



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA
MICROALGA *Haematococcus pluvialis***

DAIANE FELIX REIS

Prof.^a Dr.^a Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
ORIENTADORA

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
CO-ORIENTADOR

Rio Grande, RS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA
MICROALGA *Haematococcus pluvialis***

Eng.^a de Alimentos Daiane Felix Reis

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande.

Prof.^a Dr.^a Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
ORIENTADORA

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
CO-ORIENTADOR

Rio Grande, RS

2012

Dedico este trabalho aos meus pais: Dejair Oliveira Reis e Zeneida Arocha Felix.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nas horas difíceis, iluminar meu caminho e me dar força para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Dejair e Zeneida, por todo, amor, incentivo, dedicação, carinho e, confiança. Vocês são a inspiração deste trabalho. AMO VOCÊS! Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao meu amor Felipe Vilar, pelo teu amor, amizade e companheirismo, por me fazer (ou pelo menos tentar) rir nos momentos mais difíceis das nossas vidas. Por ter me incentivado e acreditado em mim.

Ao meu irmão Danni, pela amizade, afeto, incentivo e compreensão.

À Prof.^a Dr.^a Janaína Fernandes de Medeiros Burkert, pela oportunidade em realizar esta pesquisa, pela valiosa orientação, confiança, compreensão e incentivo. Pelo conforto nas horas difíceis. As palavras aqui não demonstram minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert, pelos ensinamentos, dedicação e apoio.

À Prof.^a Dr.^a Susana Juliano Kalil, pela amizade e incentivo. Admiro seu caráter e sabedoria.

À Elisane, exemplo de competência e humildade em tudo o que faz. Um anjo que Deus colocou na minha vida. Obrigada pelas palavras amigas, pelo incentivo, empenho e ajuda na execução deste trabalho.

Aos bolsistas Kelly Degani, Thalles Trevisol e Rafael Remedi, pela amizade, empenho, dedicação e ajuda na produção deste trabalho.

Ao querido amigo, Francisco Machado Jr., pela compreensão, amizade e auxílio nas etapas deste trabalho.

Às amigas Juliana Latorres, Mariana Rosa e Mikaela Couto. A amizade permanece mesmo que a presença não seja constante e que os caminhos sejam diferentes.

À Michele Paludo, uma grande amiga que as microalgas “me deram”. Por sempre estar do meu lado, por acreditar e sempre torcer por mim.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Bruno Ladeira, Franciela Spier e Vanessa Ribeiro, pelos momentos de descontração e agradável companhia.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, Deborah Otero, Elida Guido, Inajara Piotrowicz, Bárbara Catarina de Freitas, pela amizade e apoio.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica, em especial ao Prof. Dr. Jorge Costa e a Prof.^a Dr.^a Elisângela Radmann (Du), pelo auxílio na execução dos cultivos.

Aos colegas Luiza e Gabriel, pelo auxílio nos experimentos de CO₂.

À Islanda, pela atenção e auxílios constantes.

Aos Professores Sérgio Lourenço e Julio de Carvalho pelas cepas cedidas.

A banca pela contribuição neste trabalho, especialmente a Prof.^a Michele da Rosa A. Z. de Souza.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Pingo. Alguns anjos não possuem asas, possuem quatro patas.

À Universidade Federal do Rio Grande.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS _____	viii
LISTA DE TABELAS _____	x
RESUMO _____	xi
ABSTRACT _____	xii
1. INTRODUÇÃO _____	1
2. OBJETIVOS _____	3
2.1 Objetivo geral _____	3
2.1 Objetivos específicos _____	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	4
3.1 Carotenoides _____	4
3.2 Propriedades e funções dos carotenoides _____	5
3.2.1 Determinação da atividade antioxidante _____	7
3.3 Micro-organismos produtores de carotenoides _____	8
3.4 Astaxantina _____	11
3.5 Produção de carotenoides _____	13
3.6 Microalgas _____	15
3.6.1 Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> _____	15
3.6.2 Condições de cultivo de <i>Haematococcus pluvialis</i> _____	19
4. MATERIAL E MÉTODOS _____	22
4.1 Micro-organismo _____	23
4.2 Manutenção da cepa da microalga _____	23
4.3 Inóculo _____	23
4.4 Condições de cultivo _____	24
4.5 Métodos analíticos _____	27
4.5.1 Determinação do pH _____	27
4.5.2 Análise da concentração celular _____	27
4.5.3 Determinação de carotenoides totais _____	27
4.5.4 Determinação da atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos _____	28
4.5.5 Parâmetros de cultivo _____	29
4.6 Análises estatísticas _____	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	31
5.1 Influência dos diferentes meios de cultivo no crescimento celular e	

na bioprodução de carotenoides _____	31
5.2 Influência de diferentes concentrações de inóculo e pHs iniciais no crescimento celular e na bioprodução de carotenoides _____	36
5.3 Influência do emprego de CO ₂ na aeração do cultivo sob o crescimento celular e a bioprodução de carotenoides _____	49
5.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos _____	53
6. CONCLUSÃO _____	56
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	57
APÊNDICE 1 _____	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos principais carotenoides _____	5
Figura 2: Reações de carotenoides e radicais livres _____	6
Figura 3: interação do antioxidante com o radical ABTS [±] _____	8
Figura 4: Estrutura da astaxantina _____	10
Figura 5: Isômeros configuracionais de astaxantina _____	12
Figura 6: (a) Células vegetativas de <i>H. pluvialis</i> crescendo ativamente; (b) Cistos de <i>H. pluvialis</i> que acumularam astaxantina _____	17
Figura 7: Via de síntese de carotenoides secundários em <i>H. pluvialis</i> . A designação da enzima está de acordo com o gene correspondente: PSY, síntase fitoeno; PDS desaturase fitoeno; ZDS, desaturase γ -caroteno; CRTISO, isomerase de carotenoides; LCY, ciclase licopeno; BKT, ketolase β -caroteno; CHY, hidroxilase β - caroteno _____	18
Figura 8: Etapas de desenvolvimento do projeto _____	22
Figura 9: Fotobiorreatores de manutenção de <i>Haematococcus pluvialis</i> _____	23
Figura 10: Representação esquemática da seleção das diferentes condições de cultivo abordadas neste trabalho _____	26
Figura 11: Extração carotenogênica da biomassa proveniente de <i>H.pluvialis</i> _____	28
Figura 12: Cinética de crescimento da <i>H. pluvialis</i> com 10% de inóculo, 6 Klx, a 25°C, com pH inicial de 7 nos meios de cultivo (□) BBM e glicose, (●) BBM e acetato de sódio, (■) BAR, (▲) BG-11 e (±) BBM _____	31
Figura 13: Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos de <i>H. pluvialis</i> com 10% de inóculo, 6 Klx, a 25°C, com pH inicial de 7 nos meios de cultivo (□) BBM e glicose, (●) BBM e acetato de sódio, (■) BAR, (▲) BG-11 e (±) BBM _____	35

Figura 14: Cinética de crescimento de *H. pluvialis*, a 25°C, 6 Klx em: (a) BBM e glicose pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (b) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (c) BG-11 pH pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (d) BBM e glicose pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (e) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (f) BG-11 pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo

38

Figura 15: pH ao longo de 15 dias de cultivo de *H. pluvialis*, a 25°C, 6 Klx em (a) BBM e glicose pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (b) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (c) BG-11 pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (d) BBM e glicose pH pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (e) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (f) BG-11 pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo

42

Figura 16: Cinética de crescimento celular e pH em meio de cultivo BBM e acetato de sódio, com 20% de inóculo, 6 Klx à 25°C e pH inicial de 7 (●) Crescimento celular; (■) pH

50

Figura 17: Espectro de varredura da microalga *H. pluvialis* em éter de petróleo

55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Micro-organismos produtores de carotenoides _____	9
Tabela 2: Composição dos meios de cultivo _____	25
Tabela 3: Parâmetros dos cultivos da <i>H. pluvialis</i> em meios BBM e glicose, BBM e acetato de sódio, BG-11, BAR e BBM, com pH inicial de 7, 10% de inóculo, 6 Klx, a 25°C _____	32
Tabela 4: Crescimento celular máximo em meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11, com 10 e 20% de inóculo e pH inicial de 6, 7 e 8 _____	39
Tabela 5: Produtividade em célula e velocidade específica máxima de crescimento nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 e 8 _____	40
Tabela 6: Carotenoides totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8 _____	44
Tabela 7: Carotenoides totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8 _____	45
Tabela 8: Produtividade em carotenoides totais ($\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8 _____	46
Tabela 9: Produtividade em carotenoides totais ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8 _____	47
Tabela 10: Parâmetros estudados para o meio de cultivo BBM e acetato de sódio, pH 7, com 20% de inóculo, 6 Klx a 25°C e aeração enriquecida com 30% de CO_2 _____	50
Tabela 11: Comparação dos parâmetros estudados nos cultivos com ar enriquecido ou não de 30% de CO_2 do meio BBM e acetato de sódio, pH 7, concentração de inóculo de 20%, iluminância de 6 Klx à 25°C _____	52
Tabela 12: Atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos da <i>H. pluvialis</i> e dos padrões de β -caroteno e Astaxantina pelo método do DPPH (%inibição. μg^{-1}) nos tempo de 60, 120, e 180 minutos _____	54
Tabela 13: Atividade antioxidante de extrato carotenogênico de <i>H. pluvialis</i> pelo método do ABTS (%inibição. μg^{-1}) _____	55

RESUMO

O crescimento celular da microalga *Haematococcus pluvialis* e a bioprodução de carotenoides são influenciados pelas diferentes condições de cultivo. Dentre os corantes naturais, a astaxantina tem importante aplicação farmacêutica, cosmética e na indústria de alimentos. Este pigmento além de colorir, possui propriedades biológicas, dentre elas a atividade antioxidante. A produção de astaxantina através do cultivo de *H. pluvialis* pode alcançar até 4% do peso seco da microalga. O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento celular, bem como a produção de carotenoides pela microalga *Haematococcus pluvialis* em diferentes condições de cultivo e a atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos. Foram utilizados os meios autotróficos Blue Green-11 (BG-11), BAR (Barbera Medium) e BBM (Bold Basal Medium) e os meios mixotróficos BBM e glicose e BBM e acetato de sódio, empregando 10 ou 20% de inóculo em pHs iniciais de 6, 7 ou 8, aeração de 0,30 L.min⁻¹, sob iluminação de 6 Klx, 24±1°C durante 15 dias em fotobiorreatores de 1 L. A concentração celular foi avaliada diariamente através de leitura de absorvância a 560 nm. A ruptura celular foi realizada através de 0,05 g de células secas com 2 mL de dimetilsulfóxido e a concentração de carotenoides totais determinada a partir de leitura espectrofotométrica a 474 nm. Os meios de cultivo BG-11, BBM e glicose e BBM e acetato de sódio apresentaram, respectivamente, o maior crescimento celular e produção de carotenoides totais de 0,64, 1,18 e 0,68 g.L⁻¹, e 3026,66, 2623,12 e 2635,38 µg.g⁻¹, empregando 10% de inóculo em pH inicial de 7. Com base nesses resultados, foram selecionados esses três meios para dar continuidade ao trabalho. O meio de cultivo BBM e acetato de sódio obteve o melhor valor de concentração celular máxima, com 1,29±0,07 g.L⁻¹ e de carotenoides totais 5653,56 µg.g⁻¹ empregando pH inicial de 7 e concentração de inóculo de 20%. Este meio foi selecionado para a realização dos cultivos com injeção de 30 % de CO₂ uma vez ao dia durante 1 hora, realizados durante 22 dias, em pH inicial de 7 e 20% de inóculo, com 30% de injeção de CO₂ uma vez ao dia durante 1 hora. Nestas condições o crescimento celular alcançou o máximo de 1,13 g.L⁻¹ (10 dias), carotenoides totais específicos de 2949,91 µg.g⁻¹ e volumétricos de 764,79 µg.g⁻¹.L⁻¹ (22 dias). A capacidade antioxidante dos extratos carotenogênicos também foi avaliada pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS, não sendo possível quantificá-la através do DPPH e FRAP. Por outro lado, utilizando o método ABTS, em 90 minutos de reação, o poder de inibição encontrado foi de 35,70 % µg⁻¹. Assim, a condição que mais se destaca é a utilização do meio de cultivo BBM e acetato de sódio, com pH inicial 7, com 20% de inóculo, 0,30 L.min⁻¹ de aeração, 6 Klx e 24±1°C, uma vez que o crescimento celular e a bioprodução de carotenoides foi significativamente superior quando comparada às demais condições estudadas. Além disso, os carotenoides produzidos pela *H. pluvialis*, nesta condição, apresentaram capacidade antioxidativa.

Palavras-chave: microalga, pigmento, condições de cultivo.

ABSTRACT

Haematococcus pluvialis microalgae cell growth and carotenoid bioproduction are influenced by different culture conditions. Among the natural pigments, astaxanthin has important application in pharmaceutical, cosmetic and food industry. In addition to coloring, such pigment has biological properties, among which is antioxidant activity. Production of astaxanthin by cultivating *H. pluvialis* can reach up to 4% of the microalgal dry weight. This study was aimed at evaluating cell growth and carotenoid production by *H. pluvialis* microalgae in different culture conditions as well as the antioxidant activity of carotenogenic extracts. Blue Green-11 (BG-11), BAR (Barbera Medium) e BBM (Bold Basal Medium) autotrophic media in addition to BBM and glucose and BBM and sodium acetate mixotrophic media were used, employing 10 or 20% of inoculum at initial pH levels of 6, 7 or 8, aeration of 0.30 L.min⁻¹, under illumination of 6 Klx, 24±1°C for 15 days. Cell concentration was assessed daily by reading absorbance at 560 nm. Cell disruption was performed using 0.05g of dried cells with 2 mL of dimethyl sulphoxide and the concentration of total carotenoids was determined using a spectrophotometer at 474 nm. The growth media BG-11 (Blue , BBM and glucose and BBM and sodium acetate showed respectively the highest cell growth and production of total carotenoids of 0.64, 1.18 and 0.68 g.L⁻¹, and 3026.66, 2623.12 and 2635.38 µg.g⁻¹, using 10% inoculum of initial pH 7. Based on such results, these three media were selected to continue the study. BBM and sodium acetate culture medium gave the best value of maximum cell concentration, with 1.29 g.L⁻¹, and of total carotenoids, 5653.56 µg.g⁻¹, using initial pH of 7 and inoculum concentration of 20%. This medium was selected for carrying out the cultivation with injection of CO₂, for 22 days, at initial pH of 7 and 20% of inoculum, 30% of CO₂ injection for 1 hour once a day. Accordingly, cell growth reached a maximum of 1.13 g.L⁻¹ (10 days), specific total carotenoids of 2949.91 and volumetric total carotenoids of 764.79 µg.g⁻¹.L⁻¹ (22 days). The antioxidant activity of carotenogenic extracts was also measured by DPPH, FRAP and ABTS methods, but it was not possible to quantify it by DPPH and FRAP. Moreover, with the ABTS method the power of inhibition was found to be 35,70% µg⁻¹ after 90 minutes of reaction. Thus, the culture condition that stood out was using the medium BBM and sodium acetate, initial pH 7, 20% inoculum, 0.30 L.min⁻¹ aeration, 6 Klx and 24±1°C, since the cell growth and bioproduction of carotenoids were significantly higher than the other conditions studied. Furthermore, carotenoids produced by *H. pluvialis* in this condition showed antioxidant activity.

Keywords: microalgae, pigment, culture conditions.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são corantes naturais e estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em quase todos os filões nos reinos animal e vegetal, responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelho de muitos alimentos, como frutas, vegetais, gema de ovo, salmão e crustáceos (LORENZ & CYSEWSKI, 2000).

Dentre os carotenoides, destaca-se a astaxantina, um pigmento vermelho-laranja que é empregado na avicultura e na aquicultura, sobretudo na indústria de produção de rações para criação de peixes e crustáceos, a qual utiliza principalmente astaxantina sintética (JOHNSON & AN, 1991; GOODWIN, 1992; LOURENÇO, 2006).

Os corantes derivados de fontes naturais possuem propriedades biológicas importantes, dentre elas a atividade antioxidante. A produção de carotenoides utilizando fontes microbianas é uma alternativa para substituir os pigmentos sintéticos, uma vez que estes contêm diferentes isômeros e estruturas químicas, acarretando uma perda na atividade biológica (RODRIGUEZ-SAIZ, FUENTE & BARRETO, 2010; LI *et al.*, 2011).

O uso de microalgas como fonte de pigmentos foi vislumbrado como alternativa importante desde os anos de 1960, mas somente nos anos 1980, após substancial montante de pesquisas, esta possibilidade mostrou-se viável. Dos pigmentos existentes em microalgas, os carotenoides têm sido os mais explorados comercialmente (LOURENÇO, 2006).

Haematococcus pluvialis é uma microalga que, em resposta às condições de estresse, como deficiência de nutrientes, pH, alta intensidade de luz ou temperatura modifica sua morfologia celular, aumentando de tamanho e produzindo cistos vermelhos. Desta forma, a microalga pode sobreviver por longos períodos sob condições desfavoráveis (RODRÍGUEZ-MEIOZO *et al.* 2010).

Nas células verdes, a coloração é conferida devido à presença da clorofila, luteína e β -caroteno que predominam no conteúdo total de pigmentos. Quando o encistamento é induzido, a atividade fotossintética diminui e a quantidade de carotenoides aumenta, podendo a astaxantina constituir até 98% do conteúdo total de carotenoides, atingindo até 4% de peso seco (BOUSSIBA & VONSHAK, 1991; BOUSSIBA, 2000; RODRÍGUEZ-MEIOZO *et al.*, 2010).

No ano de 2010, o valor de mercado de carotenoides utilizados comercialmente foi estimado em cerca de US\$ 1,2 bilhões, com possibilidade de crescimento para US\$ 1,4 bilhões até o ano de 2018 (BBC Reseach, 2011). Porém, a

produção comercial de astaxantina ainda é dominada pela forma sintética. Portanto, torna-se de suma importância a busca por pigmentos oriundos de fontes naturais, como a microalga *H. pluvialis*, considerada a fonte mais rica em astaxantina (ZHANG *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento celular e a produção de carotenoides sob diferentes condições de cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência dos diferentes meios de cultivo no crescimento celular e na bioprodução de carotenoides;
- Determinar a influência de diferentes concentrações de inóculo e pHs iniciais no crescimento celular e na bioprodução de carotenoides;
- Determinar a influência do emprego de CO₂ na aeração do cultivo sob o crescimento celular e a bioprodução de carotenoides;
- Determinar a produção de carotenoides totais ao término dos cultivos;
- Avaliar a capacidade antioxidativa dos extratos carotenogênicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carotenoides

Carotenoides constituem um grupo entre 400 a 700 pigmentos naturais que essencialmente são produzidos no fitoplâncton, nas microalgas e plantas. Esses pigmentos são responsáveis pela grande variedade de cores vistas na natureza. Entre todas as numerosas classes naturais de corantes, os carotenoides são os mais difundidos. Somente as plantas, microalgas e algumas espécies de fungos e bactérias sintetizam carotenoides, logo esses pigmentos são fornecidos na dieta dos animais, muitas vezes convertidos em outros carotenoides e são incorporados dentro de vários tecidos (LORENZ & CYSEWSKI, 2000; GOSWAMI, 2010; CHAUDHURI & DUTTA, 2010).

Quimicamente os carotenoides são definidos como tetraterpenoides C_{40} (hidrocarbonetos de ocorrência natural e seus derivados), ou seja, união de oito unidades isoprenóides (C_5) de cinco átomos de carbono, formando uma cadeia carbônica de quarenta átomos de carbono, exceto a crocetina e a bixina, que possuem menos de quarenta átomos de carbono na cadeia carbônica. Ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação destes processos resultam na diversidade de estruturas dos carotenoides. São substâncias lipofílicas e geralmente insolúveis em água (MORAIS, 2006; UENOJO, JUNIOR & PASTORE, 2007).

As moléculas de carotenoides possuem um sistema de duplas ligações conjugadas entre átomos de carbono que constitui o grupo cromóforo responsável pela cor que proporcionam aos alimentos. Para que a cor amarela apareça, são necessárias, no mínimo sete ligações conjugadas. O aumento do número de ligações conjugadas resulta em maiores bandas de absorção em maiores comprimentos de onda, e, neste caso, os carotenoides tornam-se vermelhos (BRITTON *et al.*, 1995; MORAIS, 2006). A Figura 1 apresenta a estrutura dos principais carotenoides.

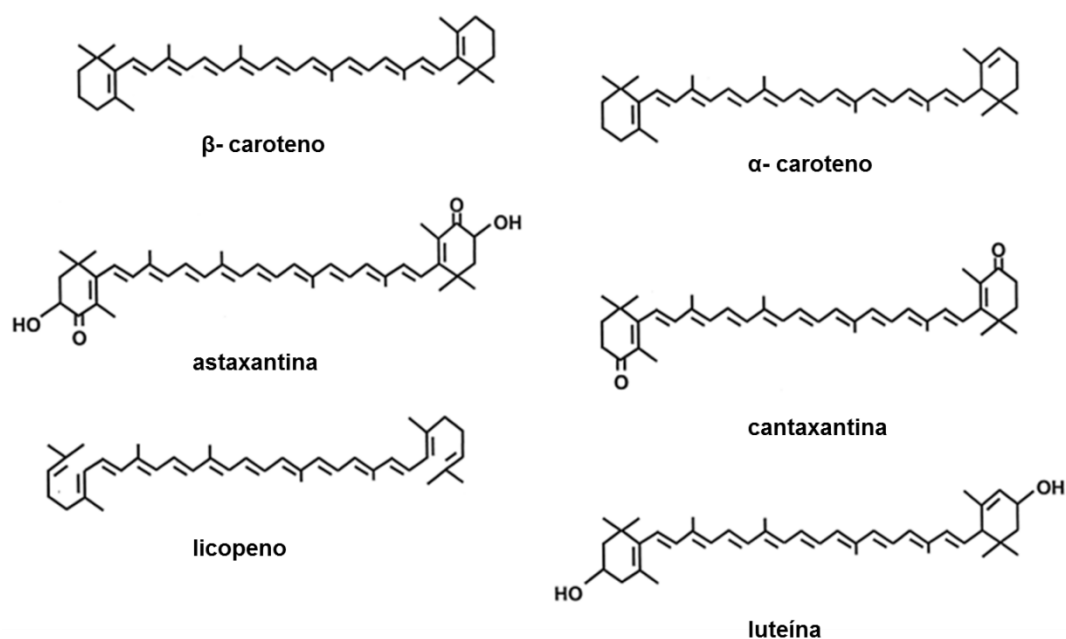


Figura 1: Estrutura dos principais carotenoides.
(Fonte: adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.)

3.2 Propriedades e funções dos carotenoides

Carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelho de muitos alimentos, tais como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes, como salmão e truta, e crustáceos. Além de colorir, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (LORENZ & CYSEWSKI, 2000; BHOSALE, 2004; MALDONADE, SCAMPARINI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Nas indústrias de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Com o crescente interesse pela saúde, os carotenoides também têm sido adicionados aos alimentos a fim de enriquecer nutricionalmente o produto. São também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores, coloração específica e foto proteção (SANCHEZ-CONTRERAS, JIMENEZ & SANCHEZ, 2000).

Os carotenoides possuem propriedades antioxidantes por reagirem com o oxigênio singleto, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular, o qual apresenta dois elétrons de spins opostos ocupando orbitais diferentes ou não. Os carotenoides protegem as células de danos oxidativos provocados por radicais livres e por espécies reativas de oxigênio que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (SHAMI & MOREIRA, 2004).

Ao combaterem as espécies reativas de oxigênio, os carotenoides podem interagir de três maneiras diferentes: transferência de elétrons (Reação 1); remoção de íons de hidrogênio (Reação 2) ou adição de espécies radicalares (Reação 3), conforme da Figura 2 (MORAIS, 2006).

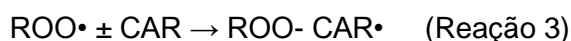
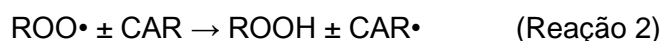
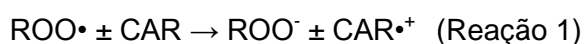


Figura 2: Reações de carotenoides e radicais livres

Legenda: ROO• radical; CAR carotenoide.

(Fonte: MORAIS, 2006)

Os antioxidantes são supressores dos radicais livres responsáveis pelo estresse oxidativo gerados através de espécies reativas de oxigênio no corpo, assim eles previnem ou retardam as espécies reativas de oxigênio que causam doenças como câncer, úlcera, diabetes, doenças cardiovasculares entre outras (KAMATH *et al.*, 2008).

Existe uma correlação entre atividade antioxidante de substratos apolares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral. Antioxidantes também têm aplicação na indústria, atuando na proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa destes pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

Sabe-se que a estrutura dos carotenoides exerce influência sobre a atividade antioxidante. Por exemplo, a cantaxantina e astaxantina apresentam melhores capacidades antioxidantes que β -caroteno ou zeaxantina. A atividade antioxidante

aumenta com o aumento do número de duplas ligações conjugadas, grupos cetona e presença de anéis ciclopentano em sua estrutura (UENOJO, JUNIOR & PASTORE, 2007).

3.2.1 Determinação da atividade antioxidante

Existem muitos métodos para a determinação da capacidade oxidativa a partir de carotenoides de microalgas, os mais utilizados são: TEAC (capacidade antioxidante equivalente de trolox) (RODRÍGUEZ-MEIOZO *et al.*, 2010), sequestro do radical DPPH (KAMATH *et al.*, 2008), inibição da oxidação de lipoproteína com baixa densidade (LDL) (KRINSKY, 2001), entre outros métodos (KRINSKY, 2001).

O método DPPH (1,1-difenil-2-picrihidrazil) é baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H^+ , sendo então reduzido. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH e a amostra, em solução. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Logo, a porcentagem de DPPH restante é proporcional a concentração de antioxidante (BONDET, BRAND-WILLIAMS & BERSET 1997; SANCHEZ-MORENO, 2002).

O poder de redução do ferro (FRAP- Ferric reducing antioxidant assay) é baseado no método descrito por Benzie & Strain (1996) e mede a capacidade da solução antioxidante em reduzir o Fe^{+3} em Fe^{+2} . Quando isto ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado com o Fe^{+2} . Quando o complexo Fe^{+3} -TPTZ é reduzido a Fe^{+2} -TPTZ por ação de um antioxidante em meio ácido, é obtida uma intensa coloração azul com máximo de absorção em 593 nm. Logo o efeito do antioxidante pode ser avaliado pelo monitoramento da formação do complexo Fe^{+2} -TPTZ com espectrofotômetro.

O método ABTS⁺ também é conhecido como ensaio TEAC (capacidade antioxidante equivalente de trolox), o conceito desta metodologia é o monitoramento do decaimento do cátion radical ABTS⁺ produzido pela oxidação do ABTS, gerado pela adição do extrato contendo antioxidantes. É utilizado para medir a atividade em produtos naturais, incluindo carotenoides, compostos fenólicos e plasma (MOON & SHIBAMATO, 2009). A Figura 3 ilustra a interação do carotenoide com o radical ABTS.

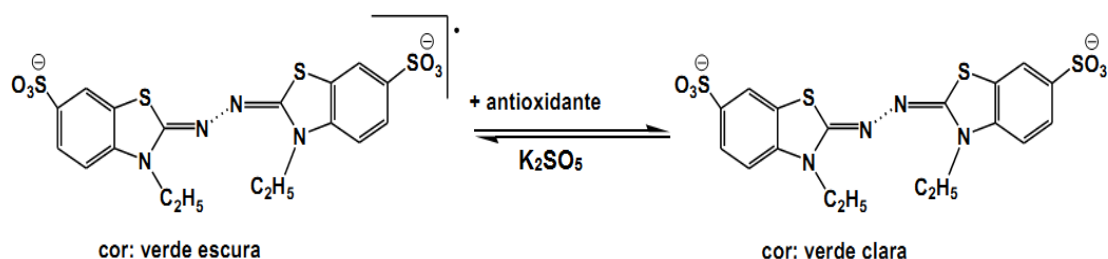


Figura 3: interação do antioxidante com o radical ABTS⁺

(Fonte: adaptado de RUFINO *et al.*, 2007)

3.3 Micro-organismos produtores de carotenoides

Existem diversas fontes de obtenção de biopigmentos, como os carotenoides, os quais podem ser sintetizados por microalgas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ZENI, 2008).

Muitos micro-organismos produzem carotenoides, porém apenas alguns são biotecnologicamente interessantes, destacando-se a produção de β -caroteno pela microalga *Dunaliella salina* e a produção de astaxantina pelas microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum sp.*, *Chlorella vulgaris* e pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (WANG, YU & ZHOU, 2006; SILVA, 2009; ONCEL *et al.*, 2010; SILVA, 2010; FONSECA *et al.*, 2011).

Há um grande interesse em microalgas, pois elas são fontes naturais de novos compostos como antioxidantes. Algumas microalgas vivem em habitats complexos submetidos a extremas condições, como por exemplo, alterações de temperatura, nutrientes, pH e radiação, portanto, devem adaptar-se rapidamente as novas condições ambientais para sobreviver, produzindo uma variedade de metabólicos secundários (compostos biologicamente ativos), que não são encontrados em outros organismos. Além disso, considerando a diversidade da taxonomia, as investigações relacionadas com a busca por novos compostos biologicamente ativos a partir de microalgas ainda é pequena (RODRIGUEZ-MEIOZO *et al.*, 2010).

Na Tabela 1 estão apresentados os micro-organismos com potencial para serem empregados na bioprodução dos principais carotenoides.

Tabela 1: Micro-organismos produtores de carotenoides

Espécies	Principais carotenoides
1. Cianobactéria	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
2. Microalgas	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
3. Bolores e Leveduras	
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno
<i>Rhodotorula sp.</i>	Toruleno e β -caroteno
<i>Rhodosporidium sp.</i>	Toruleno e β -caroteno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno e torulahodina
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina
<i>Sporobolomyces</i>	Toruleno e β -caroteno
<i>Sporidiobolus sp.</i>	Tolureno, torulahodina e β -caroteno

(Fonte: adaptado de MALDONADE, 2003).

Dentre estes micro-organismos diferentes cepas da levedura *Phaffia rhodozyma*, visando a produção de astaxantina, vem sendo estudadas pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. No trabalho de Fonseca *et al.* (2006), avaliou-se a influência dos açúcares sacarose e glicose no crescimento celular e produção de astaxantina das leveduras *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268, NRRL-Y 10921 e NRRL-Y 10922, nas mesmas condições do trabalho anterior, obtendo uma concentração celular máxima para a cepa NRRL-Y 10922 de 3,43 g/L em glicose e 4,14 g/L em sacarose. No entanto, as maiores concentrações de astaxantina foram

obtidas com a cepa NRRL-Y 17268 alcançando 130,68 µg de astaxantina/g de células e 0,43 µg de astaxantina/mL de meio, utilizando o meio de cultura YM com glicose.

Silva (2010) avaliou a bioprodução de carotenoides por *Phaffia rhodozyma* utilizando glicerina e a água de parboilização de arroz, concluindo que a temperatura de 25°C é a melhor para essa bioprodução e a concentração de glicose e glicerina bruta foram as variáveis de maior influência na produção de carotenoides específicos e no conteúdo de biomassa.

Otero (2011) realizou um screening de leveduras silvestres produtoras de carotenoides utilizando coprodutos agroindustriais. Foram identificadas três leveduras como sendo as mais promissoras, sendo uma amarela, uma laranja e uma vermelha. As leveduras selecionadas foram identificadas como *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. O meio YM permitiu a obtenção das maiores produtividades do bioproduto de interesse tanto para *Sporobolomyces pararoseus* quanto para *Pichia fermentans* porém, o mesmo não ocorreu para *Rhodotorula mucilaginosa* que alcançou valores mais elevados em meio contendo água de parboilização e melão.

Cipolatti (2012) obteve carotenoides microbianos com capacidade antioxidativa a partir de coprodutos agroindustriais, como água de maceração de milho, melão e glicerol, concluindo que dentre os extratos carotenogênicos de *Phaffia rhodozyma*, *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, os extratos de *P. fermentans* no meio de cultura adicionado de água de maceração de milho e melão foram mais promissores com relação a atividade antioxidante para os métodos DPPH, ABTS e FRAP.

Há um crescente histórico de produção de carotenoides a partir de leveduras. No entanto, o cultivo de microalgas para a produção de carotenoides é uma linha de pesquisa nova no laboratório de Engenharia de Bioprocessos. Atualmente, está em andamento uma tese de doutorado intitulada Extração e Encapsulamento de Astaxantina de *Haematococcus pluvialis*.

3.4 Astaxantina

A astaxantina (3,3'-diidroxi, 4,4'-diceno, β -caroteno), um carotenoide oxigenado, é um pigmento e um antioxidante extremamente potente, amplamente distribuído na natureza e está presente em tecidos de animais marinhos, incluindo crustáceos e salmonídeos (JOHNSON & AN, 1991).

Na avicultura é empregada em rações visando um aumento na produção e coloração da carne de galinha e gema de ovos, mas sua principal aplicação é na aquicultura. No uso comercial de peixes e na criação de crustáceos, é adicionada aos alimentos para animais a fim de compensar a falta de uma fonte natural e nutricional do pigmento. A astaxantina não só proporciona pigmentação em peixes e crustáceos, mas também é essencial para seu crescimento adequado e sobrevivência (GOODWIN, 1992; TORRISSEN & CHRISTIANSEN, 1995. YUAN *et al.*, 2011).

A astaxantina (Figura 4) é um cetocarotenoide que contém 40 átomos de carbono, tem estrutura química caracterizada por uma longa cadeia hidrocarbonada, com duplas ligações conjugadas com um anel aromático em cada extremidade da cadeia. A astaxantina ocorre em várias formas diferentes que podem ser classificadas de acordo com estereoisômeros, isômeros geométricos e livres ou formas esterificadas (GOSWAMI *et al.*, 2010).

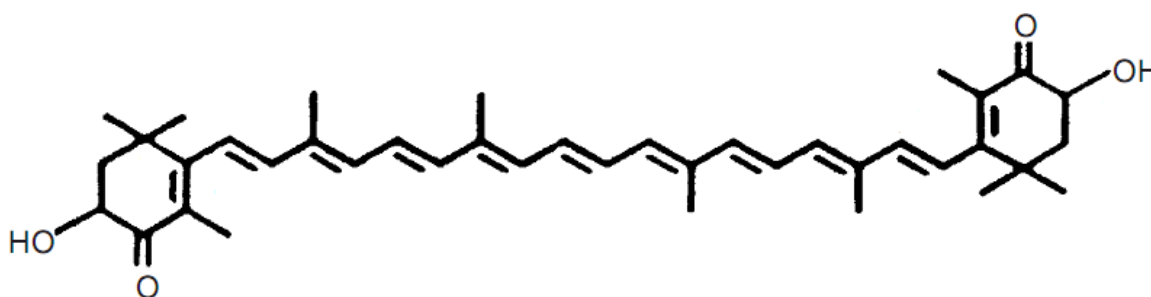


Figura 4: Estrutura da astaxantina

(Fonte: RICHMOND, 2004.)

Inúmeras propriedades farmacológicas incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, imunoduladora, anticancerígena, antidiabetes, prevenção de doenças cardiovasculares, prevenção de catarata e na bioatividade contra *Helicobacter pylori*, são apresentadas por este carotenoide. Entre tais propriedades, sua atividade antioxidante parece ser responsável pelas demais. Essa atividade tem levado à sua

introdução no promissor mercado de nutracêuticos, sendo comercializada em cápsulas. Estudos *in vitro* demonstraram efeito contra a foto-oxidação induzida por radiação UV superior ao β -caroteno e luteína. Também demonstrou excelente ação na proteção de lipídios contra peroxidação (HIGUERA-CIAPARA, FELIX-VALENZUELA & GOYCOOLEA, 2006). A FDA (Food and Drug Administration), nos EUA, aprovou a astaxantina em abril de 2009 como um aditivo de cor para usos específicos em alimentos de animais e peixes (RODRIGUEZ-SAIZ, FUENTE & BARRETO, 2010).

A propriedade antioxidante desta molécula é devido a sua estrutura especial, com 11 duplas ligações carbono-carbono conjugadas. Tal propriedade é 10 vezes maior que a do β -caroteno e até 500 vezes maior que a da vitamina E. Entretanto, em função de ser uma molécula altamente saturada, a astaxantina pode ser facilmente degradada pela luz e calor, o que pode causar a perda das propriedades biológicas (CHEN, 2007).

A astaxantina é uma xantofila amplamente usada como um pigmento em aquicultura. O isômero *trans* é encontrado na natureza juntamente com pequenas quantidades de isômeros 9-*cis* e 13-*cis*. Cantaxantina e astaxantina são formadas via introdução de grupos ceto em C_4 e C_{40} com ou sem hidroxilação em C_3 e C_{30} . O esquema de formação dos ceto carotenoides de β -caroteno e cantaxantina é bem caracterizado nas microalgas, fungos e bactérias fotossintetizantes (GOSWAMI, CHAIDHURI & DUTTA, 2010).

Além disso, a astaxantina é um composto opticamente ativo e seu ponto de fusão é de aproximadamente 224°C, é insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser dissolvida à temperatura ambiente em diclorometano (~30g/L), clorofórmio (~10g/L), acetona (~0,2g/L), dimetilsulfóxido (DMSO) (~0,5g/L) e outros solventes apolares. Seu espectro de absorção representa a sua estrutura poliênica conjugada, com $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 489nm em clorofórmio, 478nm em etanol, e 480nm em acetona (JOHNSON & AN, 1991).

A astaxantina apresenta diferentes formas ópticas, quando biossintetizada. Possui dois carbonos assimétricos nas posições 3 e 3' e pode existir em quatro configurações, incluindo os enantiômeros (3R, 3'R), (3S, 3'S) e a forma *meso* (3R, 3'R) (Figura 5) (JOHNSON & AN, 1991).

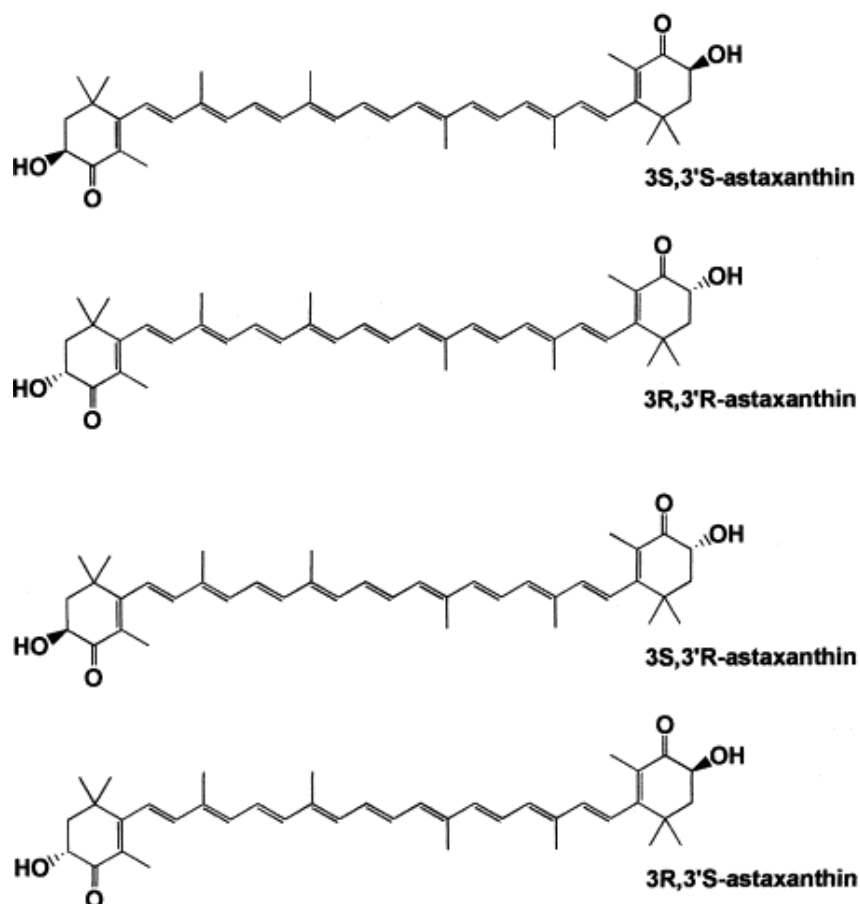


Figura 5: Isômeros configuracionais de astaxantina
(Fonte: SCHMIDT *et al.*, 2010.)

3.5 Produção de carotenoides

Carotenoides produzidos naturalmente compreendem apenas uma fração do mercado mundial. Embora haja usos crescentes de carotenoides em alimentos, produtos farmacêuticos e rações, há predomínio de formas sintéticas. Uma vez dominado o processo, a síntese de carotenoides envolve custos menores e elimina a necessidade de realização de cultivos para obtenção de biomassa e separação de substância de interesse, reduzindo a carga de trabalho e o tempo de produção. Essas características acarretam menor preço de venda (LOURENÇO, 2006).

Carotenoides obtidos sinteticamente apresentam propriedades diferenciadas nos isômeros produzidos, no caso do β -caroteno, apenas a forma trans da molécula pode ser produzida sinteticamente, ao passo que nas substâncias naturais há mistura de isômeros trans e cis. Acredita-se que a presença dos dois isômeros misturados pode acarretar atividade biológica acentuada. Além disso, a

demanda do consumo de alimentos naturais está aumentando, rejeitando assim formas sintéticas de diversas substâncias. Portanto, verifica-se um mercado disponível para carotenoides obtidos de forma natural, o que vem estimulando a abertura de empresas em vários países (LOURENÇO, 2006; YUAN *et al.*, 2011).

A síntese química da astaxantina é complexa e de elevado custo. (BONFIM, 1999). Devido ao elevado valor comercial da astaxantina e as desvantagens práticas em sua síntese química total, existe um grande interesse no uso de fontes biológicas de astaxantina. A produção biotecnológica de astaxantina tem sido desenvolvida com a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* também denominada *Phaffia rhodozyma*, sendo que a levedura produz uma concentração de astaxantina consideravelmente menor que a microalga (JOHNSON & AN, 1991; HE, DUNCAN & BARBER, 2007; RODRIGUEZ-SAIZ, FUENTE & BARRETO, 2010).

Estudos têm sido conduzidos investigando o cultivo de *H. pluvialis*, a seleção de linhagens adequadas para a cultura em massa e a acumulação de astaxantina, relatando um teor de astaxantina que pode variar de 1 a 4% do peso seco (ZHANG *et al.*, 2009).

A forma livre de astaxantina é particularmente suscetível à oxidação. Portanto, a astaxantina encontrada na forma natural é conjugada com proteínas ou esterificada com um ou dois ácidos graxos para formar monoésteres e diésteres. Na microalga *Haematococcus pluvialis* a astaxantina é encontrada esterificada através da combinação de vários ácidos graxos com diferentes isômeros de astaxantina. Dentre os pigmentos produzidos pela *H. pluvialis*, a astaxantina pode representar até 98% do conteúdo total de carotenoides (BOUSSIBA, 2000; YUAN *et al.* 2011).

Segundo a BBC Research (2011), o valor de mercado de carotenoides utilizados comercialmente foi estimado em US\$ 1,2 bilhões no ano de 2010. Espera-se que o mercado cresça em 2018 para US\$ 1,4 bilhões. O valor de mercado para o β -caroteno, foi estimado em cerca de US\$ 250 milhões em 2007 e aumentou para US\$ 261 milhões em 2010. Já para a astaxantina, o valor estimado em 2010 foi de aproximadamente US\$ 225 milhões e deve chegar a 250 milhões em 2018. Embora mais de 90% do mercado consuma carotenoides sintéticos, como β -caroteno e astaxantina, a procura por produtos oriundos de forma natural faz com que os pigmentos sintéticos sejam menos desejáveis e oferece uma oportunidade para a produção de carotenoides biotecnologicamente (LOURENÇO, 2006).

3.6 Microalgas

As microalgas são micro-organismos unicelulares fotossintéticos, vivem em ambientes salinos ou de água doce que convertem luz, água e dióxido de carbono para biomassa microalgal. Existem duas principais populações de microalgas: microalgas filamentosas e fitoplâncton, as quais são classificadas em quatro classes principais: diatomáceas, microalgas verdes, microalgas verde-azuladas e microalgas douradas. Biólogos têm classificado as microalgas em uma variedade de classes, que principalmente distinguem-se pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura básica celular. As três classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as microalgas verdes (*Chlorophyceae*), e as microalgas douradas (*Chrysophyceae*). As cianobactérias (*Cyanophyceae*) também são referidas como microalgas. As diatomáceas são a forma de vida dominante de fitoplâncton e, provavelmente, representam o maior grupo de produtores de biomassa na terra (DEMIRBAS, 2010).

As microalgas têm sido utilizadas para fins terapêuticos e sua avaliação sistemática de substâncias biologicamente ativas começou desde os anos de 1950. No entanto, na última década tornaram-se o foco para uma extensa triagem de novos compostos com atividades biológicas interessantes. O fato de que as microalgas podem produzir antibióticos já é bem conhecido, pois um grande número de extratos microalgais e/ou produtos extracelulares demonstraram ter atividade antimicrobiana (SANTOYO *et al.*, 2009).

A biomassa obtida a partir dos cultivos microalgais pode ser também utilizada na formulação de alimento humano e ração animal, além de ser utilizada para extração de pigmento e vitaminas (MORAIS, 2006).

3.6.1 Microalga *Haematococcus pluvialis*

Certas microalgas do subfilo *Chlorophyceae* produzem astaxantina como principal carotenoide. Dentro deste subfilo encontra-se a microalga *Haematococcus pluvialis*, caracterizada por ser unicelular, flagelada e produzir cistos, os quais são considerados geralmente como uma resposta às condições desfavoráveis do meio. A formação de cistos é frequente e acompanhada por uma mudança da cor verde para alaranjada ou vermelha. Seu habitat natural são cavidades rochosas periodicamente preenchidas com água da chuva. Este habitat é típico em banhos de pássaros, outros

ornamentos de jardim e recipientes contendo água da chuva. Pode ser encontrada também em piscinas rochosas, mas é pouco tolerante a altas salinidades. Ocasionalmente, a microalga *H. pluvialis* ocorre em grande quantidade em rios ou às margens de lagos, quando a seca expõe grande área de rochas ricas em fissuras (CANTER-LUND & LUND, 1995).

A microalga de água doce *Haematococcus pluvialis* é a principal fonte natural de astaxantina, cujo processo de cultivo em grande escala foi desenvolvido no final dos anos 1990. Desde então, diversas plantas de produção de *H. pluvialis* foram instaladas nos EUA, na Índia, em Israel, na Holanda e no Chile. A produção de *H. pluvialis* vem aumentando rapidamente e a espécie pode se tornar a quarta microalga em volume de produção por processos fotoautotróficos (LOURENÇO, 2006).

Sua forma é facilmente reconhecida por apresentar um protoplasto muito afastado da parede celular. Entre a parede celular e o protoplasto existe uma camada de mucilagem atravessada por delicados filamentos de citoplasma dificilmente visíveis com microscopia. Uma vez que as condições tornam-se desfavoráveis, a forma vegetativa rapidamente se diferencia numa estrutura de resistência não flagelada, o aplanosporo. Em poucos dias, as células aumentam seu volume drasticamente e entram numa fase de repouso em que a célula é cercada por uma parede de celulose pesada e resistente. Este processo é denominado encistamento. Os protoplastos são então acentuados por uma cor vermelha, devido a presença do carotenoide astaxantina (BOUSSIBA, 2000).

A produção de astaxantina por *H. pluvialis* é estimulada pelo cultivo em duas fases, que leva a uma concentração do pigmento nas células, que pode alcançar de 1 a 4% (p/p) do peso seco. A primeira fase do cultivo pode ser realizada sob condições adequadas que levam à produção de elevadas densidades de células. Quando ocorre o preparo do meio de cultivo, há produção das células vegetativas típicas da espécie: células verdes, dotadas de dois flagelos e com parede celular fina. No final da etapa de cultivo em fotobiorreator, quando o meio de cultura dispõe de menor quantidade de nutrientes, as células começam a assumir coloração avermelhada. A segunda fase de cultivo é caracterizada pelo acúmulo intenso de astaxantina, alcançada sob condições desfavoráveis como intensidade luminosa, temperatura, pH e preferencialmente com meio de cultura pobre em nutrientes. Em resposta a essas condições, formam-se cistos, que são células vermelhas dotadas de parede celular grossa e sem flagelos. Os cistos de *H. pluvialis* são densos, assim, se a agitação do cultivo for interrompida, eles decantam rapidamente. Esse fato contribui

bastante para a coleta de biomassa final formada, pois menores volumes de meio de cultura são recolhidos juntamente com os cistos (LOURENÇO, 2006). A Figura 6 mostra o aspecto de *H. pluvialis* em sua forma vegetativa (primeira fase de cultivo) e em cistos (segunda fase de cultivo).

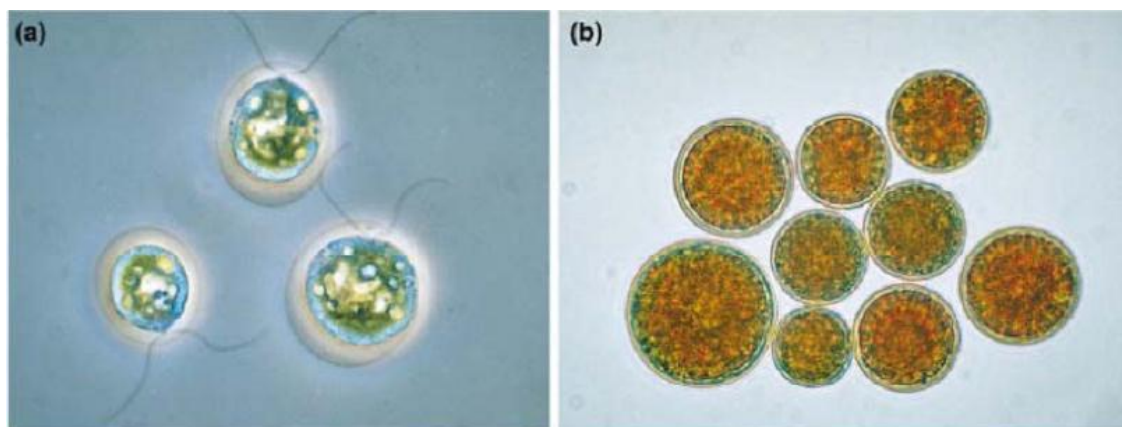


Figura 6: (a) Células vegetativas de *H. pluvialis* crescendo ativamente. (b) Cistos de *H. pluvialis* que acumularam astaxantina (Aumentado 400 x).

(Fonte: RICHMOND, 2004).

A biossíntese de astaxantina na *H. pluvialis* segue a via geral de carotenoides até a formação do β -caroteno, conforme ilustra a Figura 7.

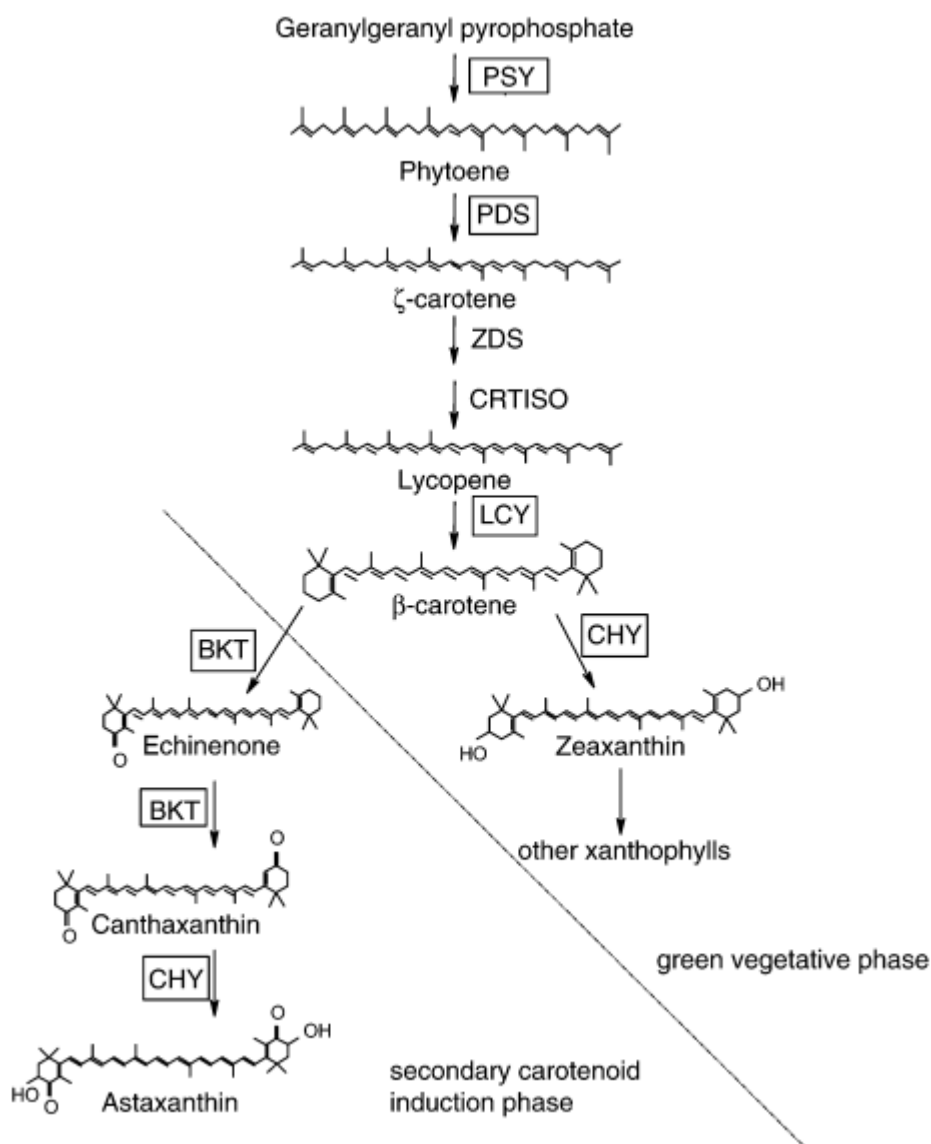


Figura 7: Via de síntese de carotenoides secundários em *H. pluvialis*. A designação da enzima está de acordo com o gene correspondente: PSY, síntase fitoeno; PDS desaturase fitoeno; ZDS, desaturase γ -caroteno; CRTISO, isomerase de carotenoides; LCY, ciclase licopeno; BKT, c etolase β -caroteno; CHY, hidroxilase β - caroteno.

(Fonte: VIDHYAVATHI *et al.*, 2008.)

Segundo Guerin, Huntley & Olaizola (2003), a microalga *H. pluvialis* é a fonte natural de astaxantina mais abundante. Comercialmente, o crescimento de *H. pluvialis* pode acumular mais de 30g de astaxantina por Kg de biomassa seca.

A produção comercial de astaxantina proveniente de *H. pluvialis* é recente. A acumulação de astaxantina ocorre sob condições de crescimento estressante, assim

produtores que cultivam em grande escala adotaram a estratégia de dois estágios, em que o primeiro estágio, a biomassa de *Haematococcus* é produzida em fotobiorreatores fechados, seguido pela segunda fase, na qual a carotenogênese é induzida sob condições desfavoráveis do ambiente de cultivo. Finalmente, a biomassa é seca e pode ser encapsulada ou adicionada em formulações nutracêuticas (GUERIN, HUNTLEY & OLAIZOLA, 2003; YUAN *et al.*, 2011).

3.6.2 Condições de cultivo de *Haematococcus pluvialis*

A microalga *Haematococcus pluvialis* no estado vegetativo apresenta o pigmento β -caroteno e uma mistura de xantofilas, principalmente luteína. A astaxantina é encontrada na forma encistada da *H. pluvialis* juntamente com pequenas quantidades de β -caroteno e luteína. O encistamento e a produção de astaxantina são decorrentes da intensidade de luz e da falta de nitrogênio assimilável ao meio (GOODWIN & JAMIKORN, 1953).

Um dos aspectos fundamentais do cultivo de microalgas é o conhecimento dos nutrientes necessários a seu desenvolvimento. Todos os meios de cultura devem contemplar as necessidades nutricionais das microalgas (LOURENÇO, 2006).

Os cultivos de microalgas podem ser realizados para pesquisa, manutenção de cepas ou produção de biomassa com finalidade comercial (SOARES, 2010). Na produção de microalgas, o conhecimento das mesmas é muito importante para obtenção das melhores condições de processo como o pH, temperatura, concentração de nutrientes, entre outros (HENRARD, 2009). As condições de cultivo influenciam consideravelmente na composição das microalgas, sendo importante seu estudo, a fim maximizar os bioprodutos alvos. Os meios de cultivo são compostos por vitaminas e nutrientes, que contém macronutrientes como carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, silicato, enxofre e potássio e micronutrientes como ferro, manganês, cobre, molibdênio, cobalto, zinco, entre outros (SOARES, 2010).

A intensidade luminosa e o comprimento de onda da fonte de iluminação influenciam diretamente o crescimento de microalgas. Os cloroplastos, responsáveis pela fotossíntese, podem ser irreversivelmente destruídos a altas intensidades de luz ultra violeta, por longos períodos de tempo (RICHMOND, 2004).

De acordo com a intensidade e qualidade da fonte luminosa, o conteúdo de pigmentos das microalgas pode sofrer variações (HENRARD, 2009). O aumento de

carotenoides está relacionado a uma adaptação necessária da célula a fim de proteger as moléculas de clorofila (GOODWIN, 1980).

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos. A temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos (LOURENÇO, 2006). Um dos efeitos mais importantes da temperatura no metabolismo das células é a influência na respiração, cuja taxa aumenta exponencialmente com a temperatura e conseqüentemente, provocando variações na produção de biomassa algal (RICHMOND, 2004).

A temperatura tem grande influência na composição química das microalgas, como na concentração de ácidos graxos e na formação da estrutura de proteínas e lipídios (RICHMOND, 2004).

A agitação nas culturas de microalgas está relacionada a alguns fatores que influenciam no crescimento celular. A agitação deve impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células (GRIMA *et al.*, 1996), permitir a captação de CO₂ da atmosfera, liberação de O₂ do interior do meio líquido, diminuir os gradientes gasosos e de nutrientes do meio (JIMENEZ *et al.*, 2003).

Domínguez-Bocanegra *et al.* (2004) reportaram que o máximo crescimento das células vegetativas ($3,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹) com a cepa NIES-144 de *Haematococcus pluvialis* foi obtida com o meio BBM, quando comparado a outros meios como BG-11, FAB e BAR, à 28°C e com iluminância contínua de 13 Klx. No entanto, as maiores produções de astaxantina foram para o meio BG-11 com 1,98 mg.g⁻¹ e para o meio BAR 3,3 mg.g⁻¹, sem aeração, com alta intensidade de iluminância (345 μmol fóton/m².s) e com adição de acetato de sódio nos 15 dias de cultivo.

Sarada, Tripathi & Ravinshankar (2002) observaram que o crescimento de *H. pluvialis* é influenciado pelo tipo de meio de cultura. Em seu estudo, meios de cultivo autotróficos (BBM), heterotrófico (KM1) e mixotrófico (BBM e acetato de sódio) foram testados para formação de biomassa e produção de astaxantina, nas condições de pH inicial dos meios de 6, 4 Klx, a 25°C por 20 dias. Entre os meios utilizados, o meio BBM foi o melhor para crescimento celular ($1,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹), enquanto que nos demais houve crescimento lento. As culturas com meio KM1 acumularam mais astaxantina (8,1 mg.L⁻¹) que os outros meios.

Vários fatores induzem a formação de astaxantina nas células vegetativas, como: alta iluminância, deficiência de nitrogênio, deficiência de magnésio, deficiência de fosfato, adição de sal, elevada temperatura, entre outros. Boussiba (2000) utilizou a cepa K-0084 de *H. pluvialis* e selecionou o meio BG-11 como o mais apropriado para a produção de astaxantina. O mesmo autor reportou que para o estado de encistamento a temperatura máxima é de 35°C, sendo que os melhores resultados foram obtidos a 32°C sob alta intensidade de iluminância (12 Klx).

Ghiggi (2007) reportou que para cepa SAG 34-1b da microalga *H. pluvialis* as condições ótimas requeridas para a produção das células vegetativas são temperatura moderada (25±1°C), iluminância de 1,5 a 2,7 Klx, pH entre 6-7 e adição de até 0,1% de NaCl utilizando meio BBM modificado. Para a produção de astaxantina (0,7 de absorvância), as melhores condições são iluminância de 3,5 a 7 Klx, salinidade entre 0,5 e 0,7%, pH inicial 8 e 9, aeração de 400 mL.min⁻¹.

Tripathi, Sarada & Ravishankar (2002) usaram a cepa SAG 19-a da microalga *H. pluvialis* e estudaram a influência do pH inicial no meio de cultivo, empregando meio heterotrófico, a 25°C, 1,5 Klx por 7 dias. O maior crescimento celular foi observado em pH 7 (0,90 g.L⁻¹) e o menor em pH 9 (0,4 g.L⁻¹). Nesse estudo também ocorreu a investigação do efeito de diferentes concentrações de sal em cultivo mixotrófico, sendo que altas concentrações de NaCl (>0,1%) foram letais às células.

Orosa *et al.* (2005) usaram a cepa CCAP 34/7 da microalga *H. pluvialis* e observaram que a exposição a meios deficientes em nitrogênio tem sido uma condição eficiente para o aumento do acúmulo de astaxantina. Diferentes concentrações de NaNO₃ foram testadas (0, 0,15, 0,25, 0,5, 0,75 e 1g.L⁻¹) sendo a melhor condição para produção da astaxantina com 0,15g.L⁻¹ de NaNO₃.

Oncel *et al.* (2010) realizaram uma comparação de diferentes cultivos e intensidades de luz de *H. pluvialis*. Os autores observaram que a adição de glicose ao meio de cultivo BBM apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento (0,60 dia⁻¹) e a maior produtividade em célula (0,53 g.L⁻¹.dia⁻¹), utilizando 12 Klx de iluminância a 25°C, com aeração de 1% (v/v) de CO₂ e concentração de inóculo de 10%.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na Figura 8 mostra a sequência do desenvolvimento deste estudo que compreende o crescimento celular da microalga *Haematococcus pluvialis* bem como a produção de carotenoides.

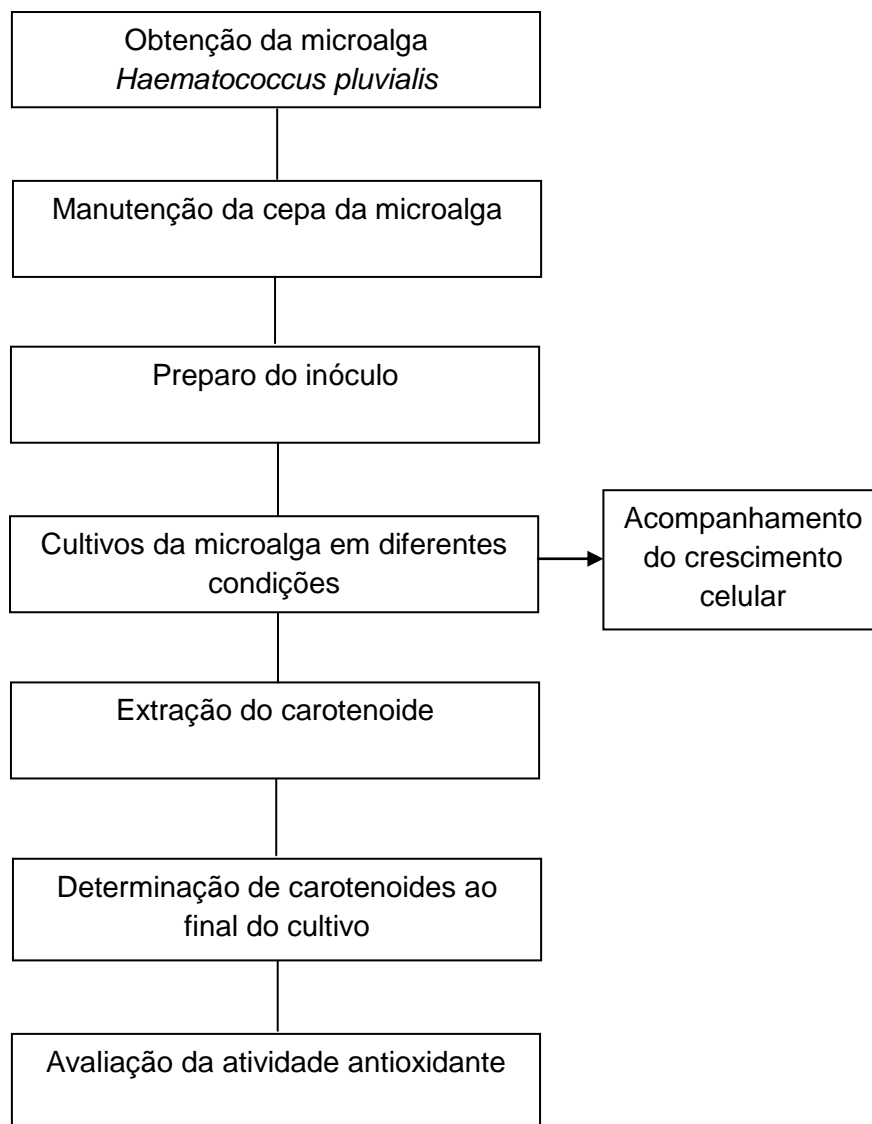


Figura 8: Etapas de desenvolvimento do trabalho.

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a microalga *Haematococcus pluvialis*, cedida através da Coleção de Microalgas Elisabeth Adair do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (UFF).

4.2 Manutenção da cepa da microalga

A cepa foi mantida em meio de cultivo *Bold Basal Medium* (BBM) descrito na Tabela 2, o qual teve pH inicial ajustado em 7 utilizando as soluções de 0,1 N de NaOH e/ou 0,1 N de HCl, em fotobiorreatores de 1L a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob constante iluminância de 1,5 Klx. Os repiques foram realizados a cada 14 dias. A Figura 9 mostra os fotobiorreatores de manutenção da cepa.



Figura 9: Fotobiorreatores de manutenção de *Haematococcus pluvialis*.

4.3 Inóculo

O inóculo foi cultivado em meio de cultivo BBM em fotobiorreatores de 1L contendo 700 mL de meio sob constante iluminância (1,5 Klx), a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 14 dias (adaptado de DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2004).

4.4 Condições de cultivo

Estudos foram realizados com variações nas condições de cultivo, alterando os nutrientes do meio de cultivo utilizado, a aeração, a concentração inicial do inóculo e o pH inicial do meio. Os experimentos foram realizados com o propósito de avaliar o crescimento celular e a produção de carotenoides a partir da microalga *H. pluvialis* frente às diferentes condições de cultivo.

Inicialmente para os cultivos foram utilizados cinco diferentes meios: BBM, BBM e acetato de sódio, BBM e glicose, BG-11 e BAR, descritos na Tabela 2. Os experimentos foram conduzidos por 15 dias, com a concentração inicial do inóculo de 10%, todos os meios foram ajustados a pH inicial 7, com aeração de 0,30 L.min⁻¹ e sob iluminância constante de 6 Klx.

Sequencialmente experimentos foram conduzidos com os meios de cultivo BBM e acetato de sódio, BBM e glicose e BG-11, estudando a concentração inicial do inóculo empregando-se 10 ou 20%, bem como o pH inicial do meio de cultivo, o qual foi ajustado inicialmente em 6, 7 ou 8, com aeração de 0,30 L.min⁻¹, sob iluminância constante de 6 Klx por 15 dias.

No meio de cultivo BBM e acetato de sódio, com 20% de inóculo, pH inicial 7,0, sob iluminância constante de 6 Klx por 22 dias, a aeração também foi analisada empregando-se aos cultivos ar atmosférico enriquecido de 30% CO₂ (v/v). O CO₂ foi injetado nos meios de cultivo durante 1h uma vez ao dia.

Todos os experimentos foram realizados em fotobiorreatores com capacidade de 1L, à temperatura de 24±1°C. Deste modo, as condições de cultivo que apresentaram maior crescimento celular e produção de carotenoides ao final do cultivo foram selecionadas, conforme demonstra a Figura 10.

Tabela 2: Composição dos meios de cultivo

Constituintes	BBM (mg.L⁻¹)	BBM e acetato de sódio (mg.L⁻¹)	BBM e glicose (mg.L⁻¹)	BG-11 (mg.L⁻¹)	BAR (mg.L⁻¹)
KH ₂ PO ₄	175	175	175	40	175
CaCl ₂ .2.H ₂ O	25	25	25	36	25
K ₂ HPO ₄	75	75	75	-	75
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	75	75	75	75
NaNO ₃	250	250	25	1500	250
NaCl	25	25	25	-	25
H ₃ BO ₃	115	115	115	2,9	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,9	4,9	4,9	-	-
EDTA.Na ₂	10	10	10	115	25
CH ₃ COONa	-	2000	-	-	1000
C ₆ H ₁₂ O ₆	-	-	5000	-	-
FeC ₆ H ₅ O ₇ .(NH ₄) ₂	-	-	-	6	-
C ₆ H ₈ O ₇	-	-	-	6	-
Na ₂ CO ₃	-	-	-	20	-
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	-	-	1,8	0,73
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	0,22	0,44
NaMoO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	3,9	0,35
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-	0,079	0,77
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	-	-	0,049	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	-	-	2500
CoCl ₃	-	-	-	-	0,23

FONTE: BBM (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2004), BBM e glicose (ONCEL *et al.*, 2010), BBM e acetato de sódio (TRIPATHI *et al.*, 1999), BG-11 (RIPPKA *et al.*, 1979), BAR (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2004).

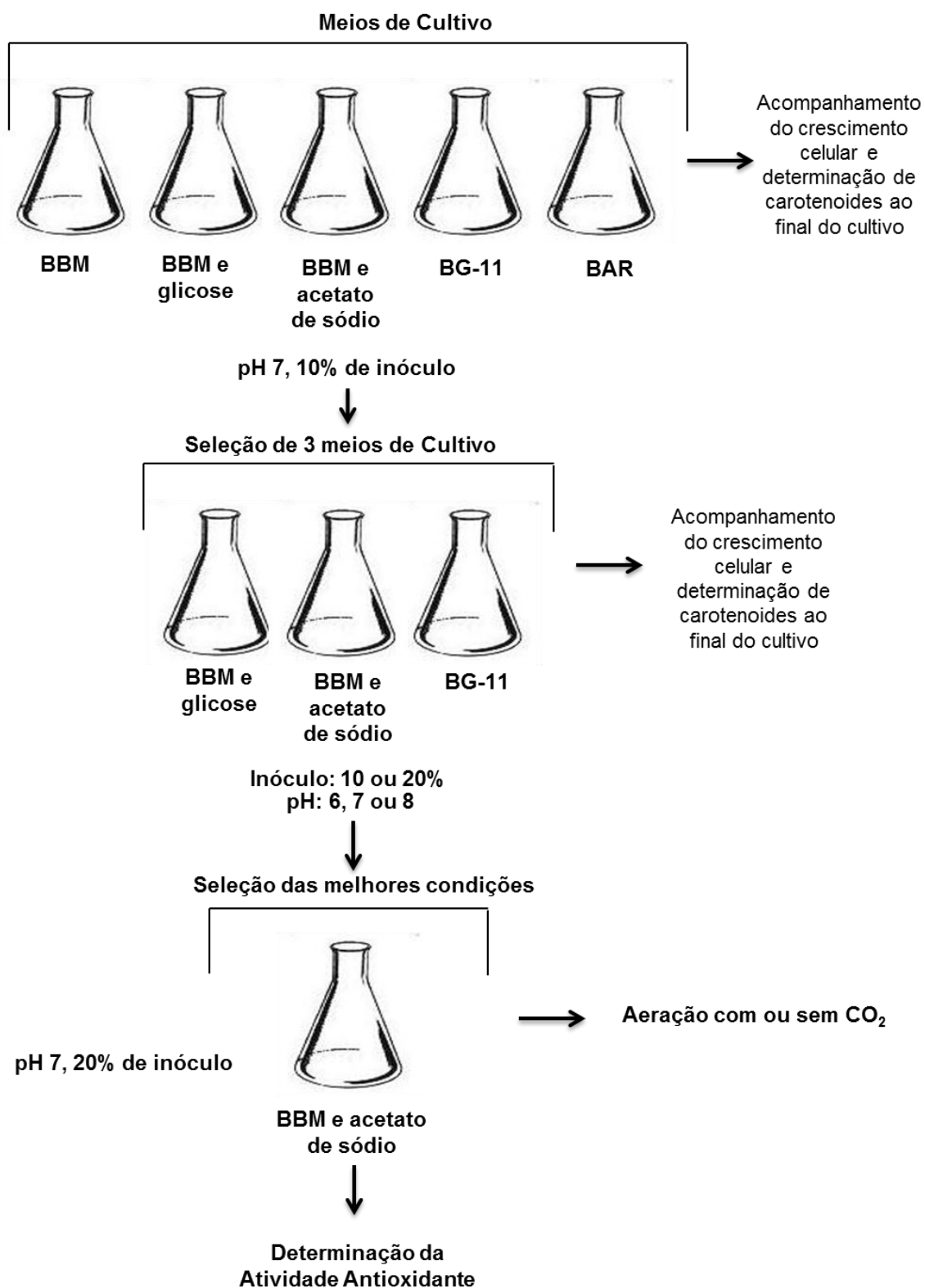


Figura 10: Representação esquemática da seleção das diferentes condições de cultivo abordadas neste trabalho.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em potenciômetro segundo AOAC (2000).

4.5.2 Análise da concentração celular

A concentração celular foi avaliada diariamente através de leitura de absorvância a 560 nm utilizando espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) (ONCEL *et al.*, 2010). A conversão de absorvância em concentração celular foi realizada utilizando uma curva padrão para a microalga apresentada no Apêndice 1.

4.5.3 Determinação de carotenoides totais

A ruptura celular foi realizada a partir de 0,05 g de células secas (12 h a 30°C), com 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) pré-aquecido a 55°C, a mistura foi homogeneizada em agitador mecânico (Biomexer, QL-901, Brasil), deixando a reação ocorrer durante 1h (adaptado de Fonseca *et al.*, 2011). Após a ruptura foram adicionados 6 mL de acetona para facilitar a extração do carotenoide. A amostra foi centrifugada a 1800 *g* por 10 minutos para a separação da fase solvente. O procedimento de ruptura foi repetido por dois ciclos. Na fase solvente foi adicionado 10 mL de cloreto de sódio 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na₂SO₄), dando origem aos extratos carotenogênicos (MICHELON *et al.*, 2012). A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-220, China) a 474 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e os valores da quantificação obtidos pela Equação 1 (DAVIES, 1976), expressos em termos de seu carotenoide majoritário astaxantina em éter de petróleo com coeficiente de absorvidade molar de 2100 (SEDMAK, WEERASINGHE & JOLLY, 1990).

$$C_e = \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} = \frac{A * V * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * 100 * m} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: C_e = carotenoides totais específicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$), A = absorvância; V = volume (mL); m = biomassa seca (g); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorvidade molar.

A Figura 11 mostra a extração carotenogênica da biomassa de *H. pluvialis*.



Figura 11: Extração carotenogênica da biomassa proveniente de *H. pluvialis*.

4.5.4 Determinação da atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos

Os extratos carotenogênicos utilizados para determinar a atividade antioxidante foram obtidos ao final de 15 dias de cultivo utilizando meio BBM e acetato de sódio, com 20% de inóculo, pH inicial 7 sob iluminância de 6 Klx à $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

O método ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi realizado de acordo com Rufino *et al.* (2007). Foi preparada uma solução estoque de 7 mM de ABTS, a partir desta foi preparado o radical ABTS^+ , que consiste da reação entre 5 mL da solução estoque com 88 μL de uma solução de persulfato de potássio 140 mM. Esta mistura foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente por 16 h. Em ambiente escuro, o radical ABTS^+ foi adicionado em tubos de ensaio, juntamente com extratos carotenogênicos com concentrações conhecidas de modo a completar 4

mL em cada tubo. A reação foi monitorada a cada 15 min, totalizando 75 min de análise, as leituras foram realizadas a 734 nm (CIPOLLATI, 2012).

Para determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, alíquotas dos extratos carotenogênicos foram colocados em contato com solução de DPPH em metanol ($5 \cdot 10^{-6}$ M), e deixados em repouso ao abrigo da luz. A absorvância foi medida a 515 nm em intervalos de 60, 120 e 180 min, calculadas as porcentagens de inibição do DPPH (CIPOLLATI, 2012).

O poder de redução do ferro foi medido com base no protocolo desenvolvido por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado a partir de uma solução de 0,1M de tampão acetato (pH 3,6), 10 mM TPTZ, e 20 mM cloreto férrico (10:1:1 v/v/v). O reagente foi aquecido a 37°C, o extrato foi adicionado (CHANG *et al.*, 2007), e a reação monitorada a cada 15 min durante 210 min (CIPOLLATI, 2012).

Como padrão de atividade antioxidante foi utilizado astaxantina (SIGMA-ALDRICH) nos métodos acima descritos. Este foi dissolvido em acetona, na concentração de $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (CIPOLLATI, 2012).

4.6 Parâmetros de cultivo

As respostas avaliadas nos diferentes cultivos foram concentração celular máxima ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), carotenoides totais volumétrico ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e específico ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) (Equação 1), produtividade em biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), produtividade em carotenoides totais volumétrico ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) e específico ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) e a velocidade específica máxima de crescimento (dia^{-1}).

O cálculo dos carotenoides totais volumétricos foi realizado através da razão dos carotenoides totais específicos ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) pela concentração celular ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) correspondente no tempo final de cultivo.

Através da Equação 2 foi possível calcular P produtividade em célula ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), onde X_t é a concentração celular máxima ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) no tempo t de cultivo (dia) e X_0 a concentração celular ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) no tempo inicial de cultivo t_0 (dia) (SCHMIDELL, LIMA & BORZANI, 2001).

$$P = \frac{(Xt - Xo)}{(t - to)} \quad (\text{Eq. 2})$$

A produtividade do produto P_c ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) e P_v ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) também foram calculadas, respectivamente, pelas Equações 3 e 4, onde C_e ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) é a concentração específica de carotenoides totais atingida no tempo final de cultivo t_f (dia), C_v ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) é a concentração volumétrica de carotenoides totais atingida no tempo final de cultivo t_f (dia) e C_o é a concentração de carotenoides no início do cultivo (considerada inexistente = 0).

$$P_c = \frac{(C_e - C_o)}{t_f} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$P_c = \frac{(C_v - C_o)}{t_f} \quad (\text{Eq. 4})$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) em (dia^{-1}) foi obtida na fase exponencial, correspondendo ao coeficiente angular da curva $\ln(X)$ versus tempo (SCHMIDELL, LIMA & BORZANI, 2001).

4.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo os resultados correspondentes à média dos valores obtidos de cada amostra, para realização de análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* ($p < 0,05$), para indicação das condições de cultivo mais promissoras quanto ao crescimento celular e a bioprodução de carotenoides. Para avaliação das duas diferentes concentrações de inóculo foi realizado o teste estatístico *t* de *Student* ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Influência dos diferentes meios de cultivo no crescimento celular e na bioprodução de carotenoides

Na Figura 12 e na Tabela 3 estão apresentados, respectivamente, o acompanhamento do crescimento celular da microalga *H. pluvialis* para os diferentes meios de cultivo estudados e os parâmetros dos cultivos como concentração celular máxima, produtividade em célula, velocidade específica máxima de crescimento, e após 15 dias de cultivo, concentrações de carotenoides e produtividades em carotenoides.

A concentração celular máxima alcançada foi de $1,18 \pm 0,36 \text{ g.L}^{-1}$ no meio de cultivo BBM e acetato de sódio, diferindo estatisticamente ao nível de 95% de confiança dos demais meios analisados. Os meios de cultivo BBM e glicose, BAR, BG-11 e BBM não apresentaram diferença estatística entre si, sendo que os resultados encontrados para a concentração celular máxima foram, respectivamente, $0,68 \pm 0,37$, $0,46 \pm 0,34$, $0,64 \pm 0,08$, $0,46 \pm 0,38 \text{ g.L}^{-1}$.

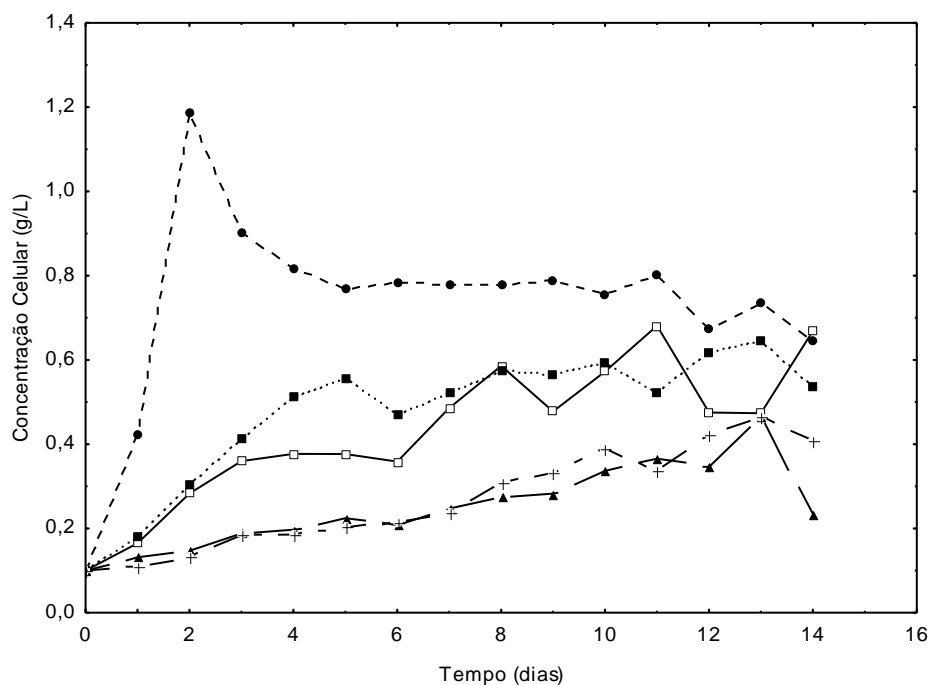


Figura 12: Cinética de crescimento de *H. pluvialis* com 10% de inóculo, 6 Klx, a 25°C, com pH inicial de 7 nos meios de cultivo (□) BBM e glicose, (●) BBM e acetato de sódio, (■) BAR, (▲) BG-11 e (±) BBM.

Tabela 3: Parâmetros dos cultivos de *H. pluvialis* em meios BBM e glicose, BBM e acetato de sódio, BG-11, BAR e BBM, com pH inicial de 7, 10% de inóculo, 6 Klx, a 25°C.

Parâmetros	BBM e Glicose	BBM e Acetato de Sódio	BG-11	BAR	BBM
$X_{máx}$ (g.L ⁻¹)	0,68±0,37 ^b	1,18±0,36 ^a	0,64±0,08 ^b	0,46±0,34 ^b	0,46±0,38 ^b
P (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	0,09±0,01 ^b	0,39±0,12 ^a	0,03±0,02 ^b	0,05±0,01 ^b	0,03±0,02 ^b
$\mu_{máx}$ (dia ⁻¹)	0,20±0,02 ^b	0,30±0,04 ^a	0,22±0,02 ^b	0,10±0,02 ^c	0,11±0,03 ^c
C _e (µg.g ⁻¹)	2635,38±397,92 ^a	2623,12±183,15 ^a	3026,66±286,95 ^a	1300,38±153,16 ^b	1295,55±237,55 ^b
P _c (µg.g ⁻¹ .dia ⁻¹)	175,69±26,52 ^a	174,87±12,21 ^a	201,77±19,13 ^a	86,69±12,50 ^b	43,18±7,91 ^b
C _v (µg.L ⁻¹)	1603,62±186,21 ^a	1646,79±85,04 ^a	1164,35±84,03 ^b	792,19±87,63 ^b	315,46±43,51 ^c
P _v (µg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	106,90±12,41 ^a	109,79±5,66 ^a	77,62±5,60 ^b	52,81±5,84 ^b	21,03±2,90 ^c

Média±desvio-padrão (exceto para $\mu_{máx}$). Letras minúsculas diferentes na mesma linha representa que há diferenças significativas (p<0,05).

$X_{máx}$: concentração celular máxima; P: produtividade em célula; $\mu_{máx}$: velocidade específica máxima de crescimento; C_e: carotenoides totais específicos; P_c: produtividade dos carotenoides totais específicos; C_v: carotenoides totais volumétricos; P_v: produtividade dos carotenoides totais volumétricos.

Segundo Thipathi *et al.* (1999), modificações nos meios de cultura de *H. pluvialis* são utilizados para melhorar a produtividade da biomassa e do carotenoide produzido. Vários estudos têm sido conduzidos no objetivo de aumentar a taxa de crescimento da microalga, os mesmos autores obtiveram melhores resultados de crescimento celular em meios mixotróficos, como o meio BBM adicionado de acetato de sódio ($3,0 \times 10^5$ células.mL⁻¹) e o meio BBM adicionado de L-asparagina ($3,25 \times 10^5$ cél.mL⁻¹) sob iluminância de 1,5 Klx à 25°C, com 7% de inóculo durante 12 dias de cultivo.

Sarada, Tripathi & Ravishankar (2002) cultivaram *H. pluvialis* para avaliar o efeito das diferentes condições de cultivo na produção de astaxantina. A microalga foi cultivada em meio heterotrófico com adição de NaCl e acetato de sódio durante um período de 16 dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com 10% de inóculo sob iluminância de $5,14 \times 10^7$ erg.m⁻².s⁻¹ e pH ajustado para 6,8. O melhor resultado observado para o crescimento celular foi de 0,9 g.L⁻¹ em 12 dias de cultivo.

Resultados inferiores ao deste trabalho foram encontrados por Yoshimura *et al.* (2006), que cultivaram a microalga em meio *Kobayashi's basal medium*, contendo em sua composição acetato de sódio, extrato de levedura, L-asparagina e compostos inorgânicos como MgCl₂.6H₂O, FeSO₄.7H₂O e CaCl₂.2H₂O, por 14 dias, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 740 lx, em fotobiorreatores de 200 mL, alcançando o máximo em biomassa de aproximadamente 0,5 g.L⁻¹, em 7 dias de processo.

Um meio autotrófico foi utilizado em cultivos de *H. pluvialis* por Garcia-Malea *et al.* (2009) a 20°C, pH controlado em 8; com injeção de CO₂, concentração de inóculo de 0,3 g.L⁻¹, durante 1-2 semanas, sob iluminância de 12h escuro/12h claro (2500 µE/m²s), atingindo a concentração celular máxima de 0,8 g.L⁻¹.

Em virtude do maior crescimento celular da microalga no meio BBM e acetato de sódio (Figura 12) ter ocorrido mais rapidamente que os demais (2 dias) isto promoveu consequentemente uma maior produtividade em célula (Tabela 3) de $0,39 \pm 0,12$ g.L⁻¹.dia⁻¹, diferindo estatisticamente dos demais meios de cultivo estudados, que apresentaram valores significativamente inferiores de $0,09 \pm 0,01$ (BBM e glicose), $0,03 \pm 0,02$ (BG-11), $0,05 \pm 0,01$ (BAR) e $0,03 \pm 0,02$ g.L⁻¹.dia⁻¹ (BBM).

Oncel *et al.* (2010) também observaram variação nos valores encontrados para a produtividade em biomassa que foi de $0,22$ g.L⁻¹.dia⁻¹ para o meio de cultivo BBM e $0,69$ g.L⁻¹.dia⁻¹ para o meio de cultivo BBM e glicose, utilizando 10% de inóculo, a 25°C, sob iluminância de 30 µE.m⁻².s⁻¹ e com aeração enriquecida com 1% de CO₂.

Jeon, Cho, & Yun (2006) analisaram meios enriquecidos com 30 mM de acetato de sódio a $20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminância, 25°C , concentração de inóculo de $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, obtendo produtividade de $0,243 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. Portanto, os resultados encontrados nesse trabalho para a produtividade em células apresentam-se semelhantes aos encontrados na literatura.

A maior velocidade específica máxima de crescimento celular (Tabela 3) foi encontrada para o meio mixotrófico BBM e acetato de sódio com $0,30\pm 0,04 \text{ dia}^{-1}$, apresentando os mínimos valores nos meios autotróficos BBM e BG-11. Em outros estudos, cultivos de *H. pluvialis* exibem resultados similares. Kobayashi *et al.* (1992) encontraram valores de $0,60 \text{ dia}^{-1}$ em cultivos mixotróficos e $0,22 \text{ dia}^{-1}$ em cultivos autotróficos, em pH inicial ajustado para 6,8, sob iluminância de 4,5 Klx a 20°C , com 10% de inóculo. Oncel *et al.* (2010), utilizando como fonte de carbono glicerol encontraram velocidade específica máxima de crescimento de $0,47 \text{ dia}^{-1}$ em cultivos de *H. pluvialis*, com 10% de inóculo, a 25°C sob iluminância de $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e aeração enriquecida com 1% de CO_2 .

H. pluvialis utiliza fontes de carbono orgânicas, como o acetato de sódio, uma vez que este composto promove o crescimento celular mais rapidamente quando comparado a cultivos autotróficos, como os meios de cultivos BG-11 e BAR. Suplementar o meio de cultivo com acetato de sódio pode estimular o crescimento celular e a formação de carotenoides. O acetato de sódio pode promover a formação de cistos e melhorar a síntese de carotenoides, porém em grandes quantidades o acetato pode inibir o crescimento celular da microalga, podendo até levar as células à morte (KOYABASHI, KAKIZONO, & NAGAI, 1991; JEON, CHO, & YUN, 2006).

Meios mixotróficos suplementados com glicose também são usados como fonte de carbono. Oncel *et al.* (2010) relatam que ocorre mudança de coloração desencadeando a formação de carotenoides em meios enriquecidos com glicose, além de promover um crescimento celular superior quando comparado a meios autotróficos. Entretanto, a utilização de meios adicionados de alta concentração de glicose implica em riscos de contaminação no cultivo. Além disso, *H. pluvialis* possui pouca capacidade de metabolizar a glicose, promovendo uma baixa produção de biomassa e, conseqüentemente, baixa produção de carotenoides (GHIGGI, 2007), não observado neste trabalho.

A Figura 13 apresenta o comportamento do pH ao longo dos 15 dias de cultivo em diferentes meios. Os maiores valores de pH encontrados neste trabalho foram para os meios BBM e acetato de sódio, BAR e BBM, respectivamente. O pH

exerce influência na bioprodução de carotenoides, uma vez que em pHs alcalinos ocorre a formação de carotenoides e degradação da clorofila. Células de *H. pluvialis* produzem astaxantina em resposta ao estresse, seja por fatores ambientais e/ou nutricionais, protegendo a célula contra os danos oxidativos. Sob condições de estresse, o conteúdo de clorofila diminui drasticamente em pH elevados (SARADA, THIPATHI & RAVINSHANKAR, 2002).

Lababpour *et al.* (2004) analisaram o efeito do pH nos cultivos de *H. pluvialis*. Os experimentos foram ajustados em pH inicial de 6,8 e após 150 h o pH atingiu valores acima de 10, porém a taxa de crescimento foi semelhante quando o pH foi mantido em 6,8 durante todo o processo, com base nesses resultados os autores optaram por não controlar o pH ao longo dos cultivos.

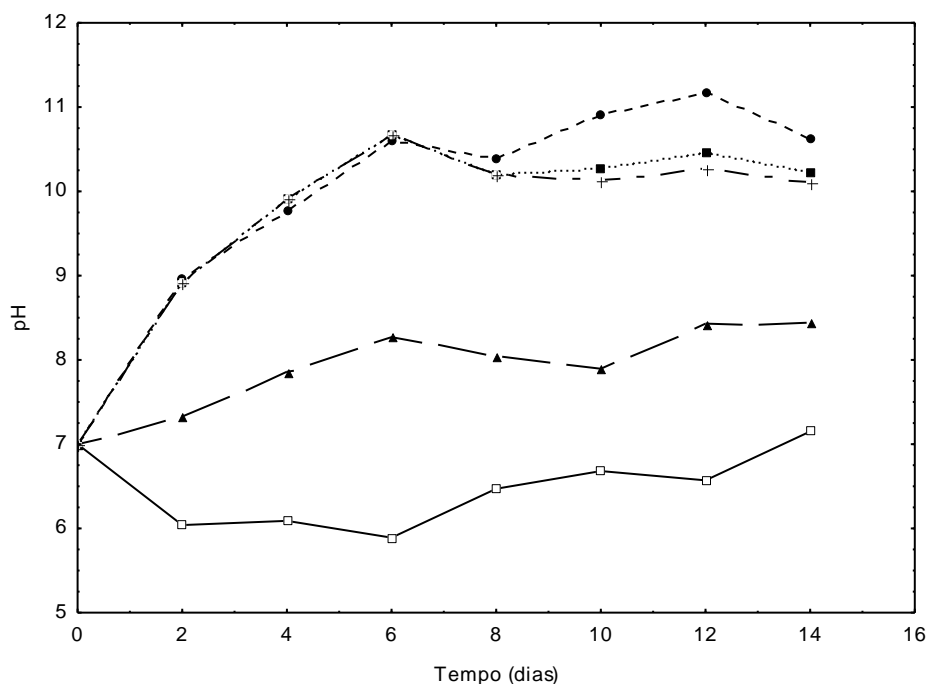


Figura 13: Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos de *H. pluvialis* com 10% de inóculo, 6 Klx, a 25°C, com pH inicial de 7 nos meios de cultivo (□) BBM e glicose, (●) BBM e acetato de sódio, (■) BAR, (▲) BG-11 e (±) BBM.

Dentre os meios estudados, as maiores produções carotenogênicas (Tabela 3) ocorreram nos meios BBM e Glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11, não apresentando diferença significativa entre eles ao nível de 95% de confiança. Já os meios BAR e BBM também não apresentaram diferença significativa entre si, entretanto com relação à produção dos carotenoides totais, estes apresentaram

resultados aproximadamente 2 vezes ou mais inferiores quando comparados aos meios destacados anteriormente em relação a concentração de carotenoides específicos e 3,7 vezes ou mais inferiores em relação a concentração de carotenoides volumétricos. O meio de cultivo que promoveu a carotenogênese mais rapidamente foi BBM e acetato de sódio, tendo alcançado a segunda fase celular no 3º dia de cultivo, que é período onde as células ficam encistadas indicando o começo da produção de carotenoides.

Segundo Ghiggi (2007), a astaxantina compreende 85-88% do conteúdo de carotenoides totais presentes na biomassa de *H. pluvialis*. De acordo com isto os resultados encontrados para a astaxantina no desenvolvimento deste trabalho mostram-se similares aos encontrados na literatura, que relatam valores entre 2000 ± 140 e $3300 \pm 100 \mu\text{g.g}^{-1}$, utilizando 10% de inóculo, iluminância constante de $177 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a 28°C . (DOMINGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2007).

Os valores encontrados para produtividade específica em carotenoides nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11 não apresentaram diferença significativa entre si. No entanto, estes meios apresentaram valores significativamente superiores quando comparados aos meios autotróficos BAR e BBM. Para produtividade volumétrica os melhores desempenhos ocorreram nos meios de cultivo mixotrófico BBM e glicose e BBM e acetato de sódio, não apresentando diferença significativa entre si.

Com base nos resultados encontrados de crescimento celular, produtividade em célula, velocidade específica máxima de crescimento, produção de carotenoides volumétrico e específico, produtividade em carotenoides volumétrica e específica, selecionou-se três meios de cultivo: um meio autotrófico (BG-11) e dois meios mixotróficos (BBM e glicose, BBM e acetato de sódio) para dar continuidade a este trabalho, uma vez que estes meios apresentaram melhores resultados quando comparados aos meios BAR e BBM.

5.2 Influência de diferentes concentrações de inóculo e pHs iniciais no crescimento celular e bioprodução de carotenoides

As cinéticas de crescimento celular em diferentes concentrações de inóculo (10 ou 20%) e pHs iniciais dos meios de cultivo (6, 7 e 8) foram realizadas visando selecionar as melhores condições destas variáveis, nos meios de cultivo BBM

e glicose, BBM e acetato e BG-11, conforme Figura 14 e Tabela 4 que mostram o crescimento celular máximo.

A concentração de 10 ou 20% de inóculo não exerceu influência sob o crescimento celular, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) para todas as condições, exceto no meio BBM e glicose (pH=6 e 10% de inóculo) que apresentou o maior crescimento celular ($1,31 \text{ g.L}^{-1}$) superior ao obtido com 20% de inóculo. Esta condição não diferiu também do desempenho obtido no meio BBM e acetato de sódio (pH=8 e 10% de inóculo) com $1,04 \text{ g.L}^{-1}$. No meio BG-11 o crescimento celular foi significativamente menor, alcançando seu máximo de $0,58 \text{ g.L}^{-1}$ em pH 6.

A concentração celular máxima é um parâmetro de crescimento importante, pois a viabilidade econômica do processo está relacionada a este indicativo. O aumento da concentração de inóculo pode estar relacionado à menor disponibilidade de nutrientes nos cultivos inoculados com o maior número de células, devido ao seu consumo no decorrer do tempo (ANDRADE, 2005).

O meio BG-11 é utilizado na manutenção de diversas microalgas, inclusive as de água doce ou de origem térmica, porém para algumas cepas este meio pode não apresentar os requisitos iônicos necessários para o crescimento celular. Um exemplo são as cepas que fixam nitrogênio, a manutenção prolongada dessas microalgas mantidas em BG-11 leva a seleção de cepas mutantes que perdem a capacidade de fixar nitrogênio aerobicamente e algumas formam heterocistos anormais (RIPPKA, 1979).

O incremento do pH inicial para cada meio estudado não proporcionou influência estatisticamente significativa no crescimento celular, nas diferentes concentrações de inóculo, com exceção do meio BBM e glicose (pH=6 e 10% de inóculo) que apresentou o maior crescimento celular ($1,31 \text{ g.L}^{-1}$) superior aos obtidos no pH 7 e 8.

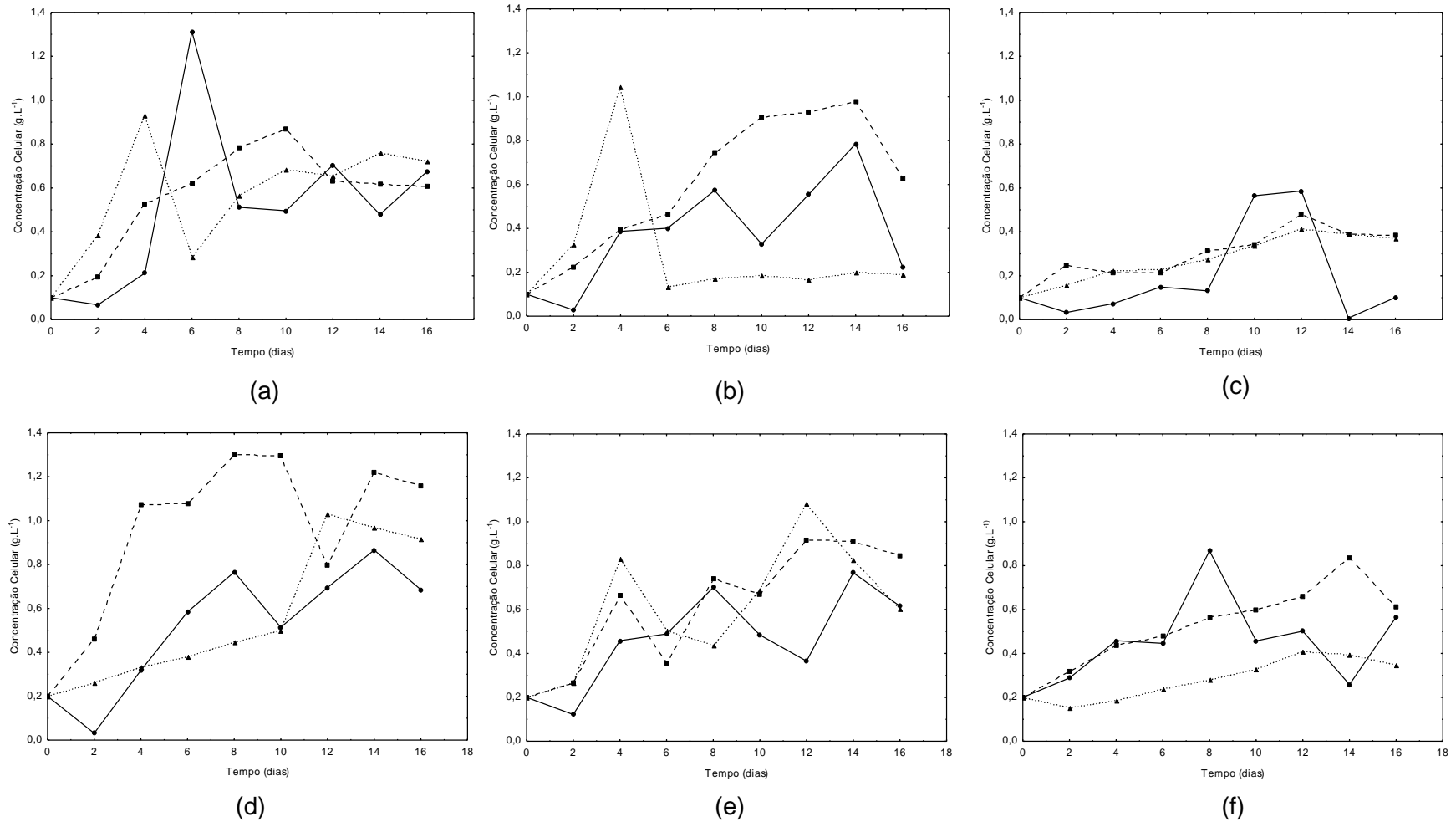


Figura 14: Cinética de crescimento de *H. pluvialis*, a 25°C, 6 Klx em: (a) BBM e glicose pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (b) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (c) BG-11 pH pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (d) BBM e glicose pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (e) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (f) BG-11 pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo.

Tabela 4: Crescimento celular máximo em meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11, com 10 e 20% de inóculo e pH inicial de 6, 7 e 8.

Meio de cultivo	pH	Concentração de inóculo 10%	Concentração de inóculo 20%
		$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)
BBM e glicose	6	1,31±0,06 ^{abA}	0,86±0,18 ^{abB}
	7	0,68±0,37 ^{abA}	0,91±0,03 ^{abA}
	8	0,92±0,04 ^{abA}	1,03±0,05 ^{abA}
BBM e acetato de sódio	6	0,78±12 ^{abA}	0,92±0,13 ^{abA}
	7	1,18±0,36 ^{abA}	1,29±0,07 ^{abA}
	8	1,04±0,06 ^{abA}	0,85±0,33 ^{abA}
BG-11	6	0,58±0,04 ^{abA}	0,86±0,24 ^{abA}
	7	0,64±0,08 ^{abA}	0,83±0,36 ^{abA}
	8	0,41±0,02 ^{abA}	0,41±0,01 ^{abA}

Média±desvio-padrão. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$). $X_{m\acute{a}x}$: concentração celular máxima.

Os valores encontrados para a produtividade em célula e a velocidade específica máxima de crescimento, para as diferentes condições de cultivo, estão apresentados na Tabela 5. Dentre os meios de cultivo analisados em diferentes condições, o meio BBM e acetato de sódio com pH inicial 7, utilizando concentração de inóculo de 10%, apresentou a maior velocidade máxima específica de crescimento de 0,30 dia⁻¹.

As maiores produtividades em célula ocorreram nos cultivos mixotróficos com concentração de inóculo de 10%, no meios BBM e acetato de sódio em pH 8 (0,17±0,01 g.L⁻¹.dia⁻¹), BBM e glicose em pH 6 (0,16±0,01 g.L⁻¹.dia⁻¹) e pH 8 (0,15±0,01 g.L⁻¹.dia⁻¹), não havendo diferença significativa entre eles. Com o aumento para 20% de inóculo, houve uma diminuição na produtividade celular, sendo as máximas alcançadas nos meios BBM e acetato de sódio pH 7 (0,12±0,01 g.L⁻¹.dia⁻¹) e BG-11 pH 6 (0,09±0,02 g.L⁻¹.dia⁻¹), não havendo diferença significativa entre eles.

Vários autores tem relatado a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade em célula de *H. pluvialis* sob diferentes condições de cultivo, variando entre 0,22 a 0,60 dia⁻¹ e 0,05 a 0,19 g.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente

(KOYABASHI *et al.*, 1992; JEON, CHO & YUN, 2006; ONCEL *et al.*, 2010). Portanto, a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade em célula obtidas neste estudo encontram-se dentro da faixa esperada.

Tabela 5: Produtividade em célula e velocidade específica máxima de crescimento nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 e 8.

Meio de cultivo	pH	Concentração de inóculo 10%		Concentração de inóculo 20%	
		P (g.L ⁻¹ . dia ⁻¹)	μ _{máx} (dia ⁻¹)	P (g.L ⁻¹ . dia ⁻¹)	μ _{máx} (dia ⁻¹)
BBM e glicose	6	0,16±0,007 ^{aA}	0,15±0,002 ^{bdA}	0,05±0,01 ^{bB}	0,12±0,03 ^{abA}
	7	0,09±0,01 ^{bA}	0,20±0,02 ^{abA}	0,06±0,002 ^{bB}	0,18±0,03 ^{aA}
	8	0,15±0,007 ^{aA}	0,16±0,01 ^{bdA}	0,07±0,003 ^{bB}	0,11±0,006 ^{bB}
BBM e acetato de sódio	6	0,06±0,008 ^{bcA}	0,14±0,005 ^{bcdA}	0,06±0,008 ^{bA}	0,12±0,01 ^{abA}
	7	0,39±0,12 ^{bB}	0,30±0,04 ^{aA}	0,12±0,006 ^{aA}	0,11±0,004 ^{bB}
	8	0,17±0,01 ^{aA}	0,05±0,004 ^{cB}	0,06±0,02 ^{bB}	0,12±0,01 ^{abA}
BG-11	6	0,05±0,003 ^{bcA}	0,09±0,04 ^{cdA}	0,09±0,02 ^{abA}	0,09±0,01 ^{bA}
	7	0,03±0,02 ^{cA}	0,10±0,02 ^{cdA}	0,05±0,02 ^{bA}	0,12±0,003 ^{abA}
	8	0,03±0,001 ^{cA}	0,09±0,003 ^{cdA}	0,03±0,001 ^{bA}	0,09±0,01 ^{bA}

Média±desvio-padrão, exceto para o μ_{máx}. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna (p<0,05) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha (p<0,05). X_{máx}: concentração celular máxima; P: produtividade em célula.

O pH do meio de cultivo pode afetar o crescimento celular, bem como a produção de carotenoides. Sarada, Tripathi & Ravinshankar (2002) estudaram a influência do pH no crescimento celular e na produção de astaxantina por *H. pluvialis*. Os autores utilizaram um meio autotrófico e ajustaram o pH para 5, 6, 7, 8 ou 9 com uma concentração de inóculo de 10% durante 10 dias de cultivo, a 25°C sob iluminação de 1,5 Klx. A contagem de células máxima foi observada no pH 7 (4,9x10⁵ células.mL⁻¹), não havendo crescimento no pH 5 e no pH 9 o menor crescimento celular. Já os teores de pigmentos foram maiores em pH 7 (8,3 mg.L⁻¹) e pH 8 (10,7 mg.L⁻¹), e significativamente menor em pH 6 (4,9 mg.L⁻¹).

Ghiggi (2007) também investigou a influência de diferentes pHs iniciais, visando a otimização da produção de biomassa e pigmento, indicando que a faixa de pH inicial 6-7 apresentou os melhores resultados de crescimento.

A Figura 15 apresenta a variação do pH dos meios BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11 ao longo dos 15 dias de cultivo, com concentração de inóculo de 10% ou 20%. O pH exerce influencia sobre o crescimento celular de *H. pluvialis*. Durante o cultivo, o pH tende a sofrer um considerável e rápido aumento, possivelmente devido ao consumo pela microalga dos ânions que são nutrientes (GHIGGI, 2007).

As elevações de pH podem ocorrer em função do metabolismo autotrófico, onde o íon bicarbonato do meio se desidrata formando CO_2 para a fotossíntese e OH^- . Enquanto que quedas no pH ocorrem devido à liberação respiratória de CO_2 (SHIRAIWA, GOYAL & TOLBERT, 1993). A biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento de micro-organismos. Normalmente, o pH do meio decresce nas primeiras horas de bioprodução, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final da bioprodução, fato esse, que de modo geral, foi observado neste trabalho (VALDUGA *et al.*, 2009)

O pH também é importante na produção de cistos de *H. pluvialis*, uma vez que o pH combinado com outras condições de estresse, como alta intensidade de luz, deficiência de nutrientes ou aumento da temperatura do cultivo promove a carotenogênese mais rapidamente.

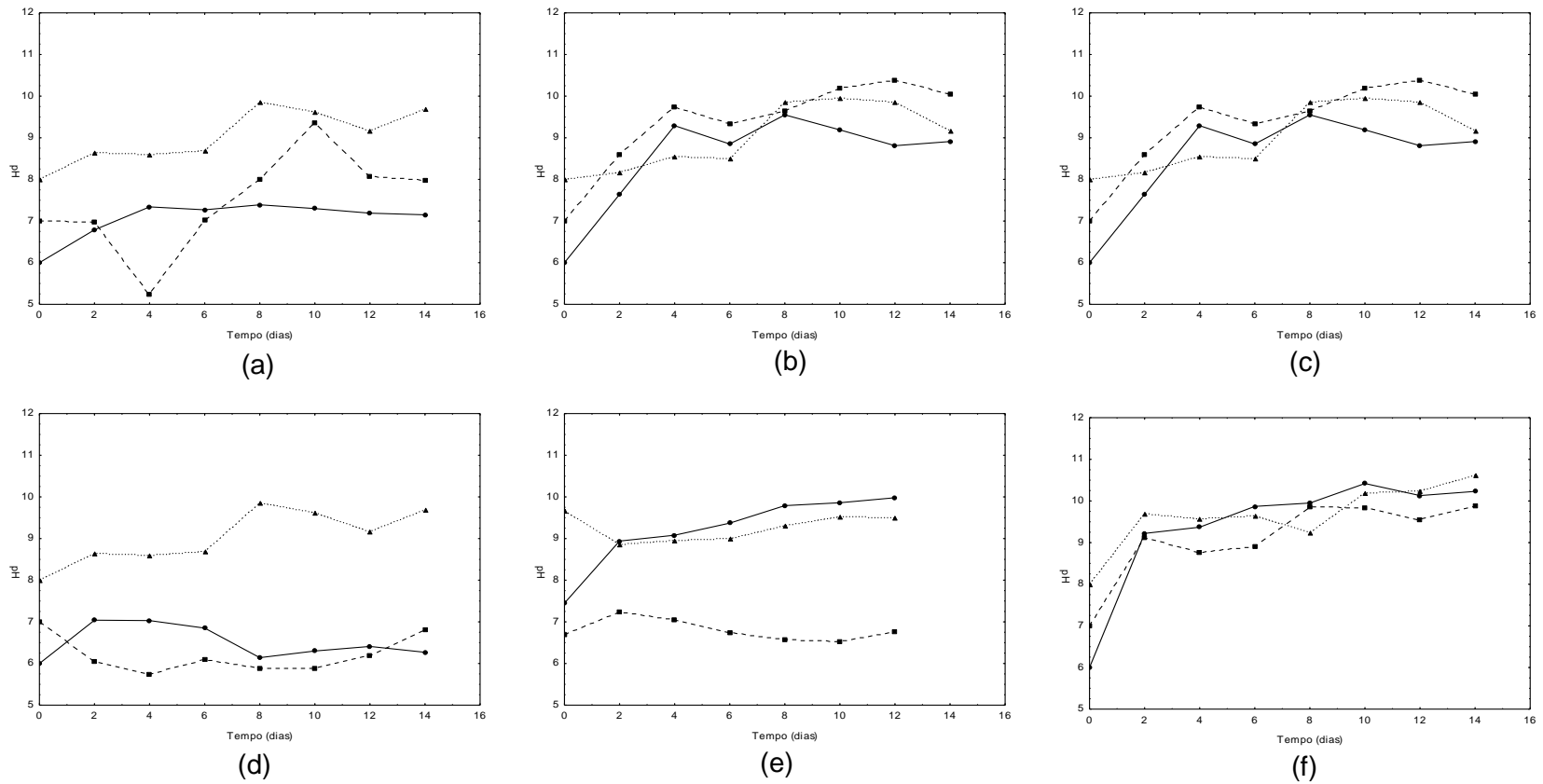


Figura 15: pH ao longo de 15 dias de cultivo de *H. pluvialis*, a 25°C, 6 Klx em (a) BBM e glicose pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (b) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (c) BG-11 pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 10% de inóculo; (d) BBM e glicose pH pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (e) BBM e acetato de sódio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo; (f) BG-11 pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲) com 20% de inóculo.

Em relação à produção de carotenoides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ e $\mu\text{g.L}^{-1}$) e a produtividade em carotenoides ($\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) as Tabelas 6, 7, 8 e 9 apresentam os resultados nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11, com concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial 6, 7 ou 8.

A produção de carotenoides, após 15 dias de cultivo, diferentemente do crescimento celular foi influenciada pela concentração inicial de inóculo e o pH inicial do meio, dependendo das condições de cultivo empregadas.

Na Tabela 6 observa-se que para o meio BBM e glicose o uso de 10% de inóculo (pH 6 e 7) proporcionou maiores produções de carotenoides, quando comparado à concentração inicial de 20%, exceto para o pH 8 que não foi influenciado por esta variável alcançando menores produções do carotenoide. No entanto para o meio BBM e acetato de sódio, ocorreu um comportamento inverso, onde as maiores produções carotenogênicas foram observadas com 20% de inóculo nos pHs 7 e 8, e o pH inicial do meio de cultivo 6 apresentou maior produção de carotenoides com 10% de inóculo. No meio BG-11 as produções de carotenoides também ocorreram na presença de maiores concentrações de inoculo (20%) em pHs 6 e 8. Na condição de 10% de inóculo, os meios BG-11 em pH 7,0 e BBM e glicose em pH 6,0 apresentaram as maiores produções de carotenoides ($3026,66\pm 218,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $3870,63\pm 481,43 \mu\text{g.g}^{-1}$), não diferindo estatisticamente entre si. Porém, empregando 20% de inóculo, o meio BBM e acetato de sódio proporcionou uma produção de carotenoides significativamente superior as demais ($5653,56\pm 235,27 \mu\text{g.g}^{-1}$ em pH 7 e $4638,72\pm 215,09 \mu\text{g.g}^{-1}$ em pH 8).

Analisando os pHs iniciais para cada meio estudado, com concentração de inóculo de 10%, observou-se que o emprego do pH 6 ao meio de cultivo BBM e glicose proporcionou a melhor concentração celular máxima, de $1,31 \text{g.L}^{-1}$. O meio BBM e acetato de sódio apresentou melhor concentração máxima utilizando pH inicial de 8,0. No entanto, o incremento do pH ao meio BG-11 não proporcionou influência estatisticamente significativa no crescimento celular.

Na concentração de inóculo de 20%, no meio BBM e glicose, o pH não exerceu influência no crescimento celular. No meio BG-11, o menor crescimento celular foi observado em pH 8 ($0,41\pm 0,01 \text{g.L}^{-1}$) e no meio BBM e acetato de sódio, utilizando pH 7 obteve-se a maior concentração celular ($1,29\pm 0,07 \text{g.L}^{-1}$) dentre os meios analisados.

Os resultados da concentração dos carotenoides específicos estão refletidos na análise da Tabela 7, onde a produção volumétrica de carotenoides obtém

valores expressivamente superiores ao utilizar o meio de cultivo BBM e acetato de sódio, com concentração de inóculo de 20%, em pH inicial de 7 ou 8 alcançando $3803,75 \pm 176,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $4798,98 \pm 197,62 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, após 15 dias.

Tabela 6: Carotenoides totais específicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8.

Meio de cultivo	pH	Concentração de inóculo 10%	Concentração de inóculo 20%
BBM e glicose	6	$3870,63 \pm 481,43^{aA}$	$2708,28 \pm 261,67^{cdeB}$
	7	$2635,38 \pm 306,01^{bA}$	$1166,41 \pm 36,87^{efB}$
	8	$680,29 \pm 82,74^{cA}$	$746,17 \pm 312,17^{fA}$
BBM e acetato de sódio	6	$2838,61 \pm 249,92^{bA}$	$1612,27 \pm 75,37^{defB}$
	7	$2623,12 \pm 135,46^{bB}$	$5653,56 \pm 235,27^{aA}$
	8	$1013,70 \pm 303,51^{cB}$	$4638,72 \pm 215,09^{abA}$
BG-11	6	$1564,82 \pm 222,194^{cB}$	$3156,92 \pm 515,32^{bcdA}$
	7	$3026,66 \pm 218,43^{abA}$	$1981,61 \pm 777,91^{cdefA}$
	8	$1573,48 \pm 136,53^{cB}$	$3262,27 \pm 657,79^{bcA}$

Média \pm desvio-padrão. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$).

Tabela 7: Carotenoides totais volumétricos ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8.

Meio de cultivo	pH	Carotenoides Totais Volumétricos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
		Concentração de inóculo 10%	Concentração de inóculo 20%
6BBM e glicose	6	2593,32 \pm 322,56 ^{aA}	1841,63 \pm 177,93 ^{cdeB}
	7	1739,35 \pm 201,96 ^{bA}	921,46 \pm 29,12 ^{deB}
	8	489,80 \pm 56,57 ^{cdB}	679,01 \pm 284,07 ^{eA}
BBM e acetato de sódio	6	624,49 \pm 54,98 ^{cdB}	1426,98 \pm 41,78 ^{defA}
	7	1678,79 \pm 86,69 ^{bB}	4798,98 \pm 197,62 ^{aA}
	8	193,23 \pm 57,24 ^{cdB}	3803,75 \pm 176,37 ^{abA}
BG-11	6	156,48 \pm 22,21 ^{dB}	1767,70 \pm 288,35 ^{bcdA}
	7	696,13 \pm 50,24 ^{cA}	1288,04 \pm 505,64 ^{cdefA}
	8	582,19 \pm 50,51 ^{cdB}	1109,17 \pm 223,64 ^{bcA}

Média \pm desvio-padrão. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$).

Investigando os efeitos das condições de cultivo em relação à produtividade em carotenoides totais, os maiores valores encontrados (Tabela 8) foram para os meios BBM e acetato de sódio (pH 6, 7 e 8), BG-11 (pH 6, 7 e 8) com 20% de inóculo e BBM e glicose (pH 6), com 10% de inóculo. Os meios BBM e glicose (pH 6) e BG-11 (pH 7), em 10% de inóculo, apresentaram valores expressivamente maiores quando comparadas às outras condições analisadas. Já para a produtividade volumétrica em carotenoides totais (Tabela 9), o meio BBM e glicose em pH 6,0 se diferiu estatisticamente dos demais meios de cultivo ($17,20 \pm 2,13 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), utilizando 10% de inóculo. Ainda analisando os efeitos das condições de cultivo em relação à produtividade volumétrica em carotenoides, quando utilizou-se 20% de inóculo, o meio BBM e acetato de sódio em pH inicial de 7 e 8 apresentou valores significativamente superiores ($316,59 \pm 13,17$ e $253,58 \pm 11,75 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), ao nível de 95% de confiança.

Tabela 8: Produtividade volumétrica em carotenoides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8.

Meio de cultivo	pH	Produtividade em carotenoides totais específicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$)	
		Concentração de inóculo 10%	Concentração de inóculo 20%
BBM e glicose	6	258,04±32,09 ^{aA}	139,86±43,85 ^{abcB}
	7	175,69±26,52 ^{bA}	80,05±1,09 ^{bcB}
	8	45,35±5,51 ^{cA}	58,64±32,68 ^{cA}
BBM e acetato de sódio	6	189,24±16,67 ^{bA}	193,34±114,60 ^{abcA}
	7	174,87±12,21 ^{bB}	351,06±42,2 ^{aA}
	8	67,80±20,08 ^{cB}	279,36±54,19 ^{abA}
BG-11	6	104,32±14,81 ^{cA}	176,92±56,68 ^{abcA}
	7	201,77±19,13 ^{abA}	166,68±51,84 ^{abcA}
	8	104,89±9,10 ^{cB}	217,49±43,85 ^{abcA}

Média±desvio-padrão. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p<0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p<0,05$).

Tabela 9: Produtividade em carotenoides totais ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11, em concentração de inóculo de 10 ou 20% e pH inicial de 6, 7 ou 8.

Meio de cultivo	pH	Produtividade em carotenoides totais volumétricos ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	
		Concentração de inóculo 10%	Concentração de inóculo 20%
BBM e glicose	6	17,20 \pm 2,13 ^{aB}	122,77 \pm 1,86 ^{bA}
	7	11,71 \pm 1,36 ^{bB}	61,43 \pm 1,94 ^{bcA}
	8	3,02 \pm 0,36 ^{cB}	45,26 \pm 18,93 ^{cA}
BBM e acetato de sódio	6	12,61 \pm 1,11 ^{cB}	95,13 \pm 2,78 ^{bcA}
	7	11,65 \pm 0,60 ^{bB}	316,59 \pm 13,17 ^{aA}
	8	4,52 \pm 1,33 ^{cB}	253,58 \pm 11,75 ^{aA}
BG-11	6	6,95 \pm 0,98 ^{cB}	117,84 \pm 19,22 ^{bA}
	7	13,45 \pm 0,97 ^{bB}	85,86 \pm 33,70 ^{bcA}
	8	6,99 \pm 0,60 ^{cB}	73,94 \pm 14,90 ^{bcA}

Média \pm desvio-padrão. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$).

Células de *Haematococcus pluvialis* expostas a diferentes condições ambientais e nutricionais podem sofrer alterações extremas em sua morfologia e no teor de pigmentos (HE, P., DUNCAN, J. & BARBER, J., 2007). A acumulação de astaxantina por *H. pluvialis* foi observada em células encistadas sob condições de crescimento desfavoráveis como suplementação com acetato de sódio e mudança do pH do meio de cultivo.

O papel que as condições nutricionais exercem sobre a acumulação de astaxantina tem sido investigado por vários pesquisadores. O acúmulo de astaxantina de *H. pluvialis* na conversão de células verdes para vermelhas sob condições de cultivo induzidas envolvem mudanças fisiológicas que incluem mudanças nos constituintes da célula e na atividade celular.

A conversão de células verdes móveis para aplanósporos vermelhos é acompanhada pelo aumento no teor de carboidratos, que pode atingir até 63% do peso seco. Isso reflete na entrada da fase de repouso (baixo metabolismo) e a síntese de compostos requer menos energia, uma vez que o teor de proteínas diminui com

esse processo (BOUSSIBA, 2000). Também foi observado por Boussiba & Vonshak (1991) que o teor de lipídeos se correlaciona com o teor de pigmento, o que ocorre provavelmente devido à necessidade de alojamento do pigmento nos glóbulos de lipídeos, sugerindo que a acumulação de astaxantina está relacionada com a síntese de ácidos graxos. Nas células verdes há presença de pigmentos como clorofilas, luteínas e β -caroteno. No entanto, nas células encistadas, a quantidade de astaxantina aumenta drasticamente a partir de poucas microgramas para centenas ao final do cultivo. Nesta fase, a astaxantina constitui até 98% dos carotenoides totais e pode atingir até 6% do peso seco total (BOUSSIBA, 2000; KATSUDA *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2009).

Zhang *et al.* (2009) reportam que cultivando *H. pluvialis* com o objetivo de produzir astaxantina, o teor desse carotenoide atingiu 0,8% de biomassa seca e a produtividade em astaxantina foi de $5,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, utilizando as seguintes condições de cultivo: meio BG-11 modificado, iluminância de 7,4 Klx à 20°C, com ar enriquecido com CO_2 (2 L.min^{-1}) e pH inicial de 6.

Del Rio *et al.* (2005) encontraram valores similares aos deste trabalho, de $5600 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ de astaxantina. No estudo, os autores realizaram o cultivo da microalga *H. pluvialis* utilizando fotobiorreatores de coluna, a 25°C, pH inicial de 7 em cultivos autotróficos com injeção de CO_2 sob iluminância de $1220 \text{ }\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Por outro lado, utilizando cultivos com injeção de CO_2 , Kang *et al.* (2005) encontraram valores superiores ($77,2 \text{ mg.g}^{-1}$) para o conteúdo de astaxantina produzida por *H. pluvialis*, empregando meio mixotrófico NIES, 3,7 Klx de iluminância, pH inicial de 7,5 à 23°C e 5% de CO_2 aos meios de cultivo. Este estudo indica que a suplementação de CO_2 pode melhorar a acumulação de astaxantina.

Associando a produção de carotenoides e o crescimento celular, bem como as produtividades do processo, o meio BBM e acetato de sódio, com concentração de inóculo de 20% e pH inicial 7 foi selecionado, pois nessas condições a microalga *H. pluvialis* apresentou valores significativamente superiores em termos de produção de biomassa ($1,29 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$) e de carotenoides ($5653,56 \pm 235,27 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ e $4798,98 \pm 197,62 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$), quando comparada às outras condições de cultivo analisadas.

5.3 Influência do emprego de CO₂ na aeração do cultivo sob o crescimento celular e a bioprodução de carotenoides

As microalgas, por serem fotossintéticas, absorvem e utilizam CO₂ como a principal fonte de carbono no crescimento celular. A biossíntese de astaxantina pode ocorrer pela limitação do nitrogênio em presença de excesso de fontes de carbono, como a utilização de CO₂ ou acetato e glicose em cultivos mixotróficos (GHIGGI, 2007, ONCEL *et al.*, 2010).

Neste estudo, avaliou-se o efeito da suplementação de CO₂ ao meio de cultivo BBM e acetato de sódio em pH 7 e com concentração de 20% de inóculo, condições previamente selecionadas. Os experimentos foram conduzidos com ar enriquecido ou não de 30% de CO₂, injetado durante 1h uma vez ao dia durante 22 dias de experimento, sob iluminância de 6 Klx à 25°C.

Na Figura 16 estão apresentados a cinética do crescimento celular e o comportamento do pH da microalga *H. pluvialis*. A Tabela 10 apresenta os parâmetros de cultivo estudados, como concentração celular máxima, produtividade em célula, $\mu_{m\acute{a}x}$, e após 22 dias concentração de carotenoides e produtividade em carotenoides.

A concentração celular máxima alcançada foi de $1,13\pm 0,04$ g.L⁻¹, no décimo dia de cultivo e a produção de carotenoides totais foi de $2949,91\pm 988,65$ µg.g⁻¹ para os específicos e de $764,79\pm 223,51$ µg.L⁻¹ para os volumétricos.

As trocas de CO₂ entre a atmosfera e o meio de cultivo também são influenciadas pelo pH. A migração de CO₂ da atmosfera para o meio líquido é facilitada pelo aumento do pH do meio (RICHMOND, 2004).

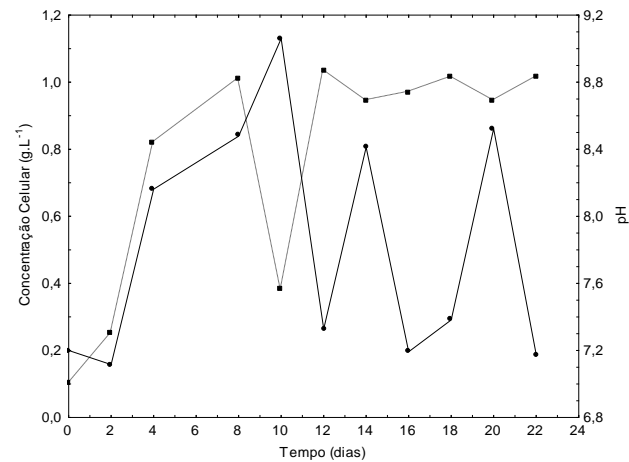


Figura 16: Cinética de crescimento celular e pH em meio de cultivo BBM e acetato de sódio, com 20% de inóculo, 6 Klx a 25°C e pH inicial de 7 (●) Crescimento celular; (■) pH.

Tabela 10: Parâmetros estudados para o meio de cultivo BBM e acetato de sódio, pH 7, com 20% de inóculo, 6 Klx a 25°C e aeração enriquecida com 30% de CO₂.

$X_{máx}$ (g.L ⁻¹)	P (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$\mu_{máx}$ (dia ⁻¹)	C_e (μ g.g ⁻¹)	C_v (μ g.L ⁻¹)	P_{ce} (μ g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)	P_{cv} (μ g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
1,13±0,04	0,11±0,004	0,04±0,02	2949,91±988,65	764,79±223,51	193,13±56,44	34,76±10,15

Média±desvio-padrão, exceto para $\mu_{máx}$.

$X_{máx}$: concentração celular máxima; P: produtividade em célula; $\mu_{máx}$: velocidade específica máxima de crescimento; C_e : carotenoides totais específicos; P_{ce} : produtividade dos carotenoides totais específicos; C_v : carotenoides totais volumétricos; P_{cv} : produtividade dos carotenoides totais volumétricos

A Tabela 11 apresenta a comparação dos cultivos com adição ou não de CO₂ dos parâmetros estudados neste trabalho. A suplementação de CO₂ como fonte de carbono dissolvida no meio de cultivo de *H. pluvialis* só não influenciou no crescimento celular e na produtividade em células. Porém, a velocidade específica máxima de crescimento, a produção de carotenoides e a produtividade em carotenoides foram afetadas negativamente com a adição do CO₂. Confrontando os resultados, o $\mu_{m\acute{a}x}$ diminuiu 84%, os carotenoides totais em 52% e a produtividade em carotenoides em 55%, quando comparados ao cultivo sem injeção de CO₂.

Provavelmente, a estratégia de suplementação adicionada do CO₂ escolhida neste trabalho não tenha sido a mais eficiente. Uma outra justificativa é que em cultivos mixotróficos, o CO₂ e a fonte de carbono orgânico são assimilados simultaneamente pelo metabolismo respiratório e fotossintético, porém, algumas espécies de microalgas não têm essa capacidade (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2010). Ainda é relatado que algumas cepas da microalga *H. pluvialis* toleram até 12% de CO₂ nos cultivos (KOBAYASHI, KURIMURA & TSUJI, 1997; GHIGGI, 2007).

Tabela 11: Comparação dos parâmetros estudados nos cultivos com ar enriquecido ou não de 30% de CO₂ do meio BBM e acetato de sódio, pH 7, concentração de inóculo de 20%, iluminância de 6 Klx a 25°C.

Parâmetros	Com CO₂	Sem CO₂
$X_{máx}$ (g.L⁻¹)	1,13±0,004 ^b	1,29±0,07 ^a
P (g.L⁻¹.dia⁻¹)	0,11±0,004 ^a	0,12±0,006 ^a
$\mu_{máx}$ (dia⁻¹)	0,04±0,02 ^b	0,11±0,004 ^a
C_e (µg.g⁻¹)	2949,91±988,65 ^b	5653,56±235,27 ^a
P_{ce} (µg.g⁻¹.dia⁻¹)	193,13±56,44 ^b	351,06±42,20 ^a
C_v (µg.L⁻¹)	764,79±223,51 ^b	4798,98±167,62 ^a
P_{cv} (µg.L⁻¹.dia⁻¹)	34,76±10,15 ^b	316,59±13,17 ^a

Média±desvio-padrão (exceto para $\mu_{máx}$): letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha (p<0,05).

$X_{máx}$: concentração celular máxima; P: produtividade em célula; $\mu_{máx}$: velocidade específica máxima de crescimento; C_e: carotenoides totais específicos; P_{ce}: produtividade dos carotenoides totais específicos; C_v: carotenoides totais volumétricos; P_{cv}: produtividade dos carotenoides totais volumétricos.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos

Dentre as fontes microbianas existentes, a microalga *Haematococcus pluvialis* é capaz de acumular uma quantidade superior de astaxantina quando comparada a outras fontes. Os corantes derivados de micro-organismos são bioativos, como é o caso da astaxantina e do β -caroteno. Dentre as atividades biológicas mais importantes, destaca-se a atividade antioxidante, substâncias antioxidantes são capazes de retardar ou reprimir a oxidação (UENOJO, JUNIOR & PASTORE, 2007; ZHANG *et al.*, 2009)

A capacidade antioxidante dos carotenoides obtidos de *H. pluvialis* ainda é pouco investigada. Neste trabalho a atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos (meio de cultivo BBM e acetato de sódio com 20% de inóculo e pH inicial 7) foi avaliada por três métodos: capacidade de interagir com os radicais DPPH e ABTS e o poder de redução do ferro FRAP. Para todos os ensaios foram utilizados volumes totais de 4 mL, variando as quantidades de reagentes e de extratos carotenogênicos. Foram testados os volumes de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mL de extrato para os ensaios do DPPH e ABTS. Para o método FRAP foram testadas volumes de 0,2 e 0,4 mL de extrato carotenogênicos. Essas variações foram realizadas a fim de encontrar a concentração de extrato ideal para cada método.

Os extratos carotenogênicos obtido a partir da microalga *H. pluvialis* não demonstraram resultados pelos métodos DPPH (Tabela 12) e FRAP, indicando que a capacidade de sequestrar radicais livres não está diretamente relacionada com a concentração de carotenoides totais, e sim com o tipo de carotenoide presente no extrato carotenogênico de cada micro-organismo. Outra explicação para estes resultados poderia ser porque quando o extrato da microalga foi adicionado ao radical DPPH observou-se uma coloração castanha escura e não violeta como esperado pelo método. Essa modificação colorimétrica afeta a leitura em espectrofotômetro e pode ser justificada pela alta quantidade de carotenoides presentes no extrato que confere efeito reverso à oxidação (FU *et al.* 2010).

Tabela 12: Atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos de *H. pluvialis* e dos padrões de β -caroteno e astaxantina pelo método do DPPH (%inibição. μg^{-1}) nos tempo de 60, 120, e 180 minutos.

	Tempo (minutos)		
	60	120	180
β -caroteno	1,4 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2
Astaxantina	0,0 \pm 0,0	7,8 \pm 0,5	8,1 \pm 1,4
Extratos carotenogênicos	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Média \pm desvio padrão.

A Tabela 13 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos extratos pelo método do ABTS⁺ em % de inibição. μg^{-1} . O extrato carotenogênico de *H. pluvialis* possui poder de inibição de reação do ABTS[±] de 35,70% μg^{-1} em 90 minutos de reação, observa-se que com o aumento do tempo de contato dos carotenoides com o reagente, há um aumento do potencial analisado.

Estudos relatam a atividade antioxidante de astaxantina com relação aos outros carotenoides, além disso a astaxantina possui uma capacidade antioxidante mais segura, mesmo em altas concentrações de oxigênio, diferentemente do β -caroteno, que apresenta comportamento de pró-oxidante sob concentrações altas de O₂. No entanto, a maior parte das pesquisas com relação à atividade antioxidante de astaxantina tem sido empregada em fontes sintéticas puras, apenas alguns estudos utilizam fontes microbianas, tal como *H. pluvialis*. A astaxantina sintética está disponível como a forma livre de astaxantina enquanto que a astaxantina proveniente da microalga está disponível em mono ou diésteres de astaxantina. Carotenoides livres ou esterificados possuem atividade antioxidantes diferentes (RODRÍGUEZ-MEIOZO *et al.*, 2010). Estudos de Yuan *et al.* (2011) reportam que a astaxantina produzida por *H. pluvialis* está disponível em forma de diésteres. Isto pode explicar o fato de que a astaxantina livre analisada neste trabalho apresentou um valor significativamente inferior quando comparada ao extrato carotenogênico da microalga, o qual apresentou resultados superiores quando comparadas a astaxantina e ao β -caroteno.

Tabela 13: Atividade antioxidante de extrato carotenogênico de *H. pluvialis* pelo método do ABTS (%inibição. μg^{-1}).

Tempo (min)	Extrato carotenogênico	Astaxantina	β -caroteno
15	24,60 \pm 1,70 ^a	4,01 \pm 0,05 ^b	4,33 \pm 0,07 ^b
30	27,78 \pm 1,37 ^a	4,87 \pm 0,16 ^b	4,85 \pm 0,25 ^b
45	30,56 \pm 0,87 ^a	5,48 \pm 0,32 ^b	5,41 \pm 0,40 ^b
60	32,26 \pm 0,82 ^a	5,83 \pm 0,46 ^b	6,03 \pm 0,71 ^b
75	34,36 \pm 0,83 ^a	6,30 \pm 0,51 ^b	6,66 \pm 0,94 ^b
90	35,70 \pm 0,64 ^a	6,57 \pm 0,60 ^b	7,03 \pm 1,18 ^b

Média \pm desvio-padrão. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$).

A capacidade antioxidativa dos extratos carotenogênicos da microalga *Haematococcus pluvialis* podem ser provenientes de uma mistura de carotenoides, como astaxantina, β -caroteno e luteína. A microalga *H. pluvialis* apresenta dois principais picos de absorção, observados na Figura 17, que ilustra o espectro de varredura realizado. Estes picos podem estar associados à mistura de pigmentos responsáveis pela atividade antioxidante.

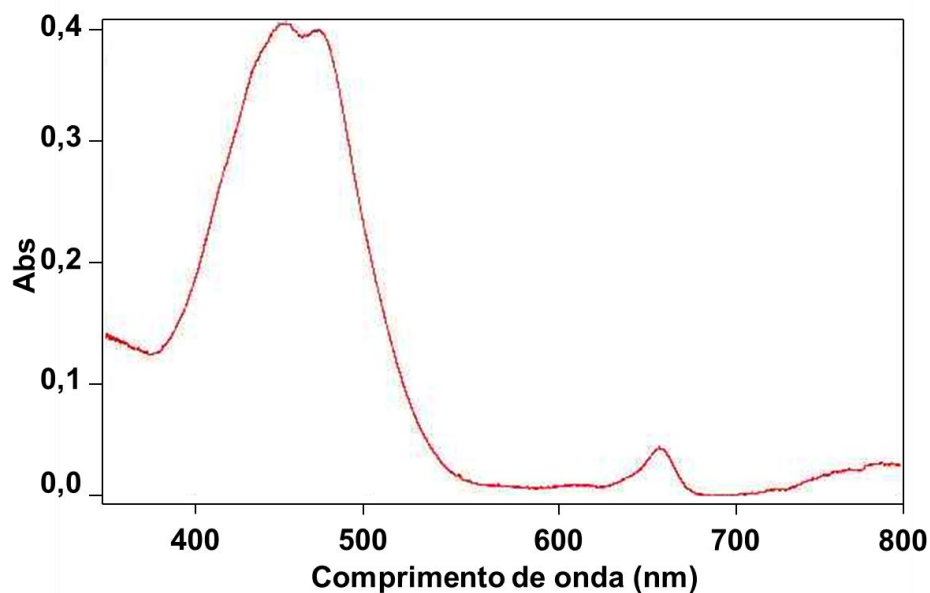


Figura 17: Espectro de varredura da microalga *H. pluvialis* em éter de petróleo

5 CONCLUSÃO

Dentre os meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato de sódio, BG-11, BAR e BBM, sob condições de inóculo de 10% e pH inicial de 7 foram selecionados os meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11 para a microalga *H. pluvialis*. Estes meios apresentaram maior concentração celular de $0,68\pm 0,37$, $1,18\pm 0,36$ e $0,64\pm 0,08$ g.L⁻¹, respectivamente. A produção de carotenoides foi de $2635,38\pm 397,92$, $2623,12\pm 183,15$ e $3026,66\pm 286,95$ µg.g⁻¹ para BBM e glicose, BBM e acetato de sódio e BG-11, respectivamente.

A partir desta seleção, os experimentos foram conduzidos empregando 10 ou 20% de inóculo em pH iniciais de 6, 7 ou 8. O meio de cultivo BBM e acetato de sódio obteve o melhor valor de concentração celular máxima, de $1,29\pm 0,07$ g.L⁻¹ e de carotenoides totais, de $5653,56$ µg.g⁻¹, empregando pH inicial de 7 e concentração de inóculo de 20%, sendo selecionado para a realização dos cultivos com injeção de CO₂.

No cultivo com aeração enriquecida com 30% de CO₂ foi encontrado valores inferiores de concentração celular máxima ($1,13\pm 0,04$ g.L⁻¹) e bioprodução de carotenoides totais ($2949,91\pm 988,65$ µg.g⁻¹).

Com base nesses resultados, conclui-se que em relação ao crescimento celular e à produção carotenogênica, as melhores condições são a utilização do meio BBM e acetato de sódio em pH inicial 7, concentração de inóculo de 20% e aeração sem adição de CO₂.

Os extratos da microalga *H. pluvialis* não apresentaram resultados frente à capacidade antioxidativa pelos métodos DPPH e FRAP. Por outro lado, pelo método ABTS, a microalga apresentou poder de inibição de 35,70%. µg⁻¹ em 90 minutos de reação.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar os cultivos de *Haematococcus pluvialis* com batelada alimentada com fonte de carbono;
- Acompanhar o pH ao longo do cultivos;
- Utilização do meio de cultivo BG-11 adicionado de fonte de carbono orgânico, visto que este meio foi o melhor autotrófico dentre os meios analisados;
- Acompanhar os carotenoides ao longo do cultivo;
- Determinação dos carotenoides;
- Estudar outras variáveis como temperatura, iluminância, agitação que podem influenciar nos cultivos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.R. **Cultivos autotrófico e mixotrófico de *Spirulina platensis* em diferentes escalas e condições ambientais no extremo sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Rio Grande, RS, 126p., 2005.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Ed. Arlington, Virginia, USA, 2000.

BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, 113-123, 2006.

BCC Research. Markert Forecasting. **The global market for carotenoids** (FOD025C). Acesso em maio de 2012. Disponível em: <http://www.bccresearch.com>

BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymology**, v. 299, p.15-27, 1996.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Science and Technology-Leb*, v.30, p.609-615, 1997.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo.** Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, UFPR. Curitiba, PR, 158p., 1999.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 63, p.351, 2004.

BOUSSIBA, S., VONSHAK, A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p. 1077-1082, 1991.

BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. **Physiologia plantarum**, v. 108, p. 111–117, 2000.

BRITTON, G. General carotenoids. **Meth. Enzymol**, v.111, p. 115-119, 1985.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J.** v. 9, p. 1551–1558, 1995.

CANTER-LUND, H., LUND, J.W.G. Freshwater algae: their microscopic world explored. **Bio press limited**, 1995.

CHANG, H.Y., HO, Y.L.; SHEU, M.J.; LIN, Y.H.; TSENG, M.C.; WU, S.H.; HUANG, G.J., CHANG, Y.S. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. **Botanical Studies**, v.48: p.407-417, 2007.

CHAUDHURI, K., DUTTA, A. Analysis of tRNA composition and folding in psychrophilic, mesophilic and thermophilic genomes: indications for thermal adaptation. **Microbiology Letters**, v.305, p.100-108, 2010.

CHEN, X. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v.101, p.1580-1584, 2007.

CIPOLATTI, E. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Rio Grande, RS, 138p., 2012.

DAVIES, B.H. **Carotenoids**. In: T.W. Goodwin (Ed). Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press London, New York, USA, v. 2, p. 38-165, 1976.

DEL-RIO, E., ACIEN, F.G, GARCIA-MALEA, M., RIVAS, J., MOLINA-GRIMA, E., GUERRERO, M.G. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, nº 7, 2005.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 2738–2749, 2010.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A.R., LEGUARRETA, G.I., JERONIMO M. F., COMPOCOSIO, A.T. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 92 p. 209–214. 2004.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A.R., PONCE-NOYOLA, T., TORRES-MUÑOZ, J.A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, p. 783–791, 2007.

FONSECA, R.A.S.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. **Seleção de linhagem de *Phaffia rhodozyma* para produção de astaxantina**. XXI Congresso de Iniciação Científica e tecnológica em Engenharia, p. 01-02, Ijuí, 2006.

FONSECA, R. A. S., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., BURKERT, J. F. M. **Extração da astaxantina de *Phaffia rhodozyma* utilizando-se métodos químicos de ruptura celular**. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), Curitiba, 2007.

FONSECA, R. A. S., RAFAEL, R. S., KALIL, S. J., BURKERT, C.A.V, BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011.

FU, H.; XIE, B.; MAB, S.; ZHU, X.; FAN, G.; PAN, S. Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatica*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 288–297, 2011.

FUNTEU, F.; GUET, C.; WU, B., TREMOLIERES, A. Effects of environmental factors on the lipid metabolism in *Spirulina platensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 63-71, 1997.

GARCIA-MALEA, M.C., ACIEN, G.F., DEL-RIO, E., FERNANDEZ, J.M., CERON, M. C., GUERRERO, M. G., MOLINA-GRIMA, E. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 651-657, 2008.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. Dissertação (mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, UFPR. Curitiba, PR, 119p, 2007.

GOODWIN, T.W. Functions of carotenoids. In Goodwin, T.W. (ed.), **The biochemistry of the carotenoids**. Capítulo 3. Chapman and Halkl. New York, USA, p. 77-85, 1980.

GOODWIN, T. W. Distribution of carotenoids. methods in enzymology. **Carotenoids**, Part A: Chemistry, separation, quantitation and antioxidation, v. 213, p. 167-172, 1992.

GOSWAMI, G., CHAUDHURI, S., DUTTA, D. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p.1925–1939, 2010.

GRIMA, E.M., SEVILLA, J.M.F., PEREZ, J.A.S., CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition on dense microalgal cultures taking into account incident and average irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 59-69, 1996.

GUERIN, M., HUNTLEY, M. E., OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Biotechnology**, v. 21, p. 210-216, 2003.

HE, P., DUNCAN, J., BARBER, J. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 447-451. 2007.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium sp.* e *Chlorella sp.*** Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Rio Grande, RS, 115p., 2009.

HIGUERA-CIAPARA, I. FELIX-VALENZUELA, F.M., GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 46, p. 185-196, 2006.

HOLTIN, K., KUEHNLE, M., REHBEIN J., SCHULER, P., NICHOLSON, G., ALBERT, K. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC - (APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 395, p.1613–1622, 2009.

IMAMOGLU, E., DALAY, C.M., SUKAN, V.F. Semi-continuous Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for Commercial Production. **Appl Biochem Biotechnol**, v.160, p. 764–772, 2010.

JEON, Y.C., CHO, C.W., YUN, Y.S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 490-495, 2006.

JIMENEZ, C., COSSIO, B., LABELLA, D., NIELL, F.X. Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. **Energy Conversion Management**, v. 36, p. 725-728, 2003.

JOHNSON, E.A., AN, G.H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotechnology**, v. 11, p. 297-326, 1991.

KAMATH, B.S., SRIKANTA, B.M., DHARMESH, S.M., SARADA, R., RAVISHANKAR, G. A. Ulcer preventive and antioxidativ properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Europen Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 387-395, 2008.

KANG, C.D, LEE, J.S., PARK, T.H., SIM, S.J. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, p. 237-241, 2005.

KATSUDA, T., LABABPOUR, A., SHIMAHARA, K., KATOH, S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDS. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 81-86, 2004.

KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NAGAI, S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, p. 335-339, 1991.

KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., YAMAGUCHI, K., NISHIO, N., NAGAI, S. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, p. 17-20, 1992.

KOBAYASHI, M., KURIMURA, Y., TSUJI, Y. Light-independent, astaxanthin production by green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 507-509, 1997.

KRINSKY, N.I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v.17, p. 815-817, 2001.

LABABPOUR, A., HADA, K., SHIMARA, K., KATSUDA, T., KATOH, S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 452-456, 2004.

LI, J., ZHU, D., NIU, J., SHEN, S., WANG, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 568-574, 2011.

LI, Y., SOMMERFELD, M., CHEN, F., HU, Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1783-1797, 2008.

LORENZ, T.R., CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Elsevier Science Ltd**, v. 18, p. 160-167, 2000.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Ed.Rima, p. 442-446, 2006.

MALDONADE, I.R. **Produção de carotenoides por leveduras**. Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, SP, 2003.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian J. Microbiol**, v. 38, p. 65-70, 2007.

MICHELON, M., BORBA, T.M., RAFAEL, R.S, BURKERT, C.A.V, BURKERT, J.F.M. Extraction of carotenoid from *Phaffia Rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2012.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MORAIS, F.L. **Carotenoides: características biológicas e químicas**. Monografia (Curso de Especialização em Qualidade em Alimentos), Universidade de Brasília. Brasília, DF. 70p., 2006.

OHSE, S., DERNER, R. B., OZÓRIO, R.A., BRAGA, M.V.C.; CUNHA, P., LAMARCA C.P., SANTOS, M.E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, v. 21 (2), p. 7-18, 2008.

ONCEL, S.S., IMAMOGLU, E., GUNERKEN, E., SUKAN, F.V. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 86, p. 414-420, 2010.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 373–378, 2005.

PASSOS, R., MORIEL, D.G., LAGREZE, F., GOUVEIA, L., MARASCHIN, M., BEIRÃO, L.H. Fontes naturais de carotenoides de interesse para a aquicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Rev. Bras. Eng^a. Pesca**, v. 2, p. 103-113, 2007.

PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F.M.E., BASHAN, L.E., BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolismo and potential products. **Water Research**, p. 1-26, 2010.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Blackwell Publishing Ltd.**, p. 281 – 288, 2004.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., STANIER, R. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODRIGUEZ-AMAYA, B.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. ILSI Press. Washington, USA. 64p., 2001.

RODRÍGUEZ-MEIOZO, I., RODRÍGUEZ-MEIOZO, L., CIFUENTES, A., SANTOYO, S., SUAREZ, S., IBÁÑEZ, SENORANS, F.X. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **Food and Technology**, v. 43, p. 105-112, 2010.

RODRIGUEZ-SAIZ, M.R., FUENTE, J.L., BARREDO, J.L. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, p.645–658, 2010.

RUFINO, M.S., ALVES, R.E., BRITO, E.S., MORAIS, S.M., SAMPAIOS, C.G., JIMÉNEZ, J.P., CALIXTO, F.D.S. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS[±]. Comunicado Técnico 128. Embrapa. Fortaleza, CE, 2007.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHEZ, S.; **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 54, p. 528 -532, 2000.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology**, v.8 p.121-137, 2002.

SANTOYO, S., RODRIGUEZ-MEIZOSO, I., CIFUENTES, A., RODRÍGUEZ-MEIOZO, L., GARCIA-BLAIRSY, R. G., SENORANS, F.J., INAVEZ, E. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1213–1218, 2009.

SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 623–627, 2002.

SARADA, R., VIDHYAVATHI, R., USHA, D., RAVISHANKAR, G.A. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **J. Agric. Food Chem**, v. 54, p. 7485-7588, 2006.

SCHMIDT, I; SCHEWE, H; GASSEL, S; JIN, C; BUCKINGHAM, J; HUMBELIN, M; SANDMAN, G; SCHRADER. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 555- 571, 2010.

SEDMAK, J.J.; WEERASINGHE, D.K.; JOLLY, S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Techniques**, v. 4, p.107–112, 1990.

SHAMI, N.J.I.E., MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, p.227-236, 2004.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 649 - 657, 1993.

SILVA, D.A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) utilizando água de parboilização do arroz.** Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Rio Grande, RS, 92p., 2009.

SILVA, C. M. **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268 utilizando glicerina e água de parboilização do arroz.** Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Rio Grande, RS, 91p., 2010.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo.** Dissertação (mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, UFPR.. Curitiba, PR, 107p., 2010.

SUNDA, W.G., PRICE, N.M., MOREL, F.M.M. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: **Algal Culturing Techniques**, San Diego, USA, p. 35-63, 2005.

TORRISSEN O.J., CHRISTIANSEN R. Requirements for carotenoids in fish diets. **J Appl Ichthyologic**, v.11, p. 225–230, 1995.

TRIPATHI, U., SARADA, R., RAMACHANDRA RAO, S., RAVINSHANKAR, G.A. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 197-199, 1999.

TRIPATHI, U., SARADA, R., RAVINSHANKAR, G.A. Effect of culture conditions on growth of green alga – *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24, p. 323-329, 2002.

UENOJO, M., JUNIOR, M.R.M., PASTORE, G.M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quim. Nova**, v. 30, p. 616-622, 2007.

UKELES, R. Cultivation of plants: Unicellular plants. **Ecology**, v. 3, p. 367-529, 1976.

VALDUGA, E. Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.. Florianópolis, SC, 200p., 2005.

VALDUGA, E., TASCH, P. O., TIGGEMANN, L., TREICHEL, H., TONIAZZO, G., ZENI, J., DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, v.32, p. 2429-2436, 2009.

VIDHYAVATHI, R., VENKATACHALAM, L., SARADA, R., RAVINSHANKAR, A. G. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1409–1418, 2008.

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, S., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. **Biomass**, v. 2, p. 175-185, 1982.

ZHANG, B. Y., GENG, Y. H., LI, K. Z., HU, J. H., LI, G. Y. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, p. 275–281, 2009.

ZENI, J. **Screening de micro-organismos produtores de carotenoids e poligalacturonases**. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Erechim, RS, 2008.

WANG, W., YU, L., ZHOU, P. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 26-31, 2006.

YOSHIMURA, S., RANJBAR, R., INOUE, R., KATSUDA, T., KATOH, S. Effective utilization of transmitted light for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 97-101, 2006.

YUAN, J.P., PENG, J., YIN, K., WANG, J.H. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. **Mol. Nut. Food Res.**, v. 55, p. 150-165, 2011.

Apêndice 1 – Curva padrão da microalga *Haematococcus pluvialis*