foram analisados em três níveis, de acordo com a metodologia descrita por Borschiver e Silva (2016):

- (i) Análise macro – Análise dos documentos segundo a distribuição por ano, país, revistas, instituições de origem dos autores e órgãos de fomento a pesquisa.
- (ii) Análise meso – Listagem dos tópicos abordados em cada documento e através da similaridade entre eles realiza-se o estabelecimento de taxonomias.
- (iii) Análise micro – Aprofundamento das taxonomias definidas na análise meso de forma a fornecer maiores informações relativas ao tema.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca de artigos realizada para o mapeamento, foram recuperados 379 documentos, sendo 83 publicados em 2018, porém, para as análises, foram selecionados os 30 dos artigos mais recentes efetivamente relacionados ao tema.

Enquanto a busca na base USPTO (United States Patent and Trademark Office – <http://www.uspto.gov>) em resumos, resultou em três patentes, e na base ESPACENET (<https://www.epo.org/>) em resumo e título, em 56 patentes. Para o mapeamento foram selecionadas 15 patentes mais recentes relacionadas ao tema.

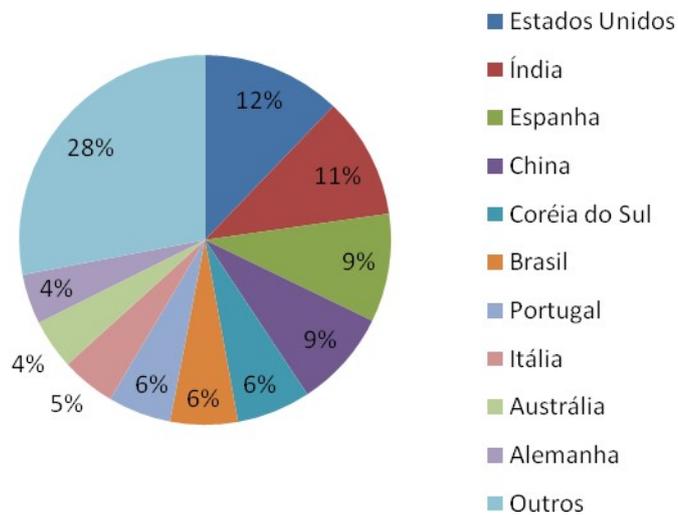
### 4.2.1 Mapeamento de artigos relacionados a microalgas e farmacêuticos

No mapeamento de artigos se utilizou apenas dos documentos que tratavam efetivamente de procedimentos experimentais nos quais microalgas indicaram atividade biológica. Assim, foi excluído qualquer documento recuperado que fosse de revisão como o artigo “*A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria*” (PATEL *et al.*, 2019), ou no qual o procedimento experimental trata-se de outra aplicação que não a explicitada, como exemplo estudos da interferência em microalgas de medicamentos despejados na água encontrado no artigo “*The influence of four pharmaceuticals on Chlorella pyrenoidosa culture*” (ZHANG *et al.*, 2019).

#### 4.2.1.1 Análise Macro

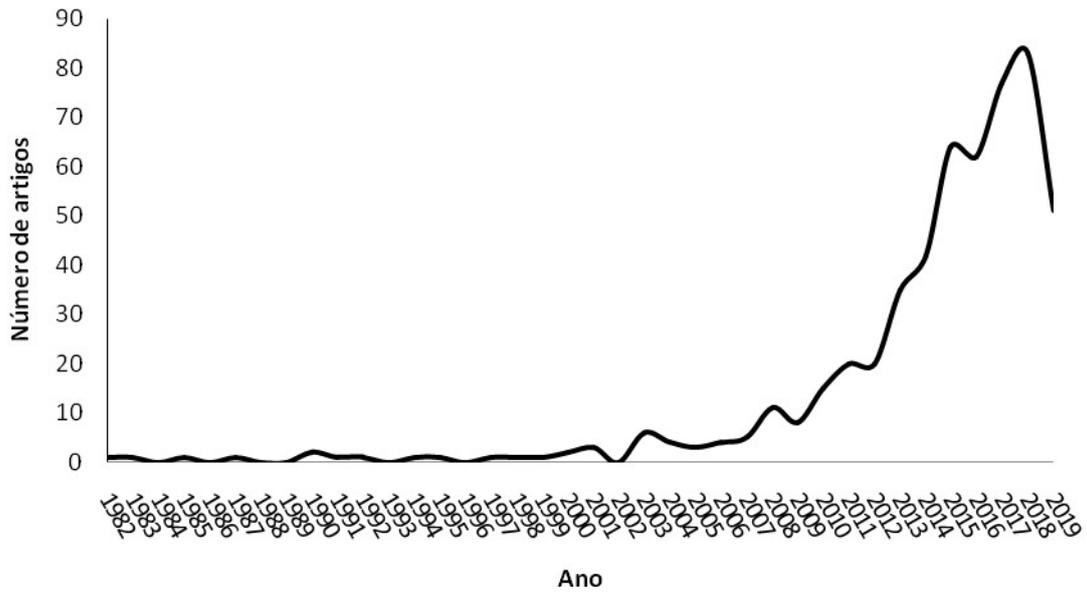
Na primeira análise proposta fez-se uma varredura de quais países mais trabalham com o tema e de número de documentos publicados por ano. Desta forma, em relação aos países envolvidos com publicações de farmacêuticos a partir de microalgas, nesta busca, os seis principais foram Estados Unidos, Índia, Espanha, China, Coreia do Sul e Brasil, como se pode observar na Figura 6. A categoria “Outros” se refere a França, Malásia, Reino Unido, México, dentre outros totalizando 50 países.

Figura 6. Gráfico de incidência de publicações de artigos de “microalgas e farmacêuticos” por país  
 Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril de 2019)



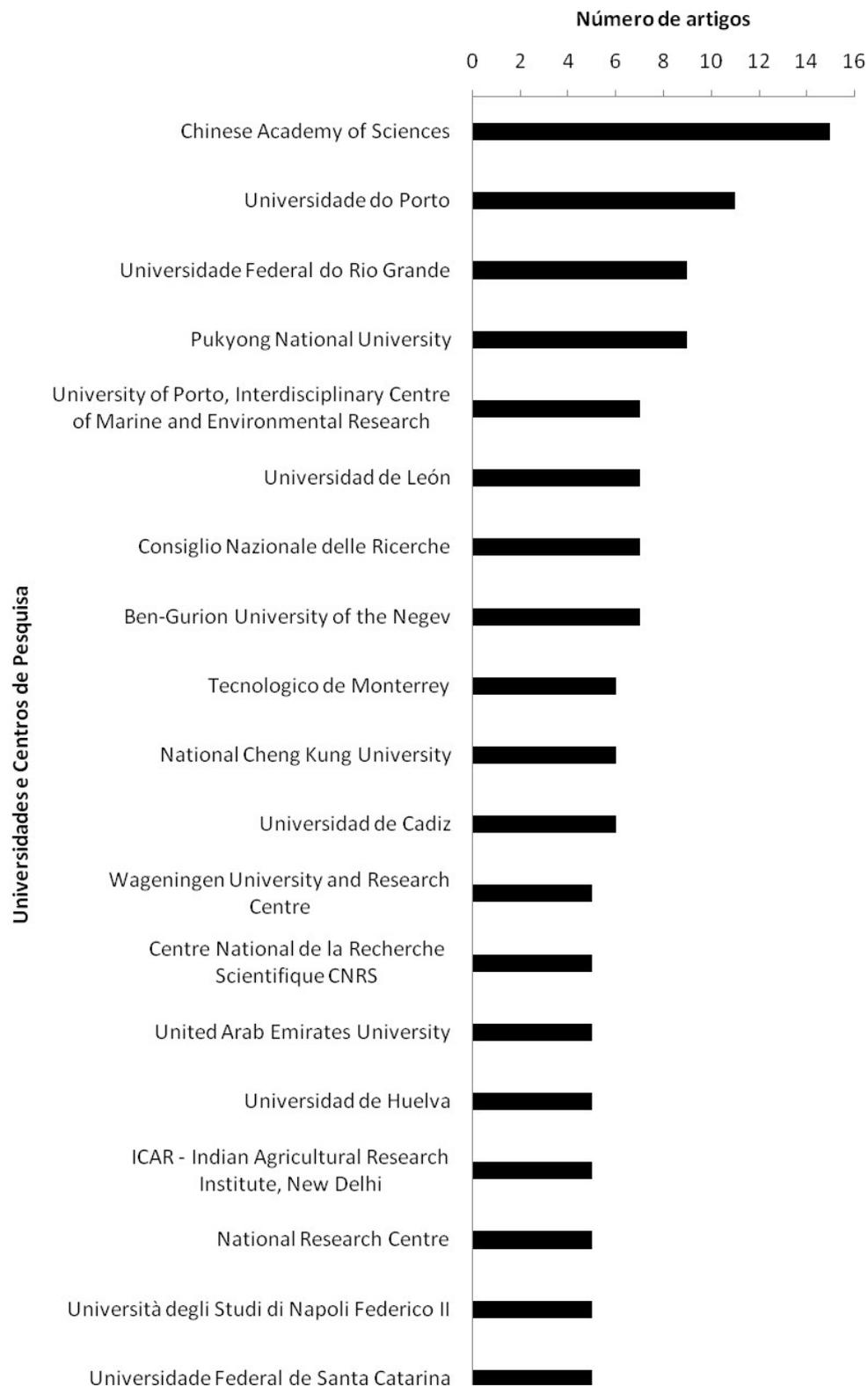
As publicações até o ano de 2007 em média foram inferiores a 10 por ano. Todavia, entre 2013 e 2018 o número de artigos aumentou de forma abrupta, indicando um potencial de aplicação de microalgas na Área Farmacêutica, impulsionado pelos avanços da Biotecnologia na manipulação de organismos no final do século 20 (BUNDERS, HAVERKORT E HIEMSTRA, 1996) (Figura 7). Esse fato vai ao encontro do que foi publicado na revista EVALUATE PHARMA® de 2018, em que a produção de fármacos a partir da Biotecnologia tende a ultrapassar os produzidos de forma química, convencional. O fato do decaimento no número de artigos em 2019 pode ser explicado pela análise que ocorreu no primeiro trimestre.

Figura 7. Série histórica das publicações de artigos de “microalgas e farmacêuticos”  
Fonte: Resultado a partir da busca na base Scopus® (1982- abril 2019)



A segunda análise dos resultados da busca na base de dados foi referente às principais Universidades e Centros de Pesquisa envolvidos na publicação de trabalhos com microalgas e farmacêuticos (Figura 8).

Figura 8. *Ranking* das 19 principais Universidades e Centros de Pesquisa produtores de artigos envolvendo “microalgas e farmacêuticos” Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril 2019)



Em primeiro lugar no *ranking* se encontra a Chinese Academy of Science (CAS), lotada em Pequim na China, fundada em 1º de novembro de 1949. As pesquisas produzidas pela CAS se encontram nas mais diversas áreas da ciência e tecnologia, desenvolvendo trabalhos de tecnologias avançadas e relacionadas ao bem-estar da sociedade e do desenvolvimento de indústrias emergentes.

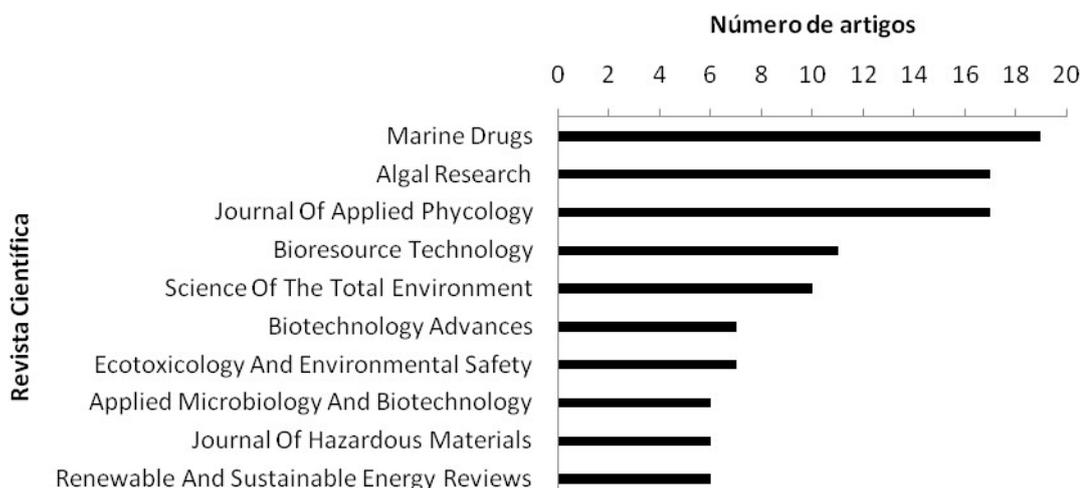
Dentre os grupos de pesquisa relacionados à busca estão: *Institute of Genetics and Developmental Biology, Center for Microalgal Biotechnology and Biofuels, Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology e Key Laboratory of Biofuels, Shandong Provincial Key Laboratory of Energy Genetics, Qingdao Engineering Laboratory of Single Cell Oil.*

O Brasil é representado no *ranking* pela Universidade Federal do Rio Grande e pela Universidade Federal de Santa Catarina. A Universidade do Rio Grande nasceu da necessidade no meio século 20 de escolas de nível superior no Rio Grande do Sul, visto que havia uma grande evasão de estudantes para outros centros de estudo. Dessa forma, inicialmente foi criada a Escola de Engenharia de Rio Grande, devido ao elevado número de profissionais na área e parque industrial existente. Posteriormente foram criados os outros cursos que consolidaram a Universidade do Rio Grande. A universidade tem como norte nas pesquisas o estudo de ecossistema costeiro na busca da harmonia entre a sociedade e a natureza. Dentre os grupos de pesquisa encontrados na busca estão: Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica, Laboratório de Engenharia Bioquímica, Laboratório de Operações Unitárias. A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) possui sua sede na capital de Santa Catarina (Florianópolis). Fundada em 18 de dezembro de 1960, com o objetivo de promover o ensino, a pesquisa e a extensão. Atualmente é constituída de aproximadamente 70 mil pessoas, entre técnicos-administrativos, docentes, em Educação e estudantes de graduação, pós-graduação, ensino médio, fundamental e básico. Dentre os grupos de pesquisa estão os departamentos: de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, de Ciência e Tecnologia de Alimentos, de Ciências Farmacêuticas, de Aqüicultura.

Dentre as 10 principais revistas em que os artigos foram publicados a *Marine Drugs* liderou o *ranking* com 19 publicações (Figura 9). Nas primeiras posições as revistas relacionadas ao tema alga e microalga foram as prevalentes, seguidas do tema Biotecnologia,

Ecossistemas e Sustentabilidade. Sendo que a revista relacionada diretamente ao tema de Tecnologia Farmacêutica melhor colocada, a *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, encontra-se em 34º lugar. Dessa forma, conclui-se que o cultivo de microalga com finalidade farmacêutica ainda não ocupa as principais revistas da área de atuação, provavelmente devido a se encontrar no início do desenvolvimento, no qual de forma geral os extratos fitoterápicos são mais incidentes que os compostos ativos purificados destes microrganismos. Todavia, a ocupação do primeiro lugar pela *Marine Drugs*, indica que a ciência tem investido em descobertas de substâncias bioativas advindas do meio aquático, e este seria um caminho promissor a comercialização de microalgas e seus produtos para fins farmacêuticos.

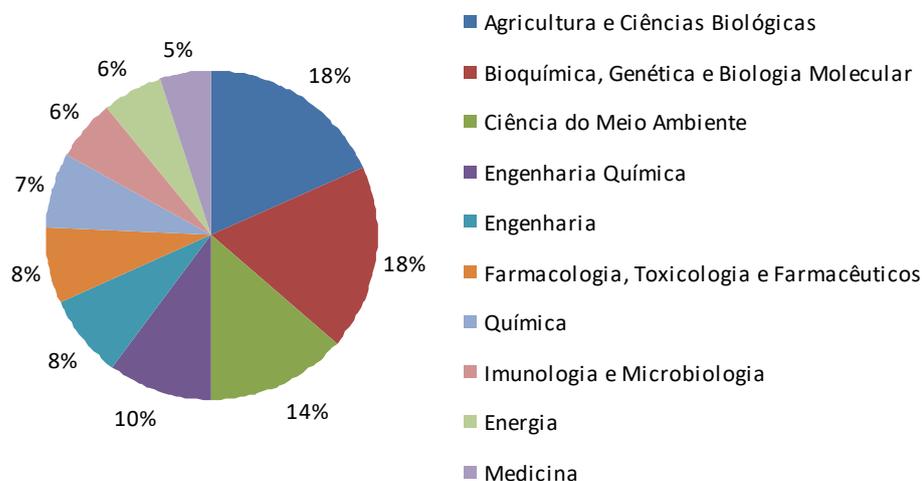
Figura 9. Dez principais revistas científicas contendo publicações de artigos em “microalgas e farmacêuticos”  
 Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril 2019)



Dentre as áreas de conhecimento de microalgas e farmacêuticos, os quatro principais grupos encontrados foram Agricultura e Ciências Biológicas, Bioquímica, Biologia Genética e Molecular, Ciência do Meio Ambiente e Engenharia Química (Figura 10).

Outro dado interessante disponível na base Scopus é referente aos órgãos de fomento que patrocinaram as pesquisas envolvidas com microalgas e farmacêuticos. Como se pode observar na Quadro 2, dois órgãos de fomento brasileiros se encontram entre os cinco primeiros da lista, dado que demonstra o interesse público no desenvolvimento deste tipo de pesquisa, voltado para área da Biotecnologia Farmacêutica.

Figura 10. Áreas de conhecimento de artigos em que são aplicadas “microalgas e farmacêuticos”.  
 Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril 2019)



Quadro 2. *Ranking* de órgãos de fomento responsáveis pelas pesquisas em “microalgas e farmacêuticos”  
 Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril 2019)

1º	Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)	Portugal
2º	National Natural Science Foundation of China	China
3º	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)	Brasil
4º	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)	Brasil
5º	European Commission	Europa
6º	National Science Foundation	EUA
7º	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia	México
8º	European Social Fund (ESF)	Europa
9º	Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER)	Espanha
10º	Ministry of Economic Affairs	Holanda ou China

#### 4.2.1.2 Análise Meso

Dentre os artigos selecionados para estudo, foram criadas seis taxonomias que abordam os temas mais incidentes nos trabalhos. A Tabela 5 contém cada uma delas e os conceitos que as definem. Deve-se ressaltar que um mesmo documento pode estar classificado em mais de uma taxonomia.

Tabela 5. Listagem de taxonomias de nível meso elaboradas e seus respectivos conceitos, a partir dos artigos selecionados para o mapeamento tecnológico de “microalgas e farmacêuticos”

<b>Taxonomias</b>	<b>Conceitos</b>	<b>Número de artigos</b>
Aplicação	Diversos usos e aplicações de moléculas bioativas produzidas por microalgas	23
Microorganismo	Tipos de microalgas cultivadas para produção de substâncias bioativas	28
Produto	Descrição de produtos de microalgas com atividade biológica	7
<i>Downstream</i>	Etapas do processo após o cultivo para recuperação de compostos bioativos	22
Técnicas de análises e Testes	Técnicas de análise dos produtos e de testes de atividade biológica	19
Condições de cultivo	Condições de cultivo que expressem os compostos bioativos	11

#### 4.2.1.3 Análise Micro

A seleção dos artigos foi baseada na proximidade com o tema de aplicação de microalgas para produção de compostos bioativos. Dentre os artigos analisados, na taxonomia “Aplicação”, observou-se que a grande maioria abordava Antioxidante, tema relacionado a tratamentos de rejuvenescimento facial de grande interesse nos dias atuais, e, em segundo lugar, no Tratamento de cancer, doença cujo histórico de pacientes tem aumentado ao longo dos anos, como se pode observar na Figura 11.

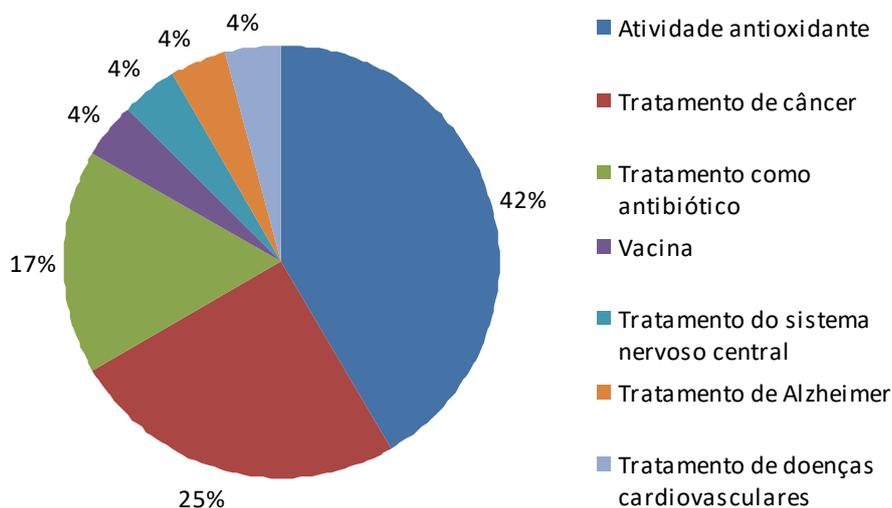
Nos artigos estudados referentes à aplicação em atividade antioxidante, o trabalho de Wan e colaboradores (2019) avaliou a atividade antioxidante de extratos orgânico e aquoso de *C. vulgaris*. Dentre os solventes que apresentaram melhor resultado, os solventes eutéticos de base polioliol (múltiplas hidroxilas) apresentaram maior eficiência de extração e atividade

antioxidante. Além disso, outro ponto positivo é que este tipo de solvente propicia uma extração mais sustentável, já que substitui os compostos de origem fóssil pelos de origem renovável e minimiza as contaminações no meio ambiente.

Feller e colaboradores (2018) avaliaram a atividade dos extratos por CO<sub>2</sub> supercrítico e n-butano subcrítico de três microalgas: *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata* e *Porphyridium cruentum*. Como conclusão, os autores constataram que o CO<sub>2</sub> supercrítico foi seletivo na extração de ácido graxo saturado, e que o n-butano subcrítico foi um excelente e eficiente método para a extração dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e ômega 6. Os testes indicaram que os carotenóides devem ser os compostos de maior atividade antioxidante.

No artigo de Zacaria e colaboradores (2017), estudou-se a extração de compostos fenólicos por água subcrítica da microalga *Chlorella sp.* e, por conseguinte foi testada a capacidade antioxidante do extrato. Os resultados mostraram que a extração foi eficiente e que a microalga pode ser utilizada como fonte natural de antioxidante.

Figura 11. Aplicações de substâncias bioativas em estudo de “microalgas e farmacêuticos” em artigos  
Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril 2019)



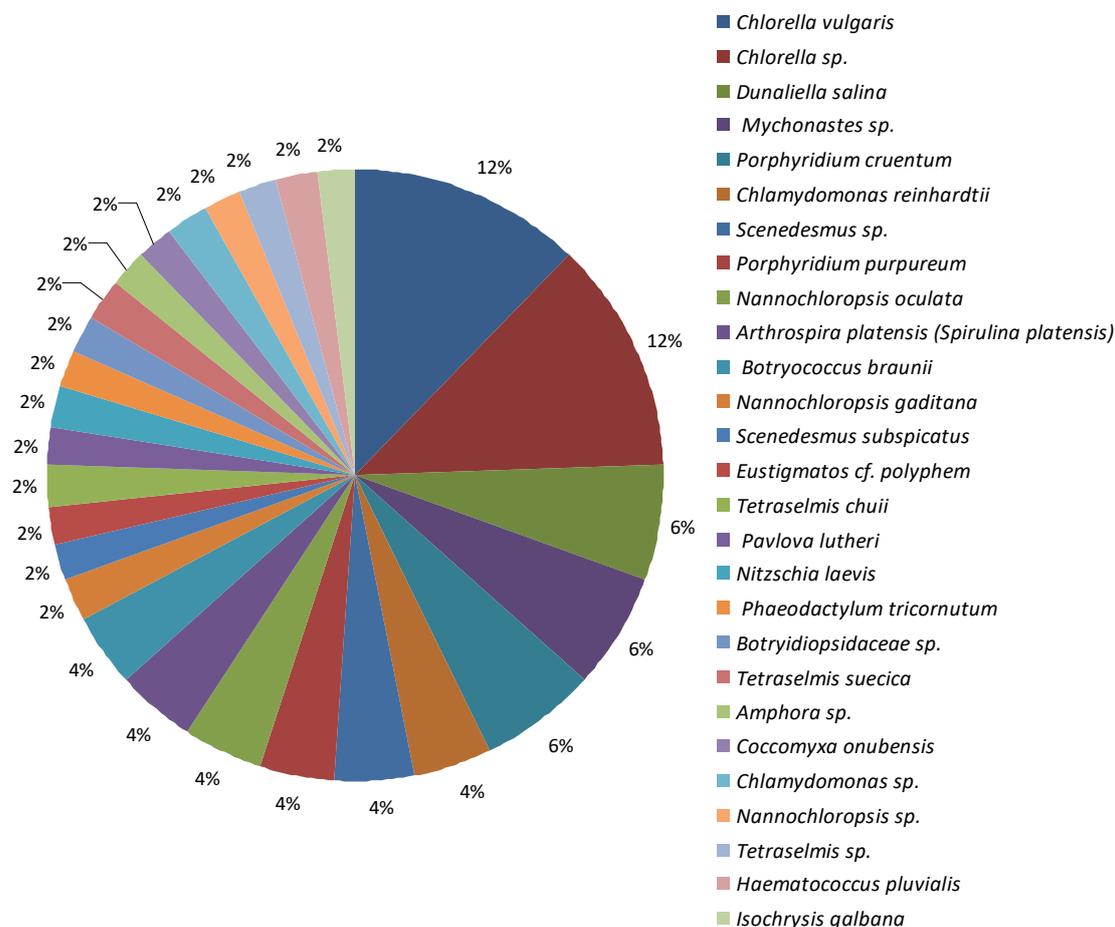
No que se refere aos artigos relacionados à atividade anti-cancer, o trabalho de El-Baz e colaboradores (2017), estudou a atividade das microalgas *H. pluvialis* e *D. salina* em células de cancer de cólo, fígado e seio. A fração rica em carotenóides de *H. pluvialis* demonstrou alta citotoxicidade pelas células de cancer e colo, e moderada citotoxicidade nos canceres de seio e fígado. Em relação à *D. salina*, seu extrato rico em carotenóides mostrou leve atividade citotóxica nas células de cancer em fígado e seio.

O trabalho de Suh e colaboradores (2017) também avaliou a capacidade anticancer de extrato de microalga, sendo que, nesse caso, utilizou-se uma espécie, não identificada pelo autor, do gênero *Botrydiopsidaceae*, obtida próxima a *King Sejong Station* (62° 13' S, 58° 47' W). A extração, nesse caso, foi realizada com etanol e exibiu considerável atividade anticancer na inibição da invasão, proliferação e migração, assim como a indução de apoptose celular. Desta forma, o extrato etanólico de *Botrydiopsidaceae sp.* é um promissor agente na terapia anticancer.

Entre os resultados da busca realizada, observou-se a presença de um artigo que trata da produção de vacina a partir de microalga “*Stable transformation of Spirulina (Arthrospira) platensis: a promising microalga for production of edible vaccines*” de Dehghani e colaboradores (2018). O objetivo dos autores foi a inserção de um plasmídeo contendo genes de interesse para expressão de proteínas terapêuticas, por intermédio de *Agrobacterium* em *A. platensis*. Como resultado o artigo indica que a transferência genética é eficiente, visto que genes marcadores são expressos, e que tal tecnologia possui um futuro promissor na área de vacinas.

No que se refere a “Microorganismos”, foram citados, em ordem decrescente de publicações: *C. vulgaris*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella salina*, *Mychonastes sp.*, *Porphyridium cruentum*, *Chlamydomonas reihardtii*, *Scenedesmus sp.*, *Porphyridium purpureum*, *Nannochloropsis oculata*, *Arthrospira platensis*, *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis gaditana*, *Scenedesmus subspicatus*, *Eustigmatos cf. polyphem*, *Tetraselmis chuii*, *Pavlova lutheri*, *Nitzschia laevis*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Botrydiopsidaceae sp.*, *Tetraselmis suecica*, *Amphora sp.*, *Coccomyxa onubensis*, *Chlamydomonas sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Haematococcus pluvialis* e *Isochrysis galbana* (Figura 12).

Figura 12. Incidência de microalgas nos artigos envolvendo “microalgas e farmacêuticos”  
 Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril de 2019)



Um estudo envolvendo secagem e extração de *C. vulgaris* foi aplicado na recuperação de compostos bioativos. O pré-tratamento de secagem mais promissor foi a liofilização e o melhor solvente aplicado na etapa de sonicação foi a água, enquanto o melhor solvente para extração do material sem pré-tratamento foi o etanol. Técnicas de espectrometria nas regiões de UV e visível, além de cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizadas para determinação de carotenóides, clorofila e conteúdo protéico. Como conclusão, o extrato que passou por secagem e extração obteve o melhor resultado de atividade anti-radical (STRAMARKOU *et al.*, 2017).

Extratos de *B. braunii* e *N. oculata* foram estudados por Custódio e colaboradores (2015), como inibidores de atividade de acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e tirosinase (TYRO), e avaliados quanto à capacidade de atenuar o peróxido de

hidrogênio que induz lesão na linhagem celular dopaminérgica SH-SY5Y. Em estudos anteriores, o grupo já havia verificado a capacidade antioxidante de compostos fenólicos e de ácidos graxos, e, em ambas as espécies, tais compostos e ácidos graxos poliinsaturados foram verificados. Dentre os resultados, com exceção do extrato em acetona de *B. braunii* e do extrato aquoso de *N. oculata*, todas as amostras inibiram a AChE, especialmente o extrato em hexano da *N. oculata*.

O extrato da microalga *D. salina* foi testado em células de carcinoma escamoso oral humano KB, atuando de forma anti-proliferativa, anti-inflamatória e pró-apoptótica. Como resultado da análise fitoquímica da microalga, verificou-se a presença de diferentes tipos de carotenóides, dentre os quais, alfa caroteno, luteína e zeaxantina. Em relação à atividade anticarcinogênica, o extrato demonstrou eficácia, visto que inibiu a atividade anti-proliferativa das células cancerosas, além de regular negativamente a expressão da proteína relacionada à atividade anti-inflamatória. Por fim, verificou-se que o extrato é capaz de induzir a apoptose das células cancerosas (CHIU *et al.*, 2017).

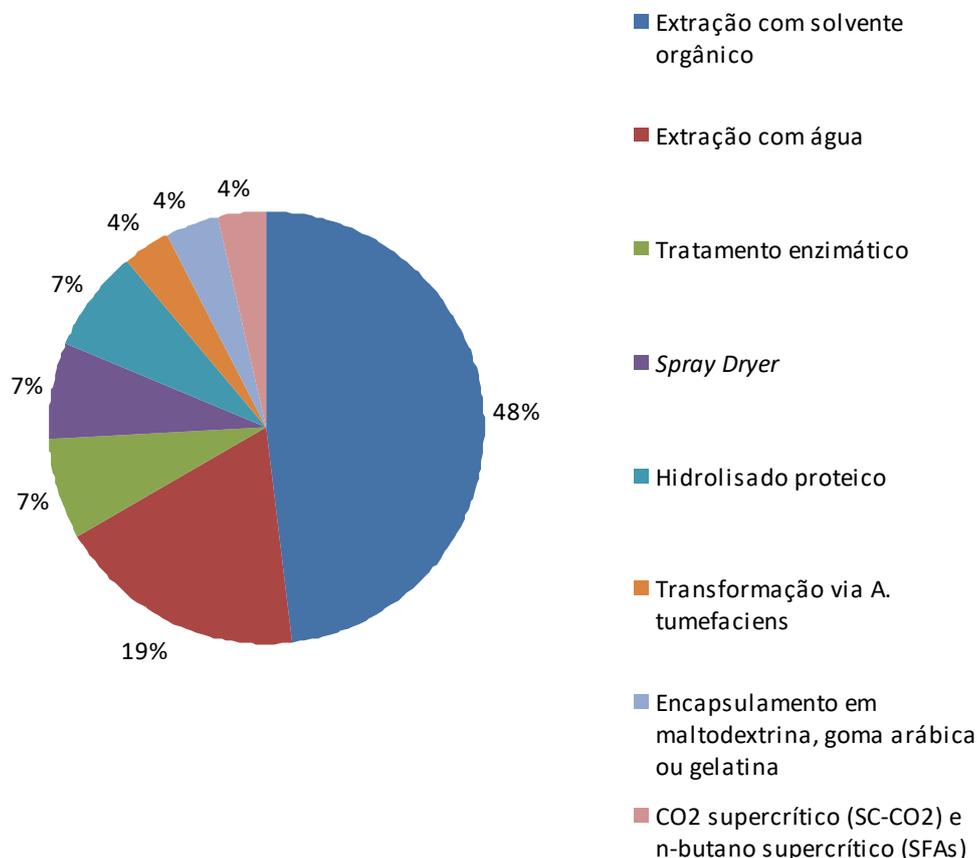
Já em relação à taxonomia “Produto”, as substâncias elucidadas como bioativas foram os ácidos graxos icosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), carotenóides ( $\beta$ -caroteno, fucoxantina, astaxantina), no artigo “*Marine microalgae used as food supplements and their implication in preventing cardiovascular diseases*” (MIMOUNI *et al.*, 2015), e ômega 3, no artigo “*Eicosapentaenoic acid from Porphyridium cruentum: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products*” (ASGHARPOUR *et al.*, 2015). Além disso, a produção de polifenóis com ação antioxidante foi estudada por Wan e colaboradores (2019) em “*Polyol-based deep eutectic solvents for extraction of natural polyphenolic antioxidants from Chlorella vulgaris*”, e a produção de xantina, também com ação antioxidante, por Wang e colaboradores (2018) em “*Optimum Production Conditions, Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Violaxanthin from Microalga Eustigmatos cf. polyphem (Eustigmatophyceae)*”. As substâncias fucoxantinol e fucoxantina com aplicação farmacêutica foram estudadas por Sun e colaboradores (2018): “*A novel strategy for isolation and purification of fucoxanthinol and fucoxanthin from the diatom Nitzschia laevis*”. Por fim, dois outros produtos foram verificados sendo eles a vacina oral, obtida a partir de *A. platensis*, por Dehghani e colaboradores (2018) e a cápsula de microalga com secagem por *spray-drying*, em “*Microencapsulation of algal biomass (Tetraselmis chuii) by spray-drying using different encapsulation materials for better*

*preservation of betacarotene and antioxidant compounds*”, estudo de Bonilla-Ahumada, Khandual e Lugo-Cervantes (2018).

No que se refere à Taxonomia “*Downstream*”, a mais utilizada foi a extração com solventes orgânicos, dentre os quais, metanol, acetona, etanol, hexano, dietil éter, clorofórmio e diclorometano (Figura 13). Em segundo lugar, a extração com água, seja em temperatura ambiente ou em ebulição, surge em uma vertente bastante presente nos dias atuais, no que se refere aos conceitos de Química Verde.

Como “Técnicas de Análises e Testes”, verificou-se que técnicas de cromatografia foram as mais incidentes nos trabalhos, seja cromatografia em camada delgada ou mesmo a cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, técnicas como PCR em tempo real e testes de atividade biológica contra células cancerosas, radicais livres e microrganismos. Em relação à “Condição de cultivo”, um terço dos artigos, principalmente os mais recentes, apresentaram as condições de cultivo aplicadas, sendo que dois deles descreveram a comparação entre as variações aplicadas no cultivo para expressão do produto de interesse. O artigo “*Eicosapentaenoic acid from Porphyridium cruentum: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products*” descreveu as variáveis temperatura, irradiância e concentração de nitrato como de interesse na expressão da substância bioativa na microalga *Porphyridium cruentum* (ASGHARPOUR *et al.*, 2015). Portanto observa-se uma mudança no perfil de trabalhos, que, em anos anteriores, reportavam apenas os métodos de extração e de atividade biológica de microalgas, enquanto nos mais recentes, observa-se, também, como enfoque, as etapas de cultivo celular. Esse resultado pode ser explicado pelo interesse em modificar as condições de cultivo, a fim de induzir a maior expressão de classes de substâncias com atividade biológica, gerando extratos com substâncias biologicamente ativas mais concentradas.

Figura 13. Técnicas de *Downstream* na recuperação de produtos de microalgas com atividade biológica em artigos. Fonte: Elaboração própria a partir da busca na base Scopus® (2014- abril 2019)



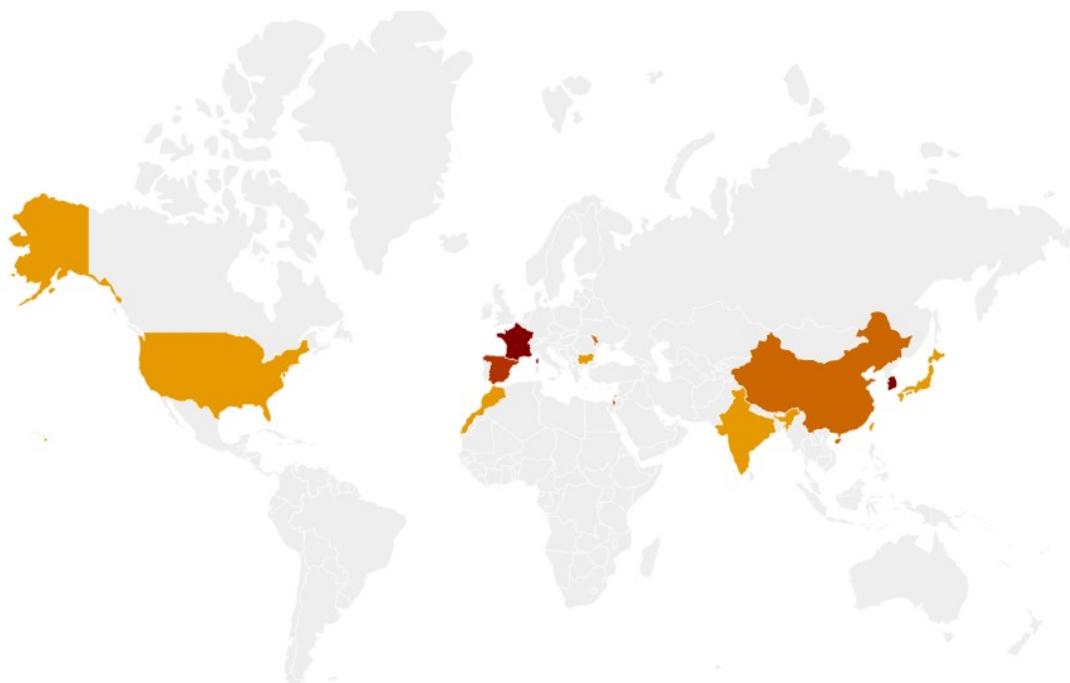
De forma geral o mapeamento de artigos indicou que, no tocante à extração, o uso de solvente orgânico foi o mais aplicado e, em relação à “Aplicações”, o uso como antioxidante correspondeu a mais de 40% dos documentos, fato que pode ser explicado pelo interesse global em tratamentos que retardem o envelhecimento. Outro resultado importante foi o uso de microalgas do gênero *Chlorella* na grande maioria das publicações, o que norteou, no presente trabalho, o cultivo da cepa de *C. vulgaris* e a avaliação de seu extrato como antiviral.

## 4.2.2 Mapeamento de patentes relacionadas a microalgas e farmacêuticos

### 4.2.2.1 Análise Macro

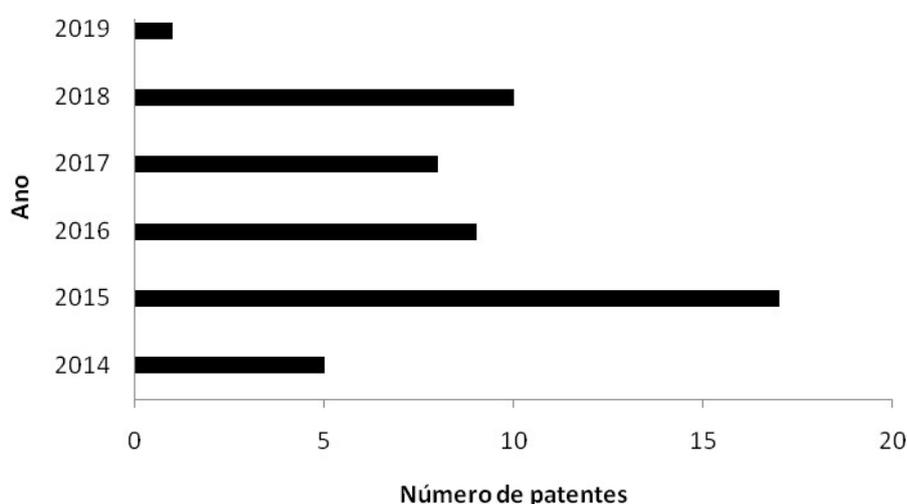
Inicialmente, somente para fazer uma primeira análise do panorama das patentes publicadas envolvendo microalgas e farmacêuticos, foi realizada uma busca na plataforma PATENT INSPIRATION® (<http://www.patentinspiration.com/>). Utilizou-se o termo “*microalgae and pharmaceutical*” e, como restrições, selecionou-se a busca em títulos e resumo, e exibição dos resultados de patentes concedidas e solicitadas nos últimos cinco anos ao redor do mundo. A partir do mapa da Figura 14 pode-se observar que os inventores das patentes (concedidas e solicitadas) em microalgas e farmacêuticos estão centralizados no hemisfério norte, especificamente nos Estados Unidos, Espanha, França, China, Índia, Japão, Marrocos, Bulgária, Moldávia e Coréia do Sul. No entanto, em relação às patentes efetivamente concedidas, apenas encontrou-se nos países: Coréia do Sul (cinco), Moldávia (quatro), China (um) e Bulgária (um).

Figura 14. Países aos quais pertencem os inventores de patentes (concedidas e solicitadas) relacionadas à “microalgas e farmacêuticos” nos últimos cinco anos  
Fonte: PATENT INSPIRATION® (Abril, 2019)



Um segundo dado da base PATENT INSPIRATION® revelou o número de patentes por ano nos últimos cinco anos, como pode-se observar na Figura 15. Percebe-se que no ano de 2015 houve a maior publicação de patentes, um total de 17, enquanto no ano anterior, em 2014, constatou-se o valor mínimo do intervalo, cinco patentes, excluindo o dado de 2019 que ainda não completou 12 meses. Em relação somente às patentes concedidas, o perfil foi praticamente o mesmo, todavia, o número ao ano foi reduzido, sendo quatro em 2015, dois em 2014, 2016 e 2017, e uma em 2018 e 2019.

Figura 15. Incidência de patentes (concedidas e solicitadas) relacionadas a “microalgas e farmacêuticos” por ano no intervalo dos cinco últimos anos  
Fonte: Patent Inspiration® (Abril, 2019)



A terceira fase da pesquisa realizada visou investigar os principais autores envolvidos na publicação das patentes concedidas e solicitadas. Dentre os principais nomes na publicação de patentes concedidas, o pesquisador Victor Salaru se destaca, principalmente, em pesquisas voltadas a proteínas, lipídeos e carboidratos nas áreas Farmacêutica e Alimentícia. Salaru é professor e pesquisador da *Universitatea de Stat din Moldova*, e, recentemente, foi um dos representantes de sua universidade no Salão Internacional de Pesquisa, Inovação e Invenção "Pro-Invent 2019", no qual receberam três medalhas de ouro.

No que se refere às buscas em patentes solicitadas, o pesquisador Eric Marechal foi o grande destaque. Marechal é diretor de pesquisa do *Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS)*, Laboratório de Fisiologia Celular e Vegetal (LPCV), no qual lidera com

Juliette Jouhet a equipe "Biogênese, dinâmica e homeostase de lipídios de membrana". Eric é associado de Ciências Naturais, e realizou seu trabalho de tese de 1991 a 1994 na Universidade Joseph Fourier, sob a direção de Jacques Joyard. Posteriormente, completou uma bolsa de pós-doutorado na Universidade Rockefeller, em Nova York, EUA, no laboratório do Professor Nam-Hai Chua, antes de ser chamado para trabalhar no CNRS em 1998. A pesquisa que desenvolve se concentra no metabolismo dos lipídeos da membrana de células vegetais, metabolismo denominado como muito original devido a presença de uma única organela, o plastídio, e de lipídios ausentes em células animais, galactolipídeos.

Por fim, buscou-se levantar os principais Centros de Pesquisa envolvidos no tema. Em relação às patentes concedidas, a Universidade do Estado da Moldávia (*Universitatea de Stat din Moldova*) foi o grande destaque. Fundada em 1 de outubro de 1946, com o nome inicial da Universidade Estadual de Chisinau, localiza-se em Chisinau, Moldávia. O estabelecimento da universidade foi um momento importante para o desenvolvimento e consolidação do ensino superior no país. Os graduados universitários estão entre as principais figuras da ciência contemporânea, e são fundadores de escolas científicas: I. Gohberg I. Bersuker A. Andries, S. Radautan, V. Moskalenko, S. Moskalenko. Em relação às patentes solicitadas, o Centro Nacional Francês de Pesquisa Científica (*CENTRE NAT RECH SCIENT*) é considerado como a maior organização de pesquisa governamental na França e a maior agência científica fundamental na Europa.

#### 4.2.2.2 Análise Meso

Assim como no caso da análise de artigos, foram utilizadas as seis taxonomias listadas para a análise de patentes, ou seja, não houve alteração de perfil de taxonomias, todavia, o número de publicações foi diferente, como se pode observar na Tabela 6.

Tabela 6. Listagem de taxonomias meso elaboradas e o número de patentes (concedidas e solicitadas) correspondentes ao mapeamento tecnológico de “microalgas e farmacêuticos” (1988- Abril de 2019)

<b>Taxonomias</b>	<b>Número de patentes</b>
Aplicação	15
Microrganismo	11
Produto	8
<i>Downstream</i>	10
Técnicas de análises e Testes	9
Condições de cultivo	5

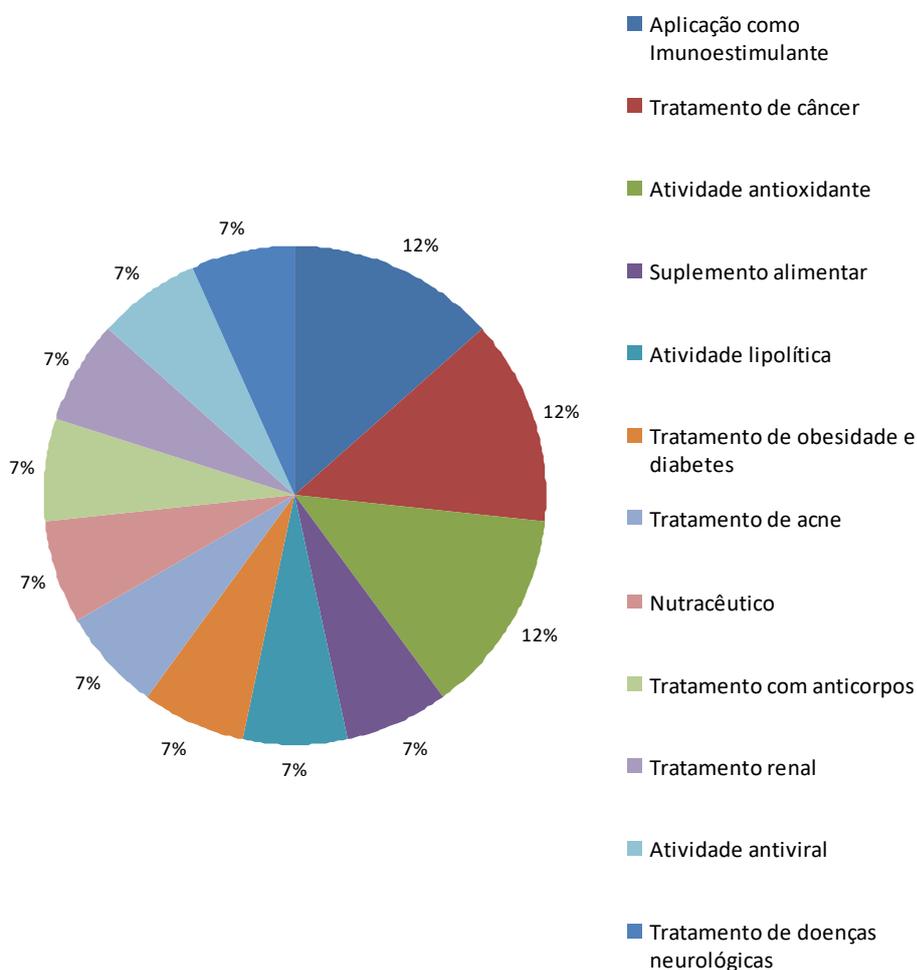
#### 4.2.2.3 Análise Micro

Dentre as patentes analisadas, se observou que estudos voltados à Atividade Imunoestimulante, que visa à prevenção de infecções, Atividade Antioxidante, envolvida no rejuvenescimento facial, e Tratamento de Cancer, cujos casos vêm aumentando ao longo dos anos, foram os mais presentes nas patentes, como se pode observar na Figura 16.

No que se refere à produção de imunoestimuladores, a patente de Pasco e Pugh, da Universidade do Mississippi, em 2010 depositada na USPTO, investigou a atividade antiinflamatória das microalgas *A. platensis*, *C. pyrenoidosa*, *A. flos-aquae*, *H. pluvialis* e *F. vesiculosus* (macroalga), e verificou-se que, em todas, há alta concentração de melanina e polissacarídeos, que estimulam o sistema imunológico. Além disso, na patente de 2004 de Roevik e Jorunn, na base ESPACENET, desenvolveu-se um estudo de atividade estimulante de extratos de microalgas. Constatou-se que os açúcares das microalgas avaliadas foram capazes de combater provocadas por microrganismos patogênicos, e, dessa forma, poderiam ser utilizados como compostos farmacêuticos.

Figura 16. Áreas de aplicação verificadas na análise micro das patentes (concedidas e solicitadas) relacionadas a “microalgas e farmacêuticos”

Fonte: Elaboração própria a partir da busca nas bases USPTO® e ESPACENET® (1988- Abril de 2019)



Os peptídeos da microalga *P. lutheri* foram avaliados como ingredientes ativos na ação preventiva e de tratamento de cancer. Dessa forma, foi realizada uma separação da fração peptídica do meio em que a microalga foi cultivada e foram avaliados os efeitos de citotoxicidade, atividade na produção de metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) e inibição de migração celular, a fim de avaliar a compatibilidade do extrato com as células de futuros pacientes. Essa patente foi depositada na base ESPACENET em 2015 (KYO *et al.*, 2015). Já a patente de Halling e Yuhas, depositada na base USPTO em 1995, descreveu um método capaz de matar células tumorais de mamíferos de forma a inibir a conversão enzimática do protoporfirinogênio em protoporfirina IX pela protoporfirinogênio oxidase nas células, causando um acúmulo de protoporfirina IX nas células. A produção de protoporfirina

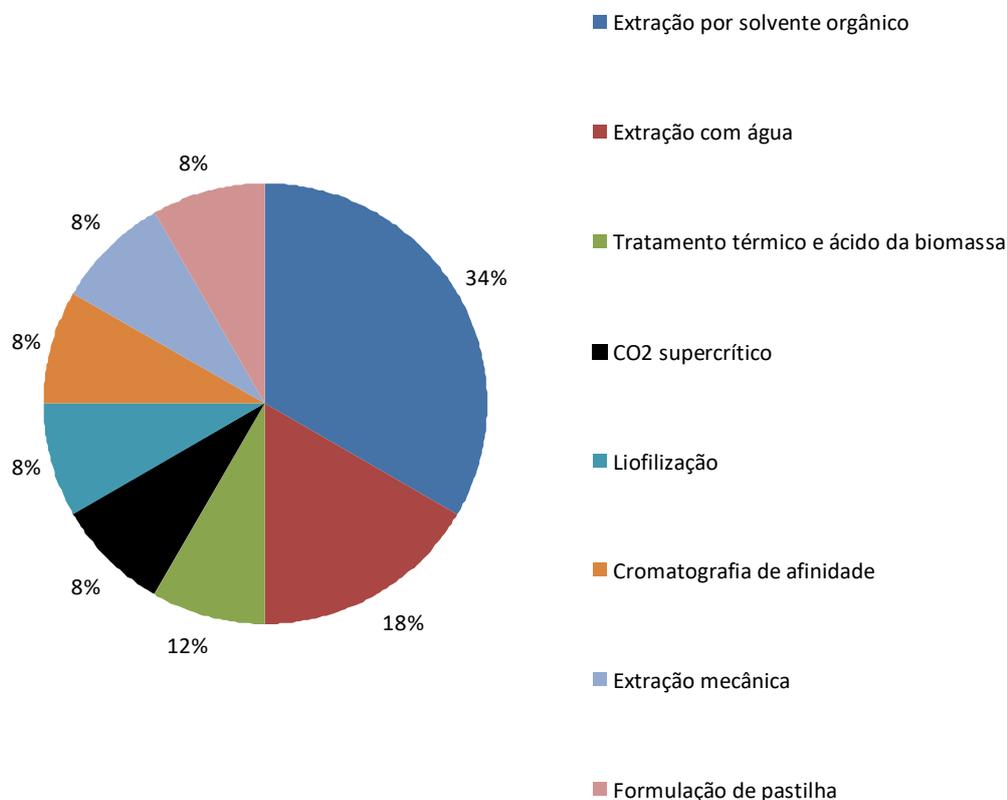
IX pode ser obtida pelo cultivo de microalgas eucarióticas, na presença de um inibidor de protoporfirinogênio oxidase.

A aplicação do derivado de microalga fucoxantina como antioxidante foi verificada nas patentes “*Improved process for producing fucoxanthin and/or polysaccharides from microalgae*” da empresa ALGAHEALTH<sup>®</sup> (AYALON, 2018), e “*Extract from microalgae comprising fucoxanthin, fucoxanthinol and fatty acids, process for its production and applications thereof*” da empresa GREENALTECH<sup>®</sup> (XAVIER *et al.*, 2015). Dentre as cepas utilizadas, se encontram *Phaeodactylum sp.*, *Isochrysis sp.*, *Amphora sp.*, *Naviculla lensi*, *Naviculla incerta* e *Chaetoceros sp* (AYALON, 2018).

No caso de aplicação como suplemento alimentar, foi avaliada a restrição de nitrogênio no cultivo de microalga da classe *Dianophyceae* em um fermentador aeróbico, a fim de induzir a expressão de 20% de ácido docosahexaenoico (DHA) dentre os triglicerídeos presentes no extrato. Essa patente foi depositada na base USPTO em 1996, pelo Martek Biosciences Corporation<sup>®</sup> (Columbia, MD) (KYLE, REEB e SICOTTE, 1996). A empresa citada, Martek Biosciences Corporation<sup>®</sup>, é integrante da Royal DSM NV<sup>®</sup>, pautada na produção de suplementos nutricionais de fungos e microalgas cultivados, e está lotada em Columbia, Maryland, EUA. Dentre os principais produtos da empresa, se encontra o ácido docosahexaenóico (DHA), ácido graxo ômega-3 poliinsaturado.

No que se refere à aplicação de produto com atividade anti-lipolítica, o extrato da microalga *Dysmorphococcus globosus* foi proposto como ingrediente na composição de cosméticos e farmacêuticos de forma a atuar no tratamento de adiposes. A patente referida foi depositada na base ESPACENET em 2013, cujos inventores são da SOLIANCE<sup>®</sup>, França (ROMAIN *et al.*, 2013).

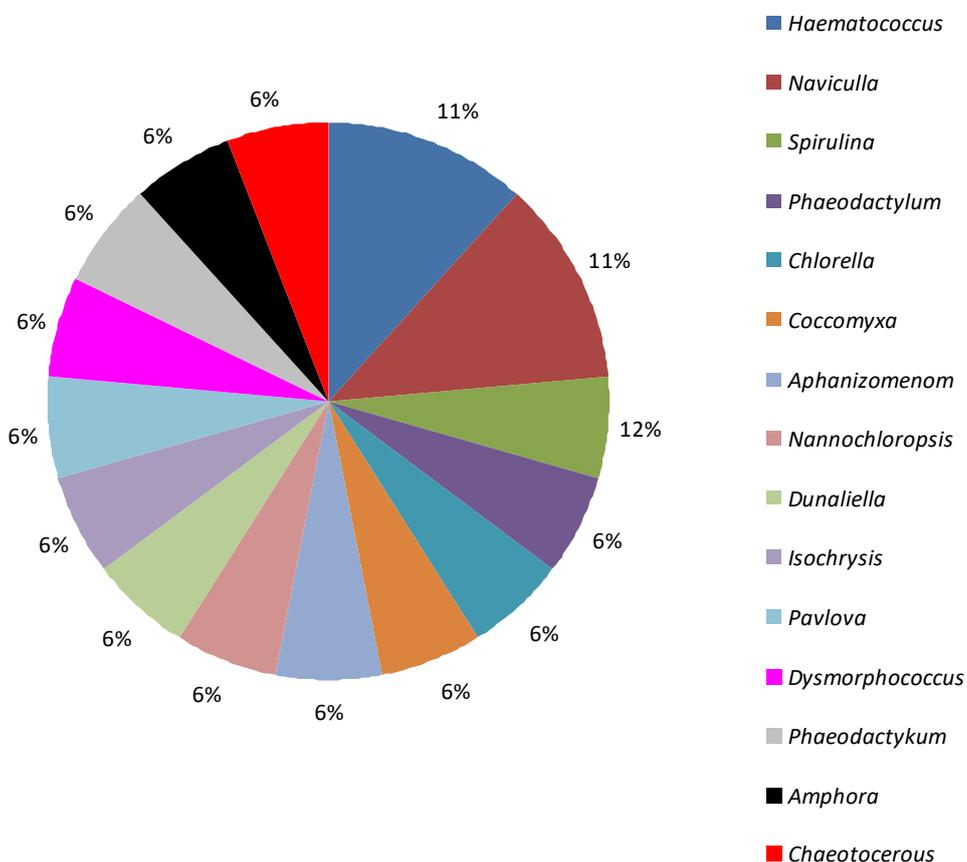
Figura 17. Técnicas de *Downstream* na recuperação de produtos de microalgas com atividade biológica em patentes (concedidas e solicitadas). Fonte: Elaboração própria a partir da busca nas bases USPTO® e ESPACENET® (1988-Abril de 2019)



No que se refere à taxonomia “*Downstream*”, o principal método para recuperação do produto de interesse foi a extração por solvente orgânico e a extração com água, seja em temperatura ambiente ou de ebulição (Figura 17). Um exemplo de patente que aplicou a extração com solvente orgânico em etapas *downstream* foi publicada por *MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE, INNOVATION & RESEARCH*, a qual teve como objetivo uma formulação para tratamento de acne utilizando extrato de microalgas, dentre elas *Nannochloropsis*, *Dunaliella* e *Isochrysis genera* (MERGHOUB, WAHBY E AINANE, 2015). Em relação à taxonomia “Técnicas de Análise e Testes”, foi verificado, em sua maioria, o uso de técnicas cromatográficas, desde cromatografia em camada delgada a cromatografia líquida de alta eficiência e, além disso, diversos testes foram descritos, de acordo com a atividade em foco, como contra radicais livres e anti-bactericida. Em “Condições de Cultivo”, um terço das patentes apresentou as condições utilizadas no

processo, nas quais se aplicou condições de estresse para a expressão do metabólito de interesse.

Figura 18. Gêneros de microalgas descritos nas patentes do mapeamento de “microalgas e farmacêuticos”.  
 Fonte: Elaboração própria a partir da busca nas bases USPTO® e ESPACENET® (1988- Abril de 2019)



Os dois gêneros de maior contribuição para as patentes em análise, como se pode observar na Figura 18, foram *Naviculla*, relacionado à produção de composto com atividade antioxidante (AYALON, 2018), e *Haematococcus*, que foi descrito em patentes, cujo objetivo foi o tratamento de doença renal (JIANGUO *et al.*, 2013), e na produção de base para fármaco de via oral em forma de pastilha (NANGAI, GUOYOU E SHENGFANG, 2015).

Em suma, o mapeamento de patentes indicou que o uso de solvente orgânico foi o mais aplicado, assim como verificado nos artigos. Em relação à “Aplicação”, o uso como imunostimulante, antioxidante e no tratamento de cancer foram os mais incidentes. No que se refere aos gêneros de microalgas descritos na busca, verificou-se, como maioria, *Naviculla* e *Haematococcus*, sendo que *H. phuvialis* uma das cepas utilizadas no presente projeto para avaliação antiviral.

### 4.2.3 O mercado de microalgas e farmacêuticos

A partir de uma busca na base “*Patent Inspiration*”, foi gerado um arquivo com as 10 principais empresas relacionadas às palavras-chave “*microalgae*” e “*pharmaceutical*”, e estas foram listadas com suas respectivas origem, descrições e produtos, que se encontram em fase de pesquisa ou já são comercializados, nos Quadros 3a e 3b. O fato de as empresas listadas, dentre as quais, a AlgaHealth® e a FitoplanctonMarino®®, comercializarem produtos de origem microalgal com atividade biológica indica um resultado mercadológico importante, visto que indica alta capacidade de inserção de extratos de microalgas aplicados à Saúde Humana, que é o foco do presente trabalho.

No Brasil, um dos destaques relacionados às microalgas e aos produtos com atividade biológica é a empresa Algae Biotecnologia® que desenvolve soluções tecnológicas no cultivo de microalgas para diversos fins. Dentre as áreas de aplicação tem-se: Tratamento de Efluentes, Nutrição animal, Biocombustíveis, fixação de CO<sub>2</sub>, e assim como o presente trabalho, a Saúde Humana. A empresa investe em forte sistema de pesquisa e desenvolvimento em parceria com universidades e de forma rápida aplica a migração de escala laboratorial para industrial. Os parceiros acadêmicos pertencem às universidades UFSCar em Araras e São Paulo, UFSM em Santa Maria, Rio Grande do Sul, UFC no Ceará.

Figura 19. Planta industrial da empresa brasileira Algae Biotecnologia  
Fonte: Página eletrônica Algae Biotecnologia®



Quadro 3a. Principais empresas que apresentam pesquisas ou produtos comerciais relacionados a “microalgas e farmacêuticos”. Fonte: Plataforma PATENT INSPIRATION®

Empresa	Descrição	Produtos	País
<p>ALGAHEALTH</p> 	<p>Empresa biotecnológica que representa o futuro da aquacultura marinha e fonte de fucoxantina e polissacarídeos. Com seu método inovador para o cultivo de microalgas no interior e novas cepas de microalgas.</p>	Fucoxantina	Israel
<p>COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE</p> 	<p>Organização pública de pesquisa que trabalha no campo das energias de baixo carbono, e em pesquisas básicas e aplicadas em outras áreas: defesa, tecnologia da informação, saúde e ciências da vida.</p>	Não divulgado	França
<p>BIOTECHMARINE</p> 	<p>Empresa de biotecnologia que concentra seus esforços em inovação, segurança, eficácia, desenvolvimento sustentável e preservação da biodiversidade.</p>	Tecnologia de cultivo CELEBRITY™	França
<p>FITOPLANCTON MARINO</p> 	<p>Empresa que desenvolve produtos a partir de microalgas e elementos funcionais para os mercados de aquicultura, aquiriologia, cosméticos, saúde e nutrição</p>	Dermalgae®, Rejuvasea®, Plancton Marino Veta la Palma®	Espanha
<p>FMC CORPORATION</p> 	<p>Empresa química que produz substâncias para o controle de pragas, plantas daninhas e doenças em culturas como soja, milho, algodão, cana-de-açúcar, arroz, frutas, hortaliças, café, fumo.</p>	Ally®, Aurora®, Gamit®, Profit®, Accurate®	Estados Unidos
<p>OIL AND NATURAL GAS CORP LTD</p> 	<p>Empresa petrolífera multinacional indiana, pertencente ao governo.</p>	Não divulgado	Índia

Quadro 3b. Principais empresas que apresentam pesquisas ou produtos comerciais relacionados a microalgas e farmacêuticos. Fonte: Plataforma PATENT INSPIRATION® (Continuação)

Empresa	Descrição	Produtos	País
<p>PHYCO BIOTECH</p> 	<p>Empresa de biotecnologia que produz e comercializa produtos farmacêuticos: suplementos alimentares naturais inovadores para fins terapêuticos, assim como cosméticos orgânicos.</p>	<p>Allophycocyanin (APC), Crosslinked Allophycocyanin (APC-XL), C-Phycocyanin (C-PC), R-Phycoerythrin (R-PE) e B-Phycoerythrin (B-PE)</p>	<p>França</p>
<p>SOC D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES SEPPIC</p> 	<p>Empresa de tecnologia atenta a cuidados com o meio ambiente atuante nas áreas de cosméticos, nutrição, alimentação animal, farmacêuticos, dentre outros.</p>	<p>MONTANOX®, SEPINEO DERM®</p>	<p>França</p>
<p>SUNCHEON RES CT FOR NATURAL MEDICINES</p>	<p>Centro de pesquisa em medicamentos naturais.</p>	<p>Não divulgado</p>	<p>República da Coreia</p>
<p>SOFARMA AD</p> 	<p>Uma das principais empresas farmacêuticas na Bulgária, destaque na fabricação de medicamentos de alta qualidade, pesquisa e desenvolvimento e responsabilidade social.</p>	<p>Carsil, Tempalgin e Nivalin</p>	<p>Bulgária</p>

## Capítulo 5

### 5 PESQUISA EXPERIMENTAL

#### 5.1 PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS A PARTIR DO MAPEAMENTO TECNOLÓGICO

A partir dos resultados do mapeamento tecnológico, pode-se observar que, no período aplicado na análise, trabalhos relacionados às microalgas e aos fármacos aplicados à atividade antiviral são menos incidentes, quando comparados aos aplicados no tratamento de cancer, atividade antioxidante e imunestimulante, mais incidentes na taxonomia “Aplicação”. Dessa forma, buscou-se outros trabalhos na literatura que indicassem atividade antiviral a partir de microalgas. Foi possível, então, selecionar as melhores “Condições de Cultivo” para expressão do antiviral, com exceção de *A. maxima* que, no artigo que indicava atividade antiviral, não apresentava os dados de cultivo. Portanto, utilizou-se condições aplicadas pelo grupo do laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese, descritas no trabalho de Lara e Demarque, 2017 (SANTOYO *et al.*, 2012 e 2010; PASQUET *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-CORONA *et al.*, 2002).

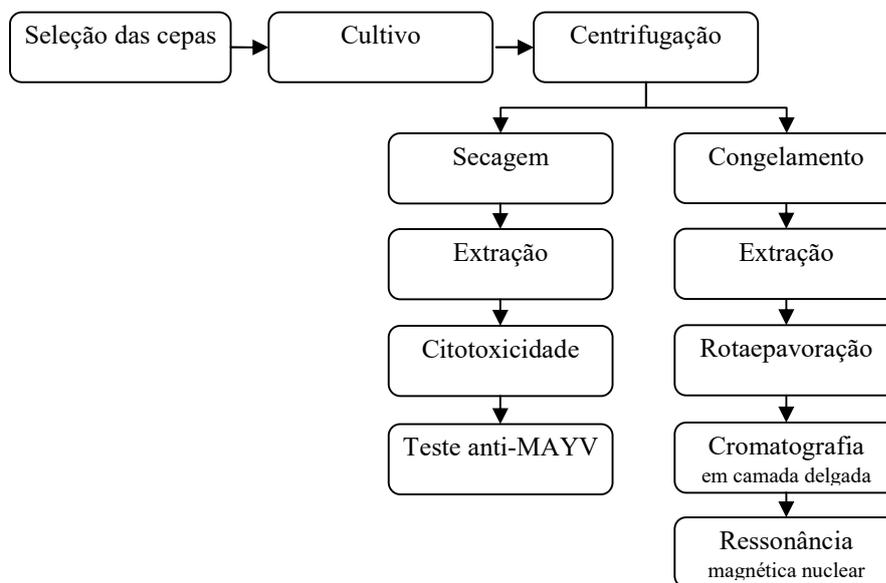
A escolha das cepas *A. maxima*, *C. vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis*, foi baseada na listagem do mapeamento tecnológico, na taxonomia “Microrganismos”, e na disponibilidade de inóculo para o cultivo no laboratório. No que se refere às etapas de “Downstream”, o mapeamento indicou que a extração por solvente orgânico ou por água foi mais incidente nos trabalhos estudados. Dessa forma, foi aplicado este método para obtenção de extratos, que foram testados e caracterizados de forma preliminar.

Em relação às “Técnicas de Análises e Testes”, a Cromatografia, mais incidente nos trabalhos do mapeamento, foi uma das técnicas aplicadas no presente trabalho para caracterização preliminar, além da Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ , e, para os Testes, avaliou-se a Citotoxicidade, citada nos trabalhos do mapeamento, e efetivamente o Teste de atividade antiviral contra o vírus *Mayaro*.

#### 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente t3pico busca detalhar os procedimentos e m3todos experimentais utilizados no projeto, que consiste em sele33o das cepas, etapas de cultivo, separa33o, estocagem, extra33o, testes de viabilidade e de atividade antiviral, e t3cnicas de caracteriza33o, como indicados no diagrama de blocos da Figura 20.

Figura 20. Diagrama de blocos de etapas experimentais realizadas no trabalho



### 5.1.1 Sele33o das cepas

A elabora33o do trabalho contou com o uso das cepas *A. maxima* (LEAF046), *C. vulgaris* (LEAF749), *D. salina* (LEAF754), integrantes da Cole33o de Microalgas do Laborat33rio de Estudos Aplicados em Fotoss3ntese (CMLEAF), do Instituto de Qu3mica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e, *H. pluvialis*, que foi adquirida da Cole33o de Microalgas Elizabeth Aidar, da Universidade Federal Fluminense (Figura 21).

Figura 21. Imagens de A: *A. maxima*, B: *C. vulgaris*, C: *D. salina*, D: *H. pluviialis*. Fonte: UTEX.



### 5.2.2 Meios de cultura

A microalga *A. maxima* foi cultivada em meio de cultura AO (AIBA E OGAWA, 1977; SCHLÖSSER, 1994), constituído de água destilada enriquecida com sais, vitaminas e metais conforme descrito na Tabela 7 (LARA E DEMARQUE, 2017). No preparo das soluções estoque foi utilizada água destilada esterilizada. A solução de cianocobalamina (vitamina B12) foi filtrada em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de poro (MFS®) para a remoção de microrganismos como bactérias, fungos e esporos, em sistema totalmente estéril e estocada em geladeira. Já as soluções I, II e III são esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 30 min, sendo as soluções II e III autoclavadas juntas e a I separadamente. Depois de autoclavadas, as duas soluções foram combinadas assepticamente. À essa solução combinada, adicionou-se 1mL/L de vitamina B12, por fim, o volume final foi alcançado adicionando água destilada esterilizada, quando necessário.

No caso de *C. vulgaris* e *H. pluviialis*, o cultivo foi realizado em meio Bold's Basal Médium - BBM (BISCHOFF e BOLD, 1963), modificado com enriquecimento de NaNO<sub>3</sub> (0,75 g/L) (Tabela 8) (SANTOYO *et al.*, 2010 e 2012). As soluções foram preparadas com água destilada, filtradas à vácuo em membrana de 0,22 µm de poro (MFS®) e, posteriormente, autoclavadas a 121°C por 30 minutos. Foram adicionados os volumes correspondentes de cada solução de nutrientes na água destilada filtrada em membrana 0,22 µm de poro (MFS®) e autoclavada, para obtenção da concentração prevista no meio.

Tabela 7. Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura AO para cultivo de *A. maxima* (AIBA E OGAWA, 1977; SCHLÖSSER, 1994). Traduzido e modificado de ANDERSEN (2005)

<b>Componentes</b>	<b>Volume da Solução</b>	<b>Massa ou Volume</b>	<b>Concentração Final (Molar)</b>
Solução I	500 mL	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	13,61 g	1,62 x 10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	4,03 g	3,80 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,50 g	2,87 x 10 <sup>-3</sup>
Solução II	500 mL	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	2,5 g	2,94 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	1,0 g	5,74 x 10 <sup>-3</sup>
NaCl	-	1,0 g	1,71 x 10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,2 g	8,11 x 10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,04 g	2,72 x 10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,01 g	3,60 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	0,08 g	2,15 x 10 <sup>-4</sup>
Solução elementos traço	-	1 mL	-
<b>Elementos traço</b>	<b>Solução Estoque (g/L H<sub>2</sub>O)</b>	<b>Massa ou Volume</b>	<b>Concentração Final (M)</b>
Solução III			
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	0,8 g	2,15 x 10 <sup>-6</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,7 g	2,52 x 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0	1 mL	3,48 x 10 <sup>-9</sup>
MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,0	1 mL	8,97 x 10 <sup>-9</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10,0	1 mL	1,62 x 10 <sup>-7</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,0	1 mL	3,44 x 10 <sup>-9</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0	1 mL	4,13 x 10 <sup>-9</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	1 mL	2,00 x 10 <sup>-11</sup>
<b>Vitaminas</b>	-	<b>Massa</b>	<b>Concentração Final (M)</b>
Cianocobalamina (B12)	-	5 mg	3,69 x 10 <sup>-9</sup>

Tabela 8. Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura BBM para cultivo de *C. vulgaris* e *H. pluvialis* (Bold's Basal Medium – BOLD 1949; BISCHOFF E BOLD 1963). Traduzido e modificado de ANDERSEN (2005)

Componentes	Volume da Solução	Concentração Solução Estoque (g/L)	Concentração Final (Molar)
<b>Macronutrientes</b>	60 mL	-	-
NaNO <sub>3</sub>	10 mL	75,00	2,94 x 10 <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 mL	2,50	1,70 x 10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mL	7,50	3,04 x 10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mL	7,50	4,31 x 10 <sup>-4</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mL	17,50	1,29 x 10 <sup>-3</sup>
NaCl	10 mL	2,50	4,28 x 10 <sup>-4</sup>
<b>Solução Alcalina de EDTA</b>	1 mL	-	-
EDTA	-	50,00	1,71 x 10 <sup>-4</sup>
KOH	-	31,00	5,53 x 10 <sup>-4</sup>
<b>Solução de Ferro acidificada</b>	1 mL	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	4,98	1,79 x 10 <sup>-5</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 mL	-	-
<b>Solução de Boro</b>	1 mL	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	11,42	1,85 x 10 <sup>-4</sup>
<b>Solução de metais traço</b>	1 mL	-	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	8,82	3,07 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	1,44	7,28 x 10 <sup>-6</sup>
MoO <sub>3</sub>	-	0,71	4,93 x 10 <sup>-6</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	1,57	6,29 x 10 <sup>-6</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,49	1,68 x 10 <sup>-6</sup>

O cultivo de *D. salina* foi realizado em meio SHAISH (SHAISH, BEN-AMOTZ E AVRON, 1992). As soluções descritas na Tabela 9 foram preparadas com água destilada, filtradas em membrana 0,22 µm de poro (MFS®) e autoclavadas a 121°C durante 30 min. Foram adicionados os volumes correspondentes de cada solução de nutrientes na água destilada filtrada em membrana 0,22 µm de poro (MFS®) e autoclavada, para obtenção da concentração prevista no meio.

Tabela 9. Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura SHAISH modificado para cultivo de *D. salina*. Traduzido e modificado de SHAISH, BEN-AMOTZ e AVRON (1992)

Componentes	Volume da Solução	Concentração Solução Estoque (g/L)	Concentração Final (M)
<b>Solução 1</b>	666 mL	-	-
NaCl	-	87,00	0,99
<b>Solução 2</b>	100 mL	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,27	0,02
NaHCO <sub>3</sub>	-	42,00	0,05
<b>Solução 3</b>	10 mL	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	42,50	0,1
KCl	-	37,27	0,1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	71,00	0,49 x 10 <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	-	101,60	0,1
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	-	221,95	0,3
<b>Solução 4</b>	10 mL	-	-
FeCl <sub>3</sub>	-	0,03	0,39 x 10 <sup>-4</sup>
EDTA	-	0,15	0,01 x 10 <sup>-3</sup>
<b>Solução 5</b>	10 mL	-	-
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	0,20	0,20 x 10 <sup>-3</sup>
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,02	0,20 x 10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,02	0,11 x 10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,02	0,20 x 10 <sup>-4</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	0,12	0,20 x 10 <sup>-4</sup>

Para *C. vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis*, que foram acessadas diretamente das coleções de cultivo, foi necessária uma etapa de aclimação de aproximadamente 1 mês dessas células às novas condições de cultivo. O cultivo de *A. maxima* foi realizado a partir da cepa que já estava aclimatada em cultivo, no laboratório.

### 5.2.3 Condições de cultivo e avaliação do crescimento celular

A Tabela 10 indica as condições de cultivo, Temperatura, Irradiância, Fotoperíodo e Agitação/Aeração, aplicadas para cada cepa de microalga (LARA E DEMARQUE, 2017, SANTOYO *et al.*, 2010 e 2012, PASQUET *et al.*, 2011). Todos os cultivos foram realizados

em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura e densidade óptica inicial de 0,1 em 750 nm (Shimadzu, UV-1800). Lâmpadas fluorescentes, dispostas verticalmente (Phillips 42W, luz branca), foram utilizadas e a densidade de fluxo de fótons foi medida na superfície externa dos frascos por meio de um sensor quântico LI-190B acoplado a um integrador radiométrico LI-250A (Li-Cor Inc.,USA). As culturas foram aeradas com a mistura atmosférica filtrada em algodão através do uso de compressores de ar para aquário (vazão de saída do compressor: 3,5 L / min).

Tabela 10. Condições de cultivo de microalgas para geração de biomassa (LARA E DEMARQUE, 2017, SANTOYO *et al.*, 2010 e 2012, PASQUET *et al.*, 2011)

Microalga	Temperatura (°C)	Irradiância ( $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )	Fotoperíodo Claro:Escuro (h:h)	Agitação/Aeração
<i>A. maxima</i>	30 ± 2	120	12:12	Orbital 156 rpm
<i>C. vulgaris</i>	30 ± 2	80	16:8	Borbulhamento de ar
<i>D. salina</i>	20 ± 2	180	Luz constante	Borbulhamento de ar
<i>H. pluvialis</i>	30 ± 2	80	16:8	Borbulhamento de ar

O crescimento celular de *A. maxima*, *C.vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis* foi acompanhado por 16, 24, 21 e 20 dias, respectivamente, mediante leitura da densidade óptica (DO) a 750 nm (Shimadzu, UV-1800), período que abrange a fase estacionária de crescimento. Diariamente, alíquotas, contendo 3,0 mL foram recolhidas para leitura da DO e, a partir dos valores de DO obtidos foram calculadas as taxas específicas de crescimento para todas as células. Esse cálculo foi feito por meio da aplicação da função logarítmica natural sobre o valor da DO, na fase exponencial de crescimento de três experimentos independentes. Esses valores foram então utilizados para a obtenção dos coeficientes angulares, sendo a média desses o valor da taxa específica de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) somado ao desvio padrão.

#### 5.2.4 Preparo de amostras para testes de citotoxicidade e anti-MAYV

Após a caracterização do crescimento celular para cada uma das microalgas, 20 mL da cultura de *A. maxima*, *H. pluvialis* e *C. vulgaris* foram coletados na fase exponencial do crescimento, transferidos para placa de Petri e colocados em estufa à 37°C durante 24h, ou até atingirem peso constante. A biomassa seca (5-10mg) foi transferida para tubos tipo Eppendorf, que foram mantidos em dessecador até o momento das análises. Quando as

culturas alcançaram a fase estacionária do crescimento, todo o volume da cultura foi centrifugado (SORVALL, RC-5B) em garrafas com capacidade de 250mL a 19.600g por 10 minutos e a 20°C. Após a centrifugação, as células precipitadas foram espalhadas em placas de Petri e secas em estufa a 37°C, até atingirem peso constante. Posteriormente, a biomassa seca foi raspada das placas de Petri, pesadas e guardadas em dessecador até o momento das análises.

Cada cultivo independente de *D. salina* foi realizado em duplicata, sendo que, quando a cultura atingiu a fase exponencial e estacionária do crescimento, respectivamente, todo volume de um dos frascos foi centrifugado (SORVALL, RC-5B) em garrafas com capacidade de 250mL a 19.600g por 15 minutos e a 20°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas por centrifugação (19.600g/15 minutos, a 20°C), por duas vezes, com 20 mL/250 mL de solução de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a 0,5 M. Este procedimento foi realizado com a finalidade de se retirar o NaCl adsorvido através de sua troca pelo  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , que na secagem em estufa se desprende da amostra por evaporação (ZHU E LEE, 1997). Após as lavagens, as células precipitadas foram espalhadas em placas de Petri e secas em estufa a 37°C, até atingirem peso constante. Posteriormente, a biomassa seca foi raspada das placas de Petri, pesadas e guardadas em dessecador até o momento das análises.

Três experimentos independentes foram realizados para cada cepa e a biomassa seca correspondente às duas fases do crescimento celular foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo recebeu água como solvente e o segundo recebeu dimetilsulfóxido (DMSO), na medida as soluções estoque de extratos para os testes foram de 2mg/mL. Após a adição do solvente, as amostras foram submetidas a 20 minutos de ultrassom.

#### **5.2.5 Preparo de amostras para caracterização preliminar dos extratos brutos através da Cromatografia de Camada Delgada e Ressonância Magnética Nuclear**

A fim de obter biomassa suficiente para caracterização dos extratos, foram realizados cultivos nas mesmas condições utilizadas para geração de amostras dos testes de viabilidade e anti-MAYV. Todavia, neste caso, o cultivo da fase exponencial de crescimento foi interrompido nos dias 4, 4, 10 e 4, de *C. vulgaris*, *D. salina*, *H. pluvialis* e *A. maxima*, e todo volume de 250 mL foi recolhido, e realizou-se um cultivo independente para a obtenção de

biomassa na fase estacionária de crescimento nos dias 21, 18, 20 e 14, de *C. vulgaris*, *D. salina*, *H. pluvialis* e *A. maxima*.

A centrifugação para separação da biomassa e do meio de cultura foi realizada, segundo as mesmas condições do preparo de amostras para os testes de citotoxicidade e anti-MAYV. As biomassas úmidas foram transferidas para frascos de plástico e congeladas a 20°C até a etapa de extração líquido/líquido da caracterização. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e colocadas em funil de separação de 125 mL, nas proporções de biomassa e solventes descritas na Tabela 11, para realização da extração das substâncias de interesse. O funil foi agitado, de forma a proporcionar o máximo contato da amostra com ambas as fases (aquosa e orgânica) e, posteriormente, recolocado em suporte por tempo suficiente para a separação das fases. Foi retirada a fase inferior (fase orgânica), e realizada a adição de mesmo volume de diclorometano utilizado na primeira extração, à fração residual, a fim de extrair ao máximo os componentes solúveis em fase orgânica, por mais duas vezes. A Figura 22 mostra o sistema de extração por funil de separação.

A fase orgânica recolhida em balão de fundo redondo de 125mL foi submetida a sistema de evaporação rotativa para remoção do solvente através do vácuo. Por fim recolheu-se o extrato concentrado para as análises de caracterização.

Tabela 11. Proporção de biomassa e solventes utilizados no processo de extração em funil de separação para caracterização

Porcentagem (v/v)					
Microalga	Fase de crescimento	Biomassa (%)	Água (%)	Diclorometano (%)	Vtotal (mL)
<i>A. maxima</i>	Exponencial	13	13	75	40,0
	Estacionária	25	00*	75	40,0
<i>C. vulgaris</i>	Exponencial	10	15	75	8,0
	Estacionária	13	13	75	40,0
<i>D. salina</i>	Exponencial	13	13	75	4,0
	Estacionária	17	17	67	9,0
<i>H. pluvialis</i>	Exponencial	13	13	75	4,0
	Estacionária	13	13	75	40,0

\* No caso de *A. maxima* na fase estacionária não foi realizada a adição de água devido a presença de significativa quantidade de água na própria amostra.

Figura 22. Sistema de extração de biomassa microalgal em funil de separação



### 5.2.6 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de microalgas em células VERO

A citotoxicidade dos extratos das microalgas em células animais foi avaliada em células VERO cultivadas *in vitro*. Estas células foram obtidas a partir de rim de macaco verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) e adquiridas do American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC). As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Gibco) constituído por 2,25 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 5 mL/L de solução penicilina-estreptomicina (10.000 Ui / mL penicilina e 10000 µg / mL estreptomicina - Gibco), suplementado com 5,0 % de soro fetal bovino (SFB - Gibco).

As células VERO foram propagadas em frasco de poliestireno transparente (25 e 75 cm<sup>2</sup>) e mantidas a 37°C em 5,0% de CO<sub>2</sub>. Culturas confluentes, cujas células se encontravam aderidas à placa, foram repicadas da seguinte forma: desprezou-se o meio de cultura e adicionou-se PBS (NaCl 0,08g/mL; KCl 0,002 g/mL; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,015 g/mL; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,002 g/mL) acrescido de EDTA 1 mM para efetuar a lavagem. Em seguida, o PBS foi desprezado e

as células foram tratadas com solução de tripsina 0,25 g em PBS-EDTA durante cerca de dois minutos, mantidas em estufa 37°C. Posteriormente adicionou-se o meio de cultura DMEM para a dispersão das células e estas foram divididas em novos frascos. As culturas em estoque foram conservadas em nitrogênio líquido, em frascos apropriados contendo SFB 10% e glicerol 10%.

O ensaio de citotoxicidade, baseado na técnica *dye-uptake*, foi realizado em monocamadas confluentes de células VERO cultivadas em microplacas 96 cavidades (TTP), que receberam tratamento com diluições seriadas em triplicata dos extratos das microalgas e foram mantidas em estufa nas condições adequadas por 24 horas. Após esse período, 100 µL da solução de meio de cultura DMEM e vermelho neutro a 50 µg/L foram adicionados às células. As placas foram incubadas por três horas ao abrigo da luz na estufa 37° C à 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as células foram fixadas por 20 minutos com 100 µL da solução de formaldeído 20% em PBS. A solução fixadora foi, então, retirada e o corante extraído por 20 minutos com 100 µL da solução extratora que consiste em 50% metanol e 10% ácido acético em PBS e por fim, quantificadas com o auxílio da leitora de placa (BIO-RAD modelo 3550), com o comprimento de onda de 490nm. Os valores obtidos na leitura foram transformados em porcentagem de células viáveis em cada concentração das células tratadas com os extratos das microalgas em relação às células controle (não-tratadas) (BORENEFREUND E PUERNER, 1985).

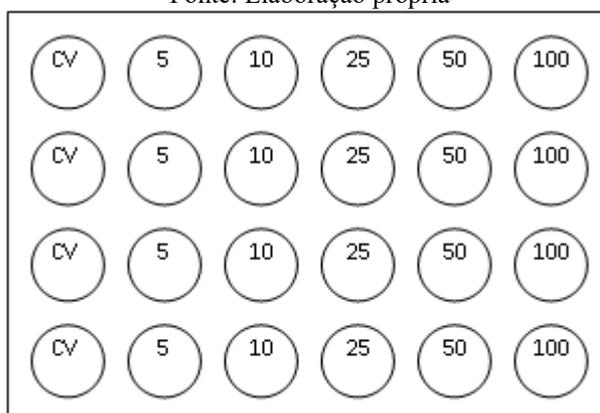
### **5.2.7 Teste de inativação do MAYV**

A infecção das células VERO com o vírus *Mayaro* foi realizada em placas de 24 cavidades. Para tal, o meio de cultura das células VERO confluentes foi retirado e a monocamada lavada com PBS. Em seguida, adicionou-se a suspensão viral na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. O período de adsorção viral utilizado foi de 1 (uma) hora, sendo as placas mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após, desprezou-se o meio de cultura para retirada do inóculo e lavou-se a monocamada com PBS para retirar as partículas virais não adsorvidas. A seguir, adicionou-se meio de cultura completo com ou sem os extratos das microalgas em diferentes concentrações (100-0,0 µg/mL), como apresentado na Figura 23.

Após 24 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, titulados pelo método de titulação por TCID<sub>50</sub> (REED E MUENCH, 1938).

Figura 23. Imagem ilustrativa da placa de 24 poços com as respectivas concentrações dos extratos das microalgas de 100; 50;25;10;5,0;0,0 (CV)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para teste anti-MAYV

Fonte: Elaboração própria



Essa titulação do sobrenadante foi realizada em quadruplicata para cada concentração utilizada dos extratos das microalgas, dentro de uma placa de 96 poços, já preparada com 80  $\mu\text{L}$  de células VERO confluentes, em que se adiciona ao primeiro poço 80  $\mu\text{L}$  de amostra contendo o extrato e o vírus em meio de cultivo. Posteriormente, se homogeneiza o poço e 80  $\mu\text{L}$  são transferidos para o poço imediatamente posterior, de forma a obter um gradiente de concentrações.

A fim de avaliar se os extratos das microalgas possuem efeito virucida, ou seja, se interagem diretamente a partícula viral, dois métodos de avaliação foram utilizados, 72 horas após a titulação. O primeiro foi o método de contagem. Esse método baseia-se na verificação por microscopia de cada um dos poços da placa, de forma a assinalar os poços em que foi detectado efeito citotóxico (morte de células VERO), ou seja, morte celular pelo vírus, e os poços em que não foi detectado, ou seja, os que os extratos das microalgas inibiram a ação do vírus (células VERO viáveis) (UOZAKI *et al.*, 2007).

Uma segunda forma de avaliação do efeito virucida é o procedimento de descarte de meio das placas e posterior aplicação de uma solução fixadora (formaldeído 20% em PBS) durante 20 minutos. Após a retirada da solução fixadora, foi realizada a aplicação da solução de cristal violeta por 20 minutos (0,08% (m/v) de cristal violeta, 450 mL de água ultrapura, 50 mL de PBS e 100 mL de etanol). A solução colorida (cristal violeta) foi descartada, a placa foi

lavada com água e posteriormente, os poços que permaneceram roxos e, conseqüentemente, continham células viáveis foram assinalados.

A partir de dados pré-estabelecidos de concentração viral em cada poço, segundo a diluição realizada, e, analisando a presença de células viáveis por cada um dos métodos descritos, foi possível determinar aqueles nos quais não houve efeito citopático. Dessa forma, comparando com os dados do controle, foi possível determinar a porcentagem de inibição de viral pelos extratos em suas diferentes concentrações.

### 5.2.8 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na placa cromatográfica, Sílica Gel 60 F254 (MERCK®), foram traçadas duas linhas horizontais, no início da qual foram demarcados oito pontos igualmente separados para a deposição das amostras (*spots*), e a final que corresponde a distância final de corrida do solvente (Figura 24). As amostras de extratos foram aplicadas com um capilar de vidro em posição vertical, cuidadosamente, de forma a obter a melhor deposição na placa. Posteriormente, preparou-se a solução de fase móvel de 20mL, cuja proporção de hexano/acetato de etila foi de 7/3, e vertida para a cuba cromatográfica, como pode-se observar na Figura 25.

Após a corrida a placa foi retirada da cuba e inserida em câmara cromatográfica, para inspeção com luz ultravioleta, em comprimento de onda de 254nm, para identificação de padrão cromatográfico. Posteriormente, foi realizada a revelação química por borrifamento de solução de sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ) a 2% em ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), seguida de aquecimento em placa aquecedora. A solução de  $\text{CeSO}_4$  a 2% em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foi preparada a partir da solubilização de 1g de  $\text{CeSO}_4$  em 500mL de água destilada e adição lenta de 28mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . O revelador  $\text{CeSO}_4$  a 2% em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é utilizado para detecção de terpenos (manchas rosas e azuis) e flavonóides (manchas cinza e amarela) (CHAVES, 1997).

Figura 24. Esquema ilustrativo de demarcações realizadas na placa cromatográfica para caracterização de extratos de microalgas. Fonte: Elaboração própria

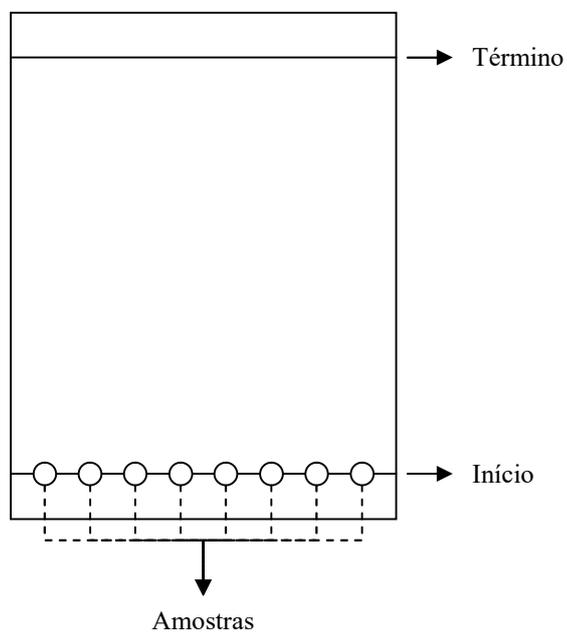
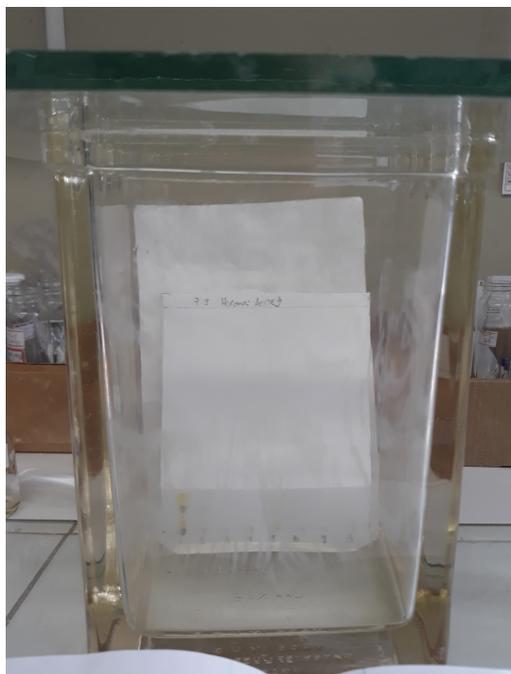


Figura 25. Sistema montado para cromatografia em camada delgada de extratos de microalgas



### 5.2.9 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  foram realizadas no LaReMN/UFF, e os espectros foram obtidos em aparelho Varian VNMRS 500MHz (RMN de  $^1\text{H}$  a 500,0 MHz), cujo padrão referencial interno foi o tetrametilsilano (TMS). As amostras concentradas foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e vertidas para tubos de RMN cuja altura de solvente foi de aproximadamente 1/3 do tubo. Todavia, no caso deste método apenas as amostras *A. maxima* em fase exponencial e estacionária e *C. vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis* em fase estacionária de crescimento foram utilizadas, já que os demais extratos apresentaram massa muito inferior ao necessário para a detecção na análise. A Tabela 12 apresenta a massa de amostra solubilizada em clorofórmio deuterado, em função das cepas e suas respectivas fases de coleta.

Tabela 12. Valores de massa dos extratos de microalgas analisados por RMN- $^1\text{H}$

Extrato	Massa (mg)
<i>A. maxima</i> - Fase estacionária	2,0
<i>A. maxima</i> - Fase exponencial	2,7
<i>H. pluvialis</i> - Fase estacionária	1,0
<i>D. salina</i> - Fase Estacionária	1,7
<i>C. vulgaris</i> - Fase estacionária	1,8

## 5.3 CÁLCULOS DAS VARIÁVEIS DE RESPOSTA

### 5.3.1 Cálculo da taxa específica de crescimento

A taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) é o coeficiente da regressão linear, obtido a partir dos valores do logaritmo da absorbância determinada durante a fase exponencial de crescimento do cultivo (Eq. 1).

$$\mu(d^{-1}) = \frac{[\ln(A_2) - \ln(A_1)]}{t_2 - t_1} \text{ (Eq. 1)}$$

onde:

$\mu$  = taxa específica de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ),

$A_1$  e  $A_2$  = Densidade ótica das células nos tempos  $t_1$  e  $t_2$  (em dias)

ln = logaritmo neperiano

### 5.3.2 Cálculo de parâmetros dos testes de citotoxicidade e anti-MAYV

A identificação da concentração de extrato em que 50% das células VERO se tornaram inviáveis ( $CC_{50}$ ) foi realizada por interpolação nos gráficos. Para cada curva de viabilidade celular ( $y$ ) relacionada à concentração de extrato ( $x$ ) foi utilizada a equação do modelo matemático  $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$  (Equação polinomial de 3º ordem – Eq.2) devido ao melhor coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e substituído no valor de viabilidade celular o valor de 50% para determinação do  $CC_{50}$ .

O mesmo modelo matemático foi aplicado para a identificação da concentração de extrato em que 50% dos vírus se tornaram inviáveis ( $IC_{50}$ ) Para cada curva de vírus inativados ( $y$ ) relacionada à concentração de extrato ( $x$ ) aplicou-se o modelo  $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$  (Equação polinomial de 3º ordem – Eq.2) devido ao melhor coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e substituído no valor de células viáveis o valor de 50% para determinação do  $IC_{50}$ .

A partir dos dados de concentração citotóxica e de concentração inibitória ao vírus *Mayaro*, foi possível calcular o índice de seletividade (IS) (Equação 3). Além disso, a fim de avaliar a eficácia dos extratos quando comparados ao antiviral comercial ribavirina, cujos dados foram retirados da literatura, foi calculada a potência relativa (Equação 4).

$$IS = \frac{CC}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde

CC = concentração citotóxica, em  $\mu\text{g/mL}$ .

IC = concentração inibitória, em  $\mu\text{g/mL}$ .

$$PR = \frac{IS \text{ substância experimental}}{IS \text{ substância comercial}} \quad (\text{Equação 4})$$

### 5.3.3 Cálculo de fator de retenção ( $R_f$ ) da CCD

A fim de comparar a composição de cada extrato, calcula-se o parâmetro  $R_f$  (“*ratio to front*”), sendo  $R_f$  a razão entre a distância em centímetros percorrida pela substância sobre a frente de solvente da placa revelada (Figura 26 - Equação 5).

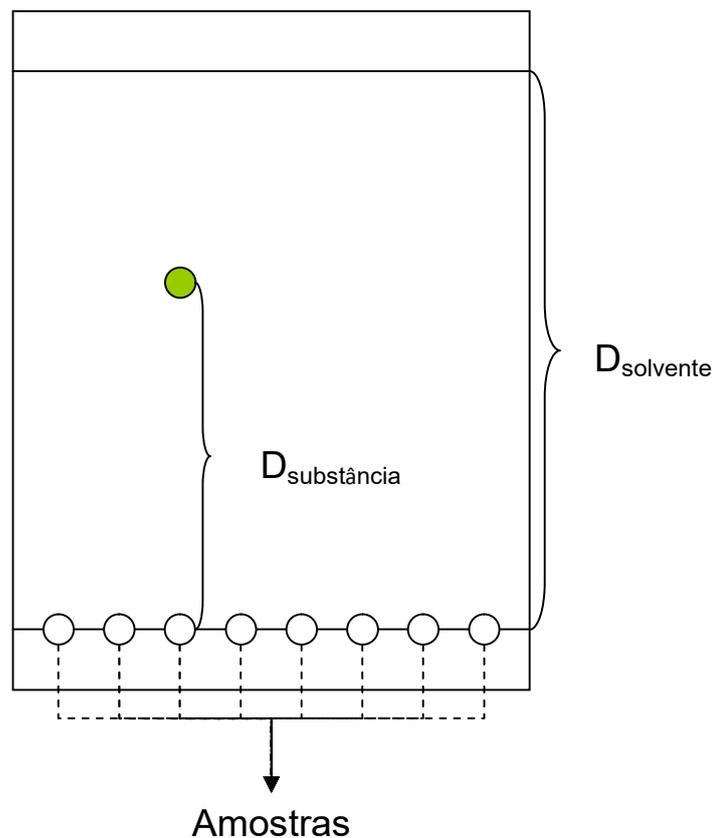
$$R_f = \frac{D_{\text{substância}}}{D_{\text{solvente}}} \text{ (Equação 5)}$$

Onde:

$D_{\text{substância}}$  = distância percorrida pela substância na placa, em cm.

$D_{\text{solvente}}$  = distância percorrida pelo solvente na placa, em cm.

Figura 26. Esquema ilustrativo da placa de CCD cujas distâncias  $D_{\text{substância}}$  e  $D_{\text{solvente}}$  foram representadas para determinação do  $R_f$  de substâncias dos extratos de microalgas. Fonte: Elaboração própria



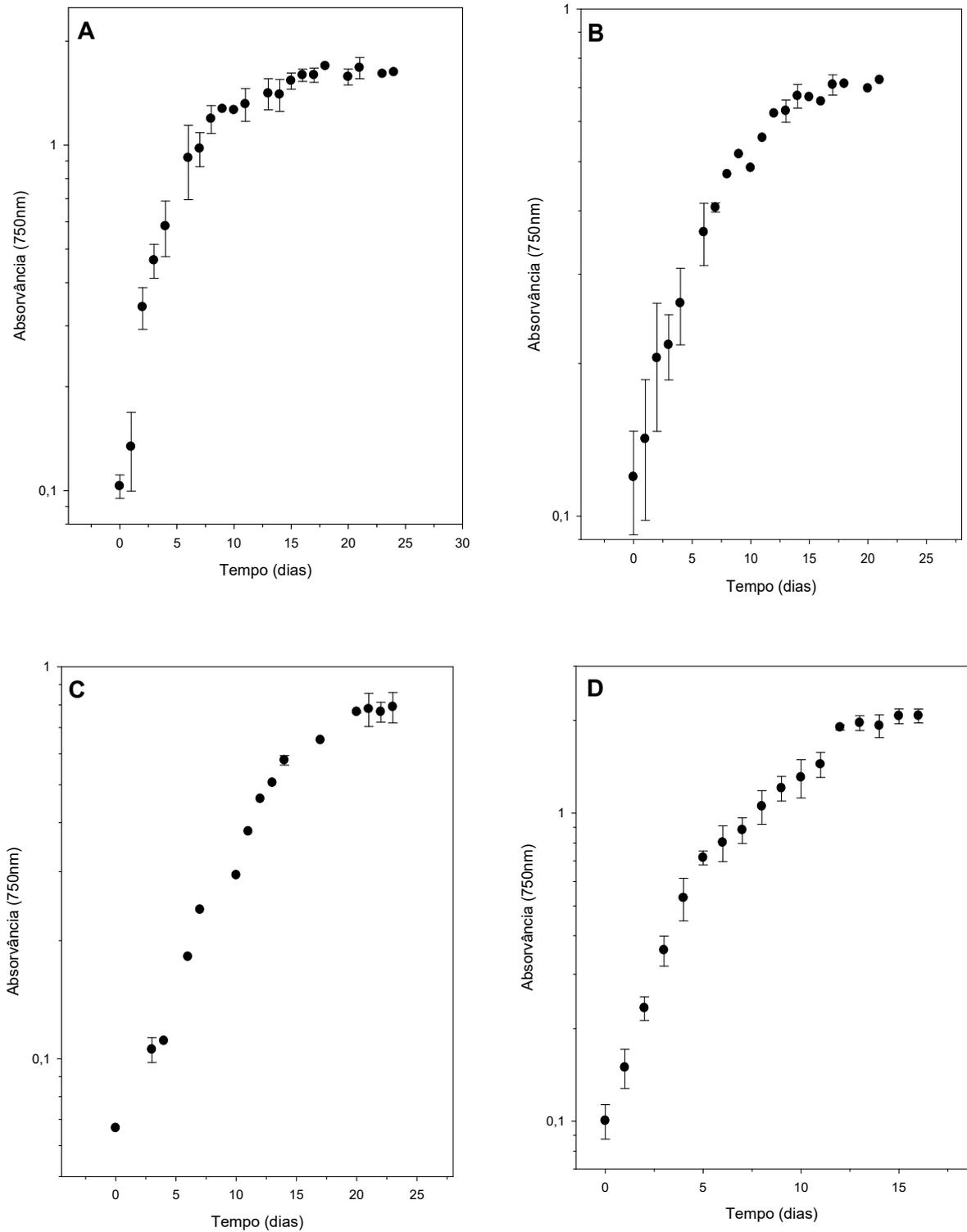
## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dada a grande relevância no meio científico e de mercado da aplicação de microalgas na Indústria Farmacêutica, verificada no mapeamento tecnológico, o presente tópico visa apresentar os resultados referentes ao cultivo, extração, testes de citotoxicidade e de atividade antiviral, assim como a caracterização dos extratos.

### 5.4.1 Crescimento celular

A Figura 27 apresenta o crescimento celular fotoautotrófico das microalgas *C. vulgaris* (A); *D. salina* (B); *H. pluvialis* (C) e *A. maxima* (D), medido pela leitura da densidade óptica (750 nm), em cultivos conduzidos até as células alcançarem a fase estacionária do crescimento. Foi verificado que todas as cepas apresentaram um padrão de crescimento com fases bem delimitadas. Para a realização das análises As células de *A. maxima*, *C. vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis* foram coletadas na fase exponencial do crescimento nos dias 4, 4, 4 e 10 e na fase estacionária dias 14, 21, 18 e 20, respectivamente. Com relação ao parâmetro de crescimento celular, as taxas específicas de crescimento foram de  $0,42 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ;  $0,58 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$ ;  $0,27 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ ;  $0,28 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ , para as células *A. maxima*, *C. vulgaris*, *D. salina* e *H. pluvialis*, respectivamente. O cálculo da taxa específica de crescimento correspondeu à média dos coeficientes angulares dos gráficos de crescimento de três experimentos independentes, na fase exponencial do crescimento em batelada (Figura 27).

Figura 27. Curvas de crescimento das microalgas *C. vulgaris* (A); *D. salina* (B); *H. pluvialis* (C) e *A. maxima* (D) cultivadas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 16:8h e aeração por borbulhamento de ar 3,5 L/min (A e C);  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ , luz constante e aeração por borbulhamento de ar 3,5 L/min (B);  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 12:12h e agitação orbital de 156 rpm (D). Os símbolos representam a média de um a três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão



A escolha entre as duas fases de crescimento (exponencial e estacionária) visou avaliar os diferentes metabólitos que são produzidos por microalgas ao longo de seu ciclo de vida. Os metabólitos secundários de maneira geral são produzidos em maior quantidade na fase estacionária de crescimento, visto que o crescimento celular é reduzido e os produtos das vias metabólicas primárias são canalizados como substratos da via metabólica secundária (CANHOTO, 2010). Fatores intrínsecos e extrínsecos ao crescimento podem modificar a composição da biomassa algácea em termos de níveis de pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídeos, entre outros (ANDRIA *et al.*, 1999). Dentre os fatores intrínsecos podem-se destacar a idade da cultura, o tempo de condicionamento das células ao meio de estudo e a interação das células com os nutrientes. Como fatores extrínsecos, são relevantes as modificações na salinidade, temperatura, abundância ou limitação por nutrientes (tais como silício, ferro, fósforo, vitaminas, nitrogênio), qualidade e intensidade luminosa. Nos cultivos em batelada, microalgas tendem a sofrer modificações nas concentrações dos componentes da biomassa por influência da idade da cultura, tendo em vista modificações contínuas na composição química do meio. Na fase exponencial de crescimento, as proteínas são o componente da biomassa que se encontra em maior concentração nas células. Com o tempo de cultivo, ocorre uma diminuição progressiva dos nutrientes do meio de cultura e as células tendem a acumular produtos de reserva não nitrogenados, como carboidratos e lipídeos (AIDAR *et al.*, 1991; LOURENÇO *et al.*, 2002).

#### **5.4.2 Citotoxicidade de células VERO em presença de extratos aquoso e orgânico de microalgas**

A partir dos dados obtidos por espectrofotometria das placas de 96 poços, foi possível avaliar, em percentagem, a concentração de extrato aquoso e orgânico (em DMSO) de cada cepa estudada, em suas duas fases de crescimento que inviabilizam as células VERO. Vale ressaltar que a água e o DMSO não apresentam efeito tóxico para as células VERO, na faixa de concentração aplicada, de forma que os solventes não interferem no ensaio (SALLES, 2014).

A Figura 28 mostra os resultados de citotoxicidade obtidos para o extrato aquoso das microalgas, nas duas fases do crescimento celular, e a Figura 29 mostra os resultados de citotoxicidade obtidos para o extrato orgânico das microalgas, nas duas fases do crescimento celular. A análise dos melhores resultados da tabela de viabilidade celular (Tabela 13) é baseada nos maiores valores de concentração, já que, quanto maior a concentração para que

50% das células VERO sejam inativadas ( $CC_{50}$  – Eq. 2), menos tóxico é o extrato. No caso da microalga *C. vulgaris* o extrato orgânico de ambas as fases de crescimento são os menos tóxicos que os aquosos, sendo o melhor resultado atribuído ao da fase estacionária. O resultado do extrato aquoso de *C. vulgaris* na fase estacionária de crescimento foi inconsistente em relação aos demais, haja visto que com o aumento da concentração do extrato houve um aumento da viabilidade de células VERO, e não o efeito citotóxico como era previsto. Já para as microalgas *D. salina* e *A. maxima*, os melhores resultados foram dos extratos aquosos na fase estacionária. Por fim, para *H. pluvialis*, os extratos aquoso e orgânico da fase exponencial indicaram menor toxicidade. De forma geral, os extratos apresentaram citotoxicidade próxima ou inferior ao antiviral comercial, o que os torna potenciais na aplicação como fitoterápicos.

Vale ressaltar que no caso dos primeiros ensaios, que foram realizados com extratos aquosos, utilizou-se de diferentes faixas de concentração a fim de avaliar o comportamento citotóxico para este tipo de amostra, haja visto que o grupo realizava pela primeira vez testes de citotoxicidade em microalgas. Verificado o perfil nos extratos aquosos, foram então testadas duas faixas de concentração para os extratos orgânicos.

Figura 28. Porcentagem de células VERO viáveis em função da concentração do extrato aquoso das microalgas *C. vulgaris* (A e B); *D. salina* (C e D); *H. pluvialis* (E e F) e *A. maxima* (G e H), nas fases exponencial e estacionária do crescimento. Os pontos representam os resultados obtidos a partir de um experimento com 4 réplicas técnicas

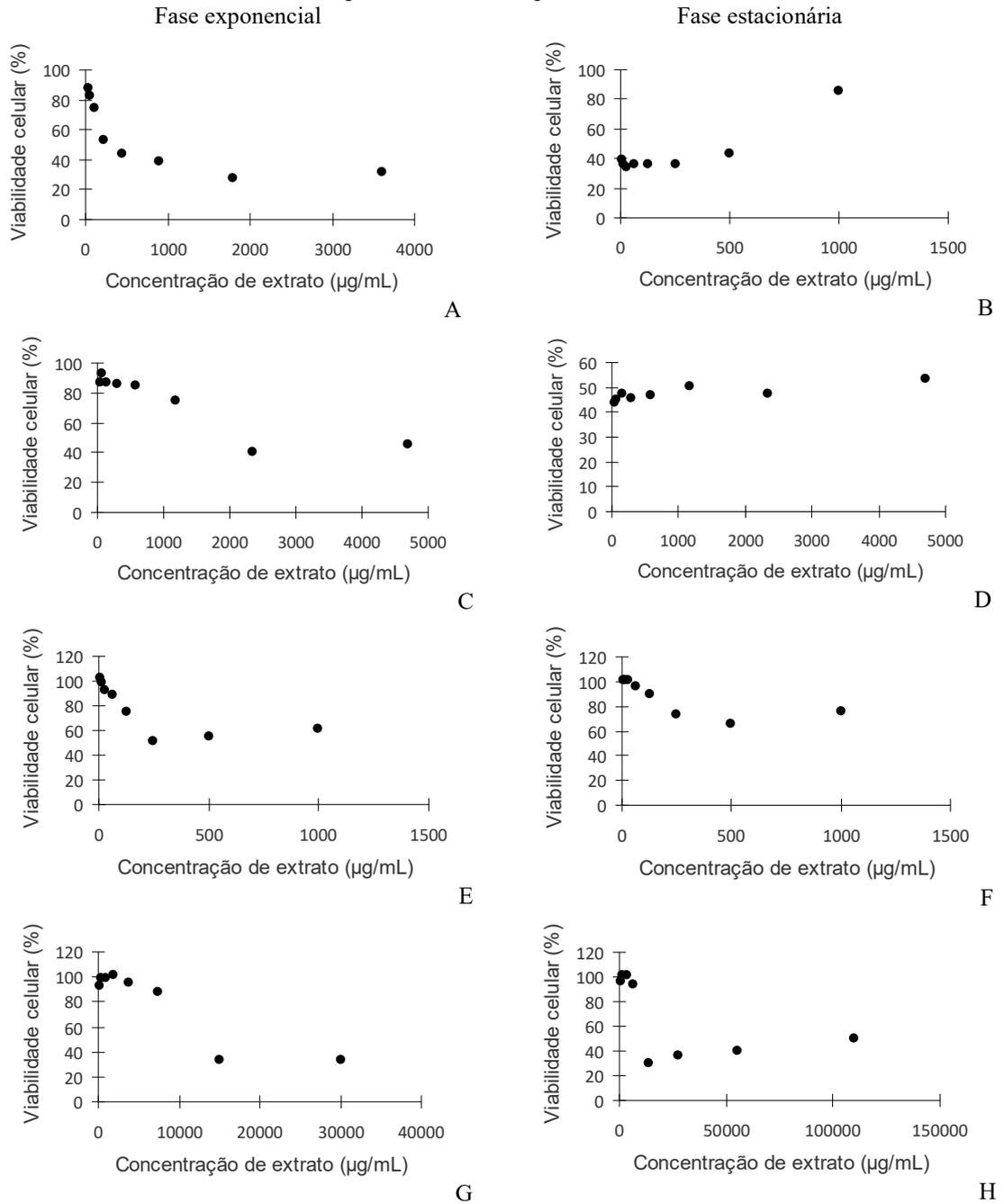


Figura 29. Porcentagem de células VERO viáveis em função da concentração do extrato orgânico das microalgas *C. vulgaris* (A e B); *D. salina* (C e D); *H. pluvialis* (E e F) e *A. maxima* (G e H), nas fases exponencial e estacionária do crescimento. Os pontos representam os resultados obtidos a partir de um experimento com 4 réplicas técnicas

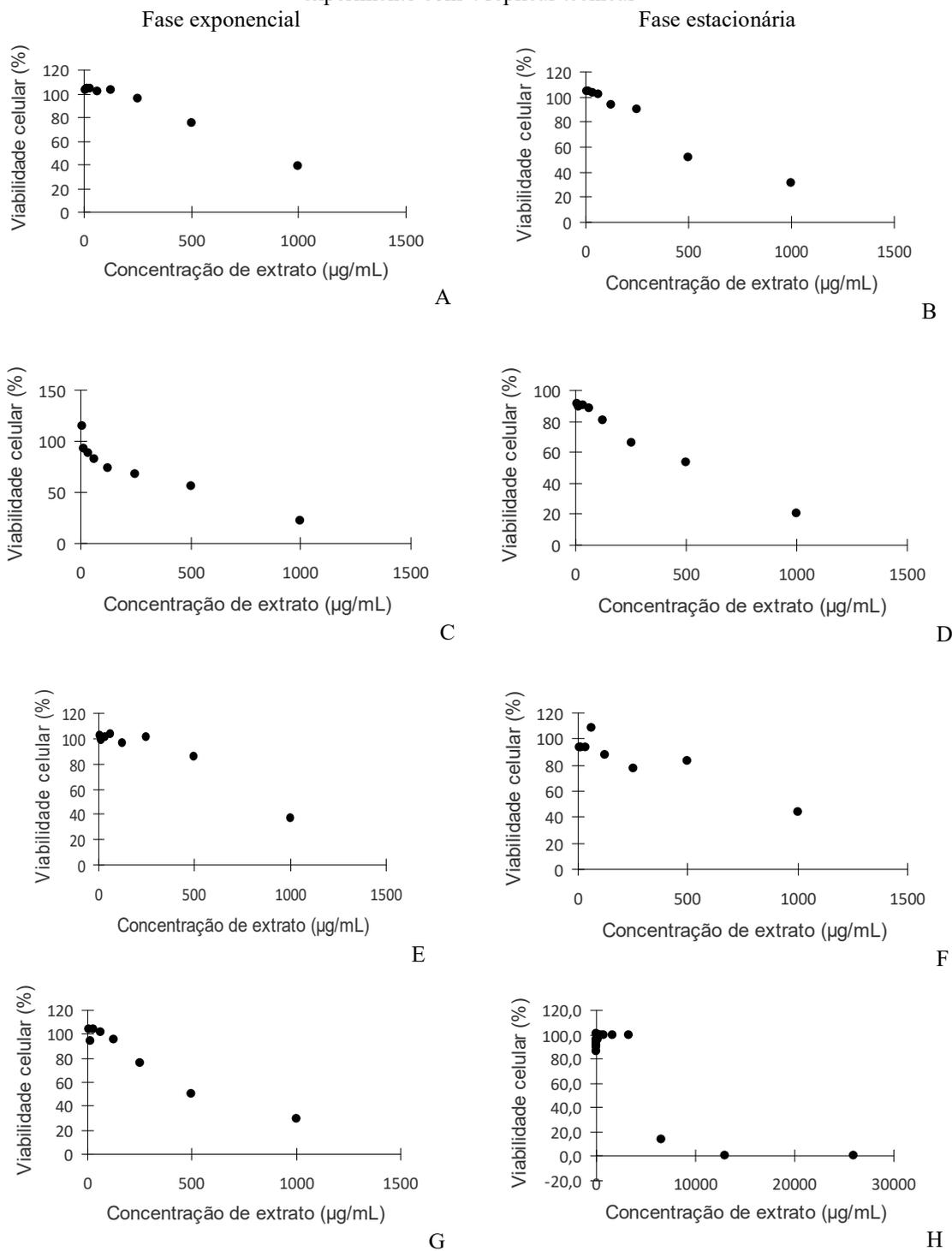


Tabela 13. Concentração citotóxica dos extratos aquoso e orgânico das microalgas sobre as células VERO (CC<sub>50</sub>). Os valores representam a média de um experimento independentes com 4 réplicas técnicas ± o erro padrão.

Microalga	Fase do crescimento	Tipo de extrato	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>A. maxima</i>	Exponencial	Aquoso	12001,94 ± 5,19
	Estacionária		17894,90 ± 5,91
	Exponencial	Orgânico	467,28 ± 0,37
	Estacionária		5643,52 ± 4,70
<i>C. vulgaris</i>	Exponencial	Aquoso	414,19 ± 0,30
	Estacionária		601,96 ± 1,61*
	Exponencial	Orgânico	623,71 ± 4,11
	Estacionária		675,55 ± 4,99
<i>D. salina</i>	Exponencial	Aquoso	1031,39 ± 0,18
	Estacionária		1432,48 ± 0,78
	Exponencial	Orgânico	406,90 ± 0,57
	Estacionária		467,13 ± 0,68
<i>H. pluvialis</i>	Exponencial	Aquoso	992,66 ± 0,13
	Estacionária		429,96 ± 0,16
	Exponencial	Orgânico	883,57 ± 4,05
	Estacionária		722,01 ± 0,63
ribavirina**			523,1 ± 10,5

\*Dado inconsistente (inválido); \*\*Dado extraído da literatura (SALLES, 2014).

### 5.4.3 Atividade antiviral de extratos de microalgas

A Figura 30 mostra os resultados de inibição do vírus *Mayaro*, obtidos para o extrato orgânico das microalgas, nas duas fases do crescimento celular. Nesses experimentos não foram utilizados os extratos aquosos, visto que, devido a um período de teste anti-MAYV (72h) maior, quando comparado ao de citotoxicidade (24h), houve a formação de grumos, o que impossibilitou a realização dos testes com extratos aquosos. O DMSO não apresenta efeito tóxico para as células VERO na faixa de concentração aplicada, de forma que não interferem no teste (SALLES, 2014). Segundo os dados de atividade antiviral, apresentados na Tabela 14, os melhores resultados tanto na fase exponencial quanto na estacionária foram da microalga *C. vulgaris*, já que com menores valores de concentração foi possível eliminar 50% das partículas virais (IC<sub>50</sub> – Eq. 2). Para *D. salina* e *H. pluvialis* o melhor resultado obtido foi referente à fase exponencial de crescimento. No caso de *A. maxima*, o teste do extrato em fase

exponencial apresentou perfil inconsistente em relação aos demais, visto que apenas em uma concentração de extrato houve inativação viral, e, portanto, apenas o resultado da fase estacionária de crescimento foi relevante para o estudo.

Figura 30. Porcentagem de vírus ativos em função da concentração do extrato orgânico das microalgas *C. vulgaris* (A e B); *D. salina* (C e D); *H. pluvialis* (E e F) e *A. maxima* (G e H), nas fases exponencial e estacionária do crescimento. Os pontos representam os resultados obtidos a partir de um experimento com 4 réplicas técnicas.

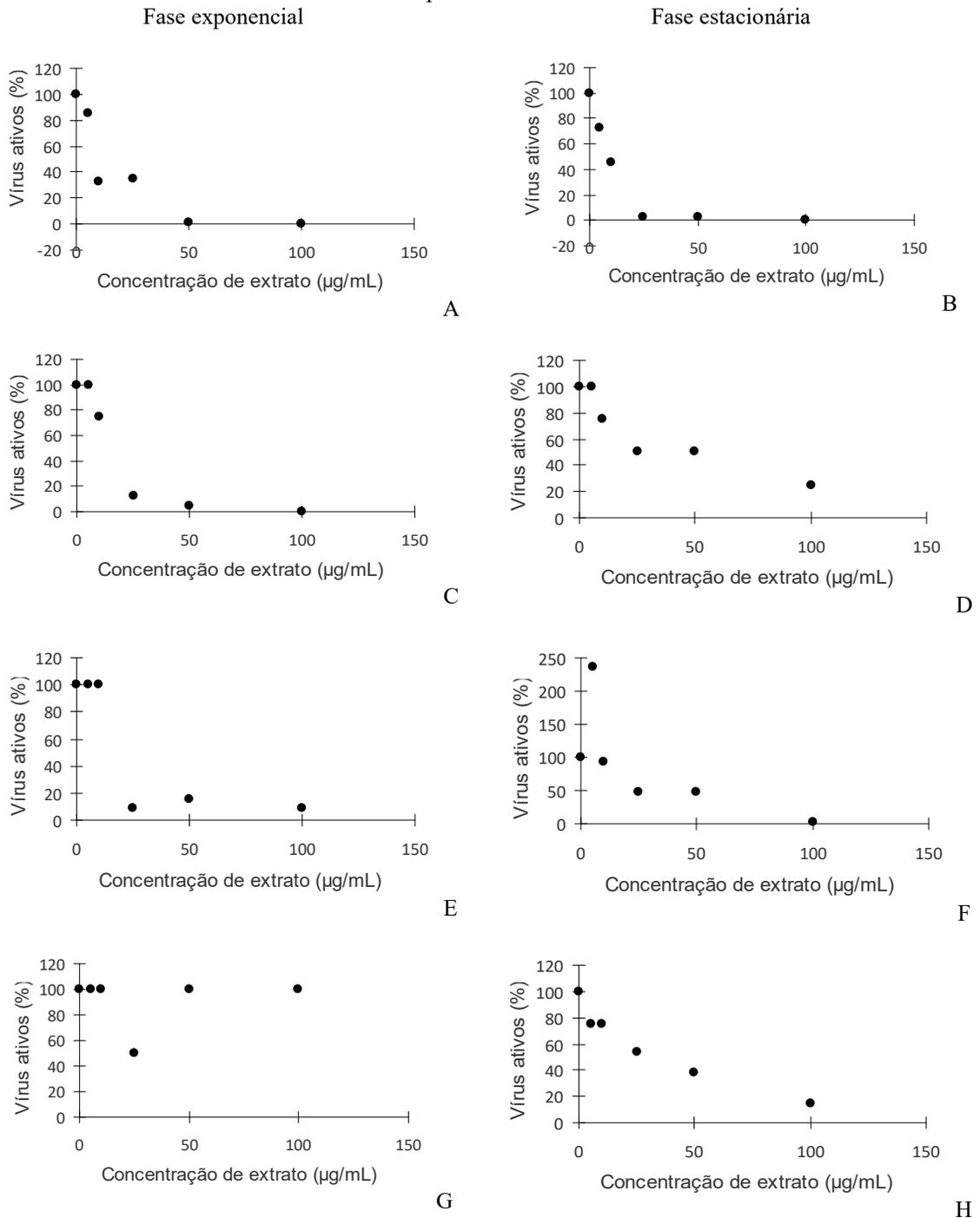


Tabela 14. Valores de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, IS e PR dos extratos orgânicos de microalgas sobre o MAYV. Os valores representam a média de um experimento independentes com 4 réplicas técnicas ± o erro padrão para os extratos orgânicos de microalgas

Microalgas e Substância comercial	Fase do crescimento	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS	PR
<i>A. maxima</i>	Exponencial	467,28 ± 0,37	18,54 ± 0,20*	25,20	3,00
	Estacionária	5643,52 ± 4,70	36,47 ± 3,30	154,74	18,42
<i>C. vulgaris</i>	Exponencial	623,71 ± 4,11	12,19 ± 0,42	51,16	6,09
	Estacionária	675,55 ± 4,99	6,12 ± 0,38	110,38	13,14
<i>D. salina</i>	Exponencial	406,90 ± 0,57	16,00 ± 0,48	25,43	3,03
	Estacionária	467,13 ± 0,68	31,39 ± 0,30	14,88	1,77
<i>H. pluvialis</i>	Exponencial	883,57 ± 4,05	17,53 ± 0,49	50,40	6,00
	Estacionária	722,01 ± 0,63	37,11 ± 0,81	19,45	2,31
ribavirina**		523,10 ± 10,50	62,5 ± 4,6	8,40	

\*Dado inconsistente (inválido); \*\*Dados foram extraídos da literatura (SALLES, 2014)

O índice de seletividade (IS) tem como propósito indicar a segurança de utilização do extrato fitoterápico, e a fim de avaliar o quão potente é o extrato em comparação ao antiviral comercial ribavirina, calcula-se a potência relativa, apresentada na Tabela 14.

Segundo os resultados, observa-se que todos os extratos orgânicos testados apresentaram algum nível de inativação do MAYV, resultado inédito e de grande importância para a literatura. O extrato de *A. maxima* na fase estacionária apresentou o melhor dentre os resultados, visto que sua atividade foi 18,42 vezes maior do que o verificado no composto comercial. O Quadro 4 descreve o *Ranking* dos extratos com atividade anti-*Mayaro*. A partir dos resultados obtidos em diferentes fases do crescimento das quatro microalgas analisadas, foi possível selecionar o melhor momento do crescimento das microalgas para a coleta de biomassa com atividade antiviral contra MAYV.

Quadro 4. *Ranking* referente à potência contra MAYV dos extratos de microalgas

	<b>Microalga</b>	<b>Fase de crescimento</b>
<b>1°</b>	<i>A. maxima</i>	Estacionária
<b>2°</b>	<i>C. vulgaris</i>	Estacionária
<b>3°</b>	<i>C. vulgaris</i>	Exponencial
<b>4°</b>	<i>H. pluvialis</i>	Exponencial
<b>5°</b>	<i>D. salina</i>	Exponencial
<b>6°</b>	<i>H. pluvialis</i>	Estacionária
<b>7°</b>	<i>D. salina</i>	Estacionária
<b>8°</b>	<i>A. maxima</i> *	Exponencial*

\*Dado inconsistente (inválido)

#### 5.4.4 Avaliação preliminar: Caracterização dos extratos

Como o extrato orgânico tende a extrair preferencialmente moléculas lipossolúveis é possível que o extrato esteja enriquecido em pigmentos (ex. carotenóides e clorofilas) e lipídeos. A fim de obter uma caracterização preliminar dos extratos, foram analisados os resultados de CCD e RMN-<sup>1</sup>H.

##### 5.4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os resultados da cromatografia em camada delgada foram analisados a partir do acompanhamento da corrida cromatográfica a olho nu, e dos dois reveladores utilizados, câmara de irradiação ultravioleta (Figura 31) e revelador sulfato cérico (Figura 32). Segundo os primeiros resultados da caracterização, obtidos na cromatografia em camada delgada, observou-se, durante a corrida cromatográfica, o aparecimento de manchas verde e amarela, e, como se trata de um extrato microalgal, podem ser associados à presença dos pigmentos clorofila (verde) e xantofila ou caroteno (amarelo), como mostrados na Figura 25 (FREITAS-FILHO, 2012).

Como foi relatado na revisão bibliográfica, o princípio da separação na cromatografia consiste na afinidade da molécula em estudo pela fase móvel e pela fase estacionária. No caso da cromatografia em camada delgada, a fase estacionária é a sílica gel, material de caráter polar, enquanto a fase móvel é menos polar, visto que a proporção de hexano (apolar) para acetato de etila (polar) é 2,34 vezes maior. Segundo o parâmetro  $R_f$ , descrito na Equação 5, moléculas com maior  $R_f$  possuem caráter apolar, enquanto as com menor  $R_f$  têm caráter polar. Após a corrida cromatográfica, a revelação química das placas possibilitou o cálculo do  $R_f$  de todos os sinais, e esse parâmetro foi listado na Tabela 15.

Tabela 15. Correlação de substância de cada  $R_f$  (cm/cm) entre os extratos de microalgas analisados

<b>R<sub>f</sub></b> (cm/cm)	<i>A. maxima</i>		<i>C. vulgaris</i>		<i>D. salina</i>		<i>H. pluvialis</i>	
	Exp.	Est.	Exp.	Est.	Exp.	Est.	Exp.	Est.
0,03		x		X				x
0,08								x
0,12				X				
0,18		x						
0,27				X		x		x
0,33				X		x		x
0,35	x	x						
0,45	x	x						
0,53		x						
0,92		x	x		x		x	

Analisando a Tabela 15, de forma geral, os extratos da fase exponencial de crescimento apresentam substâncias de maior  $R_f$ , ou seja, de menor polaridade, além de apenas ser possível identificar uma única mancha em cada extrato, com exceção de *A. maxima* em fase exponencial que apresenta duas. No entanto, no que se refere aos extratos em fase estacionária de crescimento, observa-se, pelo menos, quatro manchas com  $R_f$  distintos, com exceção da *D. salina* que apresenta apenas duas, com valores de  $R_f$ , em sua maioria, menores, quando comparados aos da fase exponencial de crescimento, indicando assim a presença de substâncias mais polares. O fato do aparecimento de maior número de manchas na fase estacionária de crescimento pode ser explicado pelo acúmulo de moléculas de reserva, maior razão C/N, tais como lipídeos (moléculas lipossolúveis que tendem a ser extraídas pela fase orgânica). Isso difere da fase exponencial, com elevadas taxas de crescimento e multiplicação celular, na qual a célula direciona seu metabolismo para a produção de proteínas (menor razão C/N), por exemplo, que são moléculas hidrossolúveis, e, portanto, não estão presentes no extrato orgânico (CHAGAS, 2010). No caso das substâncias de  $R_f$  0,03 (altamente polar) e

0,33 (polaridade média), que se encontram em fase estacionária de crescimento, foram detectadas em três dos quatro extratos.

Imediatamente após a corrida cromatográfica, foi realizada a revelação física da placa, através da incidência de radiação UV (254nm) na placa contendo indicador de fluorescência. Observou-se, apenas, quatro sinais de substâncias separadas, os de  $R_f = 0,18$ ; 0,45 e 0,53 contidos no extrato de *A. maxima* em fase estacionária de crescimento, sendo o de  $R_f=0,45$  verificado também em *A. maxima* em fase exponencial, e o de  $R_f = 0,12$  no extrato de *C. vulgaris* em fase estacionária, como pode-se observar na Figura 31. A mancha de  $R_f=0,18$  apresentou coloração amarela, que, provavelmente, é relativa à presença de xantofilas, visto que apresentam grupamento hidroxila e têm moderada afinidade com a fase estacionária, concentrando-se na região central da placa, diferentemente de carotenos que são hidrocarbonetos apolares e têm pouca afinidade com a fase estacionária e se deslocariam ao final da placa (FREITAS-FILHO, 2012). Como foi verificado nos resultados dos testes anti-MAYV, os extratos de *A. maxima* e *C. vulgaris* promoveram resultados muito superiores aos demais, no que se refere à potência relativa e a revelação física, apenas nestes extratos, indica que podem ser as responsáveis por este efeito antiviral aumentado.

A fim de um rastreamento mais amplo das substâncias, utilizou-se, posteriormente, o revelador químico, e, como resultado, visualizou-se manchas de coloração rósea em todas as amostras submetidas, como pode-se observar na Figura 32. Este resultado pode indicar que tais substâncias sejam de natureza terpenoídica, como exemplo, a presença de material graxo (CHAVES, 1997, CASTRO, OLIVEIRA E SOARES, 1997). Os terpenos de forma geral apresentam dupla ligação carbono-carbono, e por isso são definidos como “alcenos naturais”. Na medida que ocorre a presença de oxigênio na estrutura, essa classe de moléculas se denomina como terpenóide, que pode apresentar as funções orgânicas ácidos, álcoois, éteres, aldeídos, fenóis, cetonas ou epóxidos terpênicos (FELIPE E BICAS, 2017).

Figura 31. Perfil cromatográfico de extratos de microalgas em revelador UV (254nm). Legenda: 1- *A. maxima* estacionária, 2- *D. salina* estacionária, 3- *C. vulgaris* estacionária, 4- *H. pluvialis* estacionária, 5- *A. maxima* exponencial, 6- *D. salina* exponencial, 7- *C. vulgaris* exponencial e 8- *H. pluvialis* exponencial

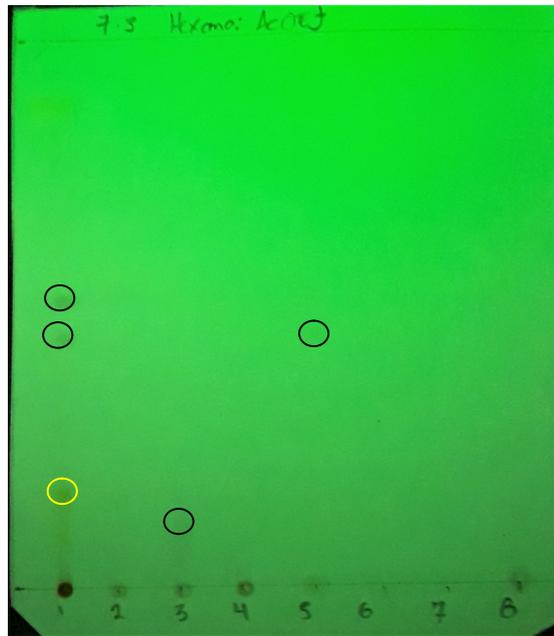
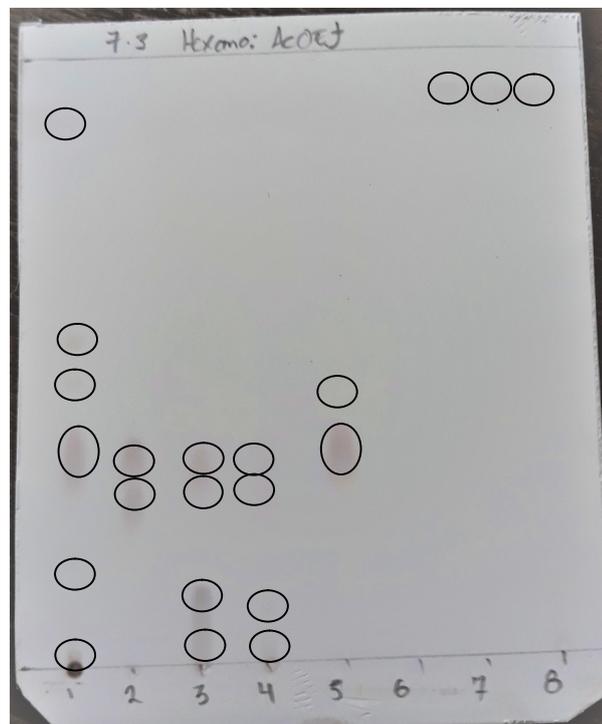


Figura 32. Perfil cromatográfico de extratos de microalgas em revelador químico  $\text{CeSO}_4$  a 2% em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Legenda: 1- *A. maxima* estacionária, 2- *D. salina* estacionária, 3- *C. vulgaris* estacionária, 4- *H. pluvialis* estacionária, 5- *A. maxima* exponencial, 6- *D. salina* exponencial, 7- *C. vulgaris* exponencial e 8- *H. pluvialis* exponencial.



Vale ressaltar que, no presente trabalho, utilizou-se de apenas uma combinação de fase móvel para a corrida cromatográfica, e que, portanto, outras substâncias com menor afinidade ao solvente podem ter permanecido no *spot* inicial e não foram separadas. Além disso, os resultados da CCD auxiliaram na diferenciação de espécies químicas pela revelação, todavia o  $R_f$  não proporcionou informação conclusiva do tipo exato de substância presente nos extratos orgânicos.

#### 5.4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN- $^1\text{H}$ )

Na Figura 33 pode-se observar os espectros sobrepostos de RMN- $^1\text{H}$  dos extratos analisados em  $\text{CDCl}_3$  e referenciados a TMS. Os sinais referentes aos solventes foram assinalados na figura e retirados da análise. Devido ao baixo rendimento da extração, a quantidade de extrato foi menor que a ideal requerida para as análises, haja visto que o limite de detecção é de 5-10mg (20 mM para RMN- $^1\text{H}$ ), e, portanto, apenas os sinais de  $\text{H}^+$  de moléculas majoritárias puderam ser observados (Protocolo de preparo de amostras do Laboratório LaReMN/UFF; MANIARA *et al.*, 1998). Ainda assim, foi possível realizar uma análise comparativa entre os extratos nas regiões demarcadas no espectro.

De forma geral, o perfil dos extratos indica a presença de cadeias alifáticas insaturadas, que é um resultado concordante com o solvente de extração utilizado (diclorometano), o qual tende a extrair substâncias lipossolúveis. As cadeias alifáticas insaturadas podem ser encontradas tanto em pigmentos (carotenóides e clorofila), quanto em lipídeos (ex.: ácidos graxos).

A análise das moléculas majoritárias dos espectros foi dividida em cinco regiões (I, II, III, IV e V), como se pode observar na Figura 33.

Na região I do espectro observa-se a presença de sinal em  $\delta 2,04\text{ppm}$  de intensidade relativamente próxima em todos os extratos, que pode indicar a presença de dupla ligação de em cadeia graxa.

Na região II, observa-se sinais no intervalo de  $\delta 2,39-2,26\text{ppm}$ , em todos os espectros, na seguinte ordem decrescente de intensidade: *C. vulgaris* estacionária, *D. salina* estacionária, *A. maxima* exponencial, *H. pluvialis* estacionária e *A. maxima* estacionária, o que pode indicar a presença de éster de ácido graxo (SOBOLEV *et al.*, 2005).

Na região III, sinais entre  $\delta 2,75-2,82\text{ppm}$  foram verificados apenas em *A. maxima* e *C. vulgaris*, que caracterizam hidrogênio do grupo metileno bis-alílico, o que corresponde a

cadeias com mais de uma dupla insaturação (MAGRITEK, 2018). A configuração bis-álílica possui diferencial no perfil reacional, visto que o grupo metileno central é ativado por duas ligações duplas ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) que reagem facilmente com o oxigênio através do mecanismo de auto-oxidação, mecanismo radicalar, com etapas de: iniciação, propagação da cadeia e terminação (KARAVALAKIS E STOURNAS, 2010).

Na região IV, o sinal  $\delta 4,07\text{ppm}$  indica a presença de próton de metileno de glicerol (álcool), que foi observado nos espectros de *C. vulgaris* estacionária, *A. maxima* exponencial, *H. pluvialis* estacionária, *A. maxima* estacionária e *D. salina* estacionária, em ordem decrescente de intensidade.

Na região V, verificou-se sinais entre  $\delta 5,32-5,40\text{ppm}$  em todos os extratos, com maior intensidade nos espectros de *A. maxima*, que, segundo a literatura indicam a presença de dupla ligação. A Tabela 16 evidencia os deslocamentos que foram identificados com base no trabalho de Guillén e Ruiz (2001).

Figura 33. Espectros de RMN-  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos extratos de microalgas em diclorometano. Legenda de picos de solventes: 1- TMS, 2a e 2b – n-hexano, 3- Água, 4- Acetona, 5- Metanol e 6- Solvente residual. As marcações de I a V correspondem as regiões de interesse analisadas.

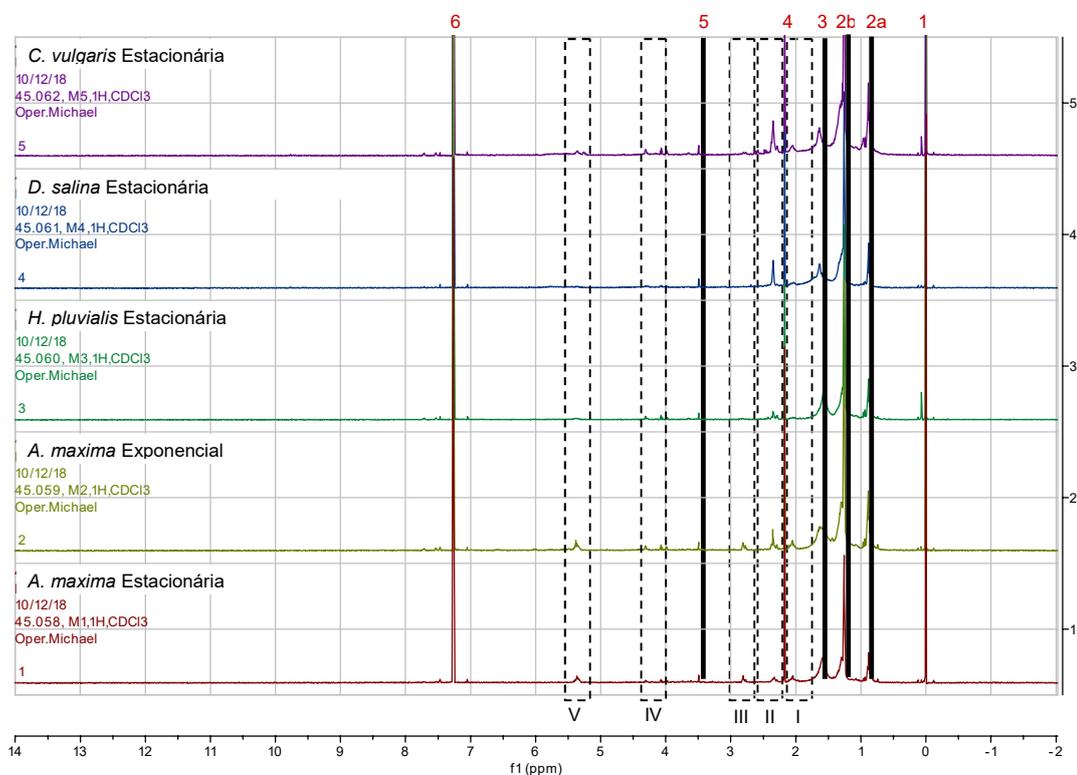


Tabela 16. Atribuição dos picos do espectro de RMN-<sup>1</sup>H segundo dados de GUILLÉN E RUIZ (2001)

Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
2,10-1,90	-CH <sub>2</sub> -CH=CH-
2,35-2,20	-OCO-CH <sub>2</sub> -
2,80-2,70	=HC-CH <sub>2</sub> -CH=
4,32-4,10	-CH <sub>2</sub> OCOR-
5,40-5,26	-CH=CH-

Não foram observados sinais típicos de carotenóides, que estariam presentes na região entre  $\delta$ 7,0-6,0ppm, nem de clorofila, entre  $\delta$ 10,0-8,0ppm (PINTO-JUNIOR, 2002; SOARES, 2006). A ausência dos pigmentos pode ter ocorrido devido à baixa concentração de amostra ou degradação oxidativa dos mesmos na análise.

Dessa forma, segundo os resultados da caracterização por RMN-<sup>1</sup>H, os extratos de *C. vulgaris* e *A. maxima* possuem em sua composição cadeias alifáticas com mais de uma insaturação, fato que os difere dos demais gêneros, também em relação à maior potência relativa. Em relação aos demais extratos, também é indicada a presença de material graxo, todavia, provavelmente, compostos monoinsaturados. Segundo a literatura, *D. salina* e *H. pluvialis*, apresentam em sua composição lipídica o ácido oléico (C18:1), ácido graxo monoinsaturado, sendo assim uma das possíveis moléculas pertencentes ao extrato analisado (Figura 34) (RISMANI E SHARIATI, 2017 e ELICIN, 2017). Além disso, há indício de presença de ésteres em todos os extratos, visto que se observa sinal de álcool (glicerol) e de ésteres graxos, podendo assim terem sido formados pela esterificação de ácidos graxos. Ésteres terpenos também podem compor os extratos já que, como foi revelado quimicamente na CCD, há presença de material terpenoídico, logo pode haver álcool terpeno na amostra que, devido à baixa concentração, não foi verificado sinal nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H (CASTRO, OLIVEIRA E SOARES, 1997).

Dentre as possibilidades de moléculas pertencentes aos extratos, os ácidos graxos e seus derivados, das famílias ômega 3 (ácido linolênico - C18:3) e ômega 6 (ácido linoléico - C18:2) são de particular interesse na aplicação como nutracêuticos (Figura 34) (GARCIA *et al.*, 2017). Além disso, dentro da taxonomia “Produto” de artigos e patentes do mapeamento tecnológico constatou-se que substâncias graxas com atividade biológica como ômega-3, ácido eicosapentanóico e ácido docosahexanóico. Outra classe de substâncias identificadas no mapeamento foram as xantofilas, que pertencem à classe dos carotenóides, representados por fucoxantina, astaxantina e zeaxantina, encontradas também no gênero *Arthrospira* com ação antioxidante, e que apresentam em sua estrutura cadeia alifática insaturada (Figura 35)

(HENRIKSON, 2009). Ainda que nos espectros de RMN não tenham sido observados sinais típicos entre  $\delta 7,0-6,0$ ppm, devido à baixa concentração ou degradação oxidativa, na CCD pôde-se identificar mancha relativa a essa classe, em extrato de *A. maxima* na fase estacionária de crescimento, que apresentou maior potência relativa na ação anti-MAYV (PINTO-JUNIOR, 2002, MAESTRIN *et al.*, 2009).

De forma geral, segundo os resultados preliminares de RMN- $^1\text{H}$ , não foi possível a determinação das moléculas com ação efetiva na inativação do MAYV, todavia, foi possível indicar a estrutura de compostos majoritários pertencentes aos extratos, que podem ter ou não relação com o processo de inativação viral, já que segundo a literatura apresentam atividade biológica.

Figura 34. Estruturas de possíveis ácidos graxos presentes nos extratos de microalgas. Fonte: ROSE E CONNOLLY, 1999

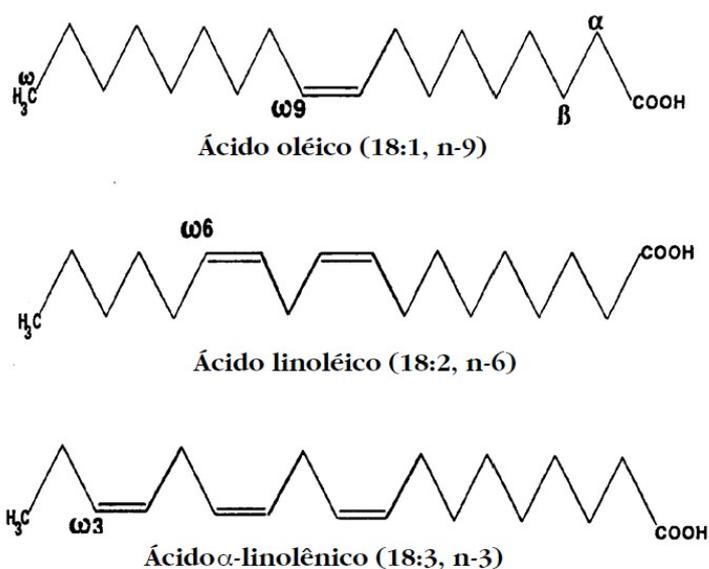
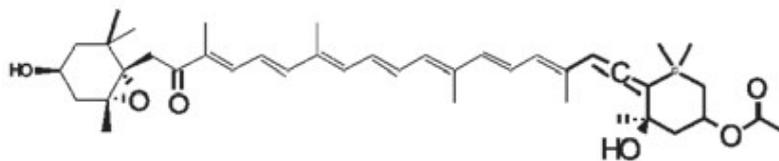
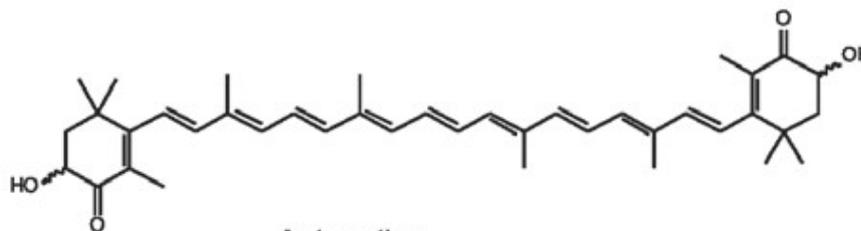


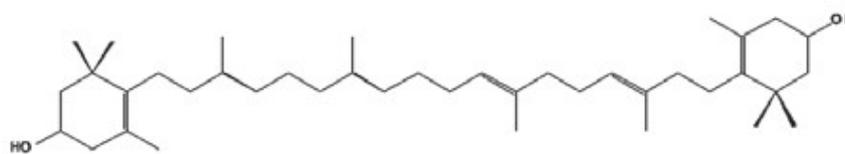
Figura 35. Estruturas de possíveis xantofilas presentes no extrato de *A. maxima* em fase estacionária de crescimento. Fonte: Adaptado de MOREIRA E VASCONCELOS, 2014



Fucoxantina



Astaxatina



Zeaxantina

## Capítulo 6

### 6 FORÇAS DE PORTER NA APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE MICROALGAS NO TRATAMENTO ANTI-MAYV

Em decorrência dos resultados do mapeamento tecnológico e dos experimentos realizados, gerou-se uma expectativa de formulação de um extrato anti-MAYV de origem microalgal com potencial de comercialização. Todavia, além da sequência de testes *in vivo* e das etapas de caracterização mais aprofundada do material, a comercialização de um produto novo necessita de estudos de mercado para avaliar a sua capacidade de inserção. No presente trabalho utilizou-se o modelo das Cinco Forças de Porter (1985) simplificado como ferramenta de análise mercadológica, no qual se avalia cinco forças competitivas que são influentes na lucratividade de uma empresa em um dado setor, que neste caso seria uma empresa produtora de extrato terapêutico microalgal no combate ao vírus *Mayaro*.

#### 6.1 O MODELO DAS CINCO FORÇAS DE PORTER

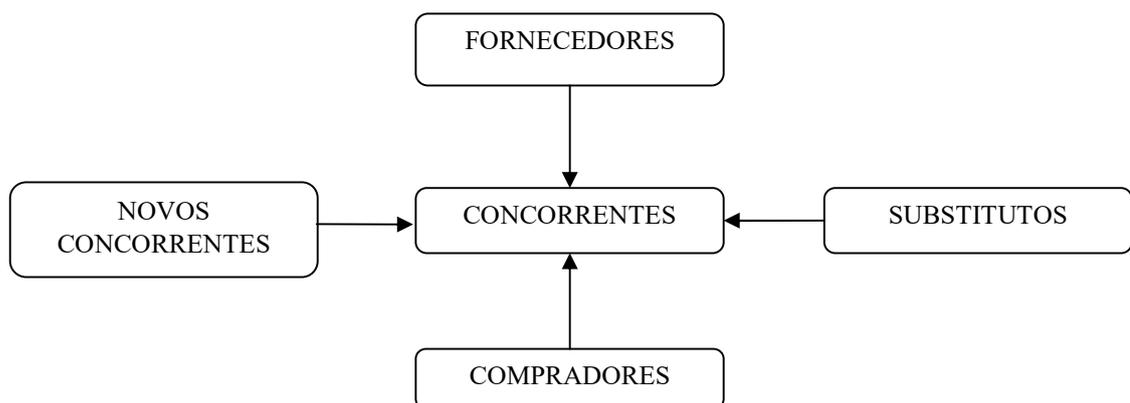
Devido à necessidade de análises sobre a estrutura de uma indústria ou de um dado segmento de serviços para auxiliar na formulação de estratégias que forneçam maior rentabilidade para um dado setor, foram desenvolvidos estudos como o de Michael Porter e seus colaboradores em 1980 e 1985. Os estudos buscaram identificar fatores que influenciam na estrutura de uma determinada indústria e fornecer a previsão de retorno sobre investimento no médio e longo prazo para as empresas (JÚLIO E SALIBI-NETO, 2002), e são utilizados tanto por acadêmicos, como por gestores e consultores em todo o mundo (CARNEIRO *et al.*, 1997).

A essência da formulação de uma estratégia competitiva baseia-se na análise da relação da empresa com seu meio ambiente, que abrange tanto forças sociais como econômicas, mas cujo aspecto principal é a indústria ou as indústrias em que dada empresa compete (CARNEIRO *et al.*, 1997). Segundo PORTER (1989, 2004), forças externas à indústria são de suma importância, uma vez que, em geral, afetam todas as empresas na indústria e a habilidade com que a empresa lida com elas possibilitará seu destaque dentre as demais. O grau de concorrência em uma indústria depende de cinco forças competitivas

básicas, as chamadas Cinco Forças de Porter que são definidas pelos Fornecedores, Concorrentes, Novos Concorrentes, Substitutos e Compradores (Figura 36).

O poder de negociação dos Fornecedores determina o quão essencial é o fornecedor no processo produtivo para geração do produto final. A rivalidade dos Concorrentes determina até que ponto as empresas que já atuam em um ramo são capazes de fornecer um produto superior aos competidores potenciais. A ameaça de entrada de Novos Concorrentes determina a probabilidade de novas empresas entrarem em um ramo de indústria e conquistarem o mercado, por meio do fornecimento de mais benefícios aos compradores. A ameaça de substitutos determina a capacidade de algum outro produto satisfazer as mesmas necessidades do comprador. O poder de negociação dos compradores determina o valor do produto para o mercado, de acordo com a oferta das demais empresas do setor (MOREIRA, 2006). O potencial de lucro das empresas em dada indústria é determinado pelo conjunto das forças, indicando de que forma poderão obter retorno no longo prazo. O conhecimento das forças na pressão competitiva coloca em destaque os pontos fortes e os pontos fracos críticos da empresa, de forma que torna mais claro o seu posicionamento na indústria em que está inserida, e, portanto, são reveladas as áreas nas quais as mudanças estratégicas podem levar a um retorno máximo e destaca as áreas em que as tendências da indústria são da maior importância, quer como oportunidades, quer como ameaças (PORTER, 1989, 2004). O desenvolvimento de cada força foi feito com base em informações disponibilizadas em artigos, patentes e página eletrônicas.

Figura 36. Modelo das cinco forças de Porter (PORTER, 1985)



## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do cenário mercadológico em que a empresa produtora de extrato terapêutico microalgal no combate ao MAYV se encontra indicou como:

- i. Fornecedores: Empresas produtoras de microalgas, biomassa sobre a qual se aplicará os procedimentos de extração orgânica da fração com atividade biológica e a formulação do extrato que será comercializado;
- ii. Concorrentes: Indústria Alimentícia, que utiliza da mesma matéria-prima (biomassa de microalga) para suplementação alimentar;
- iii. Novos Concorrentes: Plantas medicinais (fitoterápicos), cuja aplicação em diversos tratamentos cresce em substituição aos fármacos de origem química;
- iv. Substitutos: Antivirais sintéticos, que são fármacos produzidos por rota química e competem diretamente com os de origem biotecnológica
- v. Compradores: Mercado farmacêutico, que é responsável pela distribuição do medicamento.

Por meio do conhecimento das pressões exercidas por cada força, definiu-se os pontos fortes e fracos críticos do produto no mercado, como se pode observar no Quadro 5. A análise de Porter revelou que apenas uma das forças é forte (Fornecedores), duas são consideradas moderadas (Concorrentes e Novos concorrentes), e as outras duas fracas (Comprador e Substituto), o que indica um cenário relativamente confortável para o extrato de microalga com fim anti-MAYV. Muitos pontos positivos podem ser citados como a sua baixa citotoxicidade, baixo impacto ambiental, alto valor agregado e aplicação diferenciada, já que não existe no mercado medicamento capaz de tratar a Febre do *Mayaro*.

No que se refere aos Fornecedores, a força pode ser considerada como forte, devido às condições específicas de cultivo e de cepa alvo, a fim de que sejam expressas as substâncias com atividade antiviral, e das inúmeras Indústrias interessadas na matéria-prima microalgal, como Alimentícia, Cosmética e de Energia. A Indústria Alimentícia (Concorrente) pode ser considerada como força moderada, já que a matéria-prima (biomassa microalgal) não necessita de grande diferenciação quando comparada à Indústria Farmacêutica, o que amplifica o número de fornecedores. Além disso, a comercialização de produtos de origem microalgal já é uma realidade como suplemento alimentar. Todavia, no que se refere à nobreza

da aplicação, o custo do produto com fim farmacêutico é compensado, devido ao alto valor agregado. Em relação aos Novos Concorrentes, as plantas medicinais são utilizadas corriqueiramente pela população para o tratamento de diversas enfermidades, todavia, a reprodutibilidade do fitoterápico é dificultada pela dependência de condições climáticas em grandes volumes de cultivo. No que se refere aos substitutos (Antivirais de origem química), a força pode ser considerada fraca, já que não existe no mercado fármaco capaz de tratar a Febre do *Mayaro* especificamente, somente sendo empregados antivirais de espectro amplo de alta toxicidade ao paciente. Adicionalmente, a preocupação com o meio ambiente é de suma importância nos dias atuais, o que leva ao incentivo de produtos de origem biotecnológica. O mercado Farmacêutico (Comprador), ainda que disponha de fármacos de origem química para diversos tratamentos, não fornece, até os dias atuais, medicamento capaz de tratar a Febre do *Mayaro*. A partir do momento que a eficácia e segurança dos extratos em todos os testes necessários seja comprovada, será o único fornecedor com tal finalidade para o mercado. Além disso, por ser um produto diferenciado, a integração para trás é muito difícil de ser aplicada, sendo, portanto, uma força fraca.

Uma das estratégias verificadas para atenuar as barreiras de comercialização seria a integração para trás entre o produtor do extrato a ser vendido e o produtor de microalga (Fornecedor). A integração seria a incorporação na planta industrial dos setores de cultivo, extração e formulação, visto que há forte dependência de um fornecedor que trabalhe em condições determinadas de cultivo com controle minucioso para expressão do composto ativo que confere ao extrato atividade biológica. Este tipo de integração é verificado em empresas como a FitoplanctonMarino®, exemplo concreto do avanço da tecnologia de cultivo de microalgas para produção de compostos com atividade biológica (Página eletrônica de Fitoplancton Marino) (Figura 37).

Quadro 5. Análise de PORTER simplificada de extratos de microalgas com atividade anti-MAYV no mercado.

<b>FORNECEDORES</b>	- Produtores de microalgas;
Força Forte	- Alto grau de diferenciação (condições de cultivo específicas, assim como cepa alvo); - Inúmeras áreas de aplicação, e portanto gama variada de compradores.
<b>CONCORRENTES NA INDÚSTRIA</b>	- Aplicação de microalgas na Indústria Alimentícia;
Força Moderada	- A composição do extrato é menos rígida já que não há controle exigente de cepa, cultivo e extração, como para o uso como antiviral; - É um produto já comercializado como suplemento alimentar; - Alto valor agregado e ausência de antiviral no combate ao <i>Mayaro</i> no mercado.
<b>NOVOS CONCORRENTES</b>	- Plantas medicinais;
Força Moderada	- Produto de maior familiaridade na sociedade quando comparada a aceitação de ingestão de produto oriundo de microalgas; - A extração de fração bioativa é facilitada em microalgas já que a padronização de um cultivo de plantas é dificultada pela dependência das condições climáticas e grandes volumes de produção.
<b>SUBSTITUTOS</b>	- Antivirais sintéticos;
Força Fraca	- Preocupação com o meio ambiente é muito forte na sociedade atual; - Baixa citotoxicidade; - Não há anti-MAYV sintético sendo comercializado. - A partir do momento que a tecnologia for consolidada os substitutos não terão força.
<b>COMPRADORES</b>	- Mercado Farmacêutico;
Força Fraca	- A partir do momento que a eficácia em todos os testes do extrato de microalga for comprovada, será, portanto, o único anti-MAYV do mercado; - O produto é diferenciado e a integração pra trás é complicada pela complexidade da produção.

Figura 37. Imagem da planta industrial da empresa Fitoplancton Marino  
Fonte: Página eletrônica de Fitoplancton Marino (<http://www.FitoplanctonMarino.com/>)



### 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

#### 7.1 CONCLUSÕES

- A partir do mapeamento tecnológico de artigos, verificou-se que os estudos relativos ao uso de microalgas com aplicação na área Farmacêutica têm aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Além disso, existe uma prospecção de que o número de medicamentos produzidos biologicamente ultrapasse os advindos de rotas químicas em 2024, segundo a EVALUATE PHARMA<sup>®</sup>. Dessa forma, a aplicação de microalgas para produção de compostos biofarmacêuticos possui grande potencial.
- Dentre as principais aplicações farmacêuticas de microalgas, em artigos e patentes, se encontram estudos no tratamento de cancer, em moléculas com atividade anti-oxidante e atividade imunoestimulante. No mapeamento tecnológico realizado apenas uma patente descreveu a ação antiviral contra Influenza-A por microalga, indício de que estudos nesta área sejam pioneiros.
- Dentre as empresas produtoras de compostos bioativos a partir de microalgas a AlgaHealth<sup>®</sup> e a FitoplanktonMarino<sup>®</sup> se destacam no exterior, enquanto no Brasil a empresa Algae Biotecnologia apresenta grande variedade de produtos e serviços de origem microalgal.
- Neste trabalho todos os extratos orgânicos de microalgas nas fases de crescimento exponencial e estacionária demonstraram atividade anti-Mayaro. No caso do extrato de *A. maxima* em fase exponencial apenas em uma concentração apresentou atividade anti-MAYV, divergindo do perfil dose dependente dos demais extratos.
- Os extratos com atividade anti-Mayaro mostraram potência superior à da ribavirina. No caso do extrato de *A. maxima* em fase estacionária a potência relativa foi 18,42 vezes maior que o composto comercial.
- Os extratos com atividade anti-Mayaro podem ser considerados seguros no que tange aos elevados índices de seletividade, e, portanto, futuramente podem se tornar extratos fitoterápicos no tratamento de doenças virais.

- A caracterização dos extratos indica a presença de cadeias alifáticas insaturadas como pertencentes as moléculas majoritárias.
- Dentre as possíveis moléculas contidas nos extratos estão ácido oléico, ômega-3, ômega-6 e xantofilas.
- De acordo com a análise de Porter simplificada, a aplicação no mercado dos extratos de origem microalgal visando o tratamento da Febre do *Mayaro* é promissora.

## 7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para dar continuidade à linha de investigação desse trabalho, propõe-se:

- Análise por cromatografia em camada delgada, aplicando-se padrões de carotenóides e de ácidos graxos;
- Cultivo em volumes maiores para seja possível realizar novamente a análise de RMN-<sup>1</sup>H e nova análise de RMN-<sup>13</sup>C;
- Análise em Cromatógrafo Líquido e Cromatógrafo Gasoso acoplados a Espectrômetro de Massas, cujas técnicas possuem maior capacidade de elucidação deste tipo de amostra;
- Extração com diferentes solventes a fim de obter um maior rendimento de extrato;
- Purificação dos extratos por cromatografia em coluna para que as moléculas alvo sejam isoladas e avaliadas quanto a citotoxicidade e a atividade antiviral;
- Realizar testes anti-MAYV com o extrato aquoso;
- Formulação de extratos contendo as substâncias biologicamente ativas para que sejam testados nas próximas fases determinadas para a comercialização segundo a ANVISA.

## REFERÊNCIAS

ABALDE, J., Microalgas:cultivo y aplicaciones. 210p., Monografia - Universidade da Coruña, Espanha , 1995

ABED, R.M.M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology 106, 1–12, 2009

ACURIO, L.P.; SALAZAR,D.M.; VALENCIA, A.F.; ROBALINO, D.R.; BARONA, A.C.; ALVAREZ, F.C.; RODRIGUEZ, C.A.; Antimicrobial potential of *Chlorella* algae isolated from stacked waters of the Andean Region of Ecuador, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 151, 012040, 2018

AGUIAR, A. C. Informação e atividades de desenvolvimento científico, tecnológico e industrial: tipologia proposta com base em análise funcional. Ciência da Informação, Brasília, n.20, v.1, p.7-15, 1991

AIBA, S.; OGAWA, T. Assesment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis* in axenic and continous culture. J. Gen. Microbiol, v.102, p.179-82, 1977.

AIDAR, E.; EHRLICH, R.; ASANO, C.S.; SIGUAD, T.C.S. Variação da composição química do meio de cultura e da bioquímica celular de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin), em cultivos estanques. Bolm Inst. oceanogr., S Paulo, 39 (2): 131-139., 1991

AHN, M.K.; YOON, K.D.; MIN, S.Y.; LEE, J.S.; KIM, J.H.; KIM, T.G.; KIM, S.H.; KIM, N.G.; HUH, H.; KIM, J., Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the Brown alga *Ecklonia cava*. Biol. Pharm, Bull, 27, 544-547, 2004

ALBERTS, Bruce *et al.* Biologia Molecular da Célula, 5º Edição, Porto Alegre: Artmed, 2010

ALGAE BIOTECNOLOGIA, Disponível em: <http://www.algae.com.br/site/pt/>, Acesso: 19/05/2019

ALGAHEALTH, Descrição disponível em: <https://www.trendlines.com/company/algahealth/>, Acesso em: 27/04/19

ALGAHEALTH, Improved process for producing fucoxanthin and/of polysaccharides from microalgae, PATENT INSPIRATION, CN108024988A, 2018

ALGENICS, Descrição, Disponível em: <<http://www.in2lifesciences.eu/suppliers/algenics>>, Acesso em: 26/07/18

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina ssp.* Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 29, n.2, p. 109-117, 2008.

AMORIM, K.G.F., *ROADMAP TECNOLÓGICO DE ADESIVOS ESTRUTURAIIS, SUSTENTÁVEIS E DE ALTO DESEMPENHO*, Dissertação de Mestrado, UFRJ, 2017

ANASTAS, P. T.; WARNER, J.; *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: Oxford, 1998.

ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C., EDS.; *Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment*; American Chemical Society, *ACS Symp. Ser.* n. 626, 1996

ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. Bold's Basal Médium. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. P. 437. 2005.

ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. Aiba & Ogawa. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. P. 578, 2005

ANDERSON, C.R.; DOWNS, W.G.; WATTLEY, G.H.; AHIN, N.W.; REESE, A.A.; *Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I.* Am J Trop Med Hyg 6: 1012–1016. GENETIC RELATIONSHIPS AMONG *MAYARO* AND *UNA* VIRUSES 467, 1957

ANDRADE, L.M., *Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas*, Tese de Doutorado, USP, 2014

ANDRES, A.; SHARON, M.; DONOVAN, C.; MARK, S.; KUHLENSCHMIDT, D. Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 563–569, 2009

ANDRIA, J.R.; VERGARA, J.J.; PEREZ-LLORENZ, J.L. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur. J. Phycol.* 34 (5): 497-504, 1999

ANVISA, Registro de medicamentos, Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/> >, Acesso em 12/04/19

APT, K. E.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Applied Phycology*, v.35, p.215-226,1999

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. Cromatografia – Princípios Básicos e Técnicas Afins, Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2003

ASGHARPOUR, M.; RODGERS, B.; HESTEKIN, J.A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. *Energies*, 8, 10487-10503, 2015

AUDE, C.; REMY, M.; ALEXANDRE, L.; JEAN-PAUL, C., Production of secreted therapeutic antibodies in *phaeodactylum tricornutum* microalgae, ESPACENET WO2013164095, 2013

AYALON, O., Improved process for producing fucoxanthin and/or polysaccharides from microalgae, ESPACENET MX2018002318, 2018

AZEVEDO, D.A.; Espectrometria de Massas – LABEM, Fevereiro/2004.

AZEVEDO, R.S.S.; SILVA, E.V.P.; CARVALHO, V.L.; RODRIGUES, S.G.; NUNES NETO, J.P.; MONTEIROM H.A.O.; PEIXOTO, V.S.; CHIANG, J.O.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C. *Mayaro* Fever Virus, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 15, No. 11, 2009

BARATA, L.T., Conceitos subjacentes à utilização dos medicamentos biológicos Underneath mechanisms for the use of biologics , *Rev Port Imunoalergologia* vol.25 no.3 Lisboa set. 2017

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis, Boca Raton, 2006

BASHIR, K.M.I.; LEE, J.H.; PETERMANN, M.J.; SHAH, A.A.; JEONG, S.J.; KIM, M.S.; PARK, N.G.; CHO, M.G., Estimation of Antibacterial Properties of *Chlorophyta*, *Rhodophyta* and *Haptophyta* Microalgae Species, *Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 46, No. 3, 2018

BECKER, E.W.; JAKOBER, B.; LUFT, D.; SCHMILLING, R.W. Clinical and biochemical evaluations of *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. *Nutr Rep Int*, 1986.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol*; v.5, p.235-241, 1993.

BIOTECHMARINE, Descrição disponível em:  
<<https://www.seppic.com/seppic/biotechmarine>>; Acesso em: 27/04/19

BIOTECHMARINE, Method for culturing cells of acrochaetium moniliforme red algae, method for obtaining an extract of the biomass thereof, and use of same in cosmetics, PATENT INSPIRATION, US201615564624, 2016

BISCHOFF, H. W. & BOLD, H. C., Phycological Studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. University of Texas Publication No. 6318, Austin, Texas, 1963

BONILLA-AHUMADA, F.J.; KHANDUAL, S.; LUGO-CERVANTES, E.C., Microencapsulation of algal biomass (*Tetraselmis chuii*) by spray-drying using different encapsulation materials for better preservation of betacarotene and antioxidant compounds, *Algal Research*, 36, 229–238, 2018

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, v. 24, p. 119-124, 1985.

BOROWITZKA, M.A., Algal calcification. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 15: 189-223, 1977

BOROWITZKA, Michael A. Products from microalgae. *Infotech International*, v.5, p.21-26, 1993

BOROWITZKA, M. A.; HALLEGRAEFF, G. M. Algae of Australia: introduction. *Australian Biological Resources Study: Canberra*, chap. 29, 2007

BORSCHIVER, S.; SILVA, A.L.R., 2016. Technology Roadmap – Planejamento Estratégico para alinhar Mercado-Produto-Tecnologia. ISBN: 9788571933866 1.a Edição – 2016

BOUKHRIS, S.; ATHMOUNI, K.; HAMZA-MNIF, I.; SIALA-ELLEUCH, R.; AYADI, H.; NASRI, M.; SELLAMI-KAMOUN, A. The Potential of a Brown Microalga Cultivated in High Salt Medium for the Production of High-Value Compounds. *BioMed Research International*, Article ID 4018562, 10 pages, 2017

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Febre do *Mayaro*, 2015. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro>>, Acesso em: 11/04/2019

BUNDERS, J.; HAVERKORT, W.; HIEMSTRA, W. "Biotechnology: Building on Farmer's Knowledge". Macmillan Education, Ltd, 1996

BURLEW, J.S., Algal culture from laboratory to pilot plant. Washington DC: Carnegie Institution of Washington, 1953

BUTLER, D.; "Agência de pesquisa da França se divide". *Natureza* . 453 (7195): 573, 2008

CANHOTO, J.M., *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*, Coimbra, 2010

CARNEIRO, A. C. C., CAVALCANTI, M. A. F. D., SILVA, J. F., “Porter Revisitado: Análise Crítica da Tipologia Estratégica do Mestre”, *Revista de Administração Contemporânea*, v. 1, n. 2 (Set./Dez.), pp. 7-30, 1997

CASTILHO, Leda. Material de aula *Biotecnologia Farmacêutica: conceitos básicos*, Introdução à Biotecnologia Farmacêutica, COPPE/EQ – UFRJ, 2015

CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F., Síntese de esteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno, *Food Science and Technology*, vol.17, n.3, pp.224-228, 1997

CHAGAS, B.M.E., Influência do estresse nutricional programado na composição da Microalga Marinha *Isochrysis galbana*, Dissertação de Mestrado, UFRN, 2010

CHAVES, M.H., Análise de extratos de plantas por ccd: uma metodologia aplicada à disciplina “química orgânica”, QUÍMICA NOVA, 20(5), 1997

CHEN, Y.; TANG, X.; KAPOORE, R.V.; XU, C.; VAIDYANATHAN, S.; Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energ Convers Manag* 106:61–72, 2015

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294–306, 2007

CHINESE ACADEMY OF SCIENCES, Descrição, Disponível em: <<http://english.cas.cn/>>, Acesso em: 23/07/18

CHIU, H.-F.; LIAO, J.-Y.; LU, Y.-Y.; HAN, Y.-C.; SHEN, Y.-C.; VENKATAKRISHNAN, K.; GOLOVINSKAIA, O.; WANG, C.-K. Anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic effects of *Dunaliella salina* on human KB oral carcinoma cells. *J F Biochem*, 2017

CHO, K.; KIM, K.N.; LIM, N.L.; KIM, M.S.; HA, J.C.; SHIN, H.H.; KIM, M.K.; ROH, S.W.; KIM, D.; ODA, T., Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Biomass Bioenergy* 72:1–7, 2015

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. *Biomaterials*, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE, Descrição, Disponível em: <<http://www.cea.fr/>>, Acesso em: 26/07/18

COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE, Use of nitric oxide or nitric donor for inducing the production of triacylglycerols in microalgae, PATENT INSPIRATION, CN107034244A, 2017

CUSTÓDIO, L.; SOARES, F.; PEREIRA, H.; RODRIGUES, M.J.; BARREIRA, L.; RAUTER, A.P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Botryococcus braunii and Nannochloropsis oculata extracts inhibit cholinesterases and protect human dopaminergic SH-SY5Y cells from H2O2-induced cytotoxicity. *Journal of Applied Phycology*, V 27, I 2, pp 839–848, 2015

CYSEWSKI, G.R.; LORENZ, R.T. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential: *Haematococcus*. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, p.281-288, 2004

DAINIPPON INK & CHEMICALS, Descrição, Disponível em: <<http://www.dic-global.com/en/index.html>>, Acesso em: 26/07/18

DANTAS, D.M.M.; OLIVEIRA, C.Y.B.; COSTA, R.M.P.B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; GÁLVEZAND, A.O.; BEZERRA, R.S.; Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*, Food Science and Technology International, 2019

DA SILVA, L.R.; MARTINS, L.V.; BANTIM, I.F.C.; MEIRELES, M.S.D.; FERREIRA, P.M.P.; PERON, A.P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. Acta toxicol. argent. vol.23 no.1, 2015

DE CLERCQ, Strategies in the design of antiviral drugs. Nat Rev Drug Discov., 1(1):13-25, 2002

DEGHANI, J.; ADIBKIA, K.; MOVAFEGHI, A.; BARZEGARI, A.; POURSEIF, M.M.; KAKELAR, H.M.; GOLCHIN, A.; OMIDI, Y., Stable transformation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: a promising microalga for production of edible vaccines, Applied Microbiology and Biotechnology, 2018

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. Energy Convers. Manage, 51, 2738, 2010

DEVITO, S. C.; GARRET, R. L., eds.; *Design Safer Chemicals: Green Chemistry for Pollution Prevention*; American Chemical Society, ACS Symp. Ser. n. 640, 1996.

DIAS, R. F.; DE CARVALHO, C. A. A. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas. Rev. Virtual Quim., 9, 1, 2017

DOROZYNSKI, A.; " O CNRS em 50. (Centro Nacional de Pesquisa Científica) (Salute to French Technology)" . R & D . Arquivado desde o original em 10 de junho de 2013

DOS SANTOS, A.C., Estudo Ecofisiológico de *Haematococcus pluvialis*. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2015

DOS SANTOS, A.E.; KUSTER, R.M.; YAMAMOTO, K.A.; SALLES, T.S.; CAMPOS, R.; DE MENESES, M.D.; SOARES, M.R.; FERREIRA, D.F. Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-*Mayaro* virus activity. Parasit Vectors, v. 130, p. 1-7, 2014.

EHRESHMANN, D.W.; DIEG, E.F.; HATCH, M.T.; DISALVO, L.H.; VEDROS, N.A.,  
Antiviral substances from California marine algae. J. Phycol.; 13, 37-40, 1977

EL-BAZ, F.K.; HUSSEIN, R.A.; MAHMOUD, K.; ABDO, S.M. Cytotoxic activity of  
carotenoid rich fractions from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* microalgae and  
the identification of the phytoconstituents using LC-DAD/ESI-MS. Phytotherapy Research, 1–  
7, 2017

ELICIN, A.K., Investigation of *Haematococcus Pluvialis* for Microalgae Cultivation Using  
the Flashing Light Method, Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University, 34  
(1), 264-270, 2017

EMBRAPA AGROENERGIA, MICROALGAS, Ano IV, nº 10, dezembro de 2016

EVALUATE PHARMA, World Preview 2018, Outlook to 2021, Evaluate, 10th Edition, June  
2018, Disponível em: [www.evaluate.com/PharmaWorldPreview2018](http://www.evaluate.com/PharmaWorldPreview2018), Acesso em: 09/04/2019

ESPAENET – Base de dados – Disponível em: <https://www.epo.org/>

EXAME, O Verão e as Arboviroses, 2018, Disponível em:  
<<https://exame.abril.com.br/negocios/mgapress/o-verao-e-as-arboviroses/>>, Acesso em:  
16/05/2019

FABREGAS, J.; DOMINGUEZ, A.; MASEDA, A.; OTERO, A. Interactions between  
irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in  
*Haematococcus pluvialis*. Microbiology and Biotechnology, v.61, p. 545–551, 2003

FALAISE, C.; FRANÇOIS, C.; TRAVERS, M.; MORGA, B.; HAURE, J.; TREMBLAY, R.;  
TURCOTTE, F.; PASETTO, P.; GASTINEAU, R.; HARDIVILLIER, Y.; LEIGNEL, V.;  
MOUGET, J.-L.; Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human  
pathogens and diseases in aquaculture. Mar Drugs, 2;14(9). pii: E159, 2016

FAN, Y.; YUAN, C.; JIN, Y.; HU, G.-R.; LI, F.-L. Characterization of 3-ketoacyl-coA  
synthase in a nervonic acid producing oleaginous microalgae *Mychonastes* afer. Algal  
Research, Volume 31, April 2018, Pages 225-231, 2018

FELIPE, L.O.; BICAS, J.L., Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais, Quím. nova esc. – São Paulo-SP, BR, N° 2, 39:120-130, 2017

FELLER, R.; MATOS, Â.P.; MAZZUTTI, S.; MOECKE, E.H.S.; TRES, M.V.; DERNER, R.B.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, A.F. Polyunsaturated  $\Omega$ -3 and  $\Omega$ -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical n-butane. Journal of Supercritical Fluids, Volume 133, Part 1, Pages 437-443, 2018

FITOPLANCTON MARINO, Descrição, Disponível em:  
<<http://www.FitoplanctonMarino@.com/>>, Acesso em: 26/07/18

FITOPLANCTON MARINO, Method for obtaining a biomass of a microalga of the species *Tetraselmis chuii* enriched in superoxide dismutase, PATENT INSPIRATION, MX2017014092A, 2018

FLORÃO, A.; MATTANA, F.V.R.; ROCHA, F.H.; NARDIN, J.M.; MACHADO JUNIOR, J.C.; WEFFORT-SANTOS, A. Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a Proliferação de Linfócitos Humanos in vitro. Lat. Am. J. Pharm., 26 (2): 215-23, 2007

FMC CORPORATION, Descrição, Disponível em: <<http://www.fmc.com/>>, Acesso em: 26/07/18

FMC CORPORATION, Use of porphyrins, PATENT INSPIRATION, CN1171552A, 1998

FRANCO, A.L.C.; LOBO I.P.; CRUZ, R.S.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; DE ALMEIDA NETO, J.A.; MENEZES, R.S. Biodiesel from microalgae: progress and challenges. Quím. Nova, vol.36, no.3, São Paulo, 2013

FREITAS-FILHO, J.R.; FREITAS, J.J.R.; SILVA, L.P.; FREITAS, J.C.R., investigando cinza da casca do arroz como fase estacionária em cromatografia: uma proposta de aula experimental nos cursos de graduação, Quím. Nova, Vol. 35, No. 2, 416-419, 2012

GARCIA, L. J; VICENTE, DE M; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and 24 fashion nutraceuticals. Microbial Biotechnology, v. 10, p. 1017 – 1024, 2017

GERBER, P.; DUTCHER, J.D.; ADAMS, E.V.; SHERMAN, J.H., Inhibition of herpes virus replication by marine algae extracts, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99, 590-593, 1958

GRACI, J.D.; CAMERON, C.E. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.*, 16:37-48, 2006

GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis Group. 301 p. il., 2006

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A., High resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats, *Trends in Food Science & Technology* 12 , 328–338, 2001

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. N° 1034. Roma, FAO. 33p. 2008.

HALLING, B.P.; YUHAS, D.A. Method and composition for photodynamic treatment and detection of tumors. United State patent 5.407.808, 1995

HALLMANN, A., Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant Journal*. 1:81- 98, 2007

HARRISON V.R, ECKELS K.H., BARTELLONI P.J. HAMPTON C. (1971). Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J. Immunol.* 107, 643-647, 1971

HASSAN, S.S.,A.; ANJUM, K.; ABBAS, S.Q.; AKHTER, N.; SHAGUFTA, B.I.; SHAH, S.A.A.; TASNEEM, U. Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 49, 34–47, 2017

HASUI, M.; MATSUDA, M.; OKUTANI, K.; SHIGETA, S. *In vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 17, I. 5, p. 293-297, 1995

HAYASHI, K.; TOSHIMITSU, H.; KOJIMA, I. A Natural Sulfated Polysaccharide, Calcium Spirulan, Isolated from *Spirulina platensis*: *In Vitro* and *ex Vivo* Evaluation of Anti-Herpes Simplex Virus and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity. *AIDS Research and human retroviruses*, Vol 12, N° 15, 1996

HENRIKSON, R. *Earth food Spirulina*. 6 ed. California: Ronore Enterprises, 187p., 2009

HERNÁNDEZ-CORONA, A.; NIEVES, I.; MECKES, M. CHAMORRO, G., BARRON, B.L. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. Antiviral Research, 56, 279-285, 2002

HOCH, A.L.; PETERSON, N.E.; LEDUC, J.W.; PINHEIRO, F.P.; An outbreak of *Mayaro* virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. Am J Trop Med Hyg 30: 689–698, 1981

HOEK, C.V.D; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. Algae: an introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press, p. 667, 1995.

HOSOYAMADA, Y.; TAKAI, T.; KATO, T. Effects of water-soluble and insoluble fractions of *Spirulina* on serum lipid components and glucose tolerance in rats. J Jpn Soc Nutr Food Sci; 44:273-7, 1991.

HOTEZ, P.J.; MURRAY, K.O.; Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika and now *Mayaro*? PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, 2017

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied Energy, v. 87, p.38-46, 2010.

IMAMOGLU, E.; DALAY, M.C.; SUKAN, F.V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. New Biotechnology, v.26, p.199-204, 2009.

JABEEN, A.; REEDER, B.; HISAINDEE, S.; ASHRAF, S.; DARMAKI, N.A.; BATTAH, S.; AL-ZUHAIR, S. Effect of Enzymatic pre-treatment of microalgae extracts on their anti-tumor activity, Biomedical Journal, Volume 40, Issue 6, Pages 339-346, 2017

JABEEN, A.; REEDER, B.; SVISTUNENKO, D.; HISAINDEE, S.; ASHRAF, S.; AL-ZUHAIR, S.; BATTAH, S., Effect of the Photodynamic Therapy Applications with Potent Microalgae Constituents on Several Types of Tumor, IRBM, 2018

JAFARI, S.; MOBASHER, M.A.; NAJAPOUR, S.; GHASEMI, Y.; MOHKAM, M.; EBRAHIMI, M.A.; MOBASHER, N., Antibacterial Potential of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* Extracts Against *Streptococcus mutans*, Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 13 (2), 2018

JAYSHREE, A.; JAYASHREE, S.; THANGARAJU, N. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. *Indian J Pharm Sci*, 78(5): 575-581, 2016

JIANGUO, L.; TONG, P.; YONG, Z.; QIAN, L.; WEI, L.; YI, Y.; YUANRU, L.; LITAO, Z., Application of *Haematococcus astaxanthin* in preparation of drugs used for protecting or repairing renal functions, ESPACENET CN103462945, 2013

JOHNSTON R E, PETERS C J. Alphaviruses. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, editors. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; pp. 843–898, 1996

JÚLIO, C. A., SALIBI-NETO, J., *Estratégia e Planejamento: Autores e Conceitos Imprescindíveis*. São Paulo, Editora Publifolha, Coletânea HSM Management., 2002

KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S., Impact os antioxidant additives on the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Energy Fuels*, 24, 3682-3686, 2010

KATO, T.; TAKEMOTO, K.; KATAYAMA, H.; KUWABARA, Y. Effects of *Spirulina platensis* on dietary hypercholesterolemia in rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci*; v.37, p.323-332, 1984.

KIM, M.M., TA, Q.V., MENDIS, E., RAJAPALSE, N., JUNG, W.K., BYUN, H.G., JEON, Y.J., KIM, S.K., Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity., *Life Sci.*, 79, 1436-1443, 2006

KIM, M.; YIM, J.H.; KIM, S-Y.; KIM, H.S.; LEE, W.G.; KIM, S.J.; KANG,P-S.; LEE,C-K. In vitro inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03. *Antiviral Research*, 93, 253–259, 2012

KIM, S,K.; CHOJNACKA, K., PROCESS, PRODUCTS AND APLICCATION, MARINE ALGAE EXTRACTS, Vol 2, 371-378, 2015

KITADA, K.; MACHMUDAH.; S.; SASAKI, M.; GOTO, M.; NAKASHIMA, Y.; KUMAMOTO, S., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J Chem Technol Biotechnol*;84: 657–61, 2009

KYUNG, L.M.; JIP, N.S.; JEONG, P.M., Composition for prevention or treatment of obesity or diabete comprising fractions of *Tetraselmis suecica*, ESPACENET KR20160007979, 2016

KYLE, D.J.; REEB, S.E.; SICOTTE, V.J. Pharmaceutical composition and dietary supplement containing docosarexaenoic acid obtained from dinoflagellates, United States Patent 5.492.938, 1996

KYO, J.W.; WHAN, C.I.; HWAN, O.J.; WOOK, K.H.; SU YOUNG, S.S.; A Peptide derived from fermented marine microalgae *pavlova lutheri* and a pharmaceutical composition for preventing and treating cancer comprising the same. República da Korea, KR20140027858 20140310, 2015

LARA, A.; DEMARQUE, E. Análise proteômica aplicada aos estudos de otimização do cultivo de *Spirulina maxima* para fins nutricionais. Projeto Final de Curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

LaReMN/UFF, Preparação de amostras em solução, Disponível em: <[http://www.laremn.uff.br/images/stories/Preparacao\\_de\\_amostras\\_em\\_soluciao.pdf](http://www.laremn.uff.br/images/stories/Preparacao_de_amostras_em_soluciao.pdf)>, Acesso em: 20/05/2019

LEDUC, J.W.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; An outbreak of *Mayaro* virus disease in Belterra, Brazil. II. Epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 30: 682–688., 1981

LENARDÃO, E. J. *et al.*; “Green Chemistry” – Os 12 Princípios da Química verde e a sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Revista Química Nova*, Vol. 26, No. 1, p.123-129, 2003

LI J.; ZHU D. L.; NIU J.; SHEN S. D.; WANG G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Adv.* 29, 568–574, 2011

LIU, B.; BENNING, C.; Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology*, 24:300–309, 2013

LIU, Y.F.; XU, L.Z.; CHENG, N.; LIN, L.J.; ZHANG, C.W. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *J.Appl. Phycol.*, 12, p. 125-130, 2000.

LOMBARDI, A.T.; WANGERSKY, P.J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Mar Ecol Prog Ser* 77: 39-47., 1991

LOURENÇO, S. O.; MARQUES JR, N. A. Produção primária marinha. *Biologia marinha*, Cap. 6, p. 111-154, 2 ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2009.

LOURENÇO, S.O.; BARBARINO, E.; MANCINI-FILHO, J.; SCHINKE, K.P.; AIDAR, E. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41(2): 158-168, 2002

LUPATINI, A. Extração de Proteínas e Carboidratos da Biomassa de *Spirulina Platensis* e Caracterização da Fração Pro. Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

MAESTRIN, A.P.; NERI, C.R.; OLIVEIRA, K.T.; SERRA, O.A.; IAMAMOTO, Y., Extração e purificação de clorofila *A*, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química, *Quím. Nova* vol.32 no.6 São Paulo 2009

MAGRITEK, Characterizing fatty acids with advanced multinuclear NMR methods, Disponível em: <https://www.magritek.com/wp-content/uploads/2018/04/Characterizing-Fatty-Acids-with-multinuclear-NMR-Magritek-060418-back.pdf>, Acesso em: 20/05/2019

MANIARA, G.; RAJAMOORTHY, K.; RAJAN, S.; STOCKTON, G.W., Method Performance and Validation 1H and 31P NMR Spectroscopy Applications to Analytical Standards and Agricultural Chemicals, *Anal. Chem.* 70, 23, 4921-4928, 1998

MARECHAL, E.; Biografia, Disponível em: <[http://www.encyclopedie-environnement.org/author/eric\\_marechal/](http://www.encyclopedie-environnement.org/author/eric_marechal/)> , Acesso em: 22/07/18

MARGALITH, P.Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.51, p.431-438, 1999.

MARKET BIOSCIENCE CORPORATION. Disponível em: <<https://www.bloomberg.com/research/stocks/private/snapshot.asp?privcapId=31152>>, Acesso em: 22/07/18

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S.; Microalgae Lipid and Biodiesel Production: A Brazilian Challenge, *Renew. Sust. Energy Rev.*, 14, 217, 2010

Medicinal product aphanzomenon flos aquae, extracts and purified components of extractions for treatment of neurologic, neurodegenerative and affective disorders, Disponível em: <https://russianpatents.com/patent/244/2441663.html>, Acesso em: 30/04/2019

MEDINA, C.; RUBILAR, M.; SHENE, C.; TORRES, S.; VERDUGO, M. Protein Fractions with Techno-Functional and Antioxidant Properties from *Nannochloropsis gaditana* Microalgal Biomass. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, Volume 9, Number 4, pp. 417-425(9), 2015

MERGHOUB, N.; WAHBY, I.; AINANE, T., Use of a composition made from marine microalgae extracts for treating acne, ESPACENET, WO2015084136, 2015

MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; HAIMEUR, A.; GUÉNO, F.; MESKINI, N.; TREMBLIN, G. MARINE microalgae used as food supplements and their implication in preventing cardiovascular diseases. *OCL*, v 22, n 4, 2015

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Vigilância epidemiológica, 2015. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro/21159-vigilancia-epidemiologica>>, Acesso em: 04/04/18

MOREIRA, M.A.R.G., POTENCIAL DE MERCADO DE EFICIÊNCIA ENERGÉTICA NO SETOR DE ÁGUA E ESGOTO NO BRASIL – AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS SEGUNDO O MODELO DE PORTER, Dissertação de mestrado – COPPE/UFRJ, 2006

MOREIRA, B.S.; VASCONCELOS, D.F.S.A; Produtos marinhos como fonte promissora de fármacos: um foco para ação cardiovascular; *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, Salvador, v. 13, n. 3 – especial, p. 363-369, 2014

MORI, T.; O'KEEFE, B.R.; SOWDER, R.C.; BRINGANS, S.; GARDELLA, R.; BERG, S.; COCHRAN, P.; TURPIN, J.A.; BUCKHEIT, R.W.; MCMAHON, J.B.; BOYD, M.R., Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp., *J Biol Chem.*, 280(10):9345-53, 2005

MORRIS, H.J.; CARRILLO, O.V.; ALMARALES, Á.; BERMÚDEZ, R.C.; ALONSO, M.E.; BORGES, L.; Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition. *Biotechnol Appl*; 26:162–5, 2009

MULLER-FEUGA, A. Microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, p.352–364, 2004

MUELLER, G. Roadmapping. E S I, Disponível em: [www.gaudisite.nl](http://www.gaudisite.nl), 2005

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J.C.; *Mayaro*: a re-emerging arbovirus in Venezuela and Latin America Biomédica (Bogotá), 32, 286-302, 2012

NAGAYAMA, K., IWAMURA, Y., SHIBATA, T., HIRAYAMA, I., NKAMURA, T., Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. J. Antimicrob. Chemother., 50, 889-893, 2002

NANGAI, H.; GUOYOU, L.; SHENGFANG, L., Microalgae mulberry healthcare buccal tablet and preparation method thereof, ESPACENET CN104432093, 2015

NASCIMENTO, R.P.; RIBEIRO, B.D.; PEREIRA, K.S.; COELHO, M.A.Z. Microbiologia Industrial: Bioprocessos, ELSEVIER, 2017

NAVARRO, F.; FORJÁN, E.; VÁZQUEZ, M.; TOIMIL, A.; MONTERO, Z.; RUIZ-DOMÍNGUEZ, M.D.C.; GARBAYO, I.; CASTAÑO, M.Á.; VÍLCHEZ, C.; VEGA, J.M. Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. Phycological Research, 2016

NEOFOTIS, P.; HUANG, A.; SURY, K.; CHANG, W.; JOSEPH, F.; GABR, A.; 19 TWARY, S.; QIU, W.; HOLGUIN, O.; POLLE, J. E. W. Characterization and 20 classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and 21 bioproduct generation. Algal Research, v. 15, p. 164–178, 2016

NESTEC S.A., Descrição, Disponível em: <<https://www.bloomberg.com/research/stocks/private/snapshot.asp?privcapId=5479792>>, Acesso em: 26/07/18

NIKKEN SOHONSHA CORP, Descrição, Disponível em: <<http://www.nikken-miho.com/>>, Acesso em: 26/07/18

NPDEAS, Disponível em: <<http://npdeas.blogspot.com/2011/06/os-fotobiorreatores-do-npdeas.html>>, Acesso em: 21/07/2018

NUTRATEC S R L, Descrição, Disponível em: <[http://www.nutatec.it/dettaglio.asp%3Fita\\_cat%3Dazienda%26ita\\_titulo%3Dazienda](http://www.nutatec.it/dettaglio.asp%3Fita_cat%3Dazienda%26ita_titulo%3Dazienda)>, Acesso em: 26/07/18

OGBONNA, J. C.; MASUI, H.; TANAKA H.; Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *J. Appl. Phycol.*, 9, I. 4, pp 359–366, 1997

O GLOBO, UFRJ descobre o vírus *mayaro*, 'primo' do chicungunha, no estado do Rio, 2019, Disponível em: <https://oglobo.globo.com/sociedade/ufrj-descobre-virus-mayaro-primo-do-chicungunha-no-estado-do-rio-1-23669623>, Acesso em: 16/05/2019

O GLOBO, Perguntas e respostas: entenda o que é o vírus *mayaro*, 2019, Disponível em: <https://oglobo.globo.com/sociedade/perguntas-respostas-entenda-que-o-virus-mayaro-23669284>, Acesso em: 16/05/2019

OIL AND GAS CORPORATION, Descrição disponível em: <https://www.ongcindia.com/>; Acesso em: 27/04/19

OIL AND GAS CORPORATION, Council of Scientific and Industrial Research, A composition and method for controlling rotifer in microalgal culture systems, PATENT INSPIRATION, IN1787DE2012A, 2015

OLAIZOLA, M., Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace, *Biomolecular Engineering* 20(4-6):459-66, 2003

OLASEHINDE, T.A.; OLANIRAN, A.O.; OKOH, A.I.; KOULEN, P. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 18;22(3). pii: E480, 2017

OLIVEIRA, M.A.C.L., MONTEIRO, M.P.C., ROBBS, P.G., LEITE, S.G.F., Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures, *Aquaculture International* 7: 261–275, 1999

ORHAN, I.; DELIORMAN-ORHAN, D.; ÖZÇELİK, B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. *Food Chem.*, 115: 701-705, 2009

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, n.12, p.553-556, 2000

PANES, G.; CARREON, J.R., Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line, *Algal Research*, Volume 18, Pages 175-190, 2016

PAREDES, A.M.; BROWN, D.T.; ROTHNAGEL, R.; *et al.* Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(19):9095–9099, 1993

PASCO, D.S.; PUGH, N.D.; ELSOHLY, M.; ROSS, S.; ELSOHLY, N.M. Potent immunostimulatory extracts from microalgae. United States Patent 7.846.452, 2010

PASQUET, V.; MORISSET, P.; IHAMMOUINE, S.; CHEPIED, A.; AUMAILLEY, L.; BERARD, J.B.; SERIVE, B.; KAAS, R.; LANNELUC, I.; THIERY, V.; LAFFERRIERE, M.; PIOT, J.M.; PATRICE, T.; CADORET, J.P.; PICOT, L. Antiproliferative Activity of Violaxanthin Isolated from Bioguided Fractionation of *Dunaliella tertiolecta* Extracts. *Mar Drugs*. ; 9(5): 819–831, 2011

PATEL, A.; MATSAKAS, L.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria, *Bioresource Technology* Volume 278, Pages 424-434, 2019

PATENT INSPIRATION, Disponível em: <<http://www.patentinspiration.com/>>

PHYCOBIOTECH, Disponível em: <https://www.phyco-biotech.com/>; Acesso em: 27/04/19

PHYCOBIOTECH, Microalga enriched with silicon in a water-soluble form, PATENT INSPIRATION, WO2015155224, 2015

PIENKOS, P.T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, v. 3, p.431-440, 2009.

PINHEIRO, F.P.; LEDUC, J.W. *Mayaro* virus disease. In: Monath TP, editor. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Vol 3. Boca Raton (FL): CRC Press, p. 137–50, 1988

PINTO-JUNIOR, E., Modulação dos níveis de pigmentos e ácidos graxos em algas marinhas: funções dos carotenóides e efeito do estresse ambiental, Tese de doutorado, USP, 2002

PORTER, M. E., *Estratégia Competitiva: Técnicas para Análise de Indústrias e da Concorrência*. 2 ed. Rio de Janeiro, Editora Campus, Elsevier, 2004

\_\_\_\_\_, Vantagem Competitiva: Criando e Sustentando um Desempenho Superior. 2ª reimpressão. Rio de Janeiro, Editora Campus, Elsevier, 1989

\_\_\_\_\_, Competitive Advantage: Creating and Sustaining Competitive Performance. New York: Free Press, 1985,

\_\_\_\_\_, Competitive Strategy: Techniques for Analysing Industries and Competitors. New York: Free Press, 1980

POWERS, A.M.; AGUILAR, P.V.; CHANDLER, L.J.; BRAULT, A.C.; MEAKINS, T.A.; WATTS, D.; Genetic relationships among *Mayaro* and *Una* viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 75:461–9, 2006

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B., Commercial and industrial applications of microalgae – A review, *J. Algal Biomass Utiln.* 3 (4): 89–100, 2012

PUBCHEM, Base de dados de substâncias químicas, Disponível em:  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 65, p. 635-48, 2004.

QUADROS, R., VILHA, A. M. *Tecn. De Inform. No Gerenc. Do Processo Da Inovação*, Disponível em: [http://www.lukatus.com/tecnologias\\_de\\_informacaonogerenciam.pdf](http://www.lukatus.com/tecnologias_de_informacaonogerenciam.pdf), 2009

QUEIROZ, K.C.S.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, L.S.; ABREU, L.R.D.; ROCH, H.A.O.; FERREIRA, C.; JUCÁ, M.B.; AOYAMA, H.; LEITE, L.L.; Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomol. Pharmacother.*, 62, 303-307, 2008

RAPOSO, M.F.J.; MORAIS, R.M.S.C.; MORAIS, A.M.M.B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, v. 93, p. 479–486, 2013

RATCLIFFE, R.G., ROSCHER, A., SACHAR-HILL, Y., *Plant RMN spectroscopy Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 39, 4, 267-300, 2001

REED, L.J.; MUENCH, H. A Simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology*, v. 27, Issue 3, p.493–497, 1938.

REYNAUD ROMAIN, R.; FREDERIQUE, L.; ALEXIS, R.; ARNAUD, G.; CELINE, D.; ANNE, H.; SYLVIE, B.; RICHARD, O. Extract obtained from microalgae of *Dysmorphococcus globosus*, useful in cosmetic or pharmaceutical composition for treating adiposis, where the extract has lipolytic activity. França, FR20120051840 20120229, 2013

RISMANI, S.; SHARIATI, M., Changes of the Total Lipid and Omega-3 Fatty Acid Contents in two Microalgae *Dunaliella Salina* and *Chlorella Vulgaris* Under Salt Stress, Braz. arch. biol. technol. vol.60 Curitiba 2017 Epub Aug 21, 2017

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M.R., Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol Bioeng 102(1):100–112, 2009

ROEVIK, S.T.; JORUNN, S. Pharmaceutical composition comprising glucan derived from microalgae. Organização Mundial da Propriedade Intelectual, WO2004NO00157 20040602, 2004

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S., Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias, Teste Materials Research, Vol. 6, No. 3, 317–320, 2003

ROMAIN, R.; FREDERIQUE, L.; ALEXIS, R.; ARNAUD, G.; CELINE, D.; ANNE, H.; SYLVIE, B.; RICHARD, O.; Extract obtained from microalgae of *Dysmorphococcus globosus*, useful in cosmetic or pharmaceutical composition for treating adiposis, where the extract has lipolytic activity; ESPACENET, FR 2987262 A1, 2013

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacol. Ther., New York, v.83, p.217-244, 1999

SAHIN, S.C.; The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications, South African Journal of Botany, 2018

SALLES, T.S.; Efeitos antivirais dos extratos das plantas *Schinus terebinthifolius* e *Punica granatum* na replicação do vírus *Mayaro* em células VERO, Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - IQ/UFRJ, 2014

SANO, T.; TANAKA, Y.; Effect of dried powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol fed rabbits. Artery; 14:76–84, 1987

SANO, T.; KUMAMOTO, Y.; KAMIYA, N.; OKUDA, M.; TANAKA, Y.; Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. *Artery*; 15:217–24, 1988

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 1035-41, 2003

SANTOYO,S.; PLAZA, M.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; REGLERO, G.; SEÑORAS, F.J. J. Pressurized Liquid Extraction as an Alternative Process To Obtain Antiviral Agents from the Edible Microalga *Chlorella vulgaris*. *Agric. Food Chem.*, 58, 8522-8527, 2010

SANTOYO,S.; JAIME, L.; PLAZA, M.; HERRERO, M.; RODRIGUES-MEIZOSO,I.; IBAÑEZ,E.; REGLERO, G. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. *J Appl Phycol.*, 24, 731-741, 2012

SCHOPF, J W. Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Science, New Series*, Vol. 260, No. 5108, pp. 640-646, 1993

SCHÖRKEN, U., e KEMPERS, P, Lipid biotechnology: Industrially relevant production process. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v 111, p 627-645, 2009

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., *Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*, 1º Edição, Volume II, Página 93, 2001

SCOPUS – Base de dados - <<https://www.scopus.com/>>

SEDIGHI, M.; JALILI, H.; RANAIEI-SIADAT, S.O.; AMRANE, A. Potential health effects of enzymatic protein hydrolysates from *Chlorella vulgaris*. *Applied food biotechnology*, 3 (3):160-169, 2016

SHAISH A, BEN-AMOTZ A, AVRON M. Biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella*. *Method Enzymol.*, 213:439–444, 1992

SEOANE, M.; ESPERANZA, M.; CID, Á. Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Aquat Toxicol*, 191:62-72, 2017

SEPPIC – Disponível em: <https://www.seppic.com/>, Acesso em: 27/04/19

SEPPIC, Method for culturing cells of acrochaetium moniliforme red algae, method for obtaining an extract of the biomass thereof, and use of same in cosmetics, PATENT INSPIRATION, US2018117106A1, 2018

SILVA, S. X., PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE MICROALGAS. 40 f. Trabalho de Graduação (Técnico) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2011.

SINGH, M. M.; SZAFRAN, Z.; PIKE, R. M.; *J. Chem. Educ.*, 76, 1684, 1999

SMITH, G. C.; FRANCY, D. B.; Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of *Mayaro* and *Oropouche* viruses. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 89–93., 1991

SOARES, R.R.S.; Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica, Dissertação de mestrado, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 2006

SOBOLEV, A.P.; BROSIO, E.; GIANFERRI, F.; SEGRE, A.L., Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra, *Magn. Reson. Chem.*; 43: 625–638, 2005

SOPHARMA, Disponível em: <http://www.sopharmagroup.com/>, Acesso em: 27/04/19

SOPHARMA, Pharmaceutical composition and a sterile impregnated wound bandage, PATENT INSPIRATION, BG1990U1, 2014

SPOLAORE, P. JOANNIS-CASSAN, C. DURAN, E. AND ISAMBERT, A. 2006 Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101: 87-96, 2006

STRAMARKOU, M., PAPADAKI, S., KYRIAKOPOULOU, K., KROKIDA, M. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, Volume 29, Issue 6, pp 2947–2960, 2017

SUH, I.S.; LEE, C.G.; Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnol Bioprocess Eng* 8:313–321, 2003

SUH, S.-S.; KIM, S.-M.; KIM, J.E.; HONG, J.-M.; LEE, S.G.; YOUN, U.J.; HAN, S.J.; KIM, I.-C.; KIM, S. Anticancer activities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, *Botrydiopsisidaceae* sp.. *BMC Complement Altern Med.*,17(1):509., 2017

SUN, P.; WONG, C.C.; LI, Y.; HE, Y.; MAO, X.; WU, T.; REN, Y.; CHEN, F., A novel strategy for isolation and purification of fucoxanthinol and fucoxanthin from the diatom *Nitzschia laevis*, *Food Chemistry*, 2018

SUNCHEON RES CT FOR NATURAL MEDICINES, Descrição disponível em: [https://www.studyinkorea.go.kr/en/sub/college\\_info/college\\_info.do?ei\\_code=510130](https://www.studyinkorea.go.kr/en/sub/college_info/college_info.do?ei_code=510130), Acesso em: 27/04/19

SUNCHEON RES CT FOR NATURAL MEDICINES, A Composition for prevention or treatment of obesity or diabete comprising fractions of *Tetraselmis suecica*, PATENT INSPIRATION, KR20160039164, 2016

TAKAYUKI, K.; NOBUO, M.; OSAMU, S.; EIJITSU, M., Antiviral agent and method for producing the same, ESPACENET JP2012224554, 2012

TALYSHINSKY, M.M.; SOUPRUN, Y.Y.; HULEIHEL, M.M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against. *Cancer Cell International*, 2:8, 2002

TETHYS RESEARCH INSTITUTE, Disponível em: <<https://www.tethys.org>>, Acesso em: 26/07/18

TOMAS, M.K.; KREMER, C.T.; KLAUSMEIER, C.A.; LITCHMAN, E. Global pattern of thermal adaptation in marine phytoplankton. *Science*, 338 , pp. 1085-1088, 2012

TORZILLO, G.; GOKSAN, T.; ISIK O.; GOKPINAR. S. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology*, v 40, p.233-240, 2005

TRIPATHI, M. K.; TYAGI, A. K.; KARIM, S. A., Performance of weaner lambs maintained on mustard and groundnut-meal based diets. *Indian J. Anim. Sci.*, 69 (11): 991-992, 1999

TURINO, F. Estudo apresenta evidências da presença do vírus *Mayaro* no Mato Grosso do Sul. 2015, Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/estudo-apresenta-evidencias-da-presenca-do-virus-mayaro-no-mato-grosso-do-sul>>; Acesso em: 01/04/2018

UFSC, Disponível em: <http://estrutura.ufsc.br/>, Acesso em: 24/04/19

UGWU, C.U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H.; Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour Technol* 99(10):4021–4028, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE, Descrição, Disponível em: <<https://www.furg.br/>> , Acesso em: 23/07/18

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDAVIA, Histórico, Disponível em: <[http://usm.md/?page\\_id=524](http://usm.md/?page_id=524)>, Acesso em: 22/07/18

UOZAKI, M., YAMASAKI, H., KATSUYAMA, Y., HIGUCHI, M., HIGUTI, T., & KOYAMA, A. H., Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. *Antiviral Research*, 73(2), 85–91, 2007

USM, Disponível em: <<http://usm.md/?p=21531&lang=ro>>, Acesso em: 30/04/19

USPTO – Base de dados - <https://www.uspto.gov/>

UTEX, Disponível em: <<https://utex.org/products/utex-lb-2342>> (*A. maxima*), <<https://utex.org/products/utex-0026>> (*C. vulgaris*), <<https://utex.org/products/utex-lb-1644>> (*D. salina*), <<https://utex.org/products/utex-2505>> (*H. pluvialis*), Acesso em: 28/02/2018

VALE, D.; PIMENTA, D.N.; AGUIAR, E.R.; *Zika, dengue and chikungunya: challenges and issues.*, *Epidemiol. Serv. Saúde* 25 (2), 2016

VARFOLOMEEV, S.D.; WASSERMAN, L.A., Microalgae as source of biofuel, food, fodder and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 789-807, 2011

VARGAS, M.; ALVES, N.; PIMENTEL, V.; REIS, C.; PIERONI, J. Iniciativa Brasil Saúde Amanhã Prospecção Estratégica do Sistema de Saúde Brasileiro, FIOCRUZ, 2016

VAZ, R. S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F. Biotecnologia na Indústria farmacêutica. *Revista Biotecnologia Ciência Andamp; Desenvolvimento*, n. 73, p. 36-39, 2008

VERMAAS, Wim FJ. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2001

VONSHAK A. Spirulina: Growth, physiology and biochemistry. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell biology and biotechnology. London: Taylor and Francis. p.43-66, 1997.

WALSH, G. Pharmaceutical Biotechnology – Concepts and Applications. Wiley, Chichester, West Sussex, UK; p. 48. Paperback, 2007

WAN, M.; MAHMOOD, A.W.; LORWIRACHSUTEE, A.; THEODOROPOULOS, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M.; Polyol-based deep eutectic solvents for extraction of natural polyphenolic antioxidants from *Chlorella vulgaris*, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019

WANG, B.; ZARKA, A.; TREBST, A.; BOUSSIBA, S. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active protective process under high irradiance. Journal of Phycology, v.39, p.1116–1124, 2003.

WANG, F.; HUANG, L.; GAO, B.; ZHANG, C., Optimum Production Conditions, Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Violaxanthin from Microalga *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae), Marine Drugs, 16, 190; 2018

WILLIAMS, P.J. LE B.; THOMAS, D.N.; REYNOLDS. Phytoplankton productivity: carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems. Blackwell Science. 386p., 2002

XAVIER, O.A.; SONIA, T.E.; XAVIER, A.M.; OLGA, D.T.; JORDI, S.Y.; JAUME, M.R., Extract from microalgae comprising fucoxanthin, fucoxanthinol and fatty acids, process for its production and applications thereof, ESPACENET WO2015136123, 2015

YAMAGUCHI, K., Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review, Journal of Applied Phycology 8: 487-502, 1997

YOUVAN, D.C.; Photosynthetic reaction centers: interfacing molecular genetics and optical spectroscopy. Trends Biochem Sci. , 16(4):145-9, 1991

ZAKARIA, S.M.; KAMAL, S.M.M.; HARUN, M.R.; OMAR, R.; SIAJAM, S.I. Subcritical water technology for extraction of phenolic compounds from *Chlorella* sp. microalgae and assessment on its antioxidant activity. *Molecules*, 3;22(7). pii: E1105, 2017

ZAKARIA, S.M.; MUSTAPA KAMAL, S.M.; HARUN, M.R.; OMAR, R.; SIAJAM, S.I. Extraction of antioxidants from *Chlorella* sp. using subcritical water treatment. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng., 206, 2017

ZHANG, Y.; GUO, J.; YAO, T.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.; CHU, H.; The influence of four pharmaceuticals on *Chlorella pyrenoidosa* culture Volume 9, Issue 1, Article number 1624, 2019

ZHU, C.J.; LEE, Y.K.; Determination of biomass dry weight of marine microalgae, *J APPL Phycol*, 9:189-94, 1997