



PIBIC-ENSINO MÉDIO: PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Palavras-Chave: Biomassa, Microalga, Biotecnologia

Emilly Prado, Escola Estadual Castello Branco, Limeira-SP/

Nathália Gonçalves, Escola Estadual Castello Branco, Limeira-SP

Bárbara Luísa Chagas da Silva - BioTech - FCA - UNICAMP

Karina Danielle Pereira Thomaz - BioTech - FCA - UNICAMP

Letícia Tamborlin - BioTech - FCA - UNICAMP

Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi, Laboratório de Biotecnologia (BioTech), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A *Chlamydomonas reinhardtii* é uma microalga verde unicelular, da família Chlamydomonadaceae dispersa em todos os continentes. Esta microalga apresenta em sua composição proteínas, fibras, lipídios, vitaminas e minerais, além de clorofila (Murbach *et al.*, 2018). A *C. reinhardtii* tem sido estudada como um organismo modelo para muitos processos biológicos, tornando-a um organismo ideal para produção de proteínas heterólogas, tais como anticorpos monoclonais, vacinas e hormônios. Este organismo tem sido utilizado como plataforma para manipulação genética para uso na produção de produtos farmacêuticos e outros compostos de interesse industrial (Rasala e Mayfield, 2011; Rasala *et al.*, 2014; Rasala e Mayfield, 2015). Aspectos relacionados à segurança alimentar de microalgas ainda não são bem conhecidos, como a presença de contaminantes, alérgenos ou substâncias perigosas geradas durante o processamento das microalgas (Caporgno e Mathys, 2018). Nos EUA, a regulamentação de produtos e aditivos em alimentos é de responsabilidade da *Food and Drug Administration (FDA)*, que pode atribuir status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) a um produto (Caporgno e Mathys, 2018). *Arthrospira* (conhecida como Spirulina no mercado), *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Porphyridium cruentum*, *Cryptocodinium cohnii* e, recentemente, a própria *Chlamydomonas reinhardtii* possuem o certificado GRAS (Garcia *et al.*, 2017). No entanto, seu potencial como fonte nutricional segura para uso em alimentos ainda não foi

completamente investigado. Estudos demonstram que não há evidências de mutagenicidade ou atividade genotóxica nos testes realizados. Além disso, após 28 dias de exposição contínua dos camundongos às microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, não foram observados nenhum caso de mortalidade ou efeitos adversos relacionados ao tratamento (Murbach *et al.*, 2018). No entanto, a pesquisa sobre esse tema é escassa e as evidências sobre potenciais benefícios para a saúde ainda não são muito claros.

A população mundial continua aumentando enquanto os recursos estão se tornando cada vez mais escassos, e assim a busca por fontes sustentáveis de nutrição que atendam às demandas são fundamentais (Murbach *et al.*, 2018). As microalgas têm demonstrado potencial para atender a necessidade da população de um suprimento alimentar mais sustentável, principalmente no que diz respeito à demanda de proteínas (Caporgno e Mathys, 2018). Neste contexto, proteínas à base de microalgas apresentam várias vantagens sobre outras matérias-primas atualmente utilizadas do ponto de vista ambiental. As microalgas *Chlorella* e *Arthrospira* acumulam proteínas de alta qualidade, tendo ambos os perfis de aminoácidos bem equilibrados de acordo com as recomendações da WHO / FAO / UNU em relação às exigências humanas de aminoácidos essenciais (EAAs) e são similares a outras fontes convencionais de proteína, como ovos e soja (Becker, 2007).

Além das proteínas, as microalgas são fonte de vários outros compostos importantes como carboidratos, ácidos graxos polinsaturados, minerais essenciais e vitaminas (Becker, 2007; Wells *et al.*, 2017). (25) Os lipídios, em particular os ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados de cadeia longa (ω -3 PUFAs), também têm sido sugeridos como compostos valiosos com benefícios à saúde que podem ser incorporados em produtos alimentícios. Ácido α -linolênico (ALA; 18: 3 n-3), ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5 n-3), ácido docosapentaenóico (22: 5 n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6 n-3) são alguns dos mais importantes PUFAs ω -3 com benefícios para a saúde humana (Wells *et al.*, 2017). O ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico foram, por exemplo, associados à prevenção ou melhoria de doenças cardiovasculares ou renais. EPA e DHA de cadeia longa, que são considerados como nutrientes dietéticos essenciais, podem ser produzidos apenas pelas plantas, portanto os consumidores devem incorporá-los em sua dieta (Peltomaa *et al.*, 2017). EPA e DHA também podem ser sintetizados a partir de ALA, mas o processo é muito ineficiente em humanos e o óleo de peixe ainda é a principal fonte de EPA e DHA comercialmente disponível (Peltomaa *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos e oligossacarídeos são compostos promissores com potenciais benefícios para a saúde, destacando-se em relação às aplicações prébióticas (De Jesus Raposo *et al.*, 2016; Jutur *et al.*, 2016). Esta associação é baseada na primeira definição de prebióticos como “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e / ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon, e assim melhora a saúde do hospedeiro” dado por Gibson e Roberfroid (30). A microbiota intestinal vem sendo estudada como um importante regulador do balanço energético e o seu desequilíbrio, conhecido como disbiose, está associada ao desenvolvimento da obesidade. O

sobrepeso e a obesidade estão se tornando uma doença crônica prevalente em todo o mundo. Além disso, o risco de diabetes tipo 2 e distúrbios metabólicos relacionados é aumentado em decorrência do sobrepeso e da obesidade.

A microbiota intestinal contém mais de 1 trilhão de microrganismos, com uma extensa variedade entre eles, pertencentes principalmente aos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Já se é reconhecido que a microbiota intestinal desempenha um importante papel na saúde do corpo humano atuando no desenvolvimento e regulação do sistema imune, na proteção contra diversos patógenos, além de ser responsável por funções essenciais na digestão e metabolismo, e até mesmo interfere no humor e comportamento. Assim, caso um desequilíbrio na composição dessas bactérias seja observado em resposta à alimentação, por exemplo, doenças agudas e/ou crônicas podem ser originadas (Schnorr *et al.*, 2016). Dessa forma, estudos demonstram que existe uma diferença entre a microbiota intestinal de indivíduos que consomem uma dieta rica em gorduras e pobre em fibras e de indivíduos que consomem uma dieta rica em fibras (Bibbo *et al.*, 2016). Deste modo, as microalgas podem ser estudadas com a finalidade de modular a microbiota.

Além disso, uma das principais características das microalgas é a produção de compostos bioativos com benefícios para a saúde humana. Atividades antioxidantes, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, anticancerogênicas, hepato-protectoras e anticoagulantes têm sido atribuídas a alguns compostos derivados de microalgas. Nos últimos anos, as microalgas tornaram-se foco de muitos estudos de pesquisa que visam identificar produtos naturais bioativos. Os carotenoides, por exemplo, têm sido considerados como um dos mais importantes constituintes bioativos em microalgas (Guo *et al.*, 2019). A *C. reinhardtii* representa uma boa fonte de carotenóides para uso potencial em alimentos sem processamento (Gille *et al.*, 2015).

OBJETIVO:

O presente estudo tem como objetivo estabelecer o protocolo de manutenção e produção em escala laboratorial de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, visando produção de biomassa para posterior análise de sua ação na microbiota intestinal de camundongos.

METODOLOGIA:

Obtenção de biomassa de microalgas: O cultivo de linhagem de ***Chlamydomonas reinhardtii*** foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA da UNICAMP. Foi utilizada uma linhagem *Chlamydomonas reinhardtii* selvagem denominada de CC-124. A linhagem foi adquirida do California Center for Algae Biotechnology da Universidade da Califórnia – San Diego. As algas foram cultivadas em meio padrão Tris Fosfato Acetato- TAP (10 mL de solução estoque A, contendo 20,67g NH₄NO₃, 2,5g CaCl₂, 5g MgSO₄, 1 mL solução

estoque fosfato contendo 20,52g K_2HPO_4 , 10,68g KH_2PO_4 , 1 ml ácido acético glacial, 20 mL solução Tris base 1M e, 1mL de micronutrientes segundo Hutner 1950), após o preparo do meio, o pH será fixado em $7,0 \pm 0,2$ com KOH e em seguida será esterilizado por 20 min a $121^\circ C$. Para o cultivo, as algas foram mantidas a $25^\circ C$ sob condições de luz constante, e a agitação mantida a 250 rpm. Para a produção de biomassa, um inóculo de suspensão de microalga foi crescido em 10 mL de meio TAP. A seguir, o conteúdo total foi transferido para crescimento em 100 mL de meio e posteriormente a 20 L de meio, respeitando a saturação antes de cada aumento da escala de produção. A seguir, a cultura total foi submetida a centrifugação (2000 xg por 10 minutos) e as microalgas precipitadas foram submetidas a liofilização.

RESULTADOS:

1. Preparo do meio de cultura TAP

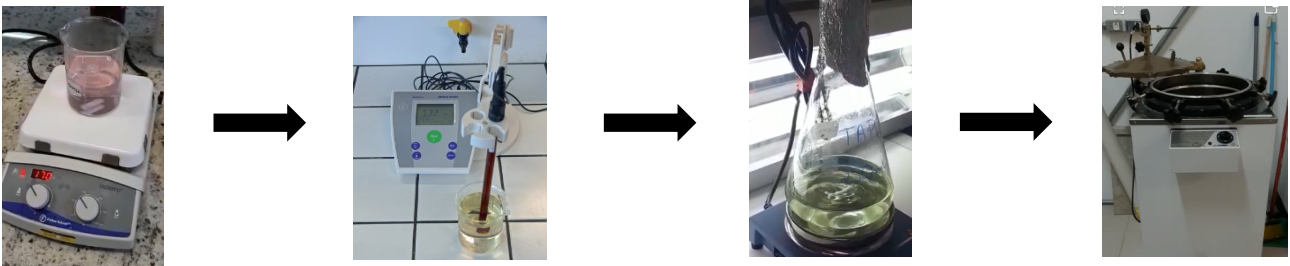


Figura 1 Preparo do meio de cultura TAP (homogeneização, ajuste do pH e esterilização)

2. Cultivo de microalga

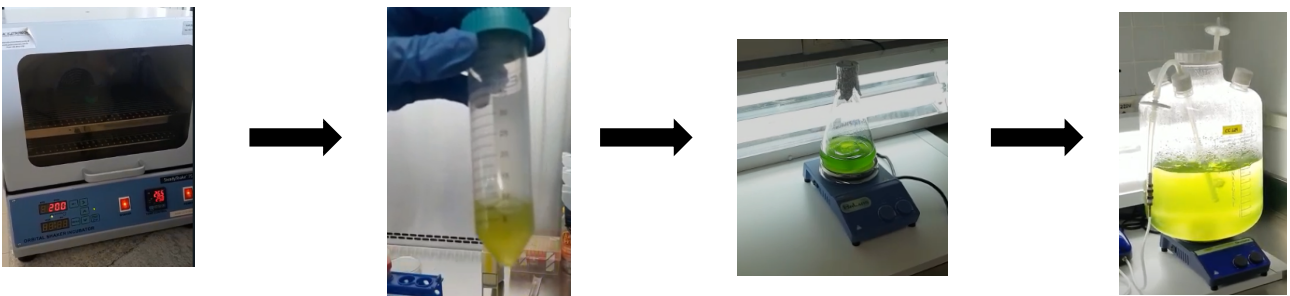


Figura 2 Cultivo da microalga (pré-inóculo - 10mL, inóculo - 100mL, cultivo em tanque 20L)

3. Obtenção da biomassa e liofilização



Figura 3 Obtenção da biomassa de microalga

BIBLIOGRAFIA

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnol Adv**, v. 25, n. 2, p. 207-10, Mar-Apr 2007. ISSN 0734-9750 (Print) 0734-9750.

BIBBO, S. et al. The role of diet on gut microbiota composition. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 22, p. 4742-4749, Nov 2016. ISSN 1128-3602.

CAPORGNO, M. P.; MATHYS, A. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. 58, 2018-July-31 2018. ISSN 2296-861X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2018.00058> >.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, A. M.; DE MORAIS, R. M. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. **Mar Drugs**, v. 14, n. 2, Jan 28 2016. ISSN 1660-3397.

GARCIA, J. L.; DE VICENTE, M.; GALAN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microb Biotechnol**, v. 10, n. 5, p. 1017-1024, Sep 2017. ISSN 1751-7915.

GILLE, A. et al. Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. **Int J Food Sci Nutr**, v. 67, n. 5, p. 507-13, Aug 2015. ISSN 1465-3478 (Electronic) 0963-7486 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27146695> >.

GUO, B. et al. Extract of the Microalga *Nitzschia laevis* Prevents High-Fat-Diet-Induced Obesity in Mice by Modulating the Composition of Gut Microbiota. **Mol Nutr Food Res**, v. 63, n. 3, p. e1800808, Feb 2019. ISSN 1613-4125.

JUTUR, P. P.; NESAMMA, A. A.; SHAIKH, K. M. Algae-Derived Marine Oligosaccharides and Their Biological Applications. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, n. 83, 2016-May-31 2016. ISSN 2296-7745. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2016.00083> >.

MURBACH, T. S. et al. A Toxicological Evaluation of *Chlamydomonas reinhardtii*, a Green Algae. **Int J Toxicol**, v. 37, n. 1, p. 53-62, Jan/Feb 2018. ISSN 1091-5818.

PELTOMAA, E.; JOHNSON, M. D.; TAIPALE, S. J. Marine Cryptophytes Are Great Sources of EPA and DHA. **Mar Drugs**, v. 16, n. 1, Dec 26 2017. ISSN 1660-3397.

RASALA, B. A. et al. Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94028, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710110> >.

RASALA, B. A.; MAYFIELD, S. P. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. **Bioeng Bugs**, v. 2, n. 1, p. 50-4, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1949-1026. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636988> >.

_____. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. **Photosynth Res**, v. 123, n. 3, p. 227-39, Mar 2015. ISSN 1573-5079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659086> >.

SCHNORR, S. L. et al. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. **Curr Opin Genet Dev**, v. 41, p. 14-26, Dec 2016. ISSN 0959-437x.