



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TAMIRES LAÍS NASCIMENTO MATOSO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE ÍONS DA
FRAÇÃO DE PEPTÍDEOS EXTRAÍDOS DA MICROALGA *Chlorella vulgaris***

**Recife
2026**

TAMIRES LAÍS NASCIMENTO MATOSO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE ÍONS DA
FRAÇÃO DE PEPTÍDEOS EXTRAÍDOS DA MICROALGA *Chlorella vulgaris***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Raquel
Pedrosa Bezerra.

Coorientador (a): Sabrina Swan Souza da
silva.

Recife

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

M425a Matoso, Tamires Laís Nascimento.

Avaliação da atividade antioxidante e quelante de íons da fração de peptídeos extraídos da microalga *Chlorella vulgaris* / Tamires Laís Nascimento Matoso. – Recife, 2026. 51 f.; il.

Orientador(a): Raquel Pedrosa Bezerra.

Co-orientador(a): Sabrina Swan Souza da Silva..

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2026.

Inclui referências.

1. Neuropeptídeos. 2. Compostos orgânicos. 3. Antioxidantes. 4. Compostos bioativos 5. Biociências - Estudo e ensino. I. Bezerra, Raquel Pedrosa, orient. II. Silva., Sabrina Swan Souza da, coorient. III. Título

CDD 574

Tamires Laís Nascimento Matoso

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE ÍONS DA
FRAÇÃO DE PEPTÍDEOS EXTRAÍDOS DA MICROALGA *Chlorella vulgaris***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 10/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Raquel Pedrosa Bezerra (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a. Anna Gabrielly Duarte Neves (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a. Maria Rafaela Oliveira Bezerra
da Silva (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Raquel Pedrosa Bezerra. pela confiança, agradeço pela orientação paciente, pelo compartilhamento de seu conhecimento e por me conduzir pelo caminho da pesquisa científica. Sua mentoria foi fundamental.

À minha coorientadora, Sabrina., pela parceria indispensável e pela ajuda constante nos desafios. Sou grata pela disponibilidade, pelo olhar aos detalhes e por todas as discussões para este estudo. Ter contado com o seu apoio tornou a jornada muito mais segura.

À minha família, por ser minha maior inspiração. Agradeço pela paciência durante os meus momentos de ausência e por acreditarem nos meus sonhos mais do que eu mesma. Sem o suporte emocional e os sacrifícios de vocês, a conclusão desta etapa não seria possível.

Agradeço a minhas amigas da escola que estiveram presentes nos dias de cansaço e nas celebrações de cada pequena conquista durante todos esses anos. Aos amigos que fiz durante a graduação, por todas as risadas, suporte e incentivo.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e torceram pelo meu sucesso.

RESUMO

As doenças neurodegenerativas representam um desafio crescente à saúde pública, tendo como marcos patológicos o estresse oxidativo e o acúmulo desregulado de íons metálicos. Diante desse cenário, a busca por compostos naturais com propriedades quelantes e antioxidantes torna-se essencial. Este trabalho investigou o potencial biotecnológico de frações peptídicas de baixo peso molecular (< 3 kDa) derivadas da microalga *Chlorella vulgaris* como agentes neuroprotetores. Após a obtenção da biomassa e ultrafiltração, as proteínas foram quantificadas pelo método BCA. A atividade biológica foi avaliada compreendendo a capacidade de quelação de Ferro e Cobre, além da neutralização dos radicais ABTS e DPPH. A estabilidade funcional das frações foi testada sob diferentes faixas de pH e variações térmicas (60°C, 80°C e 100°C) pelo tempo de 30, 60 e 90 minutos, aplicando-se uma metodologia de correção pelo branco dos tampões para isolar o efeito das frações peptídicas. Os resultados revelaram uma forte atividade antioxidante, com destaque para o ensaio DPPH, no qual a fração apresentou um $IC_{50} < 31,25$ µg/ml, sugerindo a predominância de fração peptídica hidrofóbica, característica favorável à permeabilidade em membranas biológicas. No ensaio ABTS, o processo de purificação elevou a eficácia de 14,9% para 77% em concentrações reduzidas. Quanto à quelação metálica, as frações demonstraram alta afinidade por ferro, ultrapassando a marca de 80% de inibição, mantendo a estabilidade estrutural e funcional em condições fisiológicas e de processamento térmico. A análise de pH revelou eficácia máxima em pH 7,0. Em meios moderadamente ácidos, especificamente na faixa de pH 4 a 6, a fração conseguiu preservar cerca de 35% da sua efetividade. A manutenção da atividade sob altas temperaturas comprova a viabilidade dessas moléculas. Portanto, a fração peptídica de *C. vulgaris* atua de forma preventiva e corretiva contra o dano oxidativo, consolidando-se como ingrediente nutracêutico sustentável e uma alternativa promissora aos quelantes sintéticos na prevenção de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Neuropeptídeos, Compostos orgânicos, Antioxidantes, compostos bioativos.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases represent a growing challenge to public health, with oxidative stress and the unregulated accumulation of metal ions as pathological hallmarks. In this context, the search for natural compounds with chelating and antioxidant properties becomes essential. This work investigated the biotechnological potential of low molecular weight (< 3 kDa) peptide fractions derived from the microalga *Chlorella vulgaris* as neuroprotective agents. After obtaining the biomass and ultrafiltration, the proteins were quantified using the BCA method. Biological activity was evaluated, including the capacity for chelating iron and copper, as well as the neutralization of ABTS and DPPH radicals. The functional stability of the fractions was tested under different pH ranges and temperature variations (60°C, 80°C, and 100°C) for 30, 60 and 90 minutes, applying a buffer blank correction methodology to isolate the effect of the peptide fractions. The results revealed strong antioxidant activity, particularly in the DPPH assay, where the fraction showed an $IC_{50} < 31.25$ µg/ml, suggesting a predominance of hydrophobic peptide fraction, a characteristic favorable to permeability in biological membranes. In the ABTS assay, the purification process increased the effectiveness from 14.9% to 77% at reduced concentrations. Regarding metal chelation, the fractions demonstrated high affinity for iron, exceeding 80% inhibition, while maintaining structural and functional stability under physiological and thermal processing conditions. pH analysis revealed maximum effectiveness at pH 7.0. In moderately acidic media, specifically in the pH range of 4 to 6, the fraction managed to preserve approximately 35% of its effectiveness. The maintenance of activity under high temperatures confirms the viability of these molecules. Therefore, the peptide fraction of *C. vulgaris* acts preventively and correctively against oxidative damage, establishing itself as a sustainable nutraceutical ingredient and a promising alternative to synthetic chelating agents in the prevention of neurodegenerative diseases.

Keywords: Neuropeptides, Organic compounds, Antioxidants, Bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1(A) - Tanques abertos aplicados no cultivo de <i>Spirulina</i>	18
Figura 1(B) - Fotobiorreatores fechados	18
Figura 2 - Imagem de microscopia da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	19
Gráfico 1 - Atividade antioxidante em porcentagem de captura do radical ABTS e DPPH	32
Gráfico 2 - Porcentagem de Inibição da Quelação de Fe^{2+}	34
Gráfico 3 - Porcentagem de Inibição da Quelação de Cu^{2+}	35
Gráfico 4 - Estabilidade Térmica da atividade quelante	37
Gráfico 5 - Efeito do pH na capacidade quelante de íons Fe^{2+} da fração peptídica de <i>Chlorella vulgaris</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Absorbância da amostra
Ac	Absorbância do controle
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
BBM	Bold's Basal Medium
BCA	BCATM Protein Assay Kit
Cu ²⁺	Íon cobre bivalente
Da	Dalton
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DP	Doença de Parkinson
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F.P.	Fração Peptídica
Fe ²⁺	Íon ferro bivalente
Fe ³⁺	Íon ferro trivalente
HTST	High Temperature Short Time
IC ₅₀	Concentração inibitória mínima para 50% do efeito observado
kDa	Kilodalton
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salino
PV	Violeta Pirocatecol (indicador metalocrômico)
Tris-HCl	Cloridrato de Tris(hidroximetil)aminometano (tampão biológico)
UTEX	Culture Collection of Algae at the University of Texas
UV-Vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível
µg / mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.2. Revisão De Literatura.....	16
1.2.1. Microalgas.....	16
1.2.2. Processos de Cultivo e Extração de Microalgas.....	17
1.2.3. A Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	18
1.2.4. Peptídeos Bioativos: Definição e Relevância.....	20
1.2.5. Métodos de Obtenção de Peptídeos de Fontes Naturais.....	21
1.2.6. Doenças Neurodegenerativas.....	22
1.2.7. Neuroproteção e o Potencial de Peptídeos.....	23
1.2.8. Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Obtenção da biomassa.....	27
3.2. Preparação das frações ricas em peptídeos de baixo peso molecular.....	27
3.3. Determinação do teor de proteínas.....	27
3.4. Ensaio antioxidante.....	27
3.5. Atividade quelante de ferro (Fe^{2+}).....	28
3.6. Atividade quelante de cobre (Cu^{2+}).....	29
3.7. Avaliação das frações peptídicas quanto à pH e temperatura.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Processamento da Biomassa de <i>C. vulgaris</i>	31
4.2. Atividade Antioxidante.....	31
4.3 Atividade Quelante de (Fe^{2+} e Cu^{2+}) das frações peptídicas de <i>C. vulgaris</i>	33
4.3.1. Quelação do Ferro (Fe^{2+}).....	33
4.3.2 Quelação do cobre (Cu^{2+}).....	34
4.4. Estabilidade Físico-Química das frações peptídicas Quelantes.....	36
4.4.1. Estabilidade Térmica.....	36
4.4.2 Estabilidade pH.....	38
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, representam um desafio crescente na saúde, sendo caracterizadas pela perda neuronal progressiva e pelo declínio cognitivo. Embora a causa seja multifatorial, o estresse oxidativo é amplamente reconhecido como um mecanismo patológico central, frequentemente intensificado pela desregulação e pelo acúmulo de metais no sistema nervoso central (Olasehinde et al., 2017). Atualmente, as terapias disponíveis para essas patologias são predominantemente sintomáticas, focando na modulação de neurotransmissores sem interromper a progressão da morte neuronal. Além da eficácia limitada a longo prazo, muitos fármacos convencionais apresentam efeitos adversos severos, como distúrbios gastrointestinais, hepatotoxicidade e fadiga crônica, o que compromete a adesão do paciente e a qualidade de vida (Lamptey et al., 2022).

A dispersão de íons metálicos no meio ambiente, decorrente de atividades industriais e tecnológicas, favorece tanto a exposição ambiental quanto disfunções metabólicas que resultam no acúmulo de íons como o ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^{2+}) (Shahriary et al., 2019). Em concentrações excessivas, estes metais tornam-se neurotóxicos ao catalisarem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) via reação de Fenton, gerando radicais hidroxila altamente instáveis (Behl et al., 2022). O sistema nervoso central é particularmente vulnerável a esse fenômeno devido ao seu elevado metabolismo oxidativo e à abundância de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas. A interação dos metais com esses lipídios desencadeia a peroxidação lipídica, que compromete a integridade estrutural e funcional dos neurônios, resultando em danos severos a proteínas e ao DNA, além de promover a agregação proteica patológica (Behl et al., 2022; Cheignon, 2017; Singh et al., 2019).

Diante das implicações patológicas decorrentes do acúmulo de metais, a quelatação metálica surge como uma estratégia terapêutica promissora para a desintoxicação e o controle do estresse oxidativo. Esta abordagem fundamenta-se no sequestro de íons metálicos livres, inativando sua capacidade catalítica. O desenvolvimento de quelantes sintéticos convencionais enfrenta obstáculos clínicos

significativos, pois, diferente de moléculas naturais, muitos quelantes sintéticos apresentam baixa seletividade, removendo minerais essenciais ao organismo e causando desequilíbrios eletrolíticos. Além disso, a toxicidade sistêmica e a baixa permeabilidade na barreira hematoencefálica limitam sua eficácia clínica no tratamento de doenças cerebrais (Ben-Shushan et al., 2021).

Neste contexto, as microalgas surgem como uma promissora solução biotecnológica e sustentável. Estes organismos ocupam vários ecossistemas, e são notáveis por sua alta taxa de crescimento e pela produção de uma grande quantidade de metabólitos (Mata et al., 2010). Diferente de compostos sintetizados quimicamente, os metabólitos de microalgas são reconhecidos por sua biocompatibilidade e baixa toxicidade intrínseca, sendo evolutivamente adaptados para lidar com estresses ambientais por meio de sistemas antioxidantes sofisticados (Ampofo et al., 2022).

O interesse industrial e nutracêutico nesses organismos é impulsionado pela presença de compostos bioativos, como ácidos graxos poli-insaturados, fitopigmentos, e, principalmente, peptídeos e proteínas (Abu-Ghannam et al., 2013). Estes bioativos exibem uma gama de atividades, com destaque para a função antioxidante, antiinflamatória e neuroprotetora (Olasehinde et al., 2017). Tais sequências peptídicas têm despertado atenção especial devido à sua capacidade de modular processos patológicos no sistema nervoso central, atuando na mitigação do estresse oxidativo, na quelação de metais pró-oxidantes e na proteção neuronal contra a toxicidade induzida por radicais livres, fatores determinantes na progressão de doenças neurodegenerativas (Cheignon et al., 2017).

Dessa forma, os peptídeos derivados de microalgas podem atuar como uma solução natural e eficaz para o problema da toxicidade metálica e do estresse oxidativo no sistema nervoso central. Este estudo, portanto visa avaliar o potencial da fração peptídica extraída da microalga *Chlorella vulgaris*, fornecendo uma análise da sua atividade antioxidante e quelante de íons Fe^{2+} e Cu^{2+} , de modo a evidenciar sua eficácia na neuroproteção e justificar sua aplicação como composto nutracêutico.

1.2. Revisão De Literatura

1.2.1. Microalgas

Microalgas são uma vasta e diversa categoria de microrganismos fotossintetizantes (Gonçalves et al.,2023). Elas habitam ambientes marinhos, de água doce e terrestres,, como solo úmido, cascas de árvores, e podem prosperar em condições extremas de temperatura, salinidade e luminosidade (Dolganyuk et al.,2020). Elas são responsáveis por cerca de metade da produção global de oxigênio e da fixação de carbono, sustentando cadeias alimentares aquáticas e terrestres (Naselli-Flores et al.,2022;Metting et al.,1996).

Caracterizadas por uma organização celular complexa e dimensões que variam de 0,5 a 200 μm , as microalgas exibem diversas morfologias, incluindo formas ameboides, cocoides, filamentosas e flageladas (Lin et al., 2018). Essa estrutura, contudo, é dinâmica; as microalgas demonstram alta capacidade adaptativa, alterando sua forma e a composição de sua parede celular conforme a disponibilidade de nutrientes e oscilações de temperatura (Spain et al., 2022).

A parede celular desses organismos pode ser composta por múltiplas camadas, geralmente ricas em polissacarídeos, e em alguns casos, biopolímeros resistentes como a cutina. Também produzem uma série de outros compostos bioativos de interesse, como ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), aminoácidos essenciais, poliaminas, exopolissacarídeos e pigmentos com forte ação antioxidante (Niccolai et al,2019; Lin et al,2018; Spain et al.,2022). Mais do que a presença de macronutrientes, as microalgas destacam-se pela elevada densidade e qualidade biotecnológica de seus componentes (Vaz et al.,2016).

Nos últimos anos, elas ganharam destaque como alternativas sustentáveis para diversos setores industriais. Microalgas como *Chlorella* e *Nannochloropsis* são amplamente utilizadas em suplementos alimentares, ingredientes funcionais, rações animais e aquicultura (Morais Júnior et al.,2020). Estas são fontes promissoras de biodiesel, bioetanol e biogás, destacando-se pela alta produtividade e capacidade de capturar CO_2 , embora desafios econômicos e tecnológicos (Rizwan et al.,2018). Utilizadas no tratamento de efluentes, remoção de poluentes (metais pesados,

pesticidas, fármacos) e captura de carbono, as microalgas podem contribuir para soluções ambientais (Gangl et al., 2015).

1.2.2. Processos de Cultivo e Extração de Microalgas

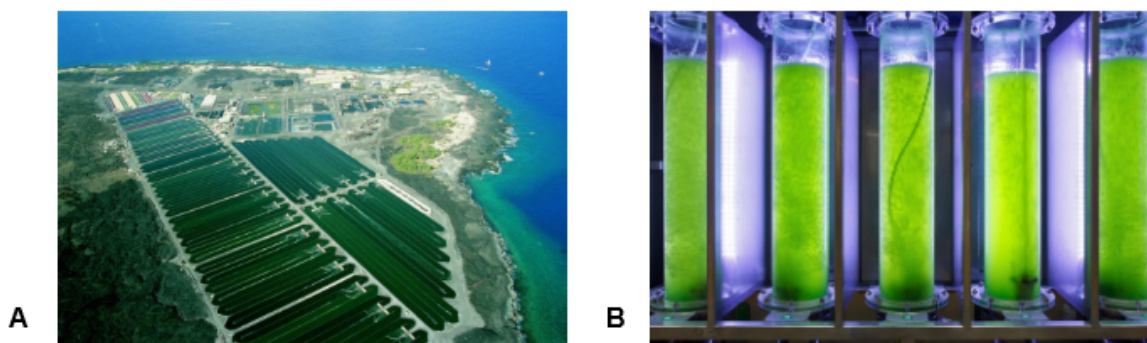
A produção de microalgas inicia-se com a escolha estratégica do sistema de cultivo, que depende diretamente do objetivo final e dos recursos disponíveis. Os métodos são classificados em sistemas abertos e fechados. Os tanques abertos (Figura 1 A) representam uma opção mais simples e econômica, ideal para produção de biomassa em larga escala, apesar de estarem mais suscetíveis a contaminações e oferecem um controle ambiental limitado. Entretanto, os fotobiorreatores fechados (Figura 1 B) destacam-se por permitirem um controle mais rigoroso das condições de cultivo, resultando em maior produtividade e menos contaminação. Embora seu custo seja mais elevado, são a escolha preferencial para a obtenção de compostos de alto valor, como pigmentos e proteínas (Show et al., 2020).

As condições de cultivo das microalgas variam conforme o metabolismo, podendo ser, autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. O crescimento autotrófico baseia-se na utilização da luz como única fonte de energia, convertida em energia química via fotossíntese (Pereira et al., 2012). Já a heterotrofia dispensa a luz em favor de fontes orgânicas de carbono. A mixotrofia, por sua vez, integra as vias autotrófica e heterotrófica, permitindo a utilização simultânea de fontes orgânicas e inorgânicas de carbono. Essa dualidade é uma vantagem estratégica, pois eleva significativamente a taxa de crescimento celular e a produtividade de biomassa em comparação aos métodos isolados (Miao et al., 2016; Perez-Garcia et al., 2011).

Nesse cenário, a *Chlorella vulgaris* destaca-se como uma das microalgas mais promissoras para a biotecnologia. Ela é amplamente reconhecida por sua alta produtividade, resistência a condições adversas e capacidade de crescer em ambientes com baixas concentrações de nutrientes (Zhu et al., 2019). Embora o cultivo autotrófico seja a maneira mais típica de manutenção das cepas, a *C. vulgaris* exibe uma eficiência produtiva notável sob regime mixotrófico, o que facilita

a manipulação de sua composição bioquímica para o enriquecimento de proteínas (Elalami et al., 2021).

Figura 1(A). Tanques abertos aplicados no cultivo de *Spirulina*. Figura 1(B) Fotobiorreatores fechados.



Disponível em: cyanotech

Disponível em: ciclovivo

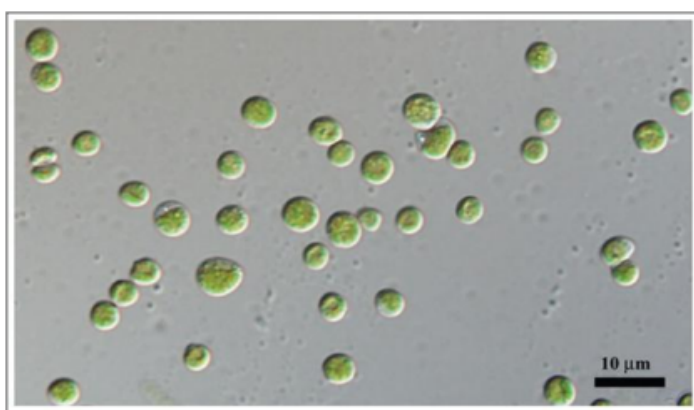
Após a etapa de cultivo, a biomassa é recuperada por métodos como a floculação, incluindo a biofloculação induzida por peptídeos, uma técnica sustentável que minimiza a geração de resíduos químicos e eleva o valor nutricional do produto final. Com a biomassa obtida, a estratégia para a extração de peptídeos exige a ruptura celular, necessária para romper a robusta parede celular da *Chlorella* e liberar o conteúdo intracelular. Esse processo emprega métodos mecânicos, como o ultrassom, ou tratamentos químicos e enzimáticos, visando aumentar o rendimento e a eficiência na liberação de proteínas que, posteriormente, serão hidrolisadas para a obtenção das frações peptídicas de interesse (Corrêa et al., 2020; Tang et al., 2020; Montone et al., 2018).

1.2.3. A Microalga *Chlorella vulgaris*

Conforme Coronado-Reyes et al.(2020). A espécie *Chlorella vulgaris* é uma alga unicelular dulciaquícola pertencente à classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales, família Oocystaceae e gênero *Chlorella*, normalmente apresentando forma de vida celular ou colonial. Sua morfologia apresenta forma esférica com

diâmetro entre 2 à 10 µm (Figura 2) contendo muitas estruturas similares às das plantas. A sua parede celular é rígida, pois apresenta glucosamina na sua composição, com espessura e composição variando de acordo com o seu estágio de crescimento. O citoplasma é composto, basicamente, por água, proteínas e minerais, e apresenta um único cloroplasto em forma de taça com ou sem pirenoides, que contêm os grãos de amido. Ela é uma microalga imóvel, então se reproduz por meio de autósporos assexuados (Safi et al., 2014).

Figura 2. Imagem de microscopia da microalga *Chlorella vulgaris*.



Fonte: HELD & RAYMOND (2011).

Conhecida por seu perfil nutricional diversificado, a microalga *Chlorella vulgaris* apresenta uma composição bioquímica que pode variar de acordo com as condições de cultivo. Geralmente a composição se destaca pelo seu alto teor de proteínas (variando de 21 a 51% do peso seco), carboidratos (13 a 27%) e lipídeos (7 a 36%). Além disso, é rica em pigmentos significativos como clorofilas, carotenoides (luteína, β - caroteno e astaxantina). (Chia et al., 2013). O amido é o polissacarídeo mais abundante em *C. vulgaris*; geralmente está localizado no cloroplasto e é composto de amilose e amilopectina e, junto aos açúcares, servem como armazenamento de energia para as células. (Lordan et al., 2011).

A *C. vulgaris* é amplamente valorizada como suplemento nutricional e imunomodulador, estimulando a resistência a doenças em humanos e animais. Sua versatilidade estende-se à sustentabilidade ambiental e à desintoxicação, atuando na fixação de CO₂, na remoção de nutrientes de efluentes e, na eliminação de

metais pesados do organismo, o que reforça seu potencial biotecnológico multifuncional (Kong et al., 2021; Mendes et al., 2024).

Além dessas propriedades, a *Chlorella vulgaris* apresenta significativa atividade antioxidante e neuroprotetora, atribuída à presença de compostos fenólicos, carotenoides e polissacarídeos que neutralizam radicais livres com eficácia comparável à antioxidantes sintéticos. Esses metabólitos são capazes de reduzir o estresse oxidativo, a inflamação e a apoptose em células neuronais, sendo sua biodisponibilidade aumentada por pré-tratamentos que facilitam a liberação desses compostos durante a digestão (El-Fayoumy et al., 2021; Yuan et al., 2020; Paterson et al., 2024).

1.2.4. Peptídeos Bioativos: Definição e Relevância

Peptídeos são cadeias curtas de aminoácidos, geralmente variando de 2 a 20 unidades. Como a maioria deles possui uma ampla gama de atividades biológicas em organismos vivos, eles são geralmente definidos como peptídeos bioativos.(Moller et al., 2008). De acordo com o Instituto Nacional de Pesquisa Humana, os peptídeos são caracterizados por possuir um átomo de carbono central, um grupo amino, um grupo carboxila e uma cadeia lateral única. Além disso, os peptídeos são moléculas com papéis importantes em diversos processos biológicos. Eles podem funcionar como hormônios, neurotransmissores, enzimas ou moléculas de sinalização. Devido à sua sequência específica de aminoácidos e conformação 3D, os peptídeos bioativos são capazes de interagir com um grande número de macromoléculas biológicas e compostos bioquímicos, modulando diversas funções e condições em organismos vivos (Moller et al., 2008).

A caracterização dos peptídeos bioativos liberados após a hidrólise de proteínas destaca sua ampla gama de atividades biológicas relacionadas a aplicações nutracêuticas e médicas (Maestri et al., 2016). Os Peptídeos são classificados em dois tipos principais: peptídeos endógenos e exógenos. Os peptídeos endógenos são produzidos em diferentes tipos de células, como células neurais (aplicação analgésica/opioide) ou células imunes (papel na inflamação e antimicrobiano), ou em várias glândulas por todo o corpo, como a hipófise e as

glândulas suprarrenais.(Lorenzo et al., 2018) Os peptídeos exógenos entram no corpo de várias fontes, como alimentos, suplementos alimentares e medicamentos (Lorenzo et al., 2018).

Segundo Akbarian et al.(2022),do ponto de vista terapêutico, os peptídeos oferecem diversas vantagens que os tornam mais promissores que os medicamentos tradicionais. Por exemplo, os peptídeos bioativos são notavelmente mais especializados em sua ação no tecido-alvo. Com isso resulta em pouco ou nenhum efeito tóxico, um grande benefício em comparação com muitos fármacos convencionais. E também, estes são eficazes mesmo em baixas concentrações, se tornando vantajoso no tratamento de doenças crônicas.

1.2.5. Métodos de Obtenção de Peptídeos de Fontes Naturais

Técnicas físicas como trituração de esferas, homogeneização sob alta pressão, ultrassom e ciclos de congelamento e descongelamento são amplamente utilizadas para romper a parede celular das microalgas, favorecendo a liberação de proteínas. Métodos como trituração e homogeneização sob alta pressão exibem altos rendimentos e são facilmente ampliáveis para aplicações industriais. Entretanto, o ultrassom destaca-se pela versatilidade, podendo ser combinado com outras técnicas para estender a eficiência do processo através do fenômeno da cavitação, que gera microfissuras na estrutura celular (García et al., 2018; Anjos et al., 2022). Atualmente, a tendência biotecnológica aponta para o uso dessas técnicas como um pré-tratamento, visando reduzir o tempo de exposição química e aumentar a acessibilidade das ligações peptídicas para as etapas subsequentes. (Costa et al.,2024; Spínola et al.,2023).

A extração química comumente utiliza soluções alcalinas ou ácidas para solubilizar proteínas e peptídeos de tecidos vegetais, animais ou marinhos. A hidrólise alcalina é rentável, podendo atingir rendimentos de até 81%, mas pode resultar em degradação de proteínas e produção de peptídeos de baixo peso molecular. A hidrólise ácida é mais recomendada para extração de carboidratos, pois pode degradar proteínas mesmo em temperaturas moderadas. O ajuste de pH é também uma estratégia comum para aumentar a solubilidade proteica, sendo

combinado com métodos físicos para potencializar o rendimento.(Rojo et al.,2023;Amorim et al.,2020,Sable et al.,2017).

De acordo com Li et al. (2019), a hidrólise enzimática utiliza enzimas específicas, como alcalase, pepsina e celulase, para clivar proteínas em peptídeos bioativos. Este método é amplamente difundido no processamento de alimentos, resíduos de frutas e organismos marinhos, sendo reconhecido por preservar a integridade estrutural e a bioatividade das moléculas. Além de possibilitar a obtenção de frações com propriedades antioxidantes e emulsificantes, a eficiência deste processo depende rigorosamente da concentração enzimática, das condições de pH e do tempo de reação.

A hidrólise enzimática consolida-se como a principal estratégia para a obtenção de sequências funcionais em *C. vulgaris*, resultando em peptídeos de baixo peso molecular com atividades incluindo ações antioxidantes, anti-hipertensivas e inibitórias de enzimas associadas ao envelhecimento (Cunha et al., 2022).

Após a etapa de hidrólise, o extrato resultante compreende uma mistura heterogênea de peptídeos de diversos comprimentos. O emprego de técnicas de separação por membrana, como a ultrafiltração, torna-se indispensável para isolar e concentrar frações que sejam por exemplo inferiores a 3 kDa. O desenvolvimento do hidrolisado com essas frações de baixo peso molecular é uma etapa determinante para o desenvolvimento de agentes neuroprotetores (Alavi et al.,2022;Picot et al,2010).

1.2.6. Doenças Neurodegenerativas

As Doenças neurodegenerativas constituem um grupo heterogêneo de doenças do sistema nervoso central, marcadas pela degeneração progressiva e irreversível de neurônios, levando a déficits motores, cognitivos e comportamentais. Entre os exemplos mais prevalentes estão a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (DH), esclerose múltipla (EM) e acidente vascular cerebral isquêmico, que afetam milhões

de pessoas globalmente e representam um grande desafio de saúde pública devido à ausência de cura e ao impacto debilitante sobre a qualidade de vida (Slanzi,2020;Pathak et al.,2021;Bourdenx et al.,2017).

A formação e acúmulo de agregados proteicos anormais são considerados fatores centrais na patogênese das Doenças Neurodegenerativas, promovendo toxicidade neuronal e propagação da degeneração por diferentes regiões cerebrais. Esses agregados podem envolver proteínas como β -amiloide, tau, α -sinucleína e TDP-43, variando conforme a doença (Bourdenx et al.,2017;Dugger,2017)

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas derivadas do oxigênio, incluindo radicais livres como o radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e outros. Elas são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, especialmente nas mitocôndrias, e desempenham papéis fisiológicos na sinalização celular e na defesa imune. No entanto, quando a produção de ROS excede a capacidade do organismo de neutralizá-las por meio de sistemas antioxidantes, ocorre o chamado estresse oxidativo, resultando em danos celulares, morte celular e desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo distúrbios neurológicos (Singh,2019;Afzal,2023; Jomová et al.,2024).

Íons metálicos como ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn) são micronutrientes essenciais para o cérebro, atuando como cofatores enzimáticos, reguladores de neurotransmissão, metabolismo energético, síntese de proteínas e defesa antioxidante.(Mezzaroba et al.,2019). A homeostase rigorosa desses metais é fundamental para a integridade neuronal e funções cognitivas normais. Quando ocorre acúmulo ou distribuição inadequada desses metais, há ativação de vias de estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e agregação de proteínas patológicas, processos centrais na neurodegeneração (Wang et al.,2019;Chen et al., 2025).

1.2.7. Neuroproteção e o Potencial de Peptídeos

A neuroproteção se refere a estratégias e intervenções que visam prevenir ou limitar o dano aos neurônios, restaurar sua função e até estimular sua regeneração.

O objetivo é desacelerar ou impedir a progressão de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica e Parkinson, das quais ainda não existe curas definitivas.(Dash et al.,2024; Sairazi et al.,2020; Nabavi et al.;2018).

Apesar da fisiopatologia não ser totalmente conhecida, a maioria dos estudos sobre diversos modelos de distúrbios neurais que replicam características significativas de doença, identificaram elementos essenciais como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação.(Dash et al.,2024). Uma grande quantidade de doenças neurodegenerativas estão relacionadas ao estresse oxidativo. Compreender o impacto deste estresse nesses distúrbios é fundamental para desenvolver novos métodos de tratamento.(Uttara et al.,2009).

De acordo com Pyatha et al.(2022) a doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa progressiva destacada pela perda da coordenação motora e sintomas não motores,em que a causa,embora incerta,está amplamente ligada à exposição e acúmulo cerebral de toxinas ambientais,principalmente metais pesados como ferro, mercúrio, manganês, cobre e chumbo. Esses metais individualmente ou em conjunto com outros elementos, têm sido associados à maior prevalência e progressão da DP em estudos epidemiológicos,agindo pela ativação de citocinas pró-inflamatórias que causam neuroinflamação e perda neuronal. E também desregulam a homeostase redox, promovendo estresse oxidativo, dano ao DNA, apoptose e disfunção mitocondrial,gerando distúrbios neurodegenerativos.

Peptídeos bioativos podem sequestrar radicais livres e diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), protegendo as células neuronais do estresse oxidativo. Além disso, modulam vias antioxidantes, como ativação do fator de transcrição NRF-2, que regula a expressão de enzimas antioxidantes.(Wang et al.,2021). Peptídeos bioativos podem inibir enzimas associadas à progressão de doenças neurodegenerativas,como beta-secretase (BACE-1),acetilcolinesterase (AChE) e monoamina oxidase (MAO).(Wang et al.,2021; Perlikowska,2021). Os Peptídeos de baixo peso molecular (<1 kDa) e peptídeos sintéticos podem ser projetados para maior penetração na barreira hematoencefálica,ampliando sua eficácia neuroprotetora. (Perlikowska,2021; Lee et al.,2019).

1.2.8. Justificativa

A procura por novas fontes naturais dessas frações peptídicas é uma área de grande interesse, sobretudo aquelas que apresentam um perfil de segurança favorável e são sustentáveis. Estudos na área de compostos bioativos de microalgas têm ganhado grande destaque em função de seu potencial de aplicação na saúde humana. Dentre esses compostos, alguns têm demonstrado uma série de atividades biológicas, englobando atividades neuroprotetoras, como por exemplo os peptídeos, definidos como cadeias curtas de aminoácidos.

A *Chlorella vulgaris* é reconhecida por sua alta composição nutricional, incluindo vitaminas, minerais, proteínas e antioxidantes. Alguns estudos indicam a presença de peptídeos bioativos em *Chlorella* com muitas funcionalidades, porém seu potencial neuroprotetor, sobretudo através da quelação de metais, ainda é pouco explorado. Considerando que a patogênese de doenças como Alzheimer e Parkinson está intimamente ligada ao acúmulo cerebral de cobre e ferro, que catalisam a formação de radicais livres e estimulam o estresse oxidativo; a busca por quelantes naturais torna-se fundamental.

Diante do exposto, este projeto justifica-se pela necessidade de investigar o potencial terapêutico de fração peptídica obtida de *C.vulgaris*. A extração, caracterização da estabilidade físico-química, atividade antioxidante e, sobretudo, a avaliação da capacidade de quelação de ferro e cobre dessas moléculas visam ampliar o conhecimento científico sobre o uso desta microalga como fonte de agentes neuroprotetores. Nesse sentido, a análise da estabilidade peptídica sob diferentes condições é fundamental para determinar sua viabilidade em futuras aplicações farmacêuticas e biotecnológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Extrair e avaliar frações peptídicas da microalga *C. vulgaris*, quanto a sua estabilidade físico-química e potencial neuroprotetor através da atividade antioxidante e da capacidade de quelação de metais (Fe^{2+} e Cu^{2+}).

2.2. Objetivos específicos

- Extrair fração peptídica presente na microalga *C. vulgaris*;
- Determinar a atividade antioxidante das fração peptídica;
- Determinar a atividade quelante de ferro da fração peptídica;
- Determinar a atividade quelante de cobre da fração peptídica;
- Avaliar a fração peptídica em relação a estabilidade frente a variações de temperatura e pH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção da biomassa

A microalga *Chlorella vulgaris* (UTEX 1803) foi cultivada em meio BBM-Bold's Basal Medium (Bischoff & Bold, 1963). As condições de cultivo foram mantidas constantes, com uma concentração celular de 50 mg.L⁻¹, temperatura de 28±2°C e intensidade luminosa de 45±5 µmol de fótons. Ao atingirem a fase exponencial de crescimento, as células foram secas e concentradas para análises subsequentes.

3.2. Preparação das frações ricas em peptídeos de baixo peso molecular

O método de extração foi conduzido conforme descrito por Zhang et al. (2018), com algumas modificações. A biomassa seca (1g) foi ressuspensa em 10 mL de tampão Tris-HCl (0,2 M pH 7,2) e submetida a um processo de sonicação durante 6 segundos, com pausas de 9 segundos, totalizando um tempo de 30 minutos (Sonicador Bandelin Sonoplus Ultrasonic homogeneizador HD 2070 electrónico, Alemanha, potência 70 W 20 kHz). O sobrenadante foi submetido a ultrafiltração através de uma membrana AMICON (Millipore, Canadá), com porosidade (cut off) de 3000 Da, esse processo ocorreu a 6000 rpm a 4°C durante 50 minutos. Posteriormente as frações foram liofilizadas e armazenadas para análises posteriores.

3.3. Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas das amostras foi determinado pelo kit de reagentes de proteína BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC).

3.4. Ensaio antioxidante

A capacidade antioxidante da fração peptídica (F.P.) de *Chlorella vulgaris* e da sua fração purificada foi determinada através de ensaios de captura de radicais livres,

conduzidos em triplicata. Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição e IC_{50} .

A atividade sobre o radical DPPH foi avaliada seguindo a metodologia proposta por Joshi, Rana e Gulati (2015), com adaptações. Para a reação, 30 μ L de amostra (fração peptídica e fração purificada), em concentrações variando de 31,25 a 1000 μ g/ml foram adicionadas a 30 μ L de uma solução de DPPH 0,1 mM preparada em Metanol. As amostras foram incubadas em ambiente escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada a 517 nm em espectrofotômetro (VWR® UV-1600PC). O Ácido Ascórbico foi utilizado como padrão de referência. Para cada amostra, foi preparado um branco (amostra + metanol) para a correção da cor intrínseca dos frações peptídicas. A porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 1: $\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$ onde A_0 é a absorbância do controle (DPPH + solvente) e A_1 é a absorbância da amostra.

A atividade antioxidante frente ao radical ABTS foi realizada conforme o método de Re et al. (1999). O cátion radical foi gerado previamente pela reação de uma solução de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 2,45 mM, mantida no escuro por 14 a 16 horas. Previamente ao ensaio, a solução foi diluída em tampão fosfato salino (PBS, 5 mM, pH 7,4) até obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,2$ a 734 nm. Para o ensaio, 10 μ L de cada amostra (fração peptídica e fração purificada) foram adicionados a 1 mL da solução de ABTS e incubados a 25 °C por 6 minutos. A absorbância foi medida a 734 nm. O Trolox foi utilizado como padrão de referência antioxidante. A capacidade de inibição foi calculada subtraindo o sinal do branco da amostra, conforme a Equação 2: $\% = \left[\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right] \times 100$. Onde A_1 é a absorbância do branco e A_2 é a absorbância da amostra.

3.5. Atividade quelante de ferro (Fe^{2+})

O ensaio foi determinado medindo-se a formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina (Santos et al., 2017). Inicialmente, 50 μ L de peptídeo em diferentes concentrações foram adicionados em uma placa de 96 poços, seguido pela adição de 160 μ L de

água destilada e 20 µL de FeSO₄ (0,3 mM) em triplicata. Após 5 minutos de reação, 30 µL de solução ferrozina (0,8 mM) foi adicionado. A absorbância foi lida em 562 nm após 15 min de reação. Uma diminuição na absorbância corresponde a um aumento na capacidade quelante de ferro. A porcentagem de formação do complexo Fe²⁺-ferrozina foi calculada como: $\% \text{Fe}^{2+} = \frac{A1-A0}{Ac} \times 100$, onde A1 é a absorbância da amostra, A0 é a absorbância sem a ferrozina e Ac é a absorbância do controle. Seis concentrações de ácido etilenodiamina tetra-acético dissódico (EDTA-Na₂) foram utilizados como padrão. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de EDTA/mL de proteína (mg EDTA/mL).

3.6. Atividade quelante de cobre (Cu²⁺)

A capacidade dos extratos de *C. vulgaris* de quelar Cu²⁺ foi avaliado usando o método que emprega violeta pirocatecol (PV) como agente cromogênico (Santos et al., 2017). Em uma placa de 96 poços, 30 µL de peptídeo em diferentes concentrações foi adicionado com 200 µL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 6). Em seguida, 30 µL de de CuSO₄ · 5H₂O (100 mg/mL) foi adicionado à placa. Após 2 min, 8,5 µL de solução PV (2 mM) foi adicionado para iniciar a reação. A microplaca foi incubada por 10 min a 25°C em agitação e posteriormente a absorbância foi lida em 632 nm. A porcentagem da formação do complexo Cu²⁺-PV foi calculado como: $\% \text{Cu}^{2+} = \frac{A1}{Ac} \times 100$, onde A1 é a absorbância da amostra e Ac é a absorbância do controle. Sete concentrações de EDTA-Na₂ foram utilizados como padrão. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de EDTA/mL de proteína (mg EDTA/mL).

3.7. Avaliação das frações peptídicas quanto à pH e temperatura.

A avaliação do efeito do pH nas frações peptídicas foi realizado em diferentes tampões de pH variando de 3 a 12, como segue: tampão Citrato fosfato (pH 3–5), tampão Tris HCl (pH 6–8) e tampão glicina-NaOH (pH 9–12) a 20mM. Uma alíquota da fração foi misturada com igual volume do tampão e incubada por 30 min, e a atividade quelante de ferro foi medida. Para avaliar o efeito da temperatura, as

frações peptídicas foram colocadas em banho-maria a diferentes temperaturas (60 °C, 80 °C e 100 °C) por 30, 60 e 90 min. Após a incubação, a amostra foi avaliada quanto à capacidade quelante de ferro e a atividade foi comparada com o controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processamento da Biomassa de *C. vulgaris*

O cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio BBM atingiu a fase exponencial de crescimento, resultando em uma biomassa metabolicamente ativa e apta para o processamento. A estratégia de lise celular por sonicação, associada ao fracionamento por ultrafiltração (3 kDa), permitiu o isolamento de uma fração com peptídeos de baixo peso molecular.

4.2. Atividade Antioxidante

O ensaio DPPH baseia-se na redução do radical, que possui coloração violeta, para a forma reduzida hidrazina, de coloração amarela, monitorada por meio da diminuição da absorbância a 517 nm. Os resultados demonstraram que a F.P. possui uma eficácia notável. A fração atingiu a inibição máxima nas maiores concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL, igualando-se ao desempenho do Ácido Ascórbico nestas dosagens. Um dos pontos de interesse foi a persistência da atividade em altas diluições, mesmo na menor concentração testada, a F.P. conservou uma inibição de 52,7%, o que situa o seu valor de IC₅₀ abaixo de 31,25 µg/mL.

A análise da Fração Purificada reforçou a eficiência do processo de isolamento de peptídeos ativos. A amostra purificada apresentou uma inibição de 70,9% a 226 µg/mL. Notavelmente, mesmo sob diluição menores, a fração purificada ainda foi capaz de neutralizar 36,2% dos radicais DPPH. Comparativamente, o padrão Ácido Ascórbico apresentou 100% de inibição até a marca de 250 µg/mL, com uma oscilação em 31,25 µg/mL (94,2%), evidenciando que os peptídeos de *C. vulgaris* operam em uma potência muito próxima à de antioxidantes de referência.

A performance no ensaio DPPH sugere que a fração peptídica de *C. vulgaris* é composta por sequências ricas em aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos. De acordo com a literatura, resíduos como Prolina (Pro), Tirosina (Tyr) e Fenilalanina

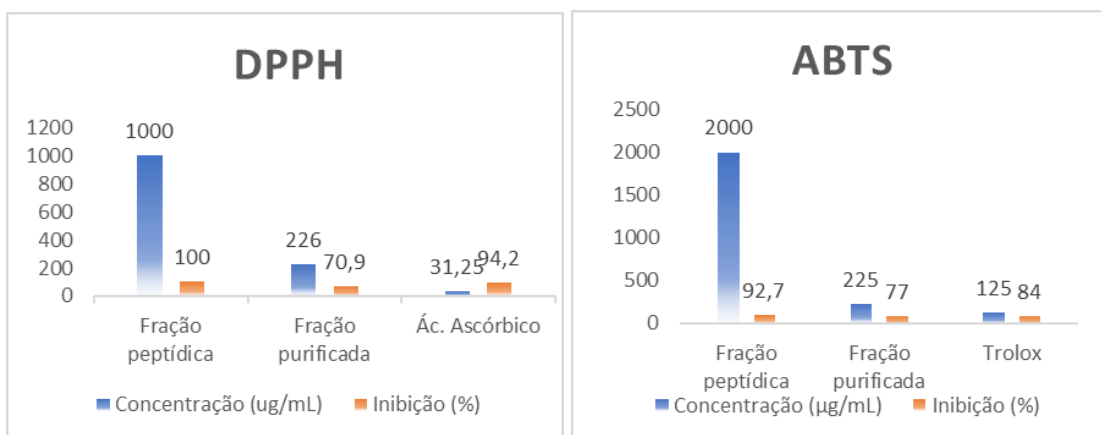
(Phe) facilitam a interação com o radical DPPH no ambiente orgânico da reação.(Hu et al., 2019; Ko et al., 2012).

No método ABTS a amostra purificada, na concentração de apenas 225 µg/mL, apresentou uma inibição de 77%, um valor significativamente maior aos 14,9% observados para a fração não purificada na mesma faixa de concentração (250 µg/mL). Sob diluições maiores (250 a 125 µg/mL), observou-se uma queda abrupta na capacidade de neutralização (14,9% e 11,7%, respectivamente).

O padrão Trolox atingiu quelação total em concentrações a partir de 250 µg/mL e mantendo 42% de atividade. Embora a fração bruta apresente uma potência menor que o padrão puro, os resultados de *C. vulgaris* são promissores, especialmente ao observar o desempenho da fração purificada.

A comparação entre os perfis revela uma discrepância notável de sensibilidade entre os dois sistemas radicais, evidenciando que a fração peptídica de *C. vulgaris* possui uma eficácia significativamente superior frente ao radical DPPH. Enquanto a neutralização do ABTS exigiu uma concentração próxima a 500 µg/mL para atingir o IC₅₀, o ensaio DPPH demonstrou o IC₅₀ situado abaixo de 31,25 µg/mL e saturação de resposta 100% em dosagens onde o ABTS ainda apresentava atividade introdutória (Gráfico 1).

Gráfico 1. Atividade antioxidante em porcentagem de captura do radical DPPH e ABTS.



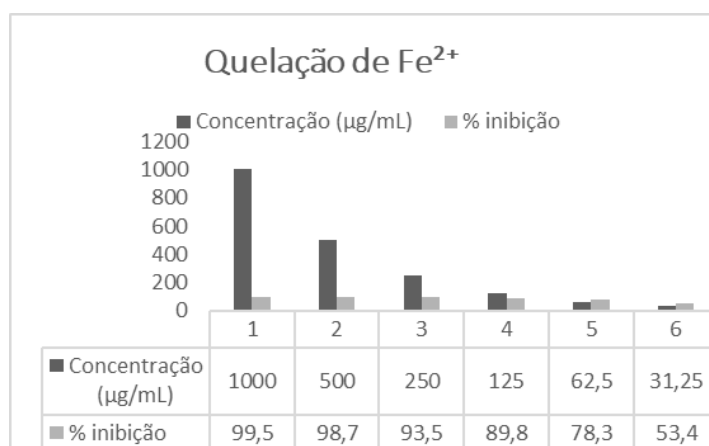
Essa seletividade sugere que as frações peptídicas obtidas possuem uma natureza predominantemente hidrofóbica. Uma vez que o ensaio DPPH é conduzido em meio metanólico, ele favorece a interação com resíduos de aminoácidos apolares, os quais parecem ser os principais na doação de prótons/elétrons desta biomassa. Em contrapartida, a menor performance no sistema aquoso do ABTS indica que, embora presentes, as frações hidrofílicas contribuem de forma secundária para o potencial redutor direto da fração. A predominância de frações hidrofóbicas é uma característica estratégica, pois favorece a travessia da barreira hematoencefálica e das membranas neuronais permitindo que as frações peptídicas atuem diretamente contra a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo no sistema nervoso central (Wu et al.,2023).

4.3 Atividade Quelante de (Fe^{2+} e Cu^{2+}) das frações peptídicas de *C. vulgaris*

4.3.1. Quelação do Ferro (Fe^{2+})

A capacidade da fração peptídica de *C. vulgaris* em sequestrar íons ferro foi determinada pela inibição da formação do complexo cromogênico Fe^{2+} -ferrozina. A validade do ensaio foi confirmada utilizando o EDTA- Na_2 como padrão de referência, o qual exibiu quelação máxima em concentrações a partir de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, validando a funcionalidade do sistema. O controle negativo, apresentou uma absorbância média de 0,5906 no comprimento de onda de 562 nm, servindo como linha de base para o cálculo das atividades.

Os resultados revelaram que a fração peptídica possui um potencial quelante de (Fe^{2+}) elevado e dose-dependente (Gráfico 2). Na concentração máxima testada (1000 $\mu\text{g/mL}$) a fração atingiu 99,5 % de inibição, demonstrando uma afinidade pelo metal. Notavelmente, a eficiência manteve-se expressiva mesmo sob as diluições: a 250 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, os percentuais de quelação foram de 93,5% e 78,3%, respectivamente. Seguidamente, mesmo na dosagem mínima de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, a fração ainda foi capaz de sequestrar mais da metade dos íons livres (53,3%), evidenciando que os peptídeos apresentam uma alta afinidade pelo íon (Fe^{2+}), mantendo a eficácia quelante em baixas dosagens, confirmando a correlação entre a concentração do peptídeo e sua eficiência.

Gráfico 2: Porcentagem de Inibição da Quelação de Fe²⁺

Este desempenho, especialmente em baixas concentrações, sugere que o processamento da biomassa de *C. vulgaris* resultou em uma fração enriquecida com peptídeos cujas sequências de aminoácidos são altamente otimizadas para a coordenação metálica. A presença provável de resíduos de histidina e aminoácidos ácidos (aspartato e glutamato) favorece a formação de complexos estáveis, neutralizando a reatividade do Fe²⁺. Do ponto de vista biológico, este sequestro é crucial, uma vez que o ferro bivalente é o principal catalisador da Reação de Fenton, responsável pela geração de radicais hidroxila; esses radicais são agentes oxidantes capazes de degradar muitos compostos orgânicos e são frequentemente aplicados em processos de oxidação avançada. (Gulcin, 2022; Deng, 2023).

Ao inativar o Fe²⁺ de forma tão eficaz, os peptídeos da *C. vulgaris* atuam como antioxidantes indiretos e potenciais agentes neuroprotetores. Em patologias neurodegenerativas, onde a homeostase do ferro está frequentemente comprometida, a capacidade desta fração em impedir a propagação de cascatas oxidativas reforça sua viabilidade para futuras aplicações terapêuticas e nutraceuticas (Apone, 2019; García-Encinas, 2025).

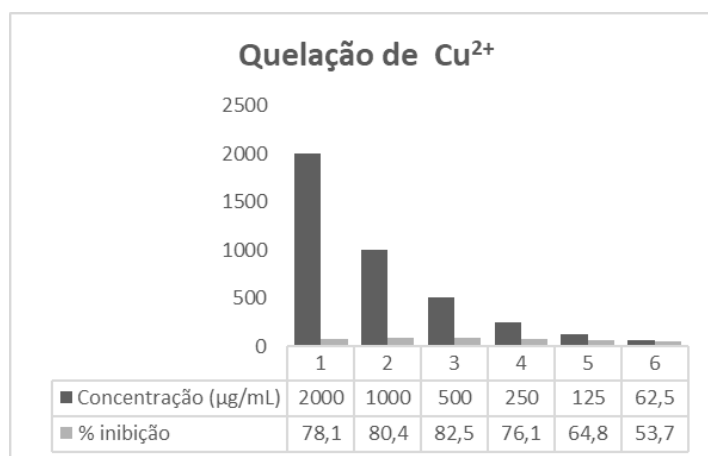
4.3.2 Quelação do cobre (Cu²⁺)

O potencial da fração peptídica em quelar íons cobre (Cu²⁺) foi avaliado utilizando o Violeta Pirocatecol (PV) como agente cromogênico. O ensaio

fundamenta-se na competição entre a fração e o PV pelo metal; uma quelação eficaz impede a formação do complexo corante-metal, medida pela diminuição da absorbância em 632nm.

Os dados experimentais revelaram que a fração peptídica possui uma forte capacidade de sequestro de Cu^{2+} , atingindo um ápice de inibição de 82,5% na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Observou-se que a atividade estabilizou-se em torno de 78,1% na dosagem máxima de 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 3), sugerindo um possível efeito de saturação dos sítios de ligação ou um equilíbrio termodinâmico específico entre o peptídeo e o indicador PV sob concentrações elevadas (Cimmperman et al.,2008) No entanto, a eficácia manteve-se notável mesmo em altas diluições, conservando uma capacidade de quelação de 53,7% na concentração mínima de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, o que confirma a presença de sítios ativos com afinidade significativa pelo cobre.

Gráfico 3: Porcentagem de Inibição da Quelação de Cu^{2+}



A confiabilidade analítica dos resultados foi assegurada pela avaliação dos controles internos. O Controle Negativo, contendo apenas Cu^{2+} e PV, registrou uma absorbância média de $1,755 \pm 0,03$, representando o estado de saturação máxima do complexo metálico colorimétrico. Em contraste, a adição da fração peptídica promoveu uma redução dose-dependente nesses valores, confirmando a captura dos íons pela fração de *C. vulgaris*.

Na patofisiologia das doenças neurodegenerativas, especialmente na Doença de Alzheimer, a quelação de cobre é uma estratégia terapêutica crucial.

(Atrián-Blasco, 2018). O Cu^{2+} livre é conhecido por interagir diretamente com o peptídeo beta-amiloide, catalisando sua agregação em placas senis e promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) via reações do tipo ascorbato-oxidação (Viles, 2012). Do ponto de vista estrutural, a habilidade da Fração em modular o cobre pode ser atribuída à provável presença de aminoácidos como histidina, cisteína e resíduos polares, que atuam como doadores de elétrons para o cátion Cu^{2+} (Haas et al., 2011).

Ao comparar os dois perfis de quelação, observa-se que, embora a fração de *C. vulgaris* seja um quelante multimetálico eficaz, ela possivelmente exibe uma seletividade, com afinidade superior pelos íons Fe^{2+} em comparação ao Cu^{2+} . Esta variação sugere que a fração possui uma composição peptídica heterogênea, capaz de modular simultaneamente os dois principais metais de transição envolvidos na toxicidade neuronal.

4.4. Estabilidade Físico-Química das frações peptídicas Quelantes

4.4.1. Estabilidade Térmica

A viabilidade da aplicação de biocompostos em processos industriais e terapêuticos depende de sua estabilidade frente a variações de temperatura. Nesse sentido, a fração peptídica de *C. vulgaris* foi submetida a diferentes regimes térmicos (60 °C, 80 °C e 100 °C) por um período prolongado de 30, 60 e 90 min., avaliando-se a preservação de sua capacidade de coordenar íons Fe^{2+} .

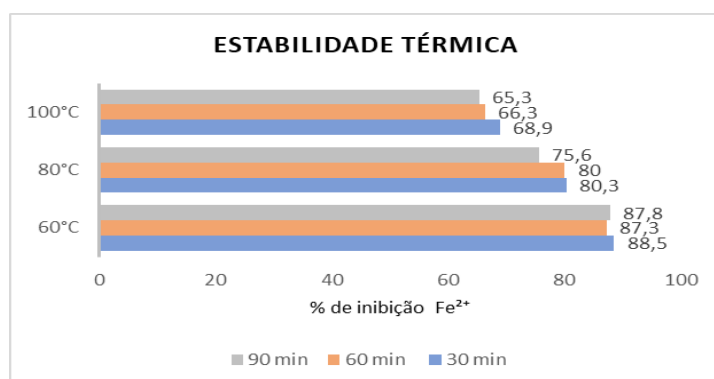
Sob condições de aquecimento moderado (60 °C), a fração exibiu uma termoestabilidade notável, mantendo níveis de bioatividade inalterados ao longo do tempo. A quelação inicial de 88,5% (30 min) apresentou variações mínimas, registrando 87,3% após 60 minutos e 87,8% após 90 minutos de exposição. Comportamento similar foi observado a 80 °C. Mesmo sob esse estresse, a inibição da formação do complexo ferro-ferrozina permaneceu resistente, flutuando entre 87,3% e 89,6% até o término do ensaio. Estes dados confirmam que a exposição prolongada ao calor moderado não induz a degradação dos sítios ativos ou a perda de função quelante.

Como padrão de referência (Controle Positivo), utilizou-se a fração mantida à temperatura ambiente, a qual registrou uma capacidade quelante inicial de $89,1 \pm 0,5\%$. A semelhança entre os resultados a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a amostra controle sugere que o estresse térmico nessas faixas não induz a degradação dos sítios ativos e a diminuição da função quelante.

A resistência funcional observada a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sugere que a exposição térmica não foi suficiente para comprometer a estrutura primária dos peptídeos. Diferente de proteínas globulares complexas ou enzimas, cuja perda de função é acelerada pela desnaturação de suas estruturas terciárias e quaternárias, a atividade quelante depende primordialmente da acessibilidade de grupos funcionais específicos, como carboxilas e aminas da cadeia principal e lateral. (Almubarak et al., 2022). Como a função está ancorada na integridade das ligações peptídicas e na sequência de aminoácidos, os sítios de coordenação do Fe^{2+} tendem a permanecer íntegros e funcionais (Almubarak et al., 2022; Tian et al., 2021).

Contudo, ao submeter a fração a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, observou-se um perfil de estabilidade diferente. Registrou-se uma redução inicial na capacidade quelante para $70,9\%$ nos primeiros 30 minutos, indicando que o calor intenso pode induzir rearranjos conformacionais ou processos de agregação que limitam parcialmente o acesso aos sítios ativos (Zapadka et al., 2017). No entanto, a atividade restante demonstrou-se altamente estável ao longo do tempo. Manteve-se em $67,3\%$ após 90 minutos de exposição térmica de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gráfico 4). Este comportamento revela a existência de peptídeos termoestáveis cujas propriedades quelantes são preservadas mesmo sob condições de estresse térmico.

Gráfico 4: Estabilidade Térmica da atividade quelante



A comparação com a literatura reforça a singularidade dos peptídeos de *C. vulgaris*. Singh e Vij (2018) observaram um aumento na atividade antioxidante de peptídeos de soja a 75°C e 100 °C, atribuindo o fenômeno a uma hidrólise térmica adicional que liberaria novas sequências ativas. Em contraste, os resultados para a *C. vulgaris* indicam que a ultrafiltração foi altamente eficiente, uma vez que a sua atividade não se intensificou com o aumento da temperatura, mas que se manteve estável em várias faixas de temperatura. Adicionalmente, deve-se considerar que a quelação metálica exige uma conformação e orientação espacial específica dos grupos ligantes, sendo um mecanismo mais sensível à agregação térmica do que o sequestro de radicais livres (Wang et al.,2020).

Portanto, a manutenção de uma alta eficácia quelante em 60 °C e 80 °C, aliada à resistência demonstrada a 100 °C, classifica a fração peptídica de *C. vulgaris* como um agente termorresistente. Essa característica representa uma vantagem estratégica, assegurando que o potencial nutracêutico e neuroprotetor do material seja preservado durante etapas rigorosas de processamento térmico industrial (García-Encinas, 2025).

4.4.2 Estabilidade pH

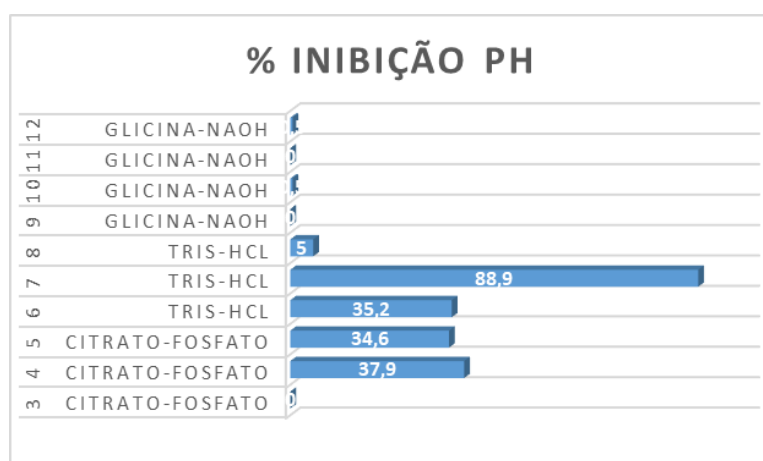
A manutenção da bioatividade em diferentes ambientes químicos é um requisito fundamental para a aplicação de peptídeos como ingredientes nutracêuticos. Para determinar a viabilidade funcional da fração peptídica frente às variações de pH, adotou-se um protocolo que avaliou, de forma independente, a atividade do tampão isolado, da reação (peptídeo + tampão) e do peptídeo em água (controle).

Os dados demonstram que a capacidade quelante da fração é altamente sensível à variação de pH, apresentando sua eficácia máxima em pH 7,0 (88,9%). Este valor é estatisticamente comparável à atividade do peptídeo em água destilada (88,0%), indicando que a neutralidade é a condição ideal para a formação do complexo peptídeo-metal. Segundo Silva et al.(2020), a estabilidade demonstrada em pH neutro e a resistência parcial em ambientes moderadamente ácidos são resultados promissores para o contexto neuroprotetor. Uma vez que na corrente

sanguínea e no sistema nervoso, onde o pH é mantido próximo a 7,4, os peptídeos estariam em sua condição de performance máxima para exercer a quelação de metais pró-oxidantes.

Em contrapartida, observou-se uma redução significativa da atividade em meios ácidos. No intervalo de pH 4 a 5 (tampão citrato-fosfato), a capacidade quelante corrigida situou-se em torno de 37,9% e 34,6%, respectivamente (Gráfico 5). Essa queda ocorre devido à alta concentração de prótons, que competem diretamente com o ferro pelos sítios de ligação. Estruturalmente, os grupos carboxílicos presentes nas cadeias laterais, como aspartato e glutamato, tornam-se protonados em pH baixo, perdendo sua carga negativa e, consequentemente, sua afinidade eletrostática pelo metal.

Gráfico 5. Efeito do pH na capacidade quelante de íons Fe^{2+} da fração peptídica de *C. vulgaris*.



Além disso, a natureza química dos sais do tampão citrato-fosfato exerce um papel competitivo em pH 3 a 5; o citrato, sendo um quelante de baixa massa molar, pode sequestrar o ferro e impedir a coordenação efetiva pelos peptídeos, que sofrem maior repulsão eletrostática sob acidez extrema. Contudo, a manutenção de cerca de 35% de atividade nessas faixas é biologicamente relevante, pois sugere que uma fração significativa das moléculas chegaria funcional ao local de absorção após enfrentar o ambiente gástrico (pH 1,5 a 3,5). (Silva et al., 2020; Tian et al., 2021; Singh & Vij, 2018).

O decréscimo maior, entretanto, ocorreu em condições alcalinas ($\text{pH} > 7$). Em pH 8, a atividade caiu para apenas 5%, e em valores superiores (pH 9 a 12), a contribuição do peptídeo foi nula após a correção. Mesmo sendo o pH alcalino teoricamente favorável à desprotonação de grupos amino, esta falha deve-se à química de especiação do ferro. Em concentrações elevadas de íons hidroxila, o ferro sofre hidrólise e forma precipitados insolúveis de hidróxido de ferro, tornando-se indisponível para a interação com o peptídeo (Raineri et al, 2019).

Adicionalmente, a interferência do tampão glicina- NaOH (acima de 90%) mascara qualquer efeito da fração nessas faixas. De acordo com Chen et al. (2007), a glicina, por ser um aminoácido mais simples, forma quelatos estáveis com metais de transição através de seus grupos amino e carboxílico em pH elevado, gerando uma "atividade de fundo" que atinge o limite de saturação do sistema. Assim, enquanto o pH ácido ainda permite alguma atividade pela disponibilidade de sítios não saturados por prótons, o pH alcalino dificulta a quelação tanto pela precipitação do metal quanto pela saturação competitiva do meio, confirmando a neutralidade como o ponto de equilíbrio funcional para esses peptídeos.

5. CONCLUSÃO

A investigação da fração peptídica obtida da microalga *Chlorella vulgaris* confirmou o seu potencial como agente antioxidante e quelante metálico. Através dos processos de extração e avaliação, foi possível isolar uma fração peptídica de baixa massa molecular e por meio dos ensaios de captura de radicais, demonstrou-se potência antioxidante superior no sistema DPPH, indicando a predominância de sequências hidrofóbicas eficazes na doação de elétrons e hidrogênios. A capacidade de quelação de metais de transição revelou-se igualmente expressiva, atingindo inibições superiores a 80% tanto para o ferro (Fe^{2+}) quanto para o cobre (Cu^{2+}), metais cujos desequilíbrios homeostáticos são centrais na patofisiologia de doenças neurodegenerativas. Os ensaios de estabilidade comprovaram a eficácia da fração peptídica. A preservação da atividade quelante em altas temperaturas, aliada à manutenção de cerca de 35% da efetividade em meios moderadamente ácidos (pH 4 a 6), sugere que os peptídeos possuem estabilidade estrutural para resistir ao processamento térmico e ao trânsito gástrico. No entanto, o ponto de máxima performance funcional ocorre em pH neutro, o que é particularmente relevante para a atuação no ambiente fisiológico e no sistema nervoso central. Dessa forma, os resultados indicam que a ultrafiltração de *C. vulgaris* produz biocompostos capazes de atenuar o estresse oxidativo e a toxicidade metálica. Estes achados ampliam o conhecimento científico sobre a microalga e fundamentam o uso desta microalga como uma fonte sustentável de peptídeos neuroprotetores, voltadas à manutenção da saúde cognitiva e ao combate de patologias ligadas ao desequilíbrio da homeostase metálica.

6. REFERÊNCIAS

- AARONSON, S.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. **Microalgae as a source of chemicals and natural products**. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. (Org.). *Algae biomass*. Amsterdam: Elsevier Biochemical Press, 1980. p. 576-601.
- ABDELFATTAH, A. et al. **Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects**. *Environmental Science and Ecotechnology*, v. 13, 2022.
- ABDEL-KARIM, O. et al. **Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris***. *Delta Journal of Science*, v. 41, n. 1, p. 79-91, 2020.
- ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A. **Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source**. *Bioresource Technology*, v. 118, p. 61-66, 2012.
- ABU-GHANNAM, N.; RAJAURIA, G. **Antimicrobial activity of compounds isolated from algae**. In: DOMÍNGUEZ, Herminia (Org.). *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013. p. 287-306.
- AHMAD, M. T. et al. **Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture**. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 1, p. 328-346, 2020.
- AKBARIAN, M. et al. **Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, p. 1445, 2022.
- ALAVI, Farhad; CIFTCI, Ozan N. **Purification and fractionation of bioactive peptides through membrane filtration: A critical and application review**. *Trends in Food Science & Technology*, v. 131, p. 118-128, 2023.
- ALMUBARAK, T. et al. **From initial treatment design to final disposal of chelating agents: a review of corrosion and degradation mechanisms**. *RSC Advances*, v. 12, n. 3, p. 1813-1833, 2022.

AMORIM, M. L. et al. **Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate.** Bioresource Technology, v. 307, p. 123190, 2020.

AMPOFO, J. et al. **Microalgae:** Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. Foods, v. 11, n. 12, p. 1744, 2022.

ANDREEVA, A. et al. **Production, Purification, and Study of the Amino Acid Composition of Microalgae Proteins.** Molecules, v. 26, n. 9, p. 2767, 2021.

ANDRADE, D. S. **Cianobactérias produtoras de toxinas:** ocorrência em reservatórios de água e impactos à saúde humana. Revista de Saúde Pública, v. 35, n. 5, p. 417-424, 2001.

ANJOS, L. et al. **Extracting protein from microalgae (*Tetraselmis chuii*) for proteome analysis.** MethodsX, v. 9, p. 101637, 2022.

APONE, F.; BARBULOVA, A.; COLUCCI, M. **Plant and Microalgae Derived Peptides Are Advantageously Employed as Bioactive Compounds in Cosmetics.** Frontiers in Plant Science, v. 10, 2019.

ATRIÁN-BLASCO, E. et al. **Cu and Zn coordination to amyloid peptides:** From fascinating chemistry to debated pathological relevance. Coordination Chemistry Reviews, v. 375, p. 38–55, 2018.

BECKER, E. W. **Microalgae:** biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 301 p.

BEHL, T. et al. **Mechanistic Insights Expatiating the Redox-Active-Metal-Mediated Neuronal Degeneration in Parkinson's Disease.** International Journal of Molecular Sciences, v. 23, 2022.

BEN-SHUSHAN, S.; MILLER, Y. **Neuropeptides:** Roles and Activities as Metal Chelators in Neurodegenerative Diseases. The Journal of Physical Chemistry. B, v. 125, p. 2796-2811, 2021.

BOURDENX, M. et al. **Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases:** Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Progress in Neurobiology*, v. 155, p. 171-193, 2017.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAETANO-SILVA, M. et al. **Peptide-metal complexes:** obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 61, n. 9, p. 1470-1489, 2021.

CERÓN GARCÍA, M. C.; SÁNCHEZ MIRÓN, A.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M. **Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*:** Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 297-305, 2005.

CHEIGNON, C. et al. **Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease.** *Redox Biology*, v. 14, p. 450-464, 2017.

CHEN, C.-Y. et al. **Removal of heavy metal ions by a chelating resin containing glycine as chelating groups.** *Separation and Purification Technology*, v. 54, n. 3, p. 396-403, 2007.

CHEN, L. et al. **Homeostasis and metabolism of iron and other metal ions in neurodegenerative diseases.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 10, 2025.

CHIA, M.; LOMBARDI, A.; MELÃO, M. **Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 4, p. 1427-1438, 2013.

CIMPERMAN, P. et al. **A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands.** *Biophysical Journal*, v. 95, n. 7, p. 3222-3231, 2008.

CORONADO-REYES, J. A. et al. ***Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology**: A review. Food Science and Technology, v. 42, p. e37320, 2020.

CORRÊA, P. S. et al. **Microalgae Biomolecules**: Extraction, Separation and Purification Methods. Processes, v. 9, p. 10, 2021.

COSTA, M. M. et al. **Improving protein extraction and peptide production from *Chlorella vulgaris* using combined mechanical/physical and enzymatic pre-treatments**. Heliyon, v. 10, 2024.

COX, J.; MANN, M. **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and Q1 proteome-wide protein quantification**. Nature Biotechnology, v. 26, p. 1367-1372, 2008.

CUNHA, S. et al. **Bioactive Hydrolysates from *Chlorella vulgaris***: Optimal Process and Bioactive Properties. Molecules, v. 27, n. 8, p. 2505, 2022.

DASH, Umesh Chandra et al. **Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders**: Mechanisms and implications. Acta Pharmaceutica Sinica. B, v. 15, p. 15-34, 2024.

DÁVALOS, A. et al. **Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis**. Journal of Food Protection, v. 67, n. 9, p. 1939-1944, 2004.

DENG, F. et al. **Critical Review on the Mechanisms of Fe²⁺ Regeneration in the Electro-Fenton Process**: Fundamentals and Boosting Strategies. Chemical reviews, 2023.

DI WU et al. **The blood–brain barrier**: Structure, regulation and drug delivery. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 8, 2023.

DOLGANYUK, V. et al. **Microalgae**: A Promising Source of Valuable Bioproducts. Biomolecules, v. 10, 2020.

DUGGER, B.; DICKSON, D. **Pathology of Neurodegenerative Diseases**. Cold Spring Harbor perspectives in biology, v. 9, n. 7, 2017.

ELALAMI, D.; OUKARROUM, A.; BARAKAT, A. **Anaerobic digestion and agronomic applications of microalgae for its sustainable valorization**. RSC Advances, v. 11, n. 43, p. 26444–26462, 2021.

EL-FAYOUMY, E. A. et al. **Evaluation of antioxidant and anticancer activity of crude extract and different fractions of *Chlorella vulgaris* axenic culture grown under various concentrations of copper ions**. BMC Complementary Medicine and Therapies, v. 21, p. 51, 2021.

EL-NAGGAR, N. E. A. et al. **Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth**. Scientific Reports, v. 10, p. 3011, 2020.

FERNÁNDEZ-LINARES, L. C. et al. **Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium**. Bioresource Technology, v. 244, n. July, p. 400–406, 2017.

FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M. **Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater**. Bioresource Technology, v. 98, p. 1700-1703, 2007.

GANGL, D. et al. **Biotechnological exploitation of microalgae**. Journal of Experimental Botany, v. 66, n. 22, p. 6975–6990, 2015.

GARCÍA, E. S. et al. **Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications**. Bioresource Technology, v. 268, p. 197-203, 2018.

GARCÍA-ENCINAS, J. et al. **Proteins from Microalgae: Nutritional, Functional and Bioactive Properties**. Foods, v. 14, 2025.

GONÇALVES, J. et al. **Microalgae as Biofertilizers: A Sustainable Way to Improve Soil Fertility and Plant Growth**. Sustainability, v. 15, 2023.

GULCIN, I.; ALWASEL, S. **Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method**. Processes, 2022.

HAAS, K. L. et al. **Model peptides provide new insights into the role of histidine residues as potential ligands in human cellular copper acquisition via Ctr1.** Journal of the American Chemical Society, v. 133, n. 12, p. 4427-4437, 2011.

HAMAI-AMARA, Hadjira et al. **Microalgae potential to protect from heavy metals-induced carcinogenicity.** Algal Research, v. 78, p. 103411, 2024.

HELD, P.; RAYMOND, K. **Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in *Chlorella vulgaris*.** Applications Department, BioTek Instruments, 2011.

HERNANDEZ-LEDESMA, B. et al. **Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin.** International Dairy Journal, v. 17, n. 1, p. 42-49, 2007.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. **Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*.** Free Radical Research, v. 25, n. 3, p. 247-257, 1996.

HU, X. et al. **Purification and identification of antioxidant peptides from *Schizochytrium limacinum* hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry.** Molecules, v. 24, n. 16, p. 3004, 2019.

JOMOVÁ, K. et al. **Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants.** Archives of Toxicology, v. 98, p. 1323-1367, 2024.

JOSHI, R.; RANA, A.; GULATI, A. **Studies on quality of orthodox teas made from anthocyanin-rich tea clones growing in Kangra valley, India.** Food chemistry, v. 176, p. 357-366, 2015.

JUSSIÁK, M. P.; DUSZOTA, K.; MYCIELSKI, R. **Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater.** Water Research, v. 18, p. 1-7, 1984.

KO, S.-C.; KIM, D. K.; JEON, Y.-J. **Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress.** Food and Chemical Toxicology, v. 50, n. 7, p. 2294-2302, 2012.

LAMPTEY, R. et al. **A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics.** International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 3, p. 1851, 2022.

KONG, Wenwen et al. ***Chlorella vulgaris* cultivation in simulated wastewater for the biomass production, nutrients removal and CO₂ fixation simultaneously.** Journal of Environmental Management, v. 284, p. 112070, 2021.

LEE, Seung Yun et al. **Mechanisms of Neuroprotective Effects of Peptides Derived from Natural Materials and Their Production and Assessment.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 18, n. 4, p. 923-935, 2019.

LI, Yuchen et al. **Recent advances in microalgae peptides: cardiovascular health benefits and analysis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 67, n. 43, p. 11825–11838, 2019.

LORDAN, Sinéad; ROSS, R. Paul; STANTON, Catherine. **Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases.** Marine Drugs, v. 9, n. 6, p. 1056-1100, 2011.

LORENZO, J. M. et al. **Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review.** Trends in Food Science & Technology, v. 79, p. 136–147, 2018.

MAESTRI, E.; MARMIROLI, M.; MARMIROLI, N. **Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs.** Journal of Proteomics, v. 16, p. 140–155, 2016.

MAHLANGU, D. et al. **Microalgae-Mediated Biosorption for Effective Heavy Metals Removal from Wastewater: A Review.** Water, v. 16, n. 718, 2024.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MENDES, Ana R. et al. **Chemical Compounds, Bioactivities, and Applications of Chlorella vulgaris in Food, Feed and Medicine**. Applied Sciences, v. 14, n. 23, p. 10810, 2024.

METTING, F. B. Jr et al. **Biodiversity and application of microalgae**. Journal of Industrial Microbiology, v. 17, p. 477-489, 1996.

MEZZAROBBA, L. et al. **The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases**. Neurotoxicology, 2019.

MIAO, M. et al. **Mixotrophic growth and biochemical analysis of Chlorella vulgaris cultivated with synthetic domestic wastewater**. International Biodeterioration & Biodeterioration, v. 113, p. 120–125, 2016.

MOLINA GRIMA, E. et al. **Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics**. Biotechnology Advances, v. 20, n. 7–8, p. 491-515, 2003.

MOLLER, N. P. et al. **Peptídeos e proteínas bioativos de alimentos: indicação de efeitos na saúde**. European Journal of Nutrition, v. 47, p. 171–182, 2008.

MONTONE, C. et al. **Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in Tetradismus obliquus microalgae**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 410, p. 3573-3586, 2018.

MORAIS JÚNIOR, W. G. de et al. **Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing**. Aquaculture, v. 528, p. 735562, 2020.

MOUNTOURAKIS, Fanourios et al. **The Microalga Chlorella vulgaris as a Natural Bioenergetic System for Effective CO2 Mitigation - New Perspectives against Global Warming**. Symmetry, v. 13, p. 997, 2021.

NABAVI, S. et al. **Apigenin as neuroprotective agent**: Of mice and men. *Pharmacological Research*, v. 128, p. 359–365, 2018.

NASELLI-FLORES, L. et al. **Ecosystem services provided by marine and freshwater phytoplankton**. *Hydrobiologia*, v. 850, p. 2691 - 2706, 2022.

NICCOLAI, A. et al. **Microalgae of interest as food source**: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, v. 41, 2019.

NIEDZIELSKA, E. et al. **Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases**. *Molecular Neurobiology*, v. 53, p. 4094–4125, 2016.

NUNES, Emmanuel et al. **Protein extracts from microalgae and cyanobacteria biomass**: Techno-functional properties and bioactivity: A review. *Algal Research*, v. 82, p. 103638, 2024.

OLAIZOLA, M. **Commercial development of microalgal biotechnology**: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLASEHINDE, T. A.; OLANIRAN, A. O.; OKOH, A. I. **Therapeutic Potentials of Microalgae in the Treatment of Alzheimer's Disease**. *Molecules*, v. 22, n. 3, p. 480, 2017.

PATERSON, S. et al. **Impact of the biomass pretreatment and simulated gastrointestinal digestion on the digestibility and antioxidant activity of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis chuii***. *Food Chemistry*, v. 453, p. 139686, 2024.

PEREIRA, C. M. P. et al. **Biodiesel renovável derivado de microalgas**: avanços e perspectivas tecnológicas. *Química Nova*, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PEREZ-GARCIA, Octavio et al. **Heterotrophic cultures of microalgae**: Metabolism and potential products. *Water Research*, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PERLIKOWSKA, Renata. **Whether short peptides are good candidates for future neuroprotective therapeutics?**. *Peptides*, v. 140, p. 170528, 2021.

PICOT, L. et al. **Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 90, n. 11, p. 1819-1826, 2010.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. **Commercial and industrial applications of micro algae - a review.** Journal of Algal Biomass Utilization, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

PYATHA, S. et al. **Association between Heavy Metal Exposure and Parkinson's Disease: A Review of the Mechanisms Related to Oxidative Stress.** Antioxidants (Basel), v. 11, n. 12, p. 2467, 2022.

RAJAURIA, G.; FOLEY, B.; ABU-GHANNAM, N. **Characterization of dietary fucoxanthin from *Himanthalia elongata* brown seaweed.** Food Research International, v. 99, p. 995–1001, 2017.

RAINERI, M. et al. **Effects of biological buffer solutions on the peroxidase-like catalytic activity of Fe₃O₄ nanoparticles.** Nanoscale, v. 11, p. 18274-18281, 2019.

RIZWAN, M. et al. **Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 92, p. 248–265, 2018.

ROJO, Elena M. et al. **Assisted-enzymatic hydrolysis vs chemical hydrolysis for fractional valorization of microalgae biomass.** Process Safety and Environmental Protection, v. 174, p. 276-285, 2023.

SABLE, R. V. et al. **Peptides, Peptidomimetics, and Polypeptides from Marine Sources: A Wealth of Natural Sources for Pharmaceutical Applications.** Marine Drugs, v. 15, n. 1, p. 30, 2017.

SAFI, C. et al. **Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 35, p. 265-278, 2014.

SAIRAZI, Nur Shahirah Adilah Mohd et al. **Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM, 2020.

SANTOS, K. C. dos.; LOPES, J. G.; COSTA, A. A. **Mapeamento tecnológico de pedidos de patentes relacionados à utilização das microalgas**. Cadernos de Prospecção, v. 11, Edição Especial, p. 236-244, 2018.

SHAHRIARY, R.; RAHIMIAN, A. **Heavy metals detoxification**: A review of herbal compounds for chelation therapy in heavy metals toxicity. Journal of Herbmед Pharmacology, v. 8, n. 2, p. 69-77, 2019.

SHARMA, R.; SINGH, G. P.; SHARMA, V. K. **Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella vulgaris***. Plant Pathology & Microbiology, v. 3, n. 6, 2012.

SHARMA, R.; SINGH, G. P.; VIJENDRA, K. S. **Comparison of different media formulations on growth, morphology and chlorophyll content of green alga, *Chlorella vulgaris***. International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences, v. 2, p. 509–5016, 2011.

SHOW, P. et al. **A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids**. Bioengineered, v. 11, p. 116-129, 2020.

SINGH, Anju et al. **Oxidative Stress**: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Molecules, v. 24, 2019.

SINGH, B. P.; VIJ, S. **In vitro stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes**. LWT, v. 91, p. 303-307, 2018.

SLADE, R.; BAUEN, A. **Micro-algae cultivation for biofuels**: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. Biomass and Bioenergy, v. 53, p. 29–38, 2013.

SLANZI, A. et al. **In vitro Models of Neurodegenerative Diseases**. Frontiers in Cell and Developmental Biology, v. 8, 2020.

SPAIN, O. et al. **Detailed Characterization of the Cell Wall Structure and Composition of Nordic Green Microalgae**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 70, p. 9711-9721, 2022.

SPÍNOLA, M. et al. **Effect of Selected Mechanical/Physical Pre-Treatments on *Chlorella vulgaris* Protein Solubility**. Agriculture, v. 13, n. 1, p. 191, 2023.

SUALI, E.; SARBATLY, R. **Conversion of microalgae to biofuel**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

SUDHAKAR, M. P. et al. **A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective**. Journal of Cleaner Production, v. 228, p. 1320-1333, 2019.

TANG, Doris Ying Ying et al. **Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products**. Bioresource Technology, v. 304, 2020.

TIAN, Q.-F. et al. **A comprehensive review of calcium and ferrous ions chelating peptides: Preparation, structure and transport pathways**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 63, n. 20, p. 4418-4430, 2023.

UTTARA, B. et al. **Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options**. Current Neuropharmacology, v. 7, p. 65-74, 2009.

VAHDATI, Saeed Niazi et al. **Butylated hydroxyl-toluene, 2,4-Di-tert-butylphenol, and phytol of *Chlorella sp.* protect the PC12 cell line against H₂O₂-induced neurotoxicity**. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 145, p. 112415, 2021.

VAZ, B. et al. **Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements**. Current Opinion in Food Science, v. 7, p. 73-77, 2016.

VILES, J. H. **Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases: Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases**. Coordination Chemistry Reviews, v. 256, n. 21-22, p. 2271-2284, 2012.

WANG, Shuguang et al. **Characterization and Exploration of Potential Neuroprotective Peptides in Walnut (*Juglans regia*) protein hydrolysate against cholinergic system damage and oxidative stress in scopolamine-induced cognitive and memory impairment mice and zebrafish.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 69, n. 9, p. 2773–2783, 2021.

XU, B. et al. **Advances in Research on the Activity Evaluation, Mechanism and Structure-Activity Relationships of Natural Antioxidant Peptides.** Antioxidants, v. 13, n. 4, art. 479, 2024.

YUAN, Qingxia et al. **Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 163, p. 2199-2209, 2020.

ZAPADKA, K. L. et al. **Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics.** Interface Focus, v. 7, n. 6, 2017.

ZHANG, Lijie et al. **Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production.** Renewable Energy, v. 115, p. 276-287, 2018.

ZIELIŃSKI, D. et al. **Biological Activity of Hydrophilic Extract of *Chlorella vulgaris* Grown on Post-Fermentation Leachate from a Biogas Plant Supplied with Stillage and Maize Silage.** Molecules, v. 25, n. 8, p. 1790, 2020.