

Potencial antifúngico de extratos da microalga *Pyramimonas virginica* frente a fungos dermatófitos

Antifungal potential of extracts of the microalgae *Pyramimonas virginica* against dermatophyte fungi

Potencial antifúngico de extractos de la microalga *Pyramimonas virginica* contra hongos dermatofitos

Recebido: 05/03/2024 | Revisado: 12/03/2024 | Aceitado: 13/03/2024 | Publicado: 16/03/2024

Gabriela Fontes Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6989-6819>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: gabbfontes@outlook.com

Vivian Marina Gomes Barbosa Lage

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9879-8548>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: vivianmarina@hotmail.com

Bianca Bomfim Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6439-8618>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: andrade.biancabomfim@gmail.com

Kathleen Ramos Deegan

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5466-3040>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: kathleen.deegan@ufba.br

Cristiane de Jesus Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2745-6588>
Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brasil
E-mail: cristiane.barbosa@embrapa.br

Suzana Telles da Cunha Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9099-324X>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: stcunhalima@ufba.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico *in vitro* dos extratos etanólicos, centrifugado e eletrofloculado, da microalga *Pyramimonas virginica* frente a fungos dermatófitos. Para obtenção da biomassa microalgal, o cultivo foi realizado em fotobiorreator tubular de 10 L, em triplicatas. A coleta da biomassa microalgal foi realizada por dois métodos, centrifugação e eletrofloculação. Para extração da biomassa microalgal, foi utilizado o solvente etanol absoluto (99.9%). A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, no intervalo de concentração de 0.0115 a 6 mg mL⁻¹. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada visualmente, pela ausência de crescimento do fungo. Os extratos foram testados contra os dermatófitos *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton tonsurans*. Ambos os extratos microalgais, centrifugado e eletrofloculado, conseguiram inibir o crescimento de todos os dermatófitos avaliados, sendo o extrato centrifugado mais ativo do que o extrato eletrofloculado. Os extratos apresentaram menor valor de CIM contra *T. tonsurans* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹) e *N. gypsea* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹), seguido por *T. mentagrophytes* (CIM: 6 mg mL⁻¹). Quanto ao tipo de atividade registrada, frente ao fungo *T. mentagrophytes* a atividade foi do tipo fungioestática e para os fungos *T. tonsurans* e *N. gypsea* foi do tipo fungicida. Este foi um estudo pioneiro acerca da atividade antifúngica da microalga *P. virginica*, assim como do método de fracionamento da sua biomassa. A microalga apresentou grande potencial antifúngico contra os fungos dermatófitos avaliados, mostrando-se promissora no desenvolvimento de novos fitoterápicos e tratamentos para as dermatofitoses.

Palavras-chave: Microalga; Clorofíceas; Fitoterápico; Dermatofitose.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antifungal potential of the extracts centrifuged and electroflocculated of the microalgae *Pyramimonas virginica* against dermatophyte fungi. To obtain the microalgal biomass, the culture was carried out in a 10 L tubular photobioreactor, in triplicates. The harvesting of microalgal biomass was performed by

two methods, centrifugation and electroflocculation. For the extraction of microalgal biomass, the absolute ethanol (99.9%) solvent was used. The antifungal activity of the extracts was evaluated by broth microdilution method, in the concentration range of 0.0115 to 6 mg mL⁻¹. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined visually, by the absence of fungal growth. Extracts were tested against the dermatophytes *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton tonsurans*. Both centrifuged and electroflocculated extracts were able to inhibit the growth of all dermatophytes evaluated, and the centrifuged extract was more active than the electroflocculated. The extracts showed lower MIC values against *T. tonsurans* (MIC: 0.75 mg mL⁻¹) and *N. gypsea* (MIC: 0.75 mg mL⁻¹), followed by *T. mentagrophytes* (MIC: 6 mg mL⁻¹). Regarding the type of activity recorded, against the fungus *T. mentagrophytes* it was of the fungistatic type and for the fungi *T. tonsurans* and *N. gypsea* it was of the fungicide type. This was a pioneering study on the antifungal activity of the microalgae *P. virginica*, as well as the method of fractionation of its biomass. The microalgae demonstrated antifungal potential against the dermatophyte fungi evaluated, showing to be promising in the development of new herbal medicines and treatments.

Keywords: Microalgae; Chlorophyceae; Herbal medicine; Dermatophytosis.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antifúngico de los extractos etanólicos de la microalga *Pyramimonas virginica*, obtenidos por centrifugación e electrofloculación, contra hongos dermatofitos. La producción de la biomasa de microalga fue obtenida a partir del cultivo en fotobiorreactor tubular (10 L). La biomasa de microalgas se recogió por medio de centrifugación y electrofloculación. La actividad antifúngica de los extractos se evaluó por medio del método de microdilución en caldo, en el rango de concentración de 0.0115 a 6 mg mL⁻¹. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se definió por la ausencia de crecimiento fúngico. Se han probado los extractos de la microalga frente a los dermatofitos *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*. Los extractos de microalgas obtenidos por centrifugado y electrofloculado, lograron inhibir el crecimiento de todos los dermatofitos evaluados, siendo el extracto centrifugado más activo que el electrofloculado. Los extractos tuvieron el valor de CIM más bajo frente a *T. tonsurans* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹) y *N. gypsea* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹), seguidos de *T. mentagrophytes* (CIM: 6 mg mL⁻¹). La actividad registrada, frente al hongo *T. mentagrophytes* fue del tipo fungistática y para los hongos *T. tonsurans* y *N. gypsea* fue del tipo fungicida. Se trata de un estudio pionero respecto la actividad antifúngica de la microalga *P. virginica*, así como sobre el método de fraccionamiento de su biomasa. En este trabajo se evidencia el potencial antifúngico contra los hongos dermatofitos evaluados, que se muestra prometedor en el desarrollo de nuevos medicamentos y tratamientos.

Palabras clave: Microalgas; Clorofícea; Medicina herbaria; Dermatofitosis.

1. Introdução

A dermatofitose, também conhecida como tinea, é uma doença ocasionada por fungos filamentosos denominados dermatófitos (Abo-Elyazeed et al., 2023). Estes microrganismos possuem um biotropismo especial por tecidos de estruturas queratinizadas, infectando principalmente a pele, os pelos e as unhas (Moskaluk & VandeWoude, 2022). Os dermatófitos pertencem ao filo Ascomycota e estão distribuídos em nove gêneros, sendo estes *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Lopophyton*, *Nannizzia*, *Ctenomyces*, *Guarromyces* e *Paraphyton* (Hoog et al., 2017). A dermatofitose é considerada uma das doenças mais comuns entre humanos e animais, além de possuir um amplo potencial de contaminação e tratamento prolongado. Por isso, é associada como um problema de saúde pública, onde os esforços são concentrados em medidas de prevenção da difusão da doença, tanto entre animais quanto entre humanos (Abo-Elyazeed et al., 2023).

Nos últimos anos, o surgimento de dermatófitos resistentes a fármacos tornou-se uma situação alarmante em todo o mundo (Khurana et al., 2019). Conseqüentemente, este fato levou a um renovado interesse de pesquisas direcionadas a estes patógenos, principalmente para a busca por novos medicamentos e tratamentos alternativos (Sacheli & Hayette, 2021). Neste cenário, os produtos naturais são considerados uma fonte promissora de compostos bioativos e potencial fonte de matéria prima para novos fármacos, onde as microalgas recebem destaque por sua rica composição bioquímica, além de suas diversas propriedades biológicas já registradas (Zhou et al., 2022; Ibrahim et al., 2023).

Compostos fitoquímicos, resultantes do metabolismo primário e secundário, já foram isolados a partir de microalgas, como carotenóides, flavonóides, terpenóides, glicosídeos, esteróis, PUFA's e fenólicos (Barkia et al., 2019; Sathasivam et al.,

2019). Estas substâncias já foram associadas à diversas atividades biológicas, tais como antiviral (Turkmen & Akyurt, 2021), antiprotozoária (Gharbi et al., 2021), antibacteriana (Guleria et al., 2024) e antifúngica (Lage et al., 2023).

O gênero *Pyramimonas* Schmarda foi descrito pela primeira vez em 1850, a partir de uma espécie dulcícola, *Pyramimonas tetrahynchus*, isolada a partir de um lago no parque Coldham's Common, situado em Cambridge, Reino Unido (Suda et al., 2013). O gênero é composto por microalgas unicelulares e flageladas, pertencente ao filo Chlorophyta e a classe Pyramimonadophyceae, com mais de 60 espécies já descritas (Suda et al., 2013). *P. virginica* é uma espécie ultraplancônica, encontrada em ambientes dulcícolas e marinhos, sendo uma clorófitica de aparelho flagelar simples e reduzido (Hori et al., 1995). Na literatura, algumas propriedades biológicas já foram reportadas para as clorófiticas, incluindo atividade antifúngica (Falaise et al., 2016).

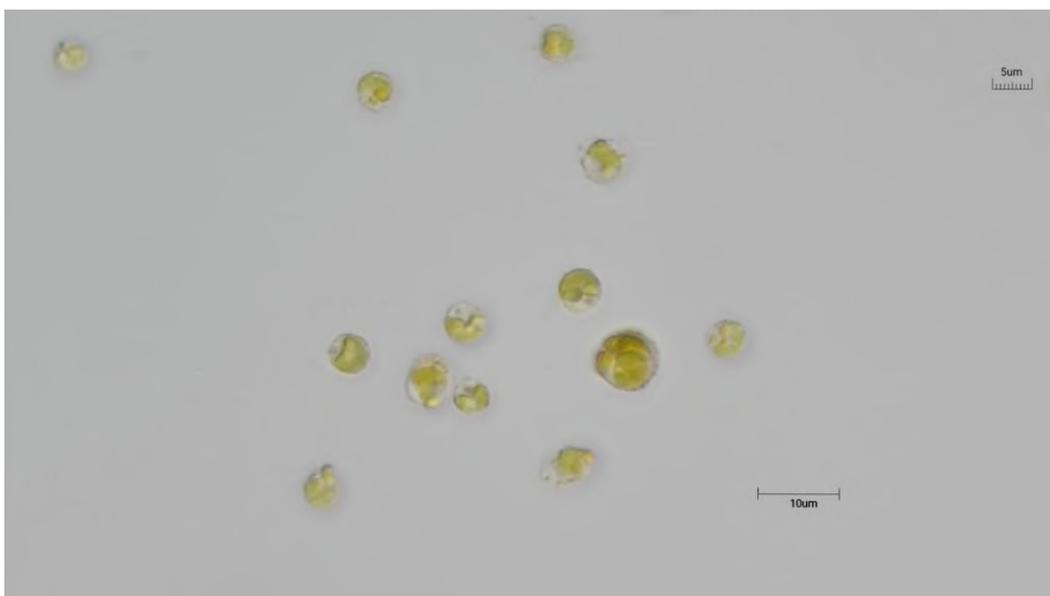
Apesar da grande biodiversidade de espécies de microalgas e o seu amplo potencial farmacológico, ainda assim, poucas espécies foram avaliadas em estudos voltados para o potencial antifúngico frente aos dermatófitos (Lage et al., 2022), como é o caso da microalga *P. virginica*, que nunca foi contemplada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico *in vitro* dos extratos etanólicos, centrifugado e eletrofloculado, da microalga *P. virginica* frente a fungos dermatófitos.

2. Metodologia

2.1 Cultivo da microalga

A microalga selecionada, *Pyramimonas virginica* (Figura 1), foi advinda do Banco de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC), localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) em Salvador, Bahia. A cepa está cadastrada no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) sob o n° ALCB137438 e no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com cadastro n° C945879.

Figura 1 - Microalga *Pyramimonas virginica* em microscópio óptico (lente de 100x).



Fonte: Autores.

A microalga foi mantida em condições controladas, de acordo com as normas propostas por Lourenço (2006), sendo estas de temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, irradiância de $40\text{-}50\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro), pH 7 e meio de cultura Conway. O meio Conway (Walne, 1966 apud Lourenço, 2006) foi preparado a partir da água do mar coletada na praia de Boa

Viagem, localizada em Salvador, Bahia (Coordenadas geográficas: 12°56'6.3827"S,38°31'12.7945"W). Esta água do mar teve sua salinidade mensurada com auxílio do aparelho salinômetro e posteriormente ajustada para 28‰, a partir da adição de água destilada. Em seguida, a água do mar foi filtrada e autoclavada (120 °C por 20 min). Posteriormente, adicionou-se as seguintes soluções para cada 1 L de água do mar: 1 mL/L de solução P (EDTA sal sódico 0.13 M, Ácido Bórico 0.54 M, Nitrato de Sódio 1.18 M, Cloreto de Manganês 2.0 mM, Cloreto de Ferro 5.0 mM e Fosfato de Sódio Di-hidrogenado 0.13 M) e 0.1 mL/L de solução de vitaminas (Cianocobalamina 0.037 mM e Biotina 3.8 mM).

2.2 Obtenção da biomassa microalgal

Para etapa de obtenção da biomassa microalgal, o volume do cultivo foi gradualmente aumentado. Inicialmente, uma alíquota de 10 mL de inóculo foi adicionada a 100 mL de meio de cultura em Erlenmeyer de 250 mL. Após atingir a fase estacionária de crescimento, foi realizado um novo repique e o volume de 100 mL de inóculo foi transferido para 1 L de meio de cultura, em Erlenmeyer de 1 L. Por fim, após atingir novamente a fase estacionária de crescimento, foi realizado um novo repique, onde 1 L de inóculo foi transferido para 10 L de meio de cultura em fotobiorreator tubular (Figura 2). Todas as etapas foram realizadas em triplicatas.

O fotobiorreator tubular (Figura 2) foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do LABBIOTEC como descrito na patente de modelo de utilidade nº BR202020019742-3, de título “Reator de eletrofloculação para separação das microalgas *Phaeodactylum tricoratum* e *Isochrysis galbana* com alta atividade antioxidante e sem toxicidade” (Andrade et al., 2020).

Figura 2 - Cultivo da microalga *P. virginica* em fotobiorreator tubular (10 L) para obtenção de biomassa.



Fonte: Autores.

2.3 Coleta e concentração da biomassa microalgal

O crescimento do cultivo da microalga foi acompanhado a fim de determinar o momento adequado para o repique e coleta da biomassa. O acompanhamento da microalga para elaboração da curva de crescimento foi realizado durante 20 dias, sendo que, a leitura foi feita em intervalos de 48 h após o início do cultivo. O crescimento foi acompanhado de duas maneiras:

através da contagem direta por microscopia óptica em câmara de Neubauer e por mensuração da absorbância em espectrofotômetro UV/Visível, para fins comparativos.

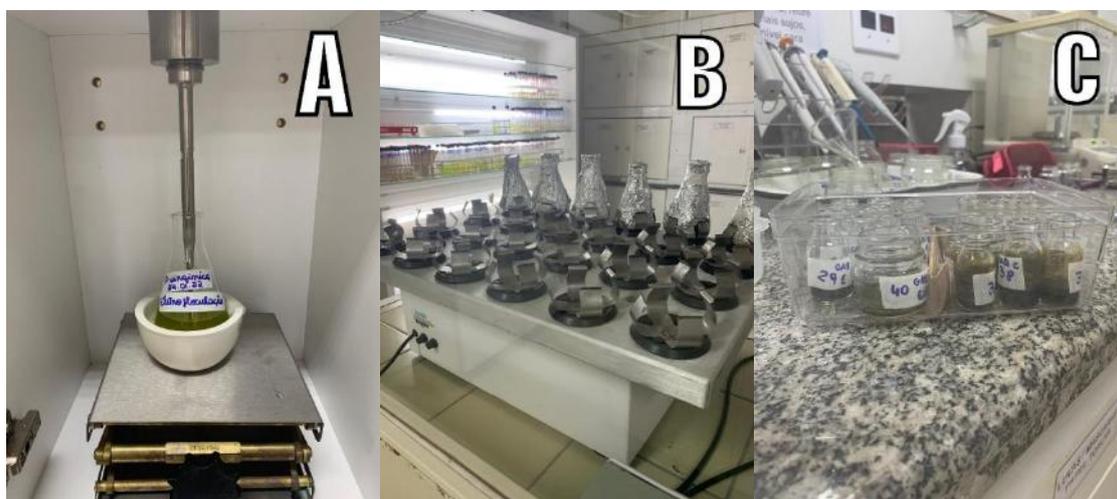
Foi realizada a contagem direta por microscopia, técnica que calcula o número de células presente em determinado volume de cultivo (Lourenço, 2006). Em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico binocular modelo Olympus TM – CX 22, o número de células foi diariamente monitorado durante 20 dias. A taxa de crescimento foi calculada a partir da seguinte equação: $\text{Céls/mL} = \text{N}^\circ \text{ de céls contadas} / \text{N}^\circ \text{ de quadrantes} \times \text{Fator de diluição} \times 10.000$ (Zhang et al., 2020). Além disso, foi realizada concomitantemente a curva de crescimento via absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 680 nm, faixa recomendada para leitura com células de microalgas (Hotos et al., 2020).

A biomassa microalgal foi coletada na fase estacionária de crescimento da cultura, através de dois métodos distintos de separação: centrifugação e eletrofloculação. Na centrifugação, utilizou-se a centrífuga MPW®-351, a 5.000 rpm durante 20 min (Chu et al., 2004). O precipitado resultante da centrifugação foi armazenado em recipientes de vidro autoclavados e levados ao freezer a -20 °C, enquanto o sobrenadante foi descartado. Na eletrofloculação, foi utilizado um fotobiorreator acoplado a um eletrofloculador com chapas de alumínio (62.40 x 2.50 cm) conectados em dois suportes plásticos cilíndricos na região superior e inferior dos eletrodos. Utilizou-se uma fonte elétrica bivolt (110 V – 220 V) com ajuste de tensão de 19 V. O processo de eletrofloculação durou 10 min, onde adicionou-se o cultivo sem agitação e, após os 10 min, deixou em repouso para que a separação fosse finalizada (Andrade et al., 2020). Posteriormente, o material eletrofloculado foi armazenado em um recipiente de vidro e guardado em freezer a -20 °C. Para obtenção da biomassa seca, ambos os materiais congelados (coletados por centrifugação e eletrofloculação) foram liofilizados por um período de 48 h, a um vácuo de 0137 µHg a -30 °C em liofilizador modelo Enterprise II, Terroni®. A biomassa seca obtida foi pesada e armazenada em recipientes de vidro estéreis e identificados de acordo com o método de separação da biomassa (centrifugação ou eletrofloculação).

2.4 Obtenção dos extratos

Após o processo de liofilização, a biomassa seca foi submetida ao processo de extração. Em um Erlenmeyer de 250 mL, 1 g de biomassa seca foi adicionada a 100 mL de solvente, álcool etílico absoluto (99.9%) da Merck®. Esse material foi homogeneizado em vórtex e, posteriormente, submetido ao processo de sonicação em gelo para promover a lise celular, em dois ciclos de 6 min a 10% de potência, utilizando Sonicador modelo Sonopuls HD 2070 da Bandelin® (Figura 3 – A). Ao retirar as amostras do sonicador, estas foram submetidas ao processo de agitação em mesa agitadora pendular por 72 h (Figura 3 - B). Após esse período, o material foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e centrifugado a 4.500 rpm por 10 min. O sobrenadante resultante desse processo foi posto em frascos de vidro autoclavados para assim iniciar a secagem em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente e assim gerar os extratos. Posteriormente, os extratos foram armazenados em freezer a -20 °C até o momento do uso nos ensaios antifúngicos (Figura 3 - C).

Figura 3 - Processo de obtenção dos extratos microalgais. A- Método de sonicação em gelo; B- Agitação das amostras em mesa pendular; C- Extratos armazenados em tubos de vidro estéreis após a secagem.



Fonte: Autores.

2.5 Cultivo dos fungos

Os extratos microalgais foram testados contra três fungos dermatófitos: *Trichophyton mentagrophytes* (ALCB072423), *Trichophyton tonsurans* (ALCB072424) e *Nannizzia gypsea* (ALCB072421), advindos do Banco de Micologia do Laboratório de Micologia do Centro Tecnológico Agropecuário da Bahia (CETAB) e cadastrados no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB). Esses fungos foram isolados clínicos ofertados pelo Hospital de Medicina Veterinária da UFBA, localizado em Salvador, Bahia. Os fungos foram cultivados em tubos de ensaios estéreis contendo meio Ágar Dextrose Batata (BDA) da Merck®, feito conforme as instruções do fabricante. As condições de cultivo foram de incubação em estufa climatizada a 32 °C, com repique sendo realizado a cada sete dias.

2.6 Teste de Microdiluição em Caldo

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pelo Teste de Microdiluição em Caldo, realizado de acordo com as normas propostas por Curatolo et al. (2020) e pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (NCCLS, 2008). Os experimentos foram realizados em condições estéreis e em triplicatas.

Neste teste, foi avaliado o potencial antifúngico dos extratos etanólicos da microalga *P. virginica* obtidos pelos métodos de centrifugação e eletrofloculação. Além disso, como amostra controle, foi usado o antifúngico Itraconazol da Infinity®, sendo este último um fármaco padrão utilizado no tratamento de dermatofitoses. Ambos os compostos avaliados, os extratos microalgais e o Itraconazol, foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) da Synth®, e, a partir disso, uma solução estoque foi preparada, sendo esta na concentração de 150 mg mL⁻¹ para os extratos e de 16 mg mL⁻¹ para o fármaco. O intervalo de concentração avaliado foi de 0.0115 a 6 mg mL⁻¹ para os extratos (DMSO 4%) e de 0.03125 a 16 µg mL⁻¹ para o Itraconazol (DMSO 4%).

Foi utilizado o meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose da TM MEDIA®, preparado conforme as indicações do fabricante. A suspensão microbiana foi preparada em solução salina estéril (NaCl) a 0.9% com turbidez ajustada à solução padrão de McFarland de 0.5 de sulfato de bário (BaSO₄), equivalente a 1.5 x 10⁸ UFC mL⁻¹. O controle negativo do meio foi

composto por meio de cultura e água autoclavada. O controle negativo dos extratos/fármaco foi composto pelos extratos/fármaco com água autoclavada. O controle positivo foi composto por inóculo e meio de cultura com DMSO a 4%.

Em placas estéreis de 96 poços, inicialmente foram adicionados 50 µL de meio de cultura em cada poço. Em seguida, adicionou-se 50 µL da solução estoque do extrato na primeira fileira. O conteúdo da primeira fileira foi homogeneizado e 50 µL foram transferidos para a segunda fileira, e assim sucessivamente até a última fileira e os 50 µL restantes foram desprezados, obtendo-se então as concentrações dos extratos de 6 a 0.0115 mg mL⁻¹, da primeira fileira até a última. Posteriormente, 50 µL da suspensão microbiana foi dispensada em cada poço. Após esta etapa, as placas foram incubadas em estufa a 32 °C por 7 dias.

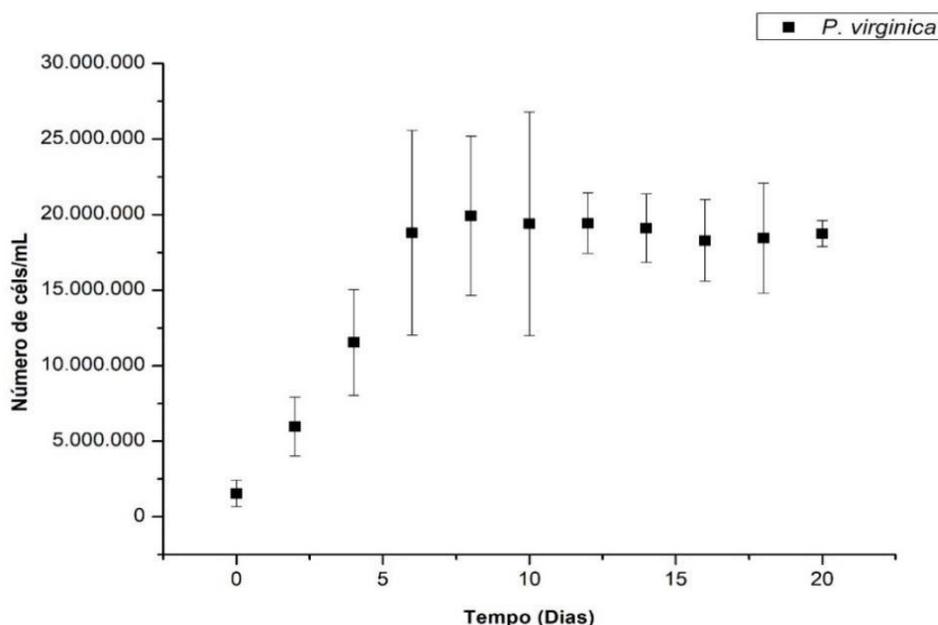
Ao final da incubação, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento dos microrganismos nos poços avaliados. Com base na metodologia de Bona et al. (2014), naqueles poços em que não foi observado crescimento fúngico visível, retirou-se todo o volume do poço, aproximadamente 100 µL, e esse material foi inoculado em placas de Petri contendo meio Ágar Dextrose Batata (BDA). Essas placas foram novamente incubadas nas condições padronizadas (32 °C por 7 dias). Após o período delimitado, foi realizada a leitura das placas semeadas para determinação do tipo de atividade (fungicida ou fungistática). Para aquelas que não se observou crescimento micelial visível após a semeadura considerou-se ação do tipo fungicida e nas quais se observou crescimento micelial foi considerada do tipo fungistática. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada após a semeadura das placas, sendo esta a menor concentração que registrou ação do tipo fungicida.

3. Resultados

3.1 Curva de crescimento, rendimento e coleta da biomassa microalgal

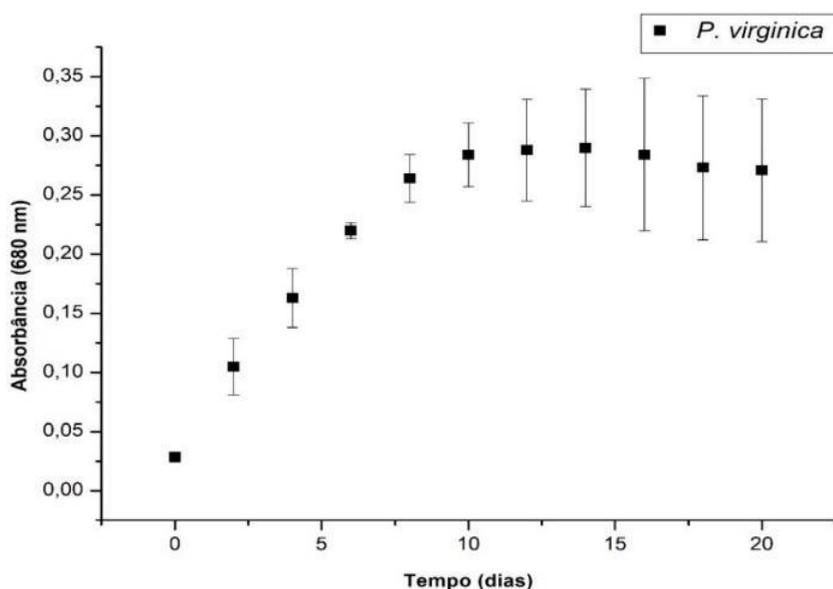
As curvas de crescimento obtidas para a microalga *P. virginica* tiveram a fase exponencial do primeiro ao nono dia, seguidas pela fase estacionária do décimo ao vigésimo dia (Figuras 4 e 5). A colheita da biomassa microalgal ocorreu no início da fase estacionária, no décimo dia de cultivo, por meio dos métodos de centrifugação e eletrofloculação (Pina et al., 2021).

Figura 4 - Curva de crescimento da microalga *P. virginica* obtida pelo método de contagem celular em microscópio óptico binocular (Lente de 40 x).



A figura representa um esquema gráfico acerca do número de células de microalgas detectado por mililitro, avaliado através do método de contagem de células em câmera de Neubauer. No eixo X está inserido o corte temporal aplicado (0 a 20 dias) e no eixo Y a frequência absoluta do número de células por mililitro. Os pontos pretos são as médias das triplicatas diárias e os colchetes o desvio padrão. Gráfico gerado no programa *Origin Pro*, versão 8.5. Fonte: Autores.

Figura 5 - Curva de crescimento da microalga *P. virginica* obtida pelo método de absorbância em espectrofotômetro (680 nm).



A figura representa um esquema gráfico acerca da absorbância de células da microalga *P. virginica* em espectrofotômetro a 680 nm. No eixo X está inserido o corte temporal aplicado (0 a 20 dias) e no eixo Y a escala de absorbância detectada (680 nm). Os pontos pretos são as médias das triplicatas diárias e os colchetes o desvio padrão. Gráfico gerado no programa *Origin Pro*, versão 8.5. Fonte: Autores.

Os cultivos da microalga foram realizados em triplicatas de 10 L, o que totalizou um volume final de 30 L, sendo 15 L separados pelo método de eletrofloculação e 15 L por centrifugação. Após a liofilização, a biomassa seca obtida foi pesada para cada um dos métodos de separação. A biomassa centrifugada obteve 7.5 g e a eletrofloculada 28.38 g, totalizando 35.88 g. Com base no volume final do cultivo microalgal e no peso da biomassa seca, foi possível calcular o rendimento total da biomassa microalgal, sendo este 1.196 g/L.

3.2 Ensaios de susceptibilidade

Os extratos microalgais centrifugado e eletrofloculado apresentaram inibição do crescimento de todas as cepas de dermatófitos avaliadas neste estudo. A partir dos resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo, foi possível calcular a taxa de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que representa a menor concentração que inibiu visualmente o crescimento micelial dos fungos. Foram obtidos valores de CIM que variaram de 0.75 a 6 mg mL⁻¹. Para todos os fungos testados, o extrato microalgal centrifugado registrou atividade antifúngica superior ou igual ao extrato eletrofloculado (Tabela 1). De modo geral, os extratos se mostraram mais efetivos contra *T. tonsurans* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹) e *N. gypsea* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹), seguido por *T. mentagrophytes* (CIM: 6 mg mL⁻¹) (Tabela 1).

Referente aos resultados do fármaco Itraconazol, Maurya et al. (2019) consideram uma cepa de dermatófito sensível ao Itraconazol quando são obtidos valores de CIM ≤ 1 µg mL⁻¹ e para valores acima disso são considerados resistentes. Portanto, no presente estudo todos os fungos testados apresentaram sensibilidade ao fármaco. O fungo *N. gypsea* demonstrou sensibilidade ao fármaco com CIM de 0.0625 µg mL⁻¹ e os fungos *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* obtiveram os menores valores, ambos com CIM de 0.03125 µg mL⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos de *P. virginica* e do fármaco Itraconazol frente aos fungos avaliados (*N. gypsea*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*).

Fungos testados	CIM		
	Extrato eletrofloculado	Extrato centrifugado	Itraconazol
<i>T. mentagrophytes</i>	6 mg mL ⁻¹	6 mg mL ⁻¹	0.0312 µg mL ⁻¹
<i>T. tonsurans</i>	3 mg mL ⁻¹	0.75 mg mL ⁻¹	0.0312 µg mL ⁻¹
<i>N. gypsea</i>	3 mg mL ⁻¹	0.75 mg mL ⁻¹	0.0625 µg mL ⁻¹

Fonte: Autores.

Para avaliar o tipo de atividade (fungicida e/ou fungistática), o conteúdo dos poços que obtiveram resultados de CIM foi semeado em placas de Petri contendo meio sólido (BDA) e incubados nas condições padronizadas (7 dias por 32 °C). Segundo Bona et al. (2014), após a semeadura das placas, aquelas que apresentam crescimento fúngico devem ser consideradas com atividade do tipo fungistática e, em contrapartida, as placas sem crescimento são consideradas com atividade do tipo fungicida.

Quanto ao tipo de atividade registrada, fungicida ou fungistática, o resultado foi semelhante para ambos os extratos avaliados, centrifugado e eletrofloculado. Frente ao fungo *T. mentagrophytes* a atividade foi do tipo fungistática e para os fungos *T. tonsurans* e *N. gypsea* foi do tipo fungicida. Para os fungos que registraram atividade fungicida, foi possível

determinar a taxa de Concentração Fungicida Mínima (CFM), sendo esta a menor concentração que inibiu visualmente 100% do crescimento micelial do fungo após o cultivo em meio sólido. Para ambos os fungos, *T. tonsurans* e *N. gypsea*, a CFM foi de 6 mg mL⁻¹. O fármaco itraconazol registrou atividade fungicida para *T. mentagrophytes* e fungistática para os demais fungos.

4. Discussão

4.1 Curva de crescimento, rendimento e coleta da biomassa microalgal

A espécie de microalga selecionada, *P. virginica*, possui poucos estudos na literatura acerca de suas características morfológicas e fisiológicas, assim como do seu cultivo e atividades biológicas relacionadas. Sendo assim, não foram encontradas publicações sobre a curva de crescimento da respectiva microalga ou do gênero *Pyramimonas* para poder comparar os resultados. No entanto, os resultados encontrados foram semelhantes a outros estudos também realizados com clorófitas marinhas, como o da microalga *Scenedesmus* sp., cuja fase exponencial foi do primeiro ao oitavo dia e a fase estacionária a partir do nono dia de crescimento (Fernandes, 2017). A escolha da fase estacionária para coleta da biomassa se deu pelo fato de alguns estudos apontarem que os metabólitos secundários das microalgas marinhas estão concentrados nesta fase, assim como uma maior densidade celular (Campos et al., 2010; Park et al., 2022).

O valor do rendimento total obtido no presente estudo (1,196 g/L) se assemelha ao de outros estudos realizados com espécies de microalgas clorófitas marinhas, como Rodolfi et al. (2003) que obtiveram um rendimento de biomassa variando de 1,88 a 4,8 g/L para o gênero *Nannochloropsis*. Além disso, outra espécie marinha como a *Porphyridium cruentum* apresentou um rendimento de biomassa de 1,1 g/L, bem próximo ao encontrado no presente estudo (Machado, 2011).

Sobre os métodos de separação, a centrifugação se destaca por ser a mais comumente utilizada nesse processo (Singh & Patidar, 2018). O princípio do método se baseia na utilização da força rotacional da centrífuga para separar a biomassa do meio de cultivo, se concentrando assim no fundo do recipiente (Majekodunmi, 2015). Portanto, consiste em um método prático e rápido, utilizado para a maioria das espécies de microalgas já descritas na literatura; principalmente pelo fato de apresentar taxa de recuperação superior a 95% (Najjar & Abu-Shamleh, 2020). No entanto, a centrifugação requer equipamentos de alto custo e, além disso, existe a questão dos danos físicos que esse método pode causar nas células devido a aplicação de forças de cisalhamento (Majekodunmi, 2015). Dessa forma, esses danos podem afetar seus metabólitos ativos e impactar no seu potencial biológico.

No método de eletrofloculação, a separação ocorre por meio de eletrodos metálicos (um ânodo e um cátodo) e começa quando ocorre uma oxidação eletrolítica dos ânodos, liberando no meio floculantes metálicos (Krishnamoorthy et al., 2021). Esses floculantes metálicos interagem com as microalgas neutralizando assim as cargas existentes, em consequência, formam aglomerados celulares que são levados pelas bolhas de aeração para a superfície do cilindro de cultivo (Lee et al., 2013). Como pontos positivos, a eletrofloculação não requer uso de floculantes químicos (não interfere na biomassa microalgal e não gera resíduos), além disso é um método barato e demanda pouca energia (Ramos et al., 2020). No entanto, o uso desse método para obtenção de biomassa microalgal ainda é pouco explorado nas pesquisas científicas e não se sabe sobre os efeitos da eletrofloculação nos compostos bioativos das microalgas, sendo necessário maiores investigações acerca dessa temática (Singh & Patidar, 2018).

No presente estudo, foi possível perceber uma diferença de coloração entre os extratos obtidos. Os extratos centrifugados apresentaram uma coloração mais escura do que os extratos eletrofloculados. Esse resultado pode ser atribuído à fatores inerentes ao processo de eletrofloculação como, por exemplo, as reações eletroquímicas nos eletrodos que podem ter levado a uma mudança do pigmento verde característico das clorófitas. Essas reações eletroquímicas geram oxigênio reativo com ação oxidante, podendo levar à oxidação e quebra de algumas das moléculas orgânicas das microalgas (Singh & Patidar,

2018). Outra forma seria pela formação do hidrogênio no polo do eletrodo positivo, reduzindo as moléculas orgânicas como carotenoides (Krishnamoorthy et al., 2021).

4.2 Ensaios de susceptibilidade

O método de microdiluição em caldo foi escolhido por ser uma técnica quantitativa que consiste em analisar a inibição dos extratos em baixas concentrações (Bona et al., 2014). Além disso, é bastante utilizado na pesquisa de compostos naturais contra microrganismos, como bactérias e fungos, permitindo uma análise em diferentes concentrações, que incluem nanogramas até miligramas, garantindo alta sensibilidade (Bona et al., 2014). Entre outras vantagens, o método permite testar diferentes concentrações ao mesmo tempo com maiores números de réplica e economia de reagentes e amostras (Pereira et al., 2022). Portanto, a microdiluição é um teste padrão ouro para avaliação da susceptibilidade fúngica, comumente utilizada na pesquisa com microalgas e antifúngicos (Guedes et al., 2012).

No presente estudo, ambos os extratos da microalga *P. virginica*, centrifugado e eletrofloculado, inibiram o crescimento de todas as três espécies de dermatófitos avaliadas. A sensibilidade de espécies dos gêneros *Nannizzia* e *Trichophyton* frente a extratos de macro e microalgas e seus compostos isolados já foi investigada anteriormente (Guedes et al., 2012; Al-Khafaji, 2023; Lage et al., 2023).

No estudo de Lage et al. (2023), foi avaliado o potencial antifúngico dos extratos etanólicos das microalgas *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros neogracilis*, *Desmodesmus brasiliensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Kirchneriella lunaris* e *Tetraselmis gracilis* frente aos dermatófitos *N. gypsea*, *N. nana*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*. Os extratos foram avaliados através da metodologia de microdiluição em caldo, no intervalo de concentração de 0.0115 a 6 mg mL⁻¹. Todos os extratos microalgais apresentaram atividade antifúngica, com destaque para *C. neogracilis*, *D. brasiliensis* e *K. lunaris*, que inibiram totalmente o crescimento de todas as espécies de fungos avaliadas. Os menores valores de CIM registrados foram para os extratos de *D. brasiliensis* e *K. lunaris* (CIM 0.188 mg mL⁻¹), contra os dermatófitos *T. tonsurans* e *N. nana*.

Al-Khafaji (2023) investigou a atividade antifúngica dos extratos etanólico e metanólico da cianobactéria *Anabaena circinalis* frente aos dermatófitos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os extratos foram avaliados na concentração de 100 mg mL⁻¹, pelo método de difusão em ágar. Foi verificado que, o extrato etanólico inibiu o crescimento micelial de ambos os fungos avaliados.

Guedes et al. (2012) avaliaram a atividade antifúngica de extratos de seis macroalgas marinhas (*Hypnea musciformis*, *Digenea simplex*, *Padina gymnospora*, *Dictyota dichotoma*, *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca*) contra três espécies de dermatófitos (*T. tonsurans*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*). Todas as algas mostraram-se ativas contra pelo menos uma das espécies de dermatófitos avaliadas. As algas que apresentaram o maior potencial antifúngico foram *H. musciformis* e *P. gymnospora*, com CIM de 0.031 a 4 µg mL⁻¹, seguidas por *D. simplex* com CIM de 0.031 a 8 µg mL⁻¹.

Apesar da maioria das pesquisas encontradas abordarem organismos diferentes, como macroalgas e cianobactérias, ainda assim esses resultados corroboram o potencial antifúngico do grupo das algas marinhas, visto que são organismos de táxons relacionados. Dessa forma, fica evidente que ainda há muito a ser explorado quanto ao potencial antifúngico das microalgas frente a fungos dermatófitos, pois muitas espécies ainda não foram contempladas (Lage et al., 2022).

No presente trabalho, o fármaco Itraconazol inibiu o crescimento de *T. mentagrophytes* (CIM: 0.03125 µg mL⁻¹), *T. tonsurans* (CIM: 0.03125 µg mL⁻¹) e *N. gypsea* (CIM: 0.0625 µg mL⁻¹). De acordo com Maurya et al. (2019), o ponto de corte para este medicamento é de 1 µg mL⁻¹, sendo assim, foi considerado ativo frente a todos os fungos avaliados. Outros estudos da literatura corroboram o perfil de sensibilidade dos fungos dermatófitos ao Itraconazol, registrando valores de CIM menores que 1 µg mL⁻¹ e se destacando entre os antifúngicos padrões utilizados no tratamento das dermatofitoses, como Fluconazol e Terbinafina, por registrar os menores valores de CIM (Magagnin et al., 2011; Curatolo et al., 2020).

Estudos futuros são necessários afim de isolar e identificar a(s) substância(s) com atividade antifúngica presentes nos extratos etanólicos da microalga, assim como a realização de testes de sensibilidade e toxicidade com os compostos isolados, visando futuramente o desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos.

5. Considerações Finais

Ambos os extratos da microalga *P. virginica*, centrifugado e eletrofloculado, inibiram o crescimento de todas as cepas de dermatófitos avaliadas, demonstrando um grande potencial antifúngico. Para todos os fungos testados, o extrato microalgal centrifugado foi mais ativo do que o extrato eletrofloculado. Os extratos se mostraram mais efetivos contra *T. tonsurans* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹) e *N. gypsea* (CIM: 0.75 mg mL⁻¹), seguido por *T. mentagrophytes* (CIM: 6 mg mL⁻¹). O fármaco Itraconazol também inibiu o crescimento de todos os fungos avaliados, *T. tonsurans* (CIM: 0.0312 µg mL⁻¹), *T. mentagrophytes* (CIM: 0.0312 µg mL⁻¹) e *N. gypsea* (CIM: 0.0625 µg mL⁻¹). Quanto ao tipo de atividade registrada, fungicida ou fungistática, o resultado foi semelhante para ambos os extratos, centrifugado e eletrofloculado. Frente ao fungo *T. mentagrophytes* a atividade foi do tipo fungistática e para os fungos *T. tonsurans* e *N. gypsea* foi do tipo fungicida. O fármaco itraconazol registrou atividade fungicida para *T. mentagrophytes* e fungistática para os demais fungos.

Este foi um estudo pioneiro acerca da atividade antifúngica da microalga *P. virginica*, assim como do método de fracionamento da sua biomassa. Espera-se que, trabalhos futuros identifiquem e isolem as biomoléculas ativas responsáveis pela atividade antifúngica e que novos fitoterápicos possam ser formulados a partir destes extratos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

Referências

- Abo-Elyazeed, H.; Soliman, R.; Hassan, H.; El-Seedy, F. R.; & Aboul-Ella, H. (2023). Development, preparation, and evaluation of a novel non-adjuvanted polyvalent dermatophytes vaccine. *Scientific Reports*, 157(13). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26567-3>
- Al-Khafaji, Z. H. A. (2023). The antagonistic effect of *Anabaena circinalis* on some dermatophyte. *Biomedicine*, 43(4), 1261-1265. <https://doi.org/10.51248/v43i4.302>
- Andrade, B. B.; Lima, S. T. C.; Rodrigues, E. D.; Druzian, J. I.; Cardoso, L. G. Reator de eletrofloculação para separação das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* com alta atividade antioxidante e sem toxicidade. Instituto Nacional da Propriedade Intelectual - INPI, N° BR202020019742-3, 28 de set de 2020.
- Barkia, I.; Saari, N.; & Manning, S. R. (2019). Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs*, 17(5). Doi: <https://doi.org/10.3390/md17050304>
- Bona, E. A. M.; Pinto, F. G. S.; Fruet, T. K.; Jorge, T. C. M.; & Moura, A. C. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81(3), 218-225. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001192012>
- Campos, V. B.; Barbarino, E.; & Lourenço, S. O. (2010). Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*, 40, 339-347.
- Chu, C. Y.; Liao, W. R.; Huang, R.; & Lin, L. P. (2004). Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 817-825. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-8712-6>
- Curatolo, R.; Juricevic, N.; Leong, C.; & Bosshard, P. P. (2020). Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: Development and evaluation of an optimised broth microdilution method. *Mycoses*, 64, 282-291. <https://doi.org/10.1111/myc.13202>
- Falaise, C.; François, C.; Travers, M. A.; Morga, B.; Haure, J.; Tremblay, R.; Turcotte, F.; Pasetto, P.; Gastineau, R.; Hardivillier, Y.; Leignel, V.; & Mouget, J. L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine drugs*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- Fernandes M. S. M.; França K. B.; Alves R. V.; Pearson H. W.; Lima S. A.; & Costa T. S. (2017). Microalgae growth rate *Scenedesmus* sp. in different NaCl concentration. *Engvista*, 19(1), 185-193.

- Gharbi, K.; Fathalli, A.; Essid, R.; Fassatoui, C.; Romdhane, M. S.; Limam, F.; & Jenhani, A. B. R. (2021). Tunisian inland water microflora as a source of phycobiliproteins and biological activity with beneficial effects on human health. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 50(4), 385-397. <https://doi.org/10.2478/oandhs-2021-0033>
- Guedes, E. A. C.; Araújo, M. A. S.; Souza, A. K. P.; de Souza, L. I. O.; de Barros, L. D.; Maranhao, F. C. A.; & Sant'Ana, A. E. G. (2012). Antifungal activities of different extracts of marine macroalgae against dermatophytes and *Candida* species. *Mycopathologia*, 174, 223-232. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9541-z>.
- Guleria, S.; Chawla, P.; Relhan, A.; Kumar, A.; Bhasin, A.; & Zhou, J. L. (2024). Antibacterial and photocatalytic potential of bioactive compounds extracted from freshwater microalgae species (*Spirogyra* and *Ocellularia*): A comparative analysis. *Science of The Total Environment*, 912(20). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169224>
- Hoog, G. S.; Dukik, K.; Monod, M.; Packeu, A.; Stubbe, D.; Hendrickx, M.; Kupsch, C.; Stielow, B.; Freeke, J.; Goker, M.; Rezaei-Matehkolaei, A.; Mirhendi, H.; & Graser, Y. (2017). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 5-31. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9>
- Hori, T.; Moestrup, O.; & Hoffman, L. R. (1995). Fine structural studies on an ultraplanktonic species of *Pyramimonas*, *P. virginica* (Prasinophyceae), with a discussion of subgenera within the genus *Pyramimonas*. *European Journal of Phycology*, 30(3), 219-234. <https://doi.org/10.1080/09670269500651001>
- Hotos, G. N.; Avramidou, D.; & Bekiari, V. (2020). Calibration Curves of Culture Density Assessed by Spectrophotometer for Three Microalgae (*Nephroselmis* sp., *Amphidinium carterae* and *Phormidium* sp.). *European Journal of Biology & Biotechnology*, 6(1). <https://doi.org/10.24018/ejbio.2020.1.6.132>
- Ibrahim, T.N.B.T.; Feisal, N.A.S.; Kamaludin, N.H.; Cheah, W.Y.; How, V.; Bhatnagar, A.; Ma, Z.; & Show, P.L. (2023). Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: A comprehensive review. *Bioresource Technology*, 372, 128661. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128661>
- Khurana, A.; Sardana, K.; & Chowdhary, A. (2019). Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genetics and Biology*, 132, 1087-1845. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103255>
- Krishnamoorthy, N.; Unpaprom, Y.; Ramaraj, R.; Maniam, G. P.; Govindan, N.; Arunachalam, T.; & Paramasivan, B. (2021). Recent advances and future prospects of electrochemical processes for microalgae harvesting. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105875. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105875>
- Lage, V. M. G. B.; Deegan, K. R.; Santos, G. F.; & Lima, S. T. C. (2022). Atividade biológica das microalgas em dermatófitos: Revisão. *Research, Society and Development*, 11(11), e126111133404-e126111133404. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33404>
- Lage, V. M. G. B.; Deegan, K. R.; Santos, G. F.; Fernandez, L. G.; Barbosa, C. J.; & Lima, S. T. C. (2023). Antifungal activity of eukaryotic microalgae extracts in dermatophytes. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 22(4), 615-622. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v22i4.52706>
- Lee, A. K.; Lewis, D. M.; & Ashman, P. J. (2013). Harvesting of marine microalgae by electroflocculation: The energetics, plant design, and economics. *Applied Energy*, 108, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.003>
- Lourenço, S. O. (2016). *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. Editora Rima, 1 ed.
- Magagnin, C. M.; Stopiglia, C. D. O.; Vieira, F. J.; Heidrich, D.; Machado, M.; Vettoratto, G.; Lamb, F. M.; & Scroferneker, M. L. (2011). Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 86(4), 694-701. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000400011>
- Majekodunmi, S. O. (2015). A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry. *American Journal of Biomedical Engineering*, 5(2), 67-78. <https://doi.org/10.5923/j.ajbe.20150502.03>
- Moskaluk, A. E.; & VandeWoude, S. (2022). Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. *Pathogens*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens11090957>
- Najjar, Y. S. H.; & Abu-Shamleh, A. (2020). Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Research*, 51, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046>
- NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard-Second Edition* (M38-A2). https://clsi.org/media/1455/m38a2_sample.pdf
- Park, Y. H.; Han, S.; Oh, B.; Kim, H. S.; Jeon, M. S.; Kim, S.; & Choi, Y-E. (2022). Microalgal secondary metabolite productions as a component of biorefinery: A review. *Bioresource Technology*, 344, 26206.
- Pereira, M. S. V.; Ribeiro, A. D.; Júnior, E. C. F.; Freire, J. C. P.; Costa, M. M. A.; & Pereira, J. V. (2022). Estudo sobre métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais: elucidações e limitações das técnicas. *Brazilian Journal of Development*, 8(4), 26085-26104. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-222>
- Ramos, L. C.; Batista, R.; Carneiro, D. C.; Sousa, L. J.; Sales, A. N.; & Lima, S. T. C. (2020). Evaluation of electroflocculation harvesting on the antioxidant activity and toxicity of extracts from the microalgae *Isochrysis galbana* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3853-3859. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02265-3>
- Sacheli, R.; & Hayette, M. P. (2021). Antifungal Resistance in Dermatophytes: Genetic Considerations, Clinical Presentations and Alternative Therapies. *Journal of Fungi*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/jof7110983>

- Sathasivam, R.; Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; & Allah, E. F. A. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 709-722. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11003>
- Singh, G.; & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217(1), 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Suda, S.; Bhuiyan, M. A. H.; & Faria, D. G. (2013). Genetic diversity of *Pyramimonas* from Ryukyu Archipelago, Japan (Chlorophyceae, Pyramimonadales). *Journal of Marine Science and Technology*, 21(7). <https://doi.org/10.6119/JMST-013-1220-16>
- Turkmen, A.; & Akyurt, I. (2021). Antiviral Effects of Microalgae. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(2), 412-419. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i2.412-419.4138>
- Zhang, M.; Gu, L.; Zheng, P.; Chen, Z.; Dou, X.; Quin, Q.; & Cai, X. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(1). <https://doi.org/10.1002/jcla.23024>
- Zhou, L.; Li, K.; Duan, X.; Hill, D.; Barrow, C.; Dunshea, F.; Martin, G.; & Suleria, H. (2022). Bioactive compounds in microalgae and their potential health benefits. *Food Bioscience*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101932>