



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR
SETOR DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

VANESSA GHIGGI

**ESTUDO DO CRESCIMENTO E INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO
ASTAXANTINA POR *Haematococcus pluvialis*.**

**CURITIBA
2007**

VANESSA GHIGGI

ESTUDO DO CRESCIMENTO E INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO

ASTAXANTINA POR *Haematococcus pluvialis*.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos – PPGBiotec – UFPR, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Julio César de Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**CURITIBA
2007**

AGRADECIMENTOS

“Algumas pessoas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, alimentando o nosso ego com alegria...”. Todo meu amor e gratidão aos meus pais (Dorival e Terezinha), que além da vida, me deram coragem para a luta, inspiraram-me a certeza de sua presença e esperança para o futuro, estando ao meu lado como amigos e orientadores. Obrigada pelo apoio, amor, abdicção e confiança dedicados todos estes anos e, principalmente, pela credibilidade no meu trabalho e incentivo durante toda esta caminhada!

Agradeço meu irmão por seu esforço, comprometimento e sede de conhecimento, buscando sempre as soluções para todos os meus problemas.

“...Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós...”. Ao professor orientador Dr. Julio César de Carvalho, que dedicou seu tempo, compartilhou experiências, soube ser orientador e amigo, minha homenagem e gratidão.

Minha Gratidão também àqueles que repartiram os seus conhecimentos, ensinando a arte de construir um hoje comprometido com o amanhã... Obrigada a toda equipe de professores do PPGBIOTEC.

“...Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho...”. Minha gratidão aos amigos e colegas do PPGBiotec, em especial Larissa e Luciana e a Prof^a Kazuko (PUC-PR) que sempre me impulsionaram e me acolheram com muito carinho e amizade.

“...O destino nos apresenta outros amigos, que não sabiam que iam cruzar o nosso caminho e que foram muito importantes ...”. A toda equipe da Ouro Fino Microalgas, em especial Camila Suarez e João Marcus Uratani e da IMCOPA (Susan e Adriana) pelo convívio, amizade, companheirismo.

“...Alguns amigos dão brilho aos nossos olhos, música aos nossos lábios, pulos aos nossos pés e sentido à nossa vida...”, agradeço ao meu namorado, Marcelo, pelo seu incentivo, as suas palavras, companhia e compreensão.

“Grandes foram as lutas, maiores foram as vitórias e o Senhor sempre estivestes ao meu lado... fazendo da derrota uma vitória... da fraqueza uma força” (Isaías 55.10-11). Agradeço ao Senhor que estivestes presente desde o princípio, em cada dificuldade, em cada alegria. Obrigada DEUS por toda força e proteção!

"O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente".

Ghandi

RESUMO

A microalga *H. pluvialis*, uma fonte do pigmento astaxantina, tem sido amplamente estudada em vista de sua potencialidade na produção industrial de astaxantina, apresentando alto teor de pigmento celular quando exposta às condições de stress. Devido à sua coloração atrativa e funcionalidade biológica, como antioxidante, a astaxantina tem sido utilizada como suplemento alimentar, corante em alimentos e fonte de pigmento em aquacultura.

Estudou-se condições de cultivo para produção de biomassa e parâmetros de indução da produção de astaxantina, visando a otimização do crescimento celular e obtenção de pigmento. Os efeitos fisiológicos de diferentes meios de cultivo, pHs, salinidades e intensidades de luz foram investigados, além de condições de extração química e estabilidade da astaxantina. A melhor condição de crescimento vegetativa foi observada em meio SAG, com irradiação de 2,7Klux e pH controlado 7,0.

Vários fatores indutores da produção de astaxantina têm sido sugeridos. Em nosso estudo a carotenogênese foi positivamente influenciada pelo aumento da intensidade de luz (7,0Klux) e a salinidade apresentou efeito positivo até 0,7% NaCl. O método de Sedmak *et al.* (1991) para extração química da astaxantina foi eficiente para a extração nos cistos de *H. pluvialis*. Os melhores resultados de extração química e estabilidade foram obtidos com a mistura de solventes diclorometano:metanol (25:75 v/v).

Palavras-chave: *Haematococcus*, Astaxantina, Stress, Indução, Pigmento.

ABSTRACT

The microalga *H. pluvialis*, a potential source of astaxanthin, has been widely studied in recent years because of its high intracellular pigment content, produced under conditions of stress. Due to its attractive orange color and biological function as antioxidant, astaxanthin has been used as a dietary supplement, food colorant and as a pigment source in aquaculture.

We studied the culture conditions for biomass production and the factors responsible for astaxanthin production induction, with the aim of optimizing the vegetative growth and production of pigment. The physiological effects of different culture media, pHs, salinities and light intensity were investigated, besides chemical extraction conditions and astaxanthin stability. The best vegetative growth was observed on SAG medium under light intensity of 2.7 klux and pH controlled at 7.0.

Several factors promoting astaxanthin formation in grown cultures have been suggested. In our studies, the carotenogenesis was positively influenced by the increase of light intensity (7.0 klux) and the salt concentration was beneficial up to 0.7% NaCl. The Sedmak *et al.* (1991) method of astaxanthin chemical extraction was efficient for *H. pluvialis* cysts, and the best results of chemical extraction and stability were obtained with the mixture of solvents dichloromethane:methanol (25:75, v/v)

Key words: *Haematococcus*, Astaxanthin, Stress, Induction, Pigment.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ATCC – American Type Culture Collection

Ax/Chl: relação astaxantina/clorofila

BHA: Butil hidroxi anisol

BHT: Butil hidroxi tolueno

C/N: relação carbono/nitrogênio

DO: demanda de oxigênio

DMSO: dimetil sulfóxido

FDA: Food and Drug Administration

g : aceleração da gravidade, $9,81 \text{ m.s}^{-2}$

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

LED: diodo emissor de luz

MBBM: meio Bold's Basal modificado

mcg: micro gramas

OD: densidade óptica

OMS: Organização Mundial da Saúde

OTR: taxa de transferência de oxigênio

PFD: photon flux density

PBR: fotobioreatores fechados

rpm: rotações por minuto

SAG: Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen

UV: ultravioleta

v/v: volume por volume

μ : velocidade específica de crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL	10
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
1.3 SIGNIFICADO E IMPACTO DO ESTUDO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 CORANTES	12
2.2 LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL DE CORANTES	14
2.3 CAROTENÓIDES	17
2.4 ASTAXANTINA	19
2.4.1 Interesse Comercial da Astaxantina	22
2.4.2 Astaxantina Natural x Astaxantina Sintética	25
2.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ASTAXANTINA.....	27
2.5.1 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	29
2.5.2 <i>Haematococcus pluvialis</i>	33
2.5.2.1 Cepas comumente utilizadas	38
2.5.2.2 Meio de Cultivo de <i>Haematococcus pluvialis</i>	39
2.5.2.3 Condições de Cultivo do <i>Haematococcus pluvialis</i>	48
2.5.2.4 Recuperação e Purificação do Pigmento Astaxantina	55
3 MATERIAIS E METODOS	63
3.1 MICRORGANISMO	63
3.2 MEIOS DE CULTURA	63
3.2.1 Meios de Cultivo para <i>Haematococcus pluvialis</i> SAG 34-1b	63
3.2.2 Meio de Manutenção para <i>Haematococcus pluvialis</i> SAG 34-1b	65
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	65
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 ESTUDO FISIO-MORFOLÓGICO	73
4.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	77
4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO COM DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ	81
4.4 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA	83
4.5 ANÁLISE DA INFLUENCIA DE DIFERENTES pHs INICIAIS	84
4.6 ANÁLISE DA INFLUENCIA DE DIFERENTES pHs CONTROLADOS	87
4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES pHs E SALINIDADES	89
4.8 CINÉTICA DE CRESCIMENTO COM DIFERENTES LEDS E INFLUENCIA SOBRE A PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA.	95
4.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES SALINIDADES E INTENSIDADES DE LUZ.....	98
4.10 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	102
4.11 ANÁLISE DE MÉTODO QUÍMICO DE EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA	102
4.12 COMPARAÇÃO ENTRE SOLVENTES EXTRATORES	104
4.13 ALTERAÇÕES NO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUÍMICA	105
5 CONCLUSÃO	107
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da indústria de alimentos tem-se observado o aumento da demanda por corantes, totalizando o número de 700. A cor do produto tem se caracterizado um dos principais indicativos de qualidade do ponto de vista do consumidor e fator fundamental na decisão de compra do produto e, desta forma, sendo empregado pelos produtores às estratégias de marketing e agregando-se valor comercial ao produto. No entanto, a segurança na utilização de corantes sintéticos em alimentos vem sendo questionada quanto a sua inocuidade, abrindo-se um nicho crescente para o mercado de corantes naturais.

Outra vantagem no desenvolvimento de corantes derivados de fontes naturais é que muitos são bioativos, como é o caso da astaxantina, licopeno, antocianinas e β -caroteno. Seguiu-se então a formulação de leis para uso destes corantes, com o objetivo de proteger a saúde do consumidor. Assim, no início do século XX, uma lista dos corantes permitidos foi divulgada nos EUA e hoje, apenas sete corantes sintéticos são permitidos.

A utilização de substâncias sintéticas, derivados de produtos petroquímicos, atinge diretamente a produção de corantes alimentares, fato este que preocupa quanto ao aspecto de alterações orgânicas que possam ser causadas pela ingestão destas substâncias ao longo do tempo. É bem provável, que o aumento das restrições quanto aos derivados petroquímicos venha a eliminar alguns corantes que são atualmente utilizados. Conseqüentemente, o mercado de pigmentos naturais está em expansão e há a necessidade de se encontrar fontes alternativas para corantes em alimentos, sendo a produção de pigmentos de origem biotecnológica uma ferramenta importante a ser explorada.

Diante deste cenário, tem aumentado a demanda do pigmento natural alaranjado astaxantina, para aplicação em indústria de alimentos, ração para aquacultura, indústria farmacêutica e cosmética, como pigmento e molécula bioativa. Embora os principais produtores atuais deste pigmento utilizem a síntese química, a pesquisa biotecnológica deste pigmento está em expansão e, nesta área, se destacam dois microrganismos conhecidos atualmente como os principais produtores de astaxantina, a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Dentre estes, o *H. pluvialis* destaca-se pela produção de maiores concentrações de astaxantina em relação ao seu peso seco

quando comparado ao *X. dendrorhous*, muito embora, apresente baixa velocidade de crescimento e um complexo ciclo de vida.

Quando expostas a condições ambientais extremas observa-se a mudança morfológica das células verdes de *H. pluvialis*, formando-se cistos vermelhos ricos em astaxantina. Diversos estudos visando aumentar a eficiência do processo de obtenção de biomassa de *H. pluvialis* e, conseqüentemente, aumentar os rendimentos de astaxantina são relatados, justificado por sua importância econômica e investimentos no conhecimento do processo biotecnológico do *H. pluvialis* com o objetivo de tornar-se competitivo a produção sintética.

Diante das potencialidades da microalga *H. pluvialis* este trabalho aborda um estudo das suas características morfológicas, ciclo evolutivo e cultivo em fotobioreator, buscando alternativas para uma maior produtividade de astaxantina. Parâmetros de produção de biomassa e/ou pigmento como pH, intensidade de luz e salinidade foram avaliados a partir de estudos de outros autores.

Este trabalho contém uma revisão da literatura com informações sobre pigmentos naturais, destacando-se a astaxantina e seus principais microrganismos produtores. Estão descritos também neste trabalho os materiais, equipamentos, microrganismo, meios de cultivo e os métodos analíticos usados na determinação da concentração de biomassa e pigmento. Os resultados compõem-se de estudos físiomorfológicos e cinéticos da microalga *H. pluvialis*, avaliação de parâmetros de cultivo e formação de cistos de astaxantina. Finalmente, a conclusão dos resultados resume as melhores condições de cultivo e produção de astaxantina obtidas em nosso estudo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho consiste no estudo da produção e recuperação do pigmento astaxantina, a partir da microalga *Haematococcus pluvialis*. Para tanto, são avaliadas as condições de cultivo e parâmetros cinéticos para a produção e extração do pigmento, para possíveis aplicações futuras em alimentos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1º) Estudar o ciclo de vida e a morfologia da microalga *H. pluvialis*, relacionando suas características fisiológicas com a produção de biopigmentos.
- 2º) Otimizar condições de cultivo para produção de biomassa da microalga *H. pluvialis*.
- 3º) Estudar os parâmetros de cultivo para produção de astaxantina sob diferentes condições de stress ambiental.
- 4º) Estudar processos de extração do pigmento astaxantina.

1.3 SIGNIFICADO E IMPACTO DO ESTUDO

Os estudos com microalgas estão em crescente expansão no Brasil e no Mundo. Explorar esta área permite avaliar etapas como o aumento da relação eficiência na produção da astaxantina a partir da engenharia biotecnológica, para futuras aplicações como biopigmento na indústria de alimentos e/ou como molécula bioativa na indústria farmacêutica e pesquisas médicas, atendendo à crescente demanda do mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CORANTES

A legislação brasileira define corante alimentar como uma substância ou mistura de substâncias com propriedades de conferir ou intensificar a coloração de alimentos e/ou bebidas (ANVISA, 1977).

Dos três principais fatores de qualidade do alimento, cor, sabor e textura (FRANCIS, 1999) a cor é a primeira característica notável no alimento (GRIFFITHS, 2005; FRANCIS, 1999) e somente após sua aparência ter sido aprovada, serão julgados o sabor e a textura do produto (O'CARROLL, 1999). A cor é usada pelo consumidor para identificar um alimento e julgar sua qualidade (GRIFFITHS, 2005) sendo importante na primeira impressão do produto, seleção visual e decisão de compra pelo consumidor (O'CARROLL, 1999). Estudos mostram que a cor pré-determina nossa expectativa de sabor e gosto, inclusive o nível aparente de doçura (GRIFFITHS, 2005). Do ponto de vista das indústrias de alimentos, a adição de corantes assegura a uniformidade da produção, ajuda a reforçar a coloração que já está presente no produto, mas em intensidade menor que a desejada pelo consumidor (SPEARS, 1988), confere cor a produtos incolores e/ou a alimentos "divertidos" como doces festivos e fornece uma variedade atrativa de alimentos aos consumidores (FDA, 1998). A quantidade e composição dos pigmentos alimentares exercem influência na aceitação do consumidor e, conseqüentemente, no valor comercial do produto (CSERHÁTIA *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas a segurança dos corantes sintéticos tem sido questionada, levando a uma redução no número de corantes permitidos em alimentos em vários países (PARMINO-DURAM *et al.*, 2001). A preferência da sociedade por ingredientes "naturais" tem estimulado o interesse em explorar novos meios e fontes para a produção biotecnológica de corantes alimentícios (MAPARI *et al.*, 2005). Um grande interesse no uso de corantes derivados de fontes naturais é que muitos são bioativos, como é o caso da astaxantina, licopeno, antocianinas e β -caroteno (GRIFFITHS, 2005, O'CARROLL, 1999). De fato, uma pesquisa da preferência do consumidor revelou que "natural" é frequentemente percebido pelo consumidor como sendo sinônimo de "seguro" (DREW e LYONS, 1988, *apud* SPEARS, 1988) agregando ainda o fator emocional às estratégias de marketing. Um

estudo realizado pelo grupo GENAMAZ (Projeto BRA/96/025 - SUDAM/PNUD) em 2000, observou a substituição dos corantes artificiais decorrente da sensibilização ecológica que se traduz em uma exigência crescente dos consumidores e dos órgãos de saúde que questionam os efeitos colaterais dos aditivos químicos (MAIMOM, 2000).

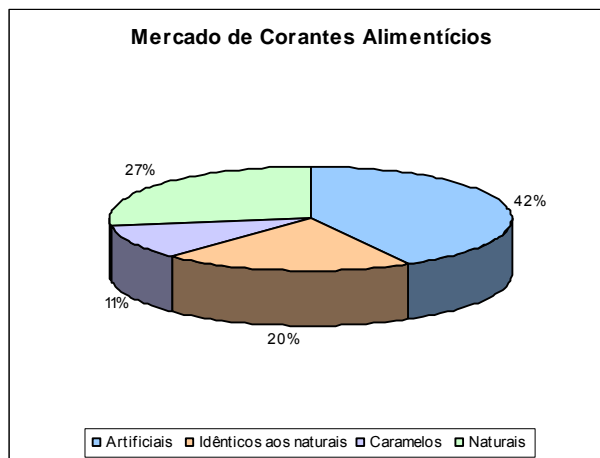


FIGURA 1: Mercado mundial de corantes alimentícios em 1995 (DOWNHAM E COLLINS, 2000).

Segundo Downham e Collins (2000), o mercado de pigmentos naturais cresce a uma velocidade de 5 a 10% ao ano, enquanto a previsão de crescimento dos corantes artificiais está entre 3-5%. No Brasil, a indústria de alimentos representa 4% do PIB e 30% do total das exportações. O setor conta com 38 mil empresas, 750 mil empregos diretos e faturamento anual de R\$ 58,1 bilhões. Considerando que a maioria dos alimentos processados leva corantes, o mercado destes pigmentos está em franca expansão (MAIMOM, 2000).

Algumas cores são mais populares que outras, tradicionalmente vermelhos e amarelos têm sido considerados as cores mais atrativas em alimentos. (O'CARROLL, 1999), tendo ampla aplicação e assim sendo interessante ampliar a gama de pigmentos naturais disponíveis à indústria de alimentos nesta faixa de espectro. Segundo Spears (1988) o número de corantes naturais disponíveis às indústrias de alimentos é relativamente pequeno, sendo realizadas muitas pesquisas para investigar novas fontes potenciais de pigmentos ainda não permitidos. A restrição nos corantes naturais disponíveis e suas dificuldades de incorporação proporcionam um desafio aos produtores de corantes naturais, incentivando a descoberta de novos pigmentos, melhoramento dos métodos de extração tradicionais, novos processos biotecnológicos e produção de plantas. Estas fontes

incluem plantas, microrganismos, algas e animais (SPEARS, 1988). Pigmentos derivados de plantas representam fontes efetivas de novos pigmentos, mas sua linha de produção não é muito rentável, além do mais, sofrem problemas de colheita, tamanho do cultivo, armazenamento e purificação da fração final (BLANC, 1998). Por outro lado, corantes provenientes de microrganismos oferecem a vantagem de produzir continuamente pigmentos bem definidos (SPEARS, 1988), podendo ter maiores rendimentos, devido sua velocidade de crescimento ser relativamente alta (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

2.2 LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL DE CORANTES

A lista de corantes sintéticos permitidos difere em diferentes países, mas o conceito geral é similar em todos. Nos Estados Unidos, o órgão responsável por regulamentar o uso de corantes em alimentos, o FDA, separa aditivos de cor em duas categorias: "corantes certificados" (derivados primariamente do petróleo) e "corantes isentos de certificação" (obtidos na maior parte de fontes minerais, de plantas, ou animais) (FDA, 1993). Em 1900, cerca de 80 corantes artificiais podiam ser usados em alimentos, porém, atualmente, o FDA permite o uso de apenas sete corantes artificiais na indústria alimentícia e de cosméticos (FDA, 1998). Assim como a legislação dos EUA, a legislação europeia (tabela 1) não distingue entre corante natural ou sintético, no entanto, vários corantes derivados de fontes naturais são observados na lista de corantes permitidos no mercado europeu e dos EUA (MAPARI *et al.*, 2005). Segundo Spears (1988), o número de corantes artificiais na União Europeia (UE) tem sido drasticamente reduzido.

TABELA 1 - Corantes permitidos na União Européia para uso em alimentos, segundo a Directiva 94/36/EC (EUROPEAN COMMISSION, 2006):

EC No	Nome Comum	EC No	Nome Comum
E 100	Curcumina	E 151*	Negro brilhante BN, Negro PN
E 101	Riboflavina, Riboflavina 5`-fosfato	E 153	Carvão vegetal
E 102*	Amarelo tartrazina	E 154*	Marrom FK
E 104*	Amarelo de quinolina	E 155*	Marrom HT
E 110*	Amarelo crepúsculo FCF Laranja crepúsculo S	E 160a	Carotenos
E 120	Cochonilha, ácido carmínico, carmins	E 160b	Urucum, bixina, norbixina
E 122*	Azorubina, carmoisina	E 160e	Beta-apo-8`-carotenal (C30)
E 123*	Amaranto (Vermelho Bordeaux)	E 160d	Licopeno
E 124*	Vermelho Ponceau 4R e conchonilha A	E 160c	Extrato de páprica, capsantina, capsorubina
E 127*	Eritrosina	E 160f	Éster etílico de beta-apo-8`-ácido carotênico (C30)
E 128*	Vermelho 2G	E 161b	Luteína
E 129*	Vermelho Allura AC	E 161g	Cantaxantina
E 131*	Azul marinho V	E 162	Vermelho de beterraba, betaína
E 132*	Indigotina, Índigo Carmin	E 163	Antocianinas
E 133*	Azul brilhante FCF	E 170	Carbonato de cálcio
E 140	Clorofilas e clorofilinas	E 171	Dióxido de titânio
E 141	Complexos de cobre de clorofilas e clorofilinas	E 172*	Óxidos e hidróxidos de ferro
E 142*	Verde S	E 173*	Alumínio
E 150a	Caramelo	E 174*	Prata
E 150b	Caramelo sulfito	E 175*	Ouro
E 150c	Caramelo amônia	E 80*	Litorubina BK
E 150d	Caramelo sulfito de amônia		

* Corantes artificiais

A seguir (tabela 2), estão descritos os corantes de uso permitido pela legislação brasileira em alimentos e bebidas, segundo a Resolução vigente nº. 4, de 24 de novembro de 1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1988):

TABELA 2 - Corantes de uso permitido em alimentos e bebidas pela legislação vigente no Brasil:

Corantes naturais:		
Açafrão	Clorofila, clorofila cúprica, sal de amônio de clorofilina cúprica, sal de potássio de clorofilina cúprica, sal de sódio de clorofilina cúprica.	Urzela:
Ácido carmínico		Orceína, orceína sulfonada
Antocianinas		Páprica
Cacau		Riboflavina
Carmin		Urucum
Carvão vegetal		Vermelho de beterraba
Carotenóides: α, β e γ-caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno	Choconilha	Xantofilas: cantaxantina, luteína, flavoxantina, criptoxantina, rodoxantina, rubixantina, violaxantina.
	Cúrcuma, Curcumina	
	Hemoglobina	
	Índigo	
Corantes sintéticos idênticos aos naturais:		
β -caroteno	Riboflavina	Xantofilas: Cantaxantina, luteína, flavoxantina, criptoxantina, rodoxantina, rubixantina, violaxantina.
Beta-apo-8'-carotenal	Riboflavina-5-(Fosfato de sódio)	
Éster etílico do ácido Beta-apo-8'-carotenóico		
Corante caramelo:		
Caramelos		
Corantes inorgânicos:		
Alumínio	Dióxido de titânio	Ouro
Carbonato de cálcio	Óxidos e hidróxidos de ferro	Prata
Corantes artificiais:		
Amarelo Crepúsculo FCF	Eritrosina	Tartrazina
Azul brilhante FCF	Indigotina	Vermelho
Bordeaux S ou amaranto	Ponceau 4R	

Fonte: ANVISA (1988)

A tabela 2 permite-nos observar o contraste entre o número de corantes naturais permitidos pela ANVISA em relação ao número restrito de corantes artificiais. Tem-se prestado atenção especial ao valor potencial de determinados corantes naturais, especialmente os polifenólicos e carotenóides, dado seu poder benéfico à saúde. Embora vários pigmentos da família dos carotenóides tenham uso liberado pela ANVISA e pelas legislações vigentes dos EUA e União Européia, ainda existe uma ampla gama de carotenóides a serem pesquisados que não estão listados nestas e podem oferecer propriedades vantajosas de estabilidade, custo de produção, atividade biológica e coloração diferenciada. A produção de carotenóides a partir de fontes biológicas tem sido uma área de intensiva investigação (AUSICH, 1997). Com o poder da biotecnologia e tecnologia do DNA recombinante, a capacidade biossintética de organismos para produzir carotenóides pode ser melhorada (AUSICH, 1997). Neste contexto, busca-se o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo como cultura de células, plantas ou microalgas, em níveis competitivos; ou ainda técnicas de mutagênese que aumentem a produtividade destes metabólitos e/ou reduzam sua toxicidade (MAPARI *et al.*, 2005).

2.3 CAROTENÓIDES

O termo carotenóides refere-se a uma classe de pigmentos naturais, de coloração amarela a vermelha, os quais estão amplamente distribuídos nos reinos animal e vegetal (HUI *et al.*, 2005), sendo reportados e caracterizados mais de 600 variantes estruturais desta família de pigmentos, encontrados em fontes naturais (AUSICH, 1997). Estes pigmentos são responsáveis por grande variedade de cores vistas na natureza sendo as mais notáveis o amarelo brilhante, alaranjado e vermelho das frutas, folhas e animais aquáticos (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

Das várias classes de pigmentos existentes na natureza, os carotenóides encontram-se entre as mais abundantes e importantes dada a grande diversidade e a relevância das funções que assumem (LORENZ e CYSEWSKI, 2000), podendo ser encontrados nas três principais linhas evolutivas *archaebacteria*, *eubacteria* e *eukarya* (ARMSTRONG e HEARST, 1996). Carotenóides são compostos isoprenóides ($C_{40}H_{56}$), constituídos por 8 unidades C_5 -isopreno e tem um esqueleto central linear constituído de 22 átomos de carbono e 9 duplas ligações conjugadas e extremidades finais anelares ou quase anelares com 9 átomos de carbono, em cada uma (LA FUENTE *et al.*, 2006). Esta estrutura química é responsável pela sua coloração característica, dado que as duplas ligações absorvem parte do espectro luminoso que nelas incide (ARMSTRONG e HEARST, 1996). O Espectro UV/VIS dos carotenóides é de grande importância para as análises, porque proporciona informação sobre sua estrutura. O espectro é devido à presença de um longo cromóforo de duplas ligações conjugadas (c.d.b.). Pelo menos 7 c.d.b. são necessárias para um carotenóide ter uma coloração perceptível. Logo, o espectro de absorção dos carotenóides depende do número de duplas ligações conjugadas em sua molécula, assim quanto mais longo o cromóforo, tanto maiores são os comprimentos de onda de absorção máxima, variando estruturalmente na faixa de 410 a 510 nm (Figura 2) (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2007).

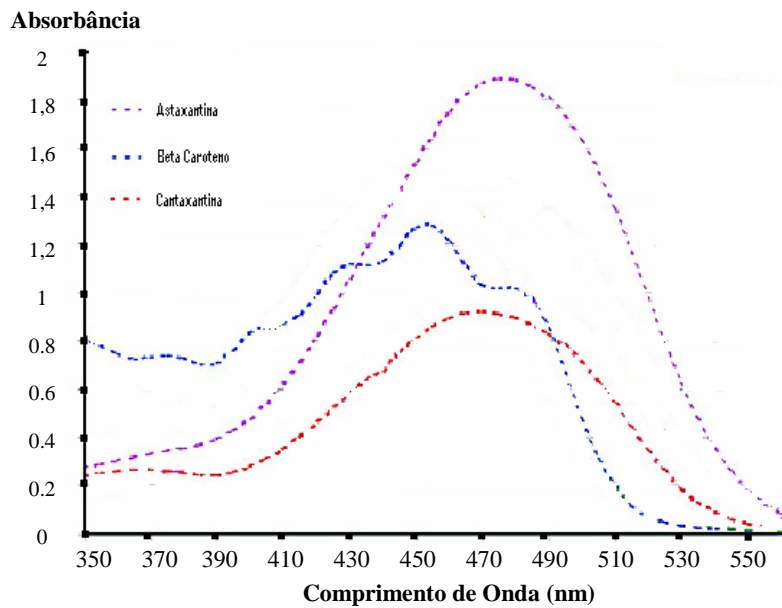


FIGURA 2: Espectro de absorção dos carotenóides: astaxantina, β -caroteno e cantaxantina (Adaptado de FONTANA, 2007).

Esta classe de pigmento compreende duas classes principais, os carotenos e as xantofilas (Figura 3). Os primeiros são hidrocarbonetos poliênicos cíclicos ou lineares, enquanto as xantofilas são carotenos com pelo menos um átomo de oxigênio funcional (como $-\text{OH}$ e $=\text{O}$) em sua molécula e representam a grande maioria dos carotenóides (LA FUENTE *et al.*, 2006; GONZALEZ, 2000).

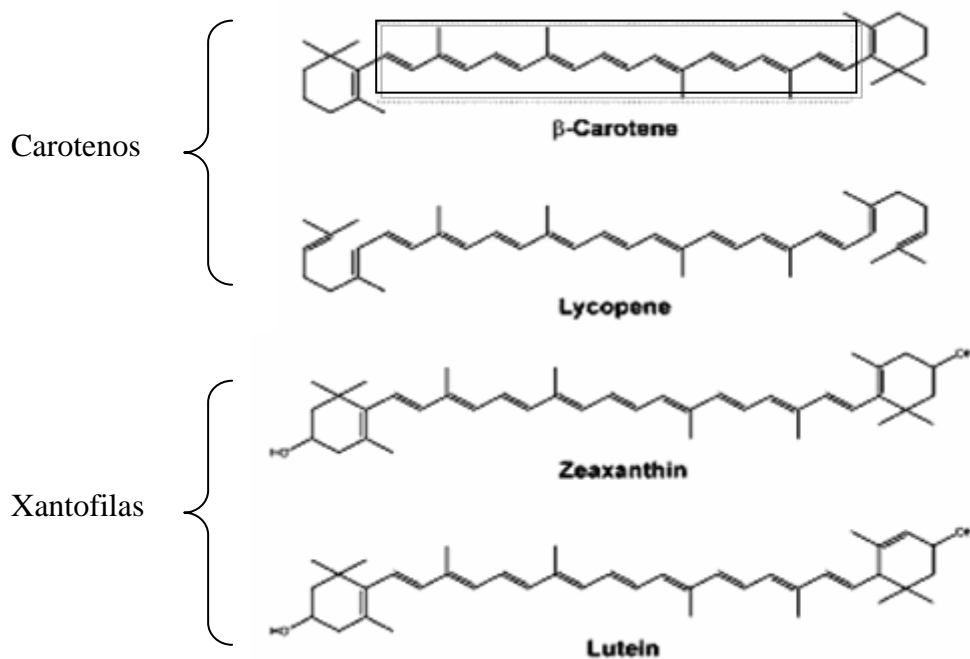


FIGURA 3: Exemplos típicos de carotenos e de xantofilas. O segmento linear destacado na estrutura do β -caroteno corresponde ao esqueleto central de 22 carbonos comum a todos os carotenos e xantofilas (LA FUENTE *et al.*, 2006).

Em decorrência da presença das insaturações, os carotenóides são sensíveis à luz, temperatura, acidez, bem como reações de oxidação (AMBRÓSIO *et al.*, 2006). Como regra geral, os carotenóides são lipossolúveis (HUI *et al.*, 2005), porém, excepcionalmente, adquirem alguma hidrossolubilidade como resultado de processos oxidativos ou derivatizações naturais como no caso da norbixina do urucum (ambas as funções carboxilas terminais demetiladas) e dos carotenóides sulfatados de organismos marinhos (FONTANA *et al.*, 1996).

Embora os carotenóides possuam diferentes propriedades biológicas, exibem propriedades físico-químicas similares (ARMSTRONG, 1997). As duas funções biológicas essenciais dos carotenóides em membranas fotossintéticas são absorver energia solar e exercer proteção contra danos solares. Muitas outras bioatividades têm sido consideradas em adição as suas propriedades antioxidantes (PALOZZA e KRINSKY, 1992).

A aquacultura atual associa o termo carotenóides com a coloração avermelhada da musculatura dos peixes salmonídeos, sendo que esta tonalidade é considerada um dos mais importantes critérios de qualidade para o filé (LATSCHA, 1990). A taxa de deposição dos carotenóides na musculatura de salmonídeos depende de um conjunto de fatores, como o tipo de pigmento na ração, densidade energética da ração, tamanho dos peixes, estado fisiológico, fatores ambientais, doenças, histórico genético e o período de arraçoamento com o carotenóide selecionado (TORRISEN, 1995).

2.4 ASTAXANTINA

A astaxantina é um carotenóide de coloração vermelho-alaranjada, do grupo xantofila, amplamente distribuído na natureza e comumente presente em animais marinhos (MIAO *et al.*, 2006; KUSDIYANTINI *et al.*, 1998). É um dos principais pigmentos da família dos carotenóides, conferindo a coloração característica de alguns pássaros (flamingo e íbis escarlata), crustáceos (camarão e lagosta), peixes (truta e salmão) e alguns microrganismos (JOHNSON e AN, 1991). É o principal pigmento carotenóide encontrado em animais aquáticos (GUERIN *et al.*, 2003). Em muitos dos animais aquáticos nos quais é encontrada, a astaxantina tem várias funções biológicas, incluindo proteção contra oxidação de ácidos graxos

poliinsaturados essenciais, proteção contra efeitos da luz UV e aumento da resposta imunológica (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

Seu nome deriva do gênero de caranguejo *Astacus astacus* e, quimicamente, é conhecida como 3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona, a qual é uma molécula que apresenta 40 átomos de carbono ($C_{40}H_{52}O_4$), com duas funções álcool e duas cetonas em sua configuração (RENSTROM *et al.*, 1981). A presença de finais hidroxila e cetona em cada anel ionona explica algumas características únicas, como a possibilidade de ser esterificada, seu elevado poder antioxidante e configuração mais polar que outros carotenóides (GUERIN *et al.*, 2003).

Na forma pura e cristalina, aparece como um pó fino de coloração escura violeta-amarronzada, com peso molecular de 596.9 daltons e ponto de fusão de aproximadamente 224°C (RENSTROM *et al.*, 1981). É insolúvel em água, podendo ser dissolvida à temperatura ambiente em diclorometano (~ 30g/L), clorofórmio (~ 10g/L), acetona (~ 0.2g/L), dimetilsulfóxido (~ 0.5g/L) e outros solventes não polares. Seu espectro de absorção representa um polieno conjugado, com $\lambda_{\text{máx}}$ de 485nm em clorofórmio, 479nm em etanol e 480nm em acetona (JOHNSON e AN, 1991).

A astaxantina é um composto opticamente ativo (VISSER *et al.*, 2003). A molécula de astaxantina tem dois carbonos assimétricos localizados nas posições 3 e 3' dos anéis nas extremidades da molécula (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

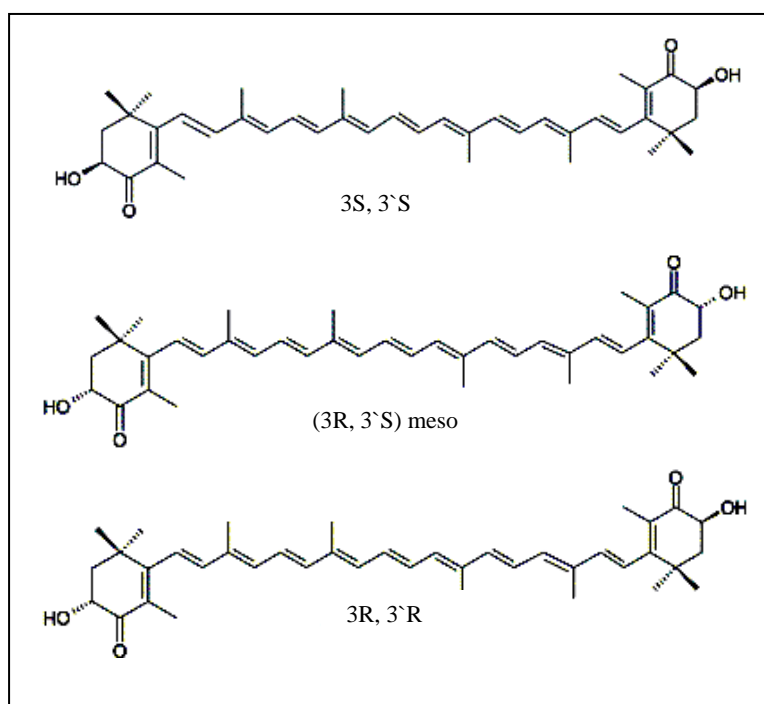


FIGURA 4: Fórmulas estruturais da astaxantina – estereoisômeros (STEPNOWSKI *et al.*, 2004).

Conforme pode ser visualizado na figura 4, diferentes enantiômeros da molécula resultam da forma em que os grupos hidroxila são ligados aos átomos de carbono assimétricos. Quando o grupo hidroxila está acima do plano da molécula, denomina-se “configuração R” e quando o grupo hidroxila está abaixo desse plano, é denominado “configuração S”. Assim, os três enantiômeros possíveis são: 3R,3R` ; 3S,3S` e 3R,3S (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). No reino vegetal, freqüentemente se encontram os isômeros 3S,3S'. (RENSTROM *et al.*, 1981). A forma livre pode estar esterificada por ácidos graxos, formando monoésteres e/ou diésteres de astaxantina, ou pode estar associada a proteínas (carotenoproteína), como na musculatura do salmão, exoesqueleto de lagostas (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; GUERIN *et al.*, 2003; GONZALEZ, 2000) ou modificando sua coloração vermelha, como na carapaça dos crustáceos, a qual adquire uma coloração verde, azul ou cinza (HOISCHEM *et al.*, 1998). A astaxantina também pode dar origem a hidrocarbonetos como consequência da perda das funções oxigenadas e levar a geração de moléculas estáveis, que são encontradas nos sedimentos fósseis (GONZALEZ, 2000).

A astaxantina na sua forma livre é instável e extremamente sensível em relação aos fatores como luz, oxigênio, acidez e calor (GUERIN *et al.*, 2003). Nestas condições, são muito suscetíveis a uma variedade de conversões oxidativas, processos degradativos, ou são isomerizados e este tipo de modificação química altera a absorção de luz e, conseqüentemente a intensidade da coloração (LATSCHA, 1990; STOREBAKKEN *et al.*, 2004). Quando esterificada com um ou dois ácidos graxos, esses estabilizam a molécula (GUERIN *et al.*, 2003; LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

A astaxantina é um tetraterpenóide (JOHNSON e AN, 1991), formada pela via do ácido mevalônico, através do acetato proveniente da fotossíntese e/ou da respiração (GOODWIN, 1980). A via se inicia no Acetil-CoA e procede via malonato a isopentenil pirofosfato (IPP), precursor geral de todos os isoprenóides (ANDREWS *et al.*, 1976; VISSER *et al.*, 2003). Subseqüentemente, 8 moléculas de IPP são condensadas para formar o carotenóide incolor fitoeno. Através de quatro desidrogenações e duas reações de ciclização, o fitoeno é convertido em β -caroteno. Finalmente, o β -caroteno é oxidado para produzir astaxantina (ANDREWS *et al.*, 1976; RISE *et al.*, 1994). Esta via é conhecida como caminho isoprenóide, devido à presença dos precursores isoprenóides, especialmente o ácido mevalônico

(MVA) e o isopentenil difosfato, sendo responsável também pela síntese de várias moléculas lipossolúveis como esteróis (ex. colesterol e ácidos biliares), hormônios esteróides (ex. estrógeno, cortisol, aldosterona), prostaglandinas e vitaminas D, K e E (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). A astaxantina é conhecida como um cetocarotenóide oxidado do betacaroteno (YUAN e CHEN, 1998).

A ordem destas reações e os produtos intermediários na biossíntese de astaxantina são diferentes para vários microrganismos produtores de astaxantina (YUAN *et al.*, 2002). Os possíveis intermediários no caminho biossintético da astaxantina são betacaroteno, echinenona, β -criptoxantina, cantaxantina, zeaxantina, 3-hidroxi-equinenona, 3'-hidroxi-equinenona, adonirubina e adonixantina (FRASER *et al.*, 1997; YOKOYAMA e MIKI, 1995 *apud* YUAN *et al.*, 2002). Na microalga *Haematococcus pluvialis*, a astaxantina é sintetizada a partir do betacaroteno através da hidroxiequinenona ou da cantaxantina (SHOEFS *et al.*, 2001). Na levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a astaxantina é produzida a partir do betacaroteno via echinenona, 3-hidroxi-equinenona e adonirubina (ANDREWES *et al.*, 1976; JOHNSON e AN, 1991). Na produção de astaxantina pela *Agrobacterium auratiacum*, o caminho biossintético é controlado pelas condições de cultura, especialmente oxigênio dissolvido no meio (YOKOYAMA e MIKI, 1995, *apud* YUAN *et al.*, 2002).

2.4.1 Interesse Comercial da Astaxantina

Este carotenóide tem elevado interesse científico e comercial, devido ao aumento da demanda por pigmentos naturais e o seu alto valor no mercado mundial, estimado em, aproximadamente, US\$ 2500/kg (JEON *et al.*, 2006; DONG e ZHAO, 2004), tendo grandes perspectivas de aplicação em indústrias farmacêuticas, cosmética, alimentícia e de ração animal (GUERIN *et al.*, 2003).

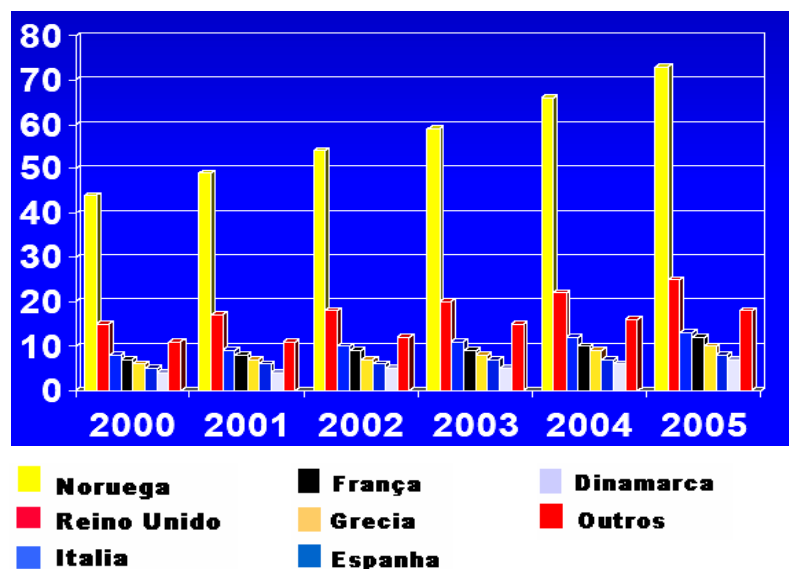


Figura 5: Mercado CEE de astaxantina (Fonte: FUENTE, 2006).

No entanto, atualmente, o maior consumo de astaxantina é na indústria de rações para aquacultura, como fonte de pigmentação para crustáceos e peixes, principalmente salmão e truta (OLAIZOLA, 2003; VISSER *et al.*, 2003), fornecendo uma pigmentação atrativa em seus ovos, carne e escama (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; JOHNSON e AN, 1991).

Devido alguns destes animais marinhos (salmão, camarão e lagosta) serem incapazes de sintetizar astaxantina, pigmentos carotenóides devem ser suplementados em sua dieta para obter a coloração desejada, de melhor aceitação do consumidor (JOHNSON e AN, 1991; OROSA *et al.*, 2005; VISSER *et al.*, 2003; GUERIN *et al.*, 2003). No meio ambiente marinho, a astaxantina é biossintetizada na cadeia alimentar, por microalgas ou fitoplanctons, como nível primário de produção. Microalgas são consumidas pelos zooplâncton, insetos ou crustáceos que acumulam a astaxantina e que, por sua vez, são ingeridos subsequentemente pelos peixes (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

No início da década de 60, utilizavam-se subprodutos da indústria camaroneira como fonte de astaxantina natural, porém para se obter uma coloração satisfatória a partir desses ingredientes, para salmonídeos, a ração passou a necessitar de uma taxa de inclusão na ordem de 10 a 25%. Como esses subprodutos contêm elevados teores de umidade e matéria inorgânica os níveis de inclusão não foram práticos e nem efetivos em termos de custos. No início da década de 80, a cantaxantina sintética tornou-se a fonte predominante de

carotenóides utilizada na alimentação destes peixes, sendo substituída nos dias atuais pela astaxantina (APTA - SAA, 2007) devido a estudos que demonstram a superioridade desta como agente pigmentante que se deposita de maneira mais eficiente, além de ser o pigmento encontrado naturalmente nos salmonídeos (JOHNSON e AN, 1991).

O uso da astaxantina em aquacultura tem amplas funções, incluindo: antioxidante, precursor hormonal, melhora da imunidade, atividade de pró-vitamina A, reprodução, crescimento, maturação e fotoproteção (BASF, 2006; LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

Em 1990 as características antioxidantes da molécula de astaxantina tornaram-se bem estabelecidas (OLAIZOLA, 2003; SCHROEDER e JOHNSON 1995). Vários estudos *in vitro* e em animais modelo demonstraram numerosas funções da astaxantina no tratamento e prevenção de doenças (GUERIN *et al.*, 2003; MAHMOUD *et al.*, 2004). Isto tem aberto a possibilidade de um novo mercado para a astaxantina nas indústrias farmacêuticas e de alimentos (MIAO *et al.*, 2006; HUI *et al.*, 2005) e estudos em medicina (JOHNSON e AN, 1991; LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

Há um aumento na quantidade de evidências sugerindo que devido à sua estrutura, a astaxantina é um eliminador de oxigênio singlete (1O_2) e radicais peróxil (H_2O_2) mais potente que o betacaroteno, cantaxantina e zeaxantina (PALOZZA e KRINSKY, 1992, BASF, 2006) e excede os benefícios antioxidantes das vitaminas C e E (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; BASF, 2006, PALOZZA e KRINSKY, 1992). É relatado que a astaxantina possui poder antioxidante, aproximadamente 10 vezes maior que outros carotenóides, inclusive o betacaroteno e mais de 500 vezes maior que o α -tocoferol (SUH *et al.*, 2006).

Radicais livres, como os radicais hidroxila e peróxil e formas altamente reativas do oxigênio (ex. oxigênio singlete) são produzidos no corpo durante reações metabólicas normais (GUERIN *et al.*, 2003). Danos oxidativos têm sido ligados ao envelhecimento, aterogênese, lesão por isquemia-reperfusão, retinopatia infantil, degeneração macular relacionada à idade e carcinogênese (PAPAS, 1999, *apud* GUERIN *et al.*, 2003; SCHROEDER e JOHNSON 1995). Os carotenóides como potentes antioxidantes biológicos, são capazes de absorver a energia de excitação do oxigênio singlete em sua estrutura, ocorrendo a degradação da molécula de

carotenóide e, conseqüentemente, prevenindo que outras moléculas ou tecidos sejam danificados (SKIBSTED *et al.*, 2006, CHONG *et al.*, 2007).

Dentre as funções biológicas da astaxantina e seus benefícios à saúde humana, são relatados: proteção da pele contra danos por foto-oxidação com radiação ultravioleta (MIAO *et al.*, 2006; LYONS e O`BRIEN, 2002), prevenção contra o envelhecimento precoce e doenças relacionadas à idade (GUERIN *et al.*, 2003; CARLOS e JOHNSON, 2004), prevenção e/ou retardo de doenças degenerativas como a arteriosclerose e neurodegenerativas como Alzheimer`s, Parkinson`s, Huntington`s (SCHROEDER e JOHNSON 1995; GUERIN *et al.*, 2003; KAMATH *et al.*, 2005); melhora da resposta imune em animais e humanos modulando o sistema imune humoral e não humoral, aumentando a produção de imunoglobulinas A, M e G e do anticorpo celular T-helper (CHEN *et al.*, 2006, MIAO *et al.*, 2006; MAHMOUD *et al.*, 2004); melhora da função hepática (GUERIN *et al.*, 2003), proteção contra cânceres induzidos quimicamente e aumento das lipoproteínas de alta-densidade (HDL) (MIAO *et al.*, 2006; LORENZ e CYSEWSKI, 2000) e conseqüente melhora da função cardíaca (GUERIN *et al.*, 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado correlação entre a ingestão aumentada de carotenóide e redução da incidência de doenças coronarianas no coração, degeneração macular e certos cânceres, aumento da resistência viral, bacteriana e fúngica e infecções parasitárias (MAHMOUD *et al.*, 2004, MIAO *et al.*, 2006; CHONG *et al.*, 2007). Os efeitos anti-carcinogênicos da astaxantina têm sido atribuídos ao efeito antioxidante, uma vez que, radicais livres estão relacionados com processo de iniciação e propagação do câncer (BAKER e GÜNTHER, 2004).

2.4.2 Astaxantina Natural x Astaxantina Sintética

A astaxantina pode ser produzida por síntese química ou biotecnológica (HU *et al.*, 2006). Tradicionalmente, a produção em escala industrial de astaxantina tem sido realizada principalmente por síntese química (BOUSSIBA *et al.*, 2000, OLAIZOLA, 2003; YAMANE *et al.*, 1997), porém a forma sintética é cara (>US\$ 3,000 / kg) e pode conter astaxantina com configuração diferente da natural (BOUSSIBA *et al.*, 2000). Os maiores produtores de astaxantina, atualmente, são BASF e Hoffman-La Roche (KUSDIYANTINI *et al.*, 1998; OLAIZOLA, 2003) dominando 80% do mercado mundial (JOHNSON e AN, 1991). Porém, segundo a

indústria química BASF (BASF, 2006) o processo de síntese da astaxantina é um dos mais complexos e longos da empresa, possuindo 14 passos.

A produção biotecnológica de carotenóides como a astaxantina é um campo de pesquisa de grande interesse, devido seu alto valor de mercado e o crescimento da demanda por produtos naturais (HUI *et al.*, 2005). Apesar de mais de 95% do mercado de aquacultura consumir derivados sintéticos da astaxantina, o aumento da demanda de consumo por produtos naturais faz com que os pigmentos sintéticos sejam menos desejáveis e proporciona uma oportunidade para a produção de astaxantina natural (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). Além disso, nos últimos anos, o uso de compostos químicos sintéticos como aditivo alimentar tem sido estritamente regulado (YAMANE *et al.*, 1997) sendo a fonte natural de astaxantina preferível pela sua segura utilização como aditivo alimentar (KUSDIYANTINI *et al.*, 1998).

Segundo a figura 6, algumas empresas, como a Cyanotech e a Aquasearch, produzem astaxantina natural utilizando a microalga *Haematococcus pluvialis*. Outras com a Archer Daniels Midland, produzem astaxantina natural utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Entretanto empresas como a Cyanotech e Igene apresentam uma produção mensal de astaxantina muito baixa (em torno de 75Kg e 60Kg, respectivamente) quando comparada à Roche (6 toneladas). A baixa produção e elevado custos de processo tornam difícil sua inserção no mercado mundial (McCOY, 1999).










	BASF	Síntese Química Carophyll pink® Lucantin Pink®
		Síntese Biotecnológica <i>Haematococcus pluvialis</i> Aquasand® Carophyll red and yellow®
	 	
		Síntese Biotecnológica <i>X. dendrorhous</i> : Natuphill pink®
		Síntese Biotecnológica <i>X. dendrorhous</i> : Astanat®

FIGURA 6: Principais Produtores de Astaxantina (Adaptado de FUENTE, 2006).

Segundo Ausich (1997), as vantagens na síntese química de carotenóides são a produção de carotenóides de excepcional pureza e uniformidade, além do custo total de produção destes carotenóides ser relativamente baixo. Porém, há desvantagens como a complexidade de síntese de certos carotenóides e a necessidade de desenvolver um novo processo químico para cada carotenóide que se deseja sintetizar. Além disso, a síntese química produz misturas de estereoisômeros, alguns dos quais podem não ser encontrados na natureza, não ser ativos como os isômeros de ocorrência natural, não ser desejados pelo público consumidor ou, ainda, podem ter efeitos indesejados (AUSICH, 1997; LIM *et al.*, 2002; GONG e CHEN, 1998). Segundo Lim *et al.* (2001) a forma de astaxantina produzida quimicamente possui estabilidade e atividade menor que aquelas produzidas por fontes naturais.

A produção de astaxantina de fontes naturais é uma potencial alternativa para substituir a astaxantina sintética (HUI *et al.*, 2005). Segundo Ausich (1997) a síntese biológica, apresenta algumas vantagens, como extensa capacidade biossintética dos microrganismos e, devido às características da biossíntese de carotenóides, o conhecimento da biossíntese de um carotenóide é aplicável a outros carotenóides. Com a produção biotecnológica, apenas os estereoisômeros de ocorrência natural são produzidos (OLAIZOLA, 2003; AUSICH 1997). Finalmente, todas as ferramentas modernas de bioprocessamento e tecnologia do DNA recombinante podem ser usadas para desenvolver sistemas para produção de carotenóides com melhores rendimentos (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; AUSICH 1997). No entanto, dentre as desvantagens, estão a produção, freqüentemente, de misturas de diferentes carotenóides nos sistemas biológicos, requerendo processamento e purificação, que aumentam o custo do processo. Em muitos casos a tecnologia é nova e requer considerável pesquisa para melhorar o sistema e, finalmente, o custo total de produção atualmente é maior que o processo de síntese química (AUSICH 1997). No entanto, a fonte natural de astaxantina é preferível pela sua segura utilização como aditivo alimentar (KUSDIYANTINI *et al.*, 1998).

2.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ASTAXANTINA

A astaxantina foi primeiramente isolada e identificada em lagostas em 1938 e muitos estudos têm sido realizados para extrair astaxantina de diversas fontes

biológicas (LIM *et al.*, 2002). Fontes naturais importantes na obtenção de astaxantina são os crustáceos (principalmente o camarão *Padalus borealis* e os microcrutáceos *Euphanasia pacifica* e *Euphanasia superba*) e alguns microrganismos (JOHNSON e AN, 1991).

Uma grande variedade de microrganismos é capaz de sintetizar astaxantina, como as microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e *Chlorococcum sp.*, as leveduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Candida utilis* e algumas bactérias como *Agrobacterium aurantiacum*, *Halobacterium salinarum*, *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium spp.* (ANDREWES *et al.*, 1976; CALO, 1995; YOKOYAMA e MIKI., 1995; MIAO *et al.*, 2006; IP e CHEN, 2005, JOHNSON e AN, 1991; RISE *et al.*, 1994; LIU e LEE, 2000; YUAN *et al.*, 2002; ATCC, 2006). É provável que existam na natureza outros microrganismos, além dos já conhecidos, que produzam astaxantina, especialmente em ambientes com condições adversas, uma vez que os carotenóides apresentam a capacidade de proteger microrganismos heterotróficos contra a luz e radicais oxigenados (JOHNSON e AN, 1991).

TABELA 3 - Fontes naturais de astaxantina (Fonte: AlgaTechnologies, 2007)

Fontes	Concentração de Astaxantina (ppm)
Salmonídeos	~ 5
Plânctons	~ 60
Eufasídeos	~ 120
Camarões árticos	~ 1200
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	~ 8000
<i>Haematococcus pluvialis</i>	~ 40,000

Dentre os microrganismos citados, a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* e a microalga *Haematococcus pluvialis* têm sido os principais microrganismos usados na produção de astaxantina natural e atraído atenção em todo o mundo como as fontes mais promissoras na produção industrial de astaxantina biotecnologicamente (DONG e ZHAO, 2004, AR *et al.*, 2007). A levedura *X. dendrorhous* produz uma concentração de astaxantina consideravelmente menor que a microalga *H. pluvialis*, no entanto essa tem como vantagem uma rápida velocidade de propagação podendo proporcionar um bom rendimento de produção de astaxantina (JOHNSON e AN, 1991). Segundo um estudo realizado por Passos *et al.*, 2007, a microalga *H. pluvialis* revelou maior conteúdo de carotenóides totais, enquanto a levedura *X. dendrorhous*, apesar de um menor conteúdo de pigmentos

totais, apresentou a maior relação entre a concentração de astaxantina livre e o conteúdo de carotenóides totais. Contudo, segundo AR *et al.*, (2007) em relação à produtividade de astaxantina, o máximo reportado foi $150 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ com uma cepa selvagem de *X. dendrorhous* e $340 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ com a cepa mutante e, no caso do *H. pluvialis*, os valores máximos foram de 290 a $488 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, dependendo das condições de cultivo (AR *et al.*, 2007).

Além disso, a astaxantina existe principalmente como astaxantina livre na levedura *X. dendrorhous* (PARAJÓ *et al.*, 1998) e éster de astaxantina na microalga *H. pluvialis* (JOHNSON e AN, 1991). Assim a levedura *X. dendrorhous* é mais apropriada para preparação de trans-astaxantina purificada, julgando-se pelo estado da astaxantina, que a alga *H. pluvialis*, mas seu conteúdo de astaxantina é menor que na alga e para preparação de trans-astaxantina purificada a partir de microrganismos é necessário escolher uma espécie que produza grande quantidade de astaxantina (YUAN e CHEN, 2000). Logo estes dois microrganismos têm muito a ser desvendado para obter-se as ótimas condições de crescimento e produtividade de astaxantina aproveitando-se ao máximo o seu potencial.

2.5.1 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

A levedura vermelha *X. dendrorhous* tem sido extensivamente estudada (AUSICH, 1997), sendo uma fonte potencial na produção de astaxantina (STOREBAKKEN *et al.*, 2004; ANDREWES *et al.*, 1976).

O estado anamorfo (ou imperfeito) da levedura *X. dendrorhous* foi isolado, contendo astaxantina, no final dos anos 60, a partir de exudatos ricos em açúcar de árvores decíduas em regiões montanhosas do Japão e Alaska por Herman Jan Phaff e colaboradores (PHAFF *et al.*, 1972). Esta foi originalmente chamada "*Dendrorhous montanae*" (PHAFF *et al.*, 1972), mas como este nome não atendia as exigências do Código de Nomenclatura Botânica, o gênero foi posteriormente mudado para *Phaffia* em homenagem aos diversos anos que Herman Jan Phaff dedicou-se a pesquisa de leveduras (JOHNSON e AN, 1991).

Phaff e colaboradores pesquisaram o estado teleomórfico (ou estado perfeito) desta levedura por muitos anos, mas não tiveram sucesso até 1995, quando Golubev (1995) reportou o estado perfeito em certas cepas e chamou o teleomorfo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Embora seja comumente assumido

que todas as cepas desta levedura poderiam ser designadas *X. dendrorhous*, Fell et al., (1999) observaram que este grupo de leveduras é muito mais complexo e que provavelmente existem várias linhagens filogenéticas (FELL *et al.*, 1999).

A figura 7 mostra a morfologia do *X. dendrorhous* em estado imperfeito ou assexuado (chamado *Phaffia rhodozyma*). Esta levedura reproduz-se assexuadamente em ótimas condições de crescimento enquanto, em condições desfavoráveis (limitação de nitrogênio, baixas temperaturas, presença de poliálcoois e deficiência de água) estimula a reprodução sexuada (estado teleomorfo ou perfeito, chamado *X. dendrorhous*) figura 8 (CARLOS e JOHNSON, 2004).

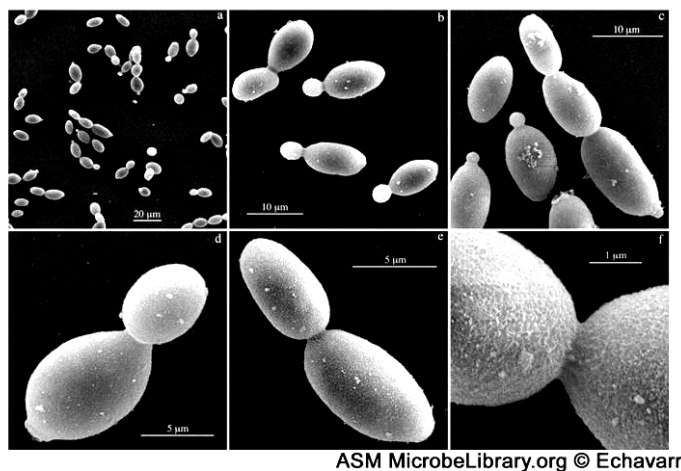


FIGURA 7: Células de *X. dendrorhous* em estado anamorfo (chamado *Phaffia rhodozyma*) (American Society for microbiology, 2007).



FIGURA 8: Indução do estado teleomorfo do *X. dendrorhous* (American Society for microbiology, 2007).

Os critérios usados na identificação desta levedura como basidiomiceto incluem sua habilidade de sintetizar carotenóides, propriedades metabólicas como a habilidade de usar uréia, a qual é menos comum em leveduras ascomicetos, a estrutura de sua parede celular e a forma de brotamento. As evidências mais conclusivas de sua origem filogenética é a parede celular multicamadas e de brotamento heteroblástico (JOHNSON e AN, 1991), a qual é característica de heterobasidiomicetos (AN *et al.*, 1989). Além disso, esta relação é suportada pela composição de carboidratos presentes na parede celular (JOHNSON e AN, 1991).

Outras propriedades incluem a capacidade de assimilar compostos carbonados, incluindo diversos mono, di e polissacarídeos. Além disso, cresce entre as temperaturas de 0°C a 27°C (JOHNSON e AN, 1991).

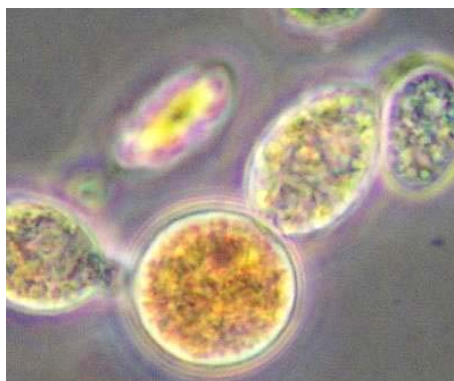


FIGURA 9: *X. dendrorhous* produzindo astaxantina. Ampliação 1000X. (Fonte: FUENTE, 2006).

A levedura *X. dendrorhous* possui algumas propriedades vantajosas: produz astaxantina naturalmente (AUSICH, 1997) e sintetizam astaxantina como carotenóide principal (ANDREWES *et al.*, 1976; VISSER *et al.*, 2003), não requer luz para seu crescimento e pigmentação, pode utilizar vários tipos de sacarídeos, sob condições aeróbias e anaeróbicas e pode crescer em uma velocidade de 0,10 a 0,15 h⁻¹ (ANDREWES *et al.*, 1976; JOHNSON e LEWIS, 1979).

A concentração de astaxantina presente em isolados naturais de *Xanthophyllomyces dendrorhous* geralmente está entre 300 - 450µg/g de biomassa seca (AN *et al.*, 1989), sendo que a análise por HPLC em coluna de sílica gel indicou que a astaxantina compreende 65-95% dos carotenóides totais desta levedura (SEDMAN *et al.*, 1990) e é uma fonte natural do isômero 3R,3'R da astaxantina não-esterificada (ANDREWS *et al.*, 1976), enquanto a maioria dos organismos conhecidos produtores de astaxantina sintetizam o isômero (3S,3'S) (ANDREWS e STARR, 1976).

A *X. dendrorhous* tem grande valor comercial como fonte alimentar de astaxantina natural, porém o nível de astaxantina tem que ser aumentado para tornar-se competitiva com a síntese industrial química (SCHOROEDER e JOHNSON, 1995), uma vez que o alto custo de produção limita o uso desta levedura (RAMÍREZ *et al.*, 2001) e isolados naturais de *X. dendrorhous* tem uma baixa concentração de astaxantina (KUSDIYANTINI *et al.*, 1998).

Muitas pesquisas têm sido realizadas visando desenvolver um processo de fermentação eficiente da *X. dendrorhous* para produção de astaxantina para produção comercial (VISSER *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2006). A produção microbiana deste pigmento pode ser melhorada através de estratégias isoladas ou combinadas (FONTANA *et al.*, 1996). Protocolos de cultivo têm sido otimizados para o melhoramento do processo de diversas formas: otimização do meio de cultura (VISSER *et al.*, 2003; YAMANE *et al.*, 1997), condições de fermentação (HU *et al.*, 2006; YAMANE *et al.*, 1997) e o uso de substratos mais baratos (FONTANA *et al.*, 1996; PARAJO *et al.*, 1998). O uso de precursores e estimulantes químicos como o ácido mevalônico, etanol, licopeno e ácido acético também poderiam melhorar a produção de astaxantina em *X. dendrorhous* (CALO *et al.*, 1995; MEYER e DU PREEZ, 1993), mas pode acarretar alto custo para uso em larga escala de produção de astaxantina (AN *et al.*, 1989).

Artifícios de engenharia genética ou metabólica, bem como mutagênese também podem ser usados, podendo aumentar a produção de astaxantina em pelo menos 6 vezes comparado às linhagens selvagens (AN *et al.*, 1989, LEE *et al.*, 2004). Os genes para a biossíntese de astaxantina têm sido elucidados e métodos estão sendo desenvolvidos para melhorar a manipulação genética da *X. dendrorhous*, obtendo-se cepas hiper-produtoras de astaxantina por técnicas clássicas de mutação e “screening” (LEE *et al.*, 2004; AN *et al.*, 1989; VISSER *et al.*, 2003). O melhoramento genético destas cepas pode ser realizado de diferentes maneiras diferentes: mutagênese, recombinação de mutantes (por exemplo, fusão e protoplastos), clonagem e amplificação e genes (JOHNSON e AN, 1991).

No entanto, a instabilidade genética é o maior problema do uso de mutagênese para criar cepas mutantes hiperprodutoras de carotenóides (VISSER *et al.*, 2003; PARAJO *et al.*, 1998), mostrando alta frequência de reversão (20 – 40%) (AN *et al.*, 1989). Apesar deste problema, alguns grupos de pesquisa têm isolado com sucesso cepas mutantes estáveis de *X. dendrorhous* com aumento na biossíntese de astaxantina (AN *et al.*, 1989). No entanto, a maioria das cepas mutantes estáveis mostraram uma redução na velocidade de crescimento e/ou produção de biomassa (VISSER *et al.*, 2003).

Cepas de *X. dendrorhous* com alta capacidade de produção de astaxantina, combinadas a condições de cultivo otimizadas para alta produção de astaxantina são usadas em indústrias, no entanto, detalhes destas cepas e processo de

fermentação são sigilosos devido à competição industrial no mercado de carotenóides. Todavia, cepas mutantes estáveis de *X. dendrorhous* que produzem 3000 a 4000µg/g peso seco de levedura tem sido reportado produzir economicamente astaxantina em produção comercial com volume de trabalho de pelo menos 1500L (VISSER *et al.*, 2003).

Uma outra estratégia que tem sido citada em alguns trabalhos para melhorar a produção de astaxantina por *X. dendrorhous*, é a estimulação por extratos de outros organismos no meio de produção (CARLOS e JOHNSON, 2004). Carlos e Johnson (2004) observaram que um contaminante fúngico, denominado *Epicoccum nigrum*, na placa de *X. dendrorhous* estimulou consideravelmente a produção de astaxantina em várias cepas desta levedura, no entanto o mecanismo pelo qual este contaminante estimulou a biossíntese de carotenóide em *X. dendrorhous* é desconhecido. Carlos e Johnson (2004) sugerem uma nova função da astaxantina, de proteção da *X. dendrorhous* contra compostos oxidantes produzidos por atividades metabólicas de patógenos de plantas como *E. nigrum* e alguns fungos de madeira podre, podendo estimular a produção de astaxantina.

2.5.2 *Haematococcus pluvialis*

As microalgas são um grupo extremamente heterogêneo de organismos (OLAIZOLA, 2003) e constituem-se em um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação de energia solar em compostos orgânicos, através da fotossíntese. Dado que apresentam uma distribuição global, podendo ser cultivadas nos mais inóspitos locais, tais como lagos salinos adjacentes a desertos ou nos mares Ártico e Antártico, elas possuem um enorme potencial de aproveitamento, quer como fontes de alimento, quer como reservatórios dos mais diversos compostos químicos de interesse. Como qualquer outro microrganismo, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular (HENRIQUES *et al.*, 1998). A grande diversidade de microalgas e suas características fisiológicas tornam este grupo uma fonte potencialmente rica de produtos químicos, com aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica (OLAIZOLA, 2003) uma vez que, a manipulação de condições de cultivo, notadamente a presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos e antioxidantes

naturais, alguns de elevado valor comercial (HENRIQUES *et al.*, 1998). Além disso, cultivos de algas são um meio de seqüestrar dióxido de carbono, purificação de efluentes e produção de biocombustível (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; DONG e ZHAO, 2004).

Há mais de 10 mil espécies de microalgas reconhecidas, porém, poucas são comercialmente cultivadas: as principais são *Spirulina*, *Chorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus* (DONG e ZHAO, 2004). As duas primeiras espécies são usadas para suplementação alimentar, enquanto as duas últimas pelo seu conteúdo pigmentar, betacaroteno e astaxantina (OLAIZOLA, 2003). Como resultado do alto custo de produção, os produtos comerciais obtidos a partir de microalgas podem chegar a altos preços (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

A microalga *Haematococcus pluvialis* tem recebido aumentado interesse como uma fonte promissora para produção de astaxantina (SUH *et al.*, 2006, GARCIA-MALEA *et al.*, 2006). O cultivo de *H. pluvialis*, tanto em laboratório quanto em escala comercial, tem recebido muita atenção (CIFUENTES *et al.*, 2003). A produção comercial de astaxantina utilizando microalgas está obtendo sucesso em algumas indústrias (LORENZ e CYSEWSKI, 2000) destacando-se, neste campo, a microalga *Haematococcus pluvialis*, devido seu elevado poder carotenogênico.

O *Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde (Chlorophyta), móvel, unicelular, fotossintética e capaz de sintetizar e acumular o pigmento astaxantina em resposta às condições ambientais (DONG e ZHAO, 2004). Seu habitat natural característico são cavidades rochosas periodicamente preenchidas com água da chuva. Este habitat natural é típico em banhos de pássaros, outros ornamentos de jardim e recipientes contendo água da chuva (Figuras 10 e 11). Pode ser encontrada também em piscinas rochosas, mas é pouco tolerante a altas salinidades. Ocasionalmente, o *H. pluvialis* aparece em grande quantidade em rios ou às margens de lagos, quando a seca expõe grandes áreas de rochas ricas em fissuras (CANTER-LUND e LUND, 1995).

Esta alga, tanto em seu habitat natural ou artificial muitas vezes tem que resistir a variáveis e freqüentes condições ambientais extremas (CANTER-LUND e LUND, 1995). Quando as condições ambientais tornam-se adversas, como escassez de nutrientes, ou as piscinas rochosas começam a secar e aumenta a exposição à radiação solar, o *H. pluvialis* entra em fase de resistência com formação de cistos, que o permite sobreviver por longos períodos, até que as condições voltem a ser

favoráveis (Mera Pharmaceuticals, 2007). Em seguida, quando as condições tornam-se favoráveis novamente, os cistos retornam à forma vegetativa verde (CANTER-LUND e LUND, 1995).



FIGURA 10: Banho de pássaros seco apresentando coloração por cistos de *Haematococcus*, no Reino Unido (CANTER-LUND e LUND, 1995).



FIGURA 11: Banho de pássaros contendo cistos de *H. pluvialis*. (Fonte: The Freshwater Algal Flora of the British Isles, 2002)

O *H. pluvialis* é capaz de acumular uma quantidade superior de astaxantina comparado a outras fontes naturais (BOUSSIBA *et al.*, 2000) uma vez que é capaz de acumular em torno de 1,5 a 6,0% p/p de astaxantina em relação ao seu peso seco, cultivada em escala industrial (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; KAMATH *et al.*, 2005; BOUSSIBA *et al.*, 2000). No *H. pluvialis* a forma esterificada é predominante, principalmente como astaxantina monoéster (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). A astaxantina padrão do *Haematococcus pluvialis* é aproximadamente 70 % monoésteres, 25% diésteres e 5% livre (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). O 3S,3'S estereoisômero é a principal forma encontrada em *H. pluvialis* (TURUJMAN *et al.*, 1997). As células vegetativas possuem mais clorofila (*a* e *b*) e menos carotenóides, no entanto, quando exposta a condições de stress, o organismo acumula carotenóide no citoplasma e simultaneamente o conteúdo de clorofila total diminui drasticamente (KAMATH *et al.*, 2005). Dentre os carotenóides produzidos, a astaxantina compreende 85-88% do conteúdo de carotenóides totais no *H. pluvialis* (KAMATH *et al.*, 2005) e outros cetocarotenóides como a cantaxantina, echinenona, adonirubina e betacaroteno representam apenas uma pequena porcentagem do conteúdo total de carotenóides nas células encistadas (GRUNG *et al.*, 1992; TSAVALOS *et al.*, 1992 *apud* HARKER *et al.*, 1996). Na alga *H. pluvialis* a

astaxantina existe principalmente como éster formado por combinação de vários ácidos graxos com diferentes isômeros de astaxantina, no entanto a composição é diferente para as diferentes cepas de *H. pluvialis* (YUAN e CHEN, 2000).

TABELA 4 - Porcentagem de clorofila e astaxantina em diferentes fases morfológicas das células de *H. pluvialis* (adaptado de LABABPOUR e LEE, 2006).

	Clorofila Total	Astaxantina
Células vegetativas verdes	15,96	0,06
Aplanosporos	5,14	0,19
Cistos vermelhos	0,03	36,56

Esta alga, no entanto, possui algumas características desfavoráveis quando comparada a outras microalgas cultivadas com êxito em escala comercial (como a *Dunaliella spp.*, *Spirulina spp.*) (CIFUENTES *et al.*, 2003). A maior preocupação é relacionada à sua lenta velocidade de crescimento, seu complexo ciclo de vida (JEON *et al.*, 2006; GARCÍA-MALEA *et al.*, 2006; CIFUENTES *et al.*, 2003) e ao pouco entendimento das condições ótimas para crescimento e produção de astaxantina (CIFUENTES *et al.*, 2003) restringindo o uso comercial desta alga (SUH *et al.*, 2006). Por isso, muitas pesquisas têm buscado melhorar a baixa velocidade de crescimento das células vegetativas móveis: 0,5 – 0,7div/dia (FAN *et al.*, 1994; GONG e CHEN, 1998; OROSA *et al.*, 2005), excepcionalmente 0,9 div/dia (HAGEN *et al.*, 1993).

O acúmulo de astaxantina pela microalga verde explica um fenômeno natural conhecido por “neve vermelha” ou “chuva de sangue” (SHOEFS *et al.*, 2001, CANTER-LUND e LUND, 1995). É uma característica comum a síntese de carotenóides secundários em microalgas quando submetidas a stress (SHOEFS *et al.*, 2001). Normalmente várias condições de stress são combinadas para aumentar a produção secundária de carotenóide (BOUSSIBA *et al.*, 2000). O acúmulo de astaxantina está relacionado a mudanças morfológicas e bioquímicas das células a qual é modificado em função das condições de cultura (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; GARCÍA-MALEA *et al.*, 2006). Sob condições ótimas de crescimento as células vegetativas verdes e flageladas do *H. pluvialis* persistem (GARCIA-MALEA *et al.*, 2006; KAMATH *et al.*, 2005), estão em contínua divisão celular (BOUSSIBA *et al.*, 2000) e possuem carotenóides normalmente encontrados no filo *Chlorophyta* e nos cloroplastos de plantas superiores, como betacaroteno, luteína, violaxantina,

neoxantina e zeaxantina (chamados coletivamente como carotenóides primários) sendo a luteína (75-80%) o carotenóide mais abundante nas células verdes de *H. pluvialis* (OROSA *et al.*, 2005, GRUNG *et al.*, 1992). Quando expostas a condições ambientais extremas, a microalga muda a morfologia, resultando na formação de cistos vermelhos imóveis (perda do flagelo), simultaneamente acumula grande quantidade de astaxantina (80% da fração de carotenóide) (GARCIA-MALEA *et al.*, 2006; KAMATH *et al.*, 2005; HARKER *et al.*, 1996, GRUNG *et al.*, 1992) e a cessa a divisão celular (BOUSSIBA *et al.*, 2000). Muitos fatores nutricionais e ambientais são potenciais indutores da formação de astaxantina nas células de *H. pluvialis* (HARKER *et al.*, 1996). Sarada *et al.* (2002) observaram, claramente, que o stress é um fator acumulativo no estado fisiológico da cultura. Segundo Kobayashi *et al.* (2001) presume-se que o stress oxidativo está envolvido na regulação da biossíntese de astaxantina devido ao seu poder antioxidante, protegendo a célula contra os danos oxidativos por agentes ambientais. Há evidências de que a astaxantina protege os cistos da luz solar e, particularmente, da luz ultravioleta (CANTER-LUND e LUND, 1995).

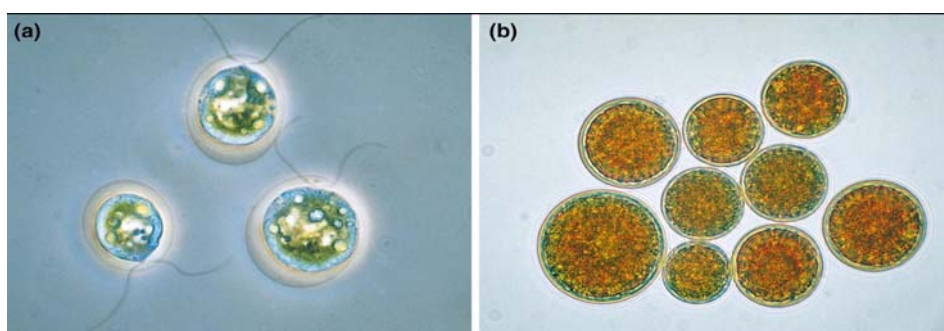


FIGURA 12: (a) Crescimento vegetativo das células de *H. pluvialis*; (b) células de *haematocistos*. (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

Alguns fatores buscando a melhora e/ou manutenção do crescimento vegetativo não permitiriam o acúmulo de astaxantina e algumas condições indutoras da produção de astaxantina tendem a restringir o crescimento da alga (CIFUENTES *et al.*, 2003). Este modelo de crescimento celular e acúmulo de carotenóide tem gerado duas estratégias de produção comercial de astaxantina por *H. pluvialis*: a primeira, em apenas um passo, usando meio apropriado (sub-ótimo) tanto para biomassa quanto produção de astaxantina, onde astaxantina é acumulada enquanto as células estão crescendo (Microgaia Inc., 2007) e outra, em dois passos consecutivos (Cyanotech Corporation 2007, Mera Pharmaceuticals, 2007,

BOUSSIBA *et al.*, 2000], onde o primeiro estágio consiste em crescimento da biomassa de *H. pluvialis* sob condições ótimas de pH, temperatura e nutrientes para favorecer o crescimento vegetativo, seguido por um segundo estágio no qual a carotenogênese é induzida através de um meio em condições de stress (GUERIN *et al.*, 2003; GARCIA-MALEA *et al.*, 2005) e ambos os processos são realizados sob condições fotoautotróficas (CIFUENTES *et al.*, 2003). Em larga escala o cultivo em duas etapas tem sido o mais utilizado (LORENZ e CYSEWSKI, 2000) sendo as duas etapas realizadas de modo descontínuo. A produtividade do processo de dois passos é diretamente proporcional à produtividade de biomassa na primeira etapa, na qual as células vegetativas são produzidas (GARCÍA-MALEA *et al.*, 2005).

Alternativamente, o metabolismo mixotrófico desta alga também tem sido estudado e documentado (GUERIN *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 1993; GONG e CHEN, 1997) e crescimento heterotrófico tem sido relatado em algumas cepas de *H. pluvialis* (KOBAYASHI *et al.*, 1993), no entanto, estas condições não têm sido aplicadas em cultivos em escala comercial (CIFUENTES *et al.*, 2003).

Vários fatores e/ou métodos promovendo a formação de astaxantina tem sido sugeridos, como: alta irradiação (SHOEFS *et al.* 2001; SUH *et al.*, 2006), deficiência de nitrogênio (ZHEKISHEVA *et al.*, 2002; SUH *et al.*, 2006), deficiência de fosfato (HARKER *et al.*, 1996), deficiência de magnésio (BRINDA *et al.*, 2004), adição de acetato (KOBAYASHI *et al.*, 1993, 2001, CORDERO *et al.*, 1996), elevados níveis de íon ferroso (KOBAYASHI *et al.*, 2001) elevada temperatura (BOUSSIBA *et al.*, 2000) e adição de sal (CORDERO *et al.*, 1996) entre outros.

2.5.2.1 Cepas comumente utilizadas

Dentre as cepas de *Haematococcus pluvialis* produtoras de astaxantina, observadas na literatura, incluem-se as descritas na tabela 5.

TABELA 5 - Cepas selvagens produtoras de astaxantina

Linhagens	Referências
NIES-144	KAERPINTONG <i>et al.</i> , 2006; KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1993; KATSUDA <i>et al.</i> , 2004.
UTEX 16	YUAN <i>et al.</i> , 1997; SUH <i>et al.</i> , 2006; KIM <i>et al.</i> , 2006; YUAN e CHEN 1998; JEON <i>et al.</i> , 2006, FABREGAS <i>et al.</i> , 2001.
CCAP 34 /7	CORDERO <i>et al.</i> , 1996; HARKER <i>et al.</i> , 1996; OROSA <i>et al.</i> , 2005
WZ26	MIAO <i>et al.</i> , 2006
CCAP 34/8	GARCIA-MALEA <i>et al.</i> 2006
K-0084	BOUSSIBA <i>et al.</i> , 2000
SAG 19-a	KAMATH <i>et al.</i> , 2005

2.5.2.2 Meios de Cultivo de *Haematococcus pluvialis*

Vários meios têm sido reportados para cultivo de *Haematococcus pluvialis* incluindo meio Bristol (CIFUENTES *et al.*, 2003), Bristol modificado N enriquecido (9mM NaNO₃) (SCHOEFS *et al.*, 2001), Z8 (RENSTROM *et al.*, 1981), A9 (LEE e PIRT, 1981 *apud* TRIPATHI *et al.*, 1998), KM1 (KOBAYASHI *et al.*, 1991 *apud* TRIPATHI *et al.*, 1998), OHM (FABREGAS *et al.*, 2001), F1 (FABREGAS *et al.*, 1998 *apud* KAEWPINTONG *et al.*, 2006) e meio Bold's basal (BBM) na forma original (OROSA *et al.*, 2005; SUH *et al.*, 2006; BRINDA *et al.*, 2004;) ou suplementado (KIM *et al.*, 2006; LABABPOUR e LEE, 2006), MCM (YUAN *et al.*, 1996).

TABELA 6 - Composição dos meios de cultura autotróficos, heterotróficos e mixotróficos (mg/L de meio).

Componentes	M1	Basal	F1	BG-11	Hong Kong	M6	BBM	Z8	KM1	MM1	MM2	OHM
CaCl ₂ . 2H ₂ O	184	25	9,78	36	73	3676	25	-	20	20	20	110
Acetato de Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1986	1986	1986	-
L-asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-	405	-	405	-
Extrato de levedura	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	-	-	-
FeCl ₃	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-
KNO ₃	500	10	410	-	300	-	-	-	-	-	-	410
NaNO ₃	-	-	-	1500	-	-	249	-	-	466	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	30	-	30	1500	-	-	-	-	-	30
NaH ₂ PO ₄	195	-	-	-	35,5	1778	-	-	-	-	-	-
H ₃ PO ₄	0.12	-	-	-	-	12,37	-	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	75	-	40	-	-	75	31	-	74	74	-
KH ₂ PO ₄	-	175	-	-	-	-	175	-	-	175	175	-
NaCl	-	2513	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-
KOH	-	30,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ SO ₄	-	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₆ H ₅ FeO ₇ . 5H ₂ O	-	-	2,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	20.9	4,976	-	-	8,3	417	5	-	10	10	10	-
Fe ³ citrato . H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,62
MgSO ₄ . 7H ₂ O	61,6	4	16,41	75	24,6	1231	75	24	-	-	-	246
ZnSO ₄	0,72	0,0088	-	-	0,014	71,89	-	-	-	-	-	-
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,62	1572	0,008	0,079	0,012	62,42	-	-	-	-	-	0,012
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,07	-	0,08	0,39	0,001	7,26	-	-	-	-	-	0,12
CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,05	-	0,0078	-	0,0005	4,67	-	-	-	-	-	0,011
H ₃ BO ₃	-	10.95	-	2,86	0,003	-	-	-	-	-	-	-
Cr ₂ O ₃	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	0,075
SeO ₂	-	-	0,036	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
EDTA Na.	18600	49,34	-	1	6,7	372	45	30	-	45	45	-
Na ₂ CO ₃	-	-	-	20	-	-	-	21	-	-	-	-
NH ₄ Fe(C ₆ H ₅ O ₇)	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
MnCl ₂ . 6 H ₂ O	-	1,445	0,66	1,81	-	-	-	-	200	-	-	0,98
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	-	-	-	0,222	-	-	-	-	-	-	-	-
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	-	0,389	-	0,049	-	-	-	-	-	-	-	-
MnSO ₄ . 7H ₂ O	0,72	-	-	-	0,001	84,51	-	-	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	-	15	-	-	-	-	-	168	-	-	-	-
Biotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 µg/L
Tiamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17 µg/L
Vitamina B ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15 µg/L
Elementos traço*	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

* Os elementos traço consistem em sais de cobalto, cobre, molibdênio, níquel, iodeto a 0.05µM; tungstênio, vanádio, cromo a 0.01 µM, zinco a 0.1 µM e manganês a 1,0 µM , segundo Renstrom *et al.*, (1981).

Fonte: Adaptado de KAEWPINTONG *et al.*, (2006), TRIPATHI *et al.*, (1999), DONG e ZHAO (2004) e FABREGAS *et al.*, (2001).

Kaewpintong *et al.* (2006) observou que o crescimento do *H. pluvialis* é bastante influenciado pelo tipo de meio de cultura. Os meios de cultivo autotróficos (BBM, Z8 e A9), heterotrófico (KM1) e mixotrófico (BBM com acetato de sódio, MM1; BBM com acetato de sódio e L-asparagina, MM2; KM1 sem extrato de levedura, KM2) foram testados por Tripathi *et al.* (1998) para formação de biomassa e produção de astaxantina. Enquanto Kaewpintong *et al.* (2006), monitorou os meios de cultivo autotróficos: M1, M6, F1, Hong Kong, Basal, BG-11 e Basal:BG-11 (1:1), com o objetivo de obter o meio mais apropriado para produção de biomassa.

O meio F1 foi selecionado por Kaewpintong *et al.* (2006) como o mais adequado para o crescimento celular de *H. pluvialis*, observando-se densidade celular máxima de $5,44 \times 10^4$ células/ml e taxa de crescimento $0,21 d^{-1}$. As menores densidades celulares e velocidades de crescimento foram detectadas nos meios M1 e M6. Os meios Hong Kong, Basal:BG-11 e BG-11 apresentaram características similares de crescimento. Nos meios M1, F1, e Hong Kong embora as células tenham começado a perder seus flagelos e converter-se a cistos, não houve acúmulo aparente de astaxantina nestes meios até após 13 dias de cultivo.

Entre os meios autotróficos analisados por Tripathi *et al.* (1998), o meio BBM foi o melhor para crescimento celular (obtendo o máximo crescimento celular de $1,5 \times 10^5$ células/ml, no décimo dia), enquanto houve crescimento lento nos meios Z8 e A9. No entanto, contagens de células de $3,0 \times 10^5$, $3,25 \times 10^5$ e $4,2 \times 10^5$ células/ml foram obtidas nos meios heterotróficos KM1, MM2 e KM2, respectivamente. Segundo Tripathi *et al.*, (1998) a maior contagem celular em MM2 e KM2 que no KM1 poderia ter sido devido à adição de vitaminas do complexo B (B_1 , B_6 e B_{12} 1,33:0,1:1,0). As culturas em meio KM1 acumularam mais astaxantina que os outros meios, porém quando adicionado elementos traço e vitaminas do complexo B aos meios KM1, MM1, MM2 e KM2 observou-se maior taxa de acúmulo de astaxantina nos meios MM1, MM2, e KM2 que observado em meio KM1. Os meios Z8, foram considerados apropriados para a manutenção das culturas em meio inclinado, o MM1 para a manutenção do crescimento vegetativo celular e o KM2 com adição de elementos traço e vitaminas B foi o melhor para produção de astaxantina com uma produção de 2.2% (p/p) (TRIPATHI *et al.*, 1998).

Segundo Kaewpintong *et al.* (2006) tem-se relatado que a vitamina B possui significativo efeito sob o crescimento do *H. pluvialis*, no entanto seu efeito sob a cultura ainda não está bem claro. Kaewpintong *et al.* (2006) observou melhora

significante sob o crescimento celular no meio F1 após a adição de vitaminas do complexo B (B1, B6 e B12, na proporção 1,33:0.1:1) na concentração de 12 µg/L com um aumento de aproximadamente 55% sob a densidade celular máxima 28.6% sob a velocidade de crescimento específica em relação ao meio sem a adição de vitamina B.

Segundo Harker *et al.* (1996) a alga *H. pluvialis*, quando cultivada em meio BBM, pode manter o estado vegetativo por um considerável período de tempo e apenas quando as culturas envelhecem e nutrientes como o nitrogênio são esgotados, é que o crescimento torna-se limitado e as células formam cistos e acumulam astaxantina.

Fontes de Carbono

Uma vez que as microalgas são microrganismos fotossintéticos, são capazes de absorver e utilizar CO₂ como a principal fonte de carbono no processo de crescimento, podendo tolerar até 12% de CO₂ a temperatura de 35°C (DONG e ZHAO, 2004). Porém, ao contrário de outras algas, o *H. pluvialis* pode utilizar também algumas fontes de carbono orgânicas em pequena quantidade (DONG e ZHAO, 2004). Como é o caso do acetato que tem sido frequentemente usado e/ou testado como fonte orgânica complementar em alguns trabalhos (KOBAYASHI *et al.*, 2001; OROSA *et al.*, 2005; HARKER *et al.*, 1996; CIFUENTES *et al.*, 2003, GONG e CHEN, 1998).

O acetato parece ser importante fonte de carbono, melhorando crescimento e carotenogênese, uma vez que, promove o encistamento celular e melhora a formação de astaxantina (OROSA *et al.*, 2005, HARKER *et al.*, 1996; BOROWITZKA *et al.*, 1991; KOBAYASHI *et al.*, 1993). Jeon *et al.* (2006) observou que um nível próprio de acetato pode melhorar a produtividade volumétrica de biomassa de *H. pluvialis* quando a luz é simultaneamente suprida. Assim, o acetato poderia promover o crescimento celular, mas a concentração de acetato seria controlada num nível apropriado para evitar inibição pelo mesmo. Quando acetato foi suplementado mais que 50 mM, a cor das células desapareceu e estas depois morreram. No entanto, aproximadamente 30 mM de acetato não causou branqueamento celular e ainda ajudou as células a manterem o estado vegetativo sob baixa intensidade de luz.

Tripathi *et al.* (1998) observaram que o crescimento do *H. pluvialis* foi mais rápido em meio heterotrófico (KM1) e mixotrófico (MM2 e KM2) que no meio autotrófico e, ao contrário do meio autotrófico, que apresentou prolongada fase vegetativa, as células no meio KM1 mostraram encistamento logo após 5 dias, subseqüentemente atingindo a fase estacionária de crescimento. Os resultados de Tripathi *et al.* (1998) demonstraram que a adição de acetato de sódio, L-asparagina, elementos traço e vitamina B nos meios autotróficos e heterotróficos poderiam aumentar a biomassa e a produção total de astaxantina por *H. pluvialis* em menor período de incubação reduzindo consideravelmente o custo do processo para a produção comercial de astaxantina.

Sob condições mixotróficas com acetato de sódio como fonte de carbono tem-se reportado velocidade específica de crescimento de $0.25d^{-1}$ (TJAHJONO *et al.*, 1994) a $0.58d^{-1}$ (KOBAYASHI *et al.*, 1993).

Orosa *et al.* (2005), analisaram diferentes concentrações de acetato e malonato (0%, 0.25%, 0.5%, 1% e 2% p/v) com o objetivo de encontrar a concentração ótima para produção de biomassa, observando que a velocidade de crescimento do *H. pluvialis* foi melhorada pela adição de 0,25% (p/v) de acetato de sódio com relação às culturas controle fotoautotróficas, mas a concentração de acetato maior que 0.5% causou inibição do crescimento. O mesmo efeito foi observado com as culturas com malonato melhorando o crescimento do *H. pluvialis* apenas na concentração de 0.25% (p/v) com leve inibição no crescimento sob concentração maior que 0.25% (p/v). No entanto, foi observado um aumento no tamanho celular sob alta concentração de malonato.

Dong e Zhao (2004) observaram que o *H. pluvialis* possui uma capacidade limitada de metabolizar glicose, apresentando níveis baixos de produção de biomassa e baixa taxa de conversão de glicose, possivelmente devido à perda ou baixa atividade enzimática envolvida no metabolismo da glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e ciclo do ácido tricarboxílico dentro das células da alga.

Fontes de Nitrogênio

Segundo Harker *et al.* (1996) variando a concentração de nitrato do meio a alga poderia ser manipulada com relação tanto ao crescimento quanto à formação de astaxantina. O principal problema da deficiência de nitrogênio é a redução da velocidade de crescimento (OROSA *et al.*, 2005).

Sarada *et al.* (2002) analisaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , NH_4NO_3 e NaNO_3) no crescimento vegetativo do *H. pluvialis*, observando máxima contagem celular com nitrato de potássio ($6,2 \times 10^5$ células/ml) e menor no nitrato de amônio ($1,65 \times 10^5$ células/ml). No entanto, as células crescendo no meio com nitrato de potássio foram menores quando comparadas às que cresceram nas outras fontes de nitrogênio e o conteúdo de clorofila foi maior na cultura com nitrato de sódio.

Cifuentes *et al.* (2003) testou três fontes de nitrogênio (NaNO_3 , NH_4Cl e uréia) sob condições autotróficas. A melhor fonte de nitrogênio para crescimento observada por Cifuentes *et al.*, (2003) foi claramente cloreto de amônio, não apenas produzindo uma maior biomassa quando comparado às outras fontes de nitrogênio, mas também um estado saudável das células móveis na cultura, evidenciado por uma coloração verde, um tamanho celular grande e fina matriz extracelular. Quando cultivado em nitrato de sódio os parâmetros de crescimento (densidade celular e peso seco) foram menores que no cloreto de amônio, mas significativamente maiores que com uréia, onde o crescimento foi deficiente. Em todas as fontes de nitrogênio testadas o número relativo de células vegetativas móveis durante o crescimento foi alto (>85%) e maior em cloreto de amônio (95%) que em outras fontes.

Orosa *et al.* (2005), testou diferentes concentrações de nitrato: 0, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75 e 1g/L NaNO_3 para determinar as condições ótimas para a produção de biomassa. Os resultados mostraram que as culturas de *H. pluvialis* com diferentes concentrações de NaNO_3 não mostraram diferença no crescimento até o 11º dia, quando as culturas com 0,15g/L NaNO_3 tiveram diminuição na velocidade de crescimento e as culturas sem nitrogênio não cresceram.

Condições de stress nutricional visando a produção de astaxantina

Segundo Fabregas *et al.* (2001) uma combinação de fatores poderia ser aplicada na fase de encistamento com o objetivo de reduzir o período de indução da formação de astaxantina.

- Deficiência de Nitrogênio

Alguns pesquisadores (OROSA *et al.*, 2005; HAGEN *et al.*, 1993) têm relatado que a exposição a meios deficientes em nitrogênio tem sido uma condição eficiente para aumento do acúmulo de astaxantina no *H. pluvialis*.

Sarada *et al.* (2002) testaram a influência da fonte de nitrogênio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , NH_4NO_3 e NaNO_3) na produção de astaxantina e observaram que o conteúdo de carotenóide total e produtividade de astaxantina foi maior nas culturas que cresceram em meio com nitrato de sódio e menor em nitrato de amônio e potássio. Observou-se um aumento (3x) significativa na produtividade de astaxantina em culturas com nitrato de cálcio comparado com outros meios com nitrato, sugerindo a possível influência das condições de cultura na produção de astaxantina por stress induzido.

Orosa *et al.* (2005), testou diferentes concentrações de NaNO_3 (0, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75 e 1g/L) para determinar as condições ótimas para a produção de astaxantina e relataram que a concentração ótima de nitrato para obter astaxantina e evitar a inibição da divisão celular foi 0.15g/L NaNO_3 . Orosa *et al.* (2005) relatou ainda que em presença de nitrato no meio a relação entre a quantidade de clorofila e de carotenóide foi maior que 4, no entanto esta relação decaiu sob deficiência de nitrogênio. Em meio sem nitrogênio este decréscimo foi observado logo no primeiro dia e nas culturas com 0.15 e 0.25 g/L NaNO_3 o decréscimo ocorreu após o 9º e 11º dia, respectivamente.

Segundo Orosa *et al.* (2005) a deficiência de nitrogênio é uma forma efetiva de melhorar o acúmulo de astaxantina em *Haematococcus*, mas a densidade celular é baixa devido à inibição da divisão celular. Uma solução para este problema seria o uso de baixa concentração de nitrato, assim, em poucos dias o nitrato presente no meio seria exausto, mas permitindo obter uma maior densidade celular (OROSA *et al.*, 2005). Segundo Orosa *et al.* (2005) a síntese de astaxantina requer nitrogênio refletindo a necessidade de síntese contínua de proteína com o objetivo de suportar o acúmulo massivo de pigmento.

- Adição de Acetato de Sódio

Cifuentes *et al.* (2003) testou o crescimento mixotrófico com adição de diferentes concentrações de acetato de sódio (4, 8 e 12 mM) ao meio de cultivo e observou que a adição de acetato causou significativo aumento na quantidade

relativa de cistos, de 0.42% (cultura controle) para 8.7% (cultura com 12nM acetato) a 35 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Um menor aumento de cistos foi obtido a 85 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, de 1,9% (cultura controle) para 3.0% (cultura com 12mM acetato).

Orosa *et al.* (2005), estudou a formação de carotenóide em *H. pluvialis* sobre diferentes concentrações de acetato (0%, 0.25%, 0.5%, 1% e 2% p/v) e também usando outra fonte de carbono (malonato), nas mesmas concentrações, com o objetivo de encontrar a concentração ótima para o máximo acúmulo de astaxantina. Com a suplementação de acetato nas culturas, o *H. pluvialis* foi induzido a formar cistos celulares, o qual foi associado com um aumento concomitante no conteúdo de astaxantina na célula. O acetato também afetou a quantidade de clorofila presente. O máximo conteúdo de clorofila por célula foi detectado nas culturas sem acetato no meio. O acetato melhorou o acúmulo de carotenóides totais celular com valores 3 vezes maior que em culturas autotróficas. No entanto, o maior acúmulo ocorreu nas culturas com 2% de acetato o qual apresentou inibição do crescimento acompanhado por encistamento celular. As análises em HPLC mostraram que acetato induziu principalmente o acúmulo de ésteres de astaxantina (quase 90% dos carotenóides totais) e redução dos carotenóides primários, sendo que a quantidade de luteína por célula foi mais que 5 vezes menor nas culturas com 2% de acetato que nas culturas controle. Logo, o efeito do acetato foi dependente da concentração, maiores concentrações inibiram o crescimento, mas aumentaram consideravelmente o conteúdo de astaxantina por célula. O mesmo efeito foi observado com as culturas com malonato, onde as células acumularam mais astaxantina em menos tempo que nas culturas sem este composto ou ainda nas culturas com acetato. A quantidade de astaxantina por célula já na menor concentração de malonato testada foi pelo menos duas vezes maior que nas culturas controle.

- Adição de ferro

Kobayashi *et al.* (1993) desenvolveram um meio rico em Fe^{2+} , com acetato como fonte de carbono para melhorar a produção de astaxantina. Neste meio de crescimento heterotrófico, uma mudança rápida na morfologia, formando-se cistos, foi observada após 6 dias de cultivo (KOBAYASHI *et al.*, 1993) o que levaria várias semanas sob condições autotróficas (BOROWITZKA *et al.*, 1991). Além da formação de cisto, a produção de astaxantina teve melhor resultado pela adição de acetato e Fe^{2+} que pela adição de acetato sozinho. A melhora na carotenogênese pela Fe^{2+} foi

inibida pela adição de iodeto de potássio, um consumidor de radicais hidroxila, sugerindo que o radical hidroxila formado pela reação Fenton ferro-catalisada pode ser requerida para melhorar a biossíntese de carotenóide.

Sabe-se que a forma ferrosa (Fe^{2+}) é responsável pela formação de radicais livres (especialmente radical hidroxila, $\text{HO}\cdot$) pela via química de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{HO}\cdot + \text{Fe}^{3+}$) acreditando-se que esta seja a razão deste íon estimular a produção de astaxantina por ação antioxidante (HARKER *et al.*, 1996). Logo, Kobayashi *et al.* (1993) observou que Fe^{2+} pode trabalhar como um gerador de $\text{HO}\cdot$ através da reação de Fenton ferro-catalisada nos cistos celulares para melhorar a carotenogênese.

- Altas Concentrações de Sal

Tem-se relatado que o *Haematococcus pluvialis* possui pouca tolerância a altas concentrações salinas, logo sob determinadas concentrações este fator isoladamente ou associado a outras condições de stress tem se mostrado eficiente na indução da produção de astaxantina (HARKER *et al.*, 1996; SARADA *et al.*, 2002; CIFUENTES *et al.*, 2003; CORDERO *et al.*, 1996).

Sarada *et al.* (2002) investigaram o efeito de diferentes concentrações de NaCl (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0% p/v) em cultivo mixotrófico, sob o estado fisiológico da cultura e produção de astaxantina. A adição de NaCl junto com acetato de sódio mostrou diferenças marcantes no conteúdo de astaxantina, estimulando significativamente sua produção, no entanto altas concentrações de NaCl (>1,0% v/v) foram letais e a idade da cultura foi crucial na produção de astaxantina induzida por stress. Culturas de 4 a 8 dias foram sensíveis a adição de NaCl enquanto culturas mais velhas (12 – 16 dias) foram resistentes e acumularam 8.3-10.69 mg de astaxantina/L comparado a 0.95-8.1mg/L em culturas de 4-8 dias, respectivamente. A produtividade de astaxantina foi a mesma a 0,25 e 0,5% de NaCl em 9 dias de cultivo.

Cifuentes *et al.* (2003), após stress das células por adição de sal observaram significativa mortalidade celular diretamente proporcional ao aumento da concentração de sal, no entanto, observou-se um aumento no conteúdo total de carotenóide e diminuição concomitante do conteúdo de clorofila, com o aumento da salinidade. Apesar da alta mortalidade, um aumento na coloração vermelha nas

células sobreviventes em maior salinidade foi evidenciado e o aumento da carotenogênese foi maior quando associada com alto PFD ($85 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Cordero *et al.* (1996) induziu a produo de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* em diferentes concentraes de acetato (0,025, 0,05 e 0,1g/L) e NaCl (0,1, 0,2 e 0,4%). As melhores condies de cultivo para produo de astaxantina foram 0,2% de NaCl, 0,025g/L de acetato de sódio e 0,05g/L de acetato de sódio, com produo de 3,0, 1,83 e 1,78% de astaxantina por peso seco total, respectivamente. A maior produo de astaxantina no bioreator foi 18,6mg/L com 0,2% de NaCl. Os menores valores foram obtidos em 0,4% NaCl + 0,1g/L de acetato de sódio, com produo de astaxantina de 0,47 e 0,50% por peso seco total e peso seco orgânico, respectivamente. Tem sido mencionado que altas salinidades como 1% podem ser letais ao *H. pluvialis* (BOROWITZKA *et al.*, 1991). Boussiba e Vonshak (1991) reportaram que expondo *H. pluvialis* a stress por adio de sal a 0,8% de NaCl, causou completa inibio do crescimento, mas induziu um acúmulo massivo de astaxantina.

- Adio de Perido de Hidrognio (H_2O_2)

Harker *et al.* (1996) observou que a adio de H_2O_2 estimulou a síntese de astaxantina por célula, porém quando exposta a altos níveis ou por um período maior que 9-10 dias inibiu intensamente o crescimento da alga. Estes resultados levam a hipótese de que stress oxidativo pode ser um mecanismo responsável pela formao de astaxantina em *H. pluvialis*, apesar dos níveis de astaxantina serem menores comparados aos obtidos pela exposio a baixos níveis de nutrientes chave (HARKER *et al.*, 1996).

Segundo Kobayashi *et al.* (1993) espécies ativas de oxigênio são capazes de ativar a produo de astaxantina por estarem envolvidas com a modificao estrutural de enzimas carotenognicas como a glutathiona transferase e glutathiona redutase, ou por participar diretamente em reações de enzimas carotenognicas como agente oxidante ou acceptor de H. Além disso, o stress oxidativo nas células de *H. pluvialis* pode ser utilizado como oxidante para oxigenao e hidroxilao do betacaroteno ou como acceptor de H para a regenerao de NAD(P). Posteriormente, a função antioxidante da astaxantina foi testada, sugerindo que o acúmulo de astaxantina pode proteger a célula contra danos por stress oxidativo ambiental, estimulando sua produo.

2.5.2.3 Condições de Cultivo do *Haematococcus pluvialis*

Conforme tem se encontrado na literatura, as condições ótimas requeridas para produção das células verdes são temperatura moderada (20-28°C), baixo nível de radiação (30-140 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$), alta concentração de nitrato e fosfato (20 e 1mM, respectivamente), pH entre 6.0-7.0 e adição de acetato (0.25% p/v) como fonte de energia adicional (BOUSSIBA *et al.*, 2000; OROSA *et al.*, 2005; BOROWITZKA *et al.*, 1991; GARCÍA-MALEA *et al.*, 2006). A produção de células verdes limita o processo de produção de astaxantina uma vez que este pigmento é acumulado no interior dos cistos (GARCÍA-MALEA *et al.*, 2005) tornando-se importante a otimização da fase de crescimento vegetativo do *H. pluvialis* para alcançar-se bom rendimento de astaxantina.

Quanto ao fotobioreator

Tanto no estado de crescimento vegetativo, quanto de encistamento é possível usar-se com sucesso inúmeros modelos de bioreatores (tanque agitado, coluna de bolhas e bioreator airlift, bioreator tubular, sistema de bolsas, etc.) (BOUSSIBA *et al.*, 2000; KIN *et al.*, 2006), mas basicamente dividem-se em sistemas aberto ou fechado. As vantagens e desvantagens de alguns fotobioreatores são relatados por algumas empresas e autores. Na Suíça, fotobioreatores completamente fechados (com luz artificial) estão sendo usados para a produção comercial de astaxantina; no Havaí, uma combinação de fotobioreatores fechados e tanques de cultura abertos estão sendo usados com êxito para produção, em larga escala, de *H. pluvialis* (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

No cultivo de células fotossintéticas, o design dos fotobioreatores para uma iluminação efetiva é essencial para reduzir o custo de produção. Enquanto a luz solar é a fonte de luz mais barata disponível, sua intensidade não é constante e varia durante o dia e a região, e a intensidade de energia é limitada (KATSUDA *et al.*, 2004). Para alcançar condições de cultivo controladas e alta produtividade, um mecanismo de iluminação elétrica com alta eficiência e que emite luz com efeito fisiológico favorável nas células fotossintéticas devem ser usadas em sistemas de fotobioreatores (KATSUDA *et al.*, 2004).

Devido à baixa velocidade de crescimento, suscetibilidade a contaminação e preferência por baixa temperatura de crescimento (HARKER *et al.*, 1996), o cultivo

aberto (“outdoor”) tem sido geralmente mal sucedido (KAEWPINTONG *et al.*, 2006), no entanto, segundo Boussiba *et al.* (2000) é o sistema mais econômico e mais utilizado por grandes produtoras de astaxantina por *H. pluvialis*.

Segundo Garcia-Malea *et al.* (2006) o uso de acetato de sódio aumenta os riscos de contaminação e normalmente obriga que a produção seja realizada em modo descontínuo, levando a baixos rendimentos. Com o objetivo de aumentar o rendimento da produção de astaxantina, a produtividade de células verdes no primeiro passo de produção deveria ser realizada continuamente em fotobioreatores abertos (*outdoor*) sob condições autotróficas. Garcia-Malea *et al.*, 2006 realizaram cultivo sob saturação de nitrato e os resultados mostraram que a produção contínua autotrófica de células vegetativas é possível. Observaram que a produção de células verdes de *H. pluvialis* sob condições autotróficas *outdoor* é possível com velocidade de crescimento e produtividade substancialmente maiores que as observadas em condições heterotróficas e mixotróficas. A ausência de fontes orgânicas de carbono permitiram com que a cultura opere por um longo período de tempo sem contaminação, ainda que a esterilização do meio de cultura seja realizada apenas por filtração como é o caso dos fotobioreatores abertos. Além disso, a alta irradiação na superfície do reator ao meio-dia não danificou drasticamente as células. A alta produtividade de biomassa e não indução de produção de astaxantina na cultura contínua realizada por Garcia-Malea *et al.* (2006) foi devida à manutenção de suprimento de nitrato suficiente para evitar a limitação de nitrogênio durante o experimento.



FIGURA 13: Produção “outdoor” de microalgas em escala comercial da Cyanotech Corporation, localizada em Kona, Hawaii.

Kaewpintong *et al.* (2006) estudou o efeito do cultivo de células vegetativas de *H. pluvialis* em bioreator airlift em condições fotoautotróficas sob a velocidade específica de crescimento e a densidade celular. Comparou-se o desempenho do bioreator airlift e o bioreator de bolhas em escala laboratorial, utilizando o meio F1 (tabela 7). Segundo Kaewpintong *et al.* (2006), bioreatores pneumáticos são uma alternativa eficiente para o cultivo de *H. pluvialis*, uma vez que esta microalga é muito sensível ao cisalhamento. Em sistemas pneumáticos como colunas de bolha ou bioreatores airlift, a mistura e a transferência de massa são induzidas apenas por aeração, o qual gera baixo nível de cisalhamento e menor intensidade de energia que tanques agitados. A comparação entre a performance da coluna de bolhas e do bioreator airlift sob as mesmas condições de operação mostrou que a densidade celular máxima e a velocidade de crescimento específico em bioreator airlift (79.5×10^4 células/ml e $0,45d^{-1}$) foi maior que em coluna de bolhas (42×10^4 células/ml e $0,36d^{-1}$). Além disso, o modelo airlift proporcionou melhor movimentação dentro do reator entre as células na zona interna (escura) e externa (clara) melhorando a exposição celular a luz o que não pode ser obtido na coluna de bolhas. Este trabalho mostrou que o sistema airlift em escala laboratorial é apropriado para cultivo de *H. pluvialis* com bom rendimento tanto em sistema em batelada quanto semicontínuo, sugerindo a investigação deste modelo em escala industrial seria atrativa.

Segundo Kaewpintong *et al.* (2006) o sistema de cultivo fechado, oferece melhor controle do meio de cultura, proteção contra contaminação ambiental e obtenção de alta densidade celular. Muitos estudos têm sido conduzidos para investigar o cultivo de *H. pluvialis* em frascos sob ambiente controlado. No entanto, na prática, para a produção em larga escala, o cultivo de *H. pluvialis* deve ser realizado em um bioreator de grande capacidade (KAEWPINTONG *et al.*, 2006).

A empresa Mera Pharmaceuticals (<http://www.aquasearch.com/>) produtora comercial de microalgas com experiência em cerca de 40 espécies de microalgas em escala pequena e grande, incluindo *H. pluvialis*, tem cultivado com sucesso muitas espécies utilizando fotobioreatores fechados (PBRs) em escala comercial maiores que 10.000 litros. Segundo Olaizola (2003) as condições de cultura em fotobioreatores fechados com capacidade de mais de 2000L são estabelecidas, controlados por computadores e escalonados para o fotobioreator PBRs em escala comercial (capacidade para 25.000L ocupando uma área de $100m^2$) segundo o módulo de crescimento Mera (MGM - Mera Growth Module). O MGM utiliza controles

de alto nível computadorizados, para monitorar, manter e ajustar o ambiente para todas as condições críticas, tais como a temperatura, o pH e níveis nutrientes. Este nível do controle permite a manutenção das circunstâncias que promovem a taxa de crescimento mais desejável.

Em escala industrial a utilização da luz solar é, do ponto de vista econômico, essencial para o crescimento fotoautotrófico da alga (SUH *et al.*, 2006). Para simplificar o processo convencional de produção em dois estágios Suh *et al.* (2006) introduziram um fotobioreator de duas regiões para a produção de astaxantina em *H. pluvialis*. No fotobioreator de 1L cilíndrico com duas regiões (dois tubos cilíndricos concêntricos), o crescimento vegetativo foi acompanhado na região interna enquanto simultaneamente a produção de astaxantina foi realizada na região externa. A excessiva irradiação de luz ($770 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) na superfície externa do bioreator melhora o acúmulo de astaxantina nas células. Enquanto penetrando a região externa, o suprimento de luz foi diminuído para $40 \pm 3 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ por sombreamento pelas próprias células. A iluminação atenuada foi usada para crescimento das células vegetativas na região interna. Segundo Suh *et al.* (2006), o uso de fotobioreator com duas regiões minimiza as perdas de energia, reduz o custo com equipamento e tempo de cultivo. Os resultados indicaram que é praticável usar este método para produção de astaxantina com simultâneo crescimento vegetativo, podendo ser uma boa alternativa de estratégia de redução do custo de produção e otimização do processo em substituir a produção de dois estágios. Os resultados obtidos indicaram que o fotobioreator com duas regiões é uma boa alternativa para produção comercial de astaxantina por *H. pluvialis* com ambiente controlado.



FIGURA 14: Fotobioreator fechado com estruturas tubulares cilíndricas e transparentes (Fishace Ecological Engineering, 2007).

Quanto ao pH do meio

O pH para cultivo de *H. pluvialis* tem sido em torno de, pH 6.5 ± 0.5 (SUH *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; CIFUENTES *et al.*, 2003; HARKER *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 1993; OROSA *et al.*, 2005).

A influência do pH no crescimento vegetativo do *H. pluvialis* foi determinada por Sarada *et al.*, 2002 em meio basal com pH ajustado em 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0, a temperatura e intensidade de luz constantes e observaram maior contagem celular em pH 7.0, menor contagem celular em pH 9.0, não havendo crescimento em pH 5.0.

Quanto à iluminação

A produção de células vegetativas verdes do *H. pluvialis* não tolera alta irradiação e, logo, deve ser cultivada em condições de baixa intensidade de luz (BOUSSIBA *et al.*, 2000), no entanto este regime de pouca luz resulta em baixa velocidade de crescimento requerendo a adição de fontes orgânicas de carbono para melhorar ao crescimento (GARCIA-MALEA *et al.*, 2006).

Segundo Boussiba *et al.* (2000) a intensidade de luz ótima para a fase de crescimento celular está na faixa de $60\text{-}110 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Schoefs *et al.* (2001) cultivou *H. pluvialis* em bioreator airlift com fluxo de f\u00f3tons na superf\u00edcie do bioreator de aproximadamente $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de cultivo constante em $20 \pm 1^\circ\text{C}$, mantendo a cultura em alta e constante taxa de divis\u00e3o celular. Por outro lado, Kaewpintong *et al.* (2006) relataram que a \u00f3tima intensidade de luz para crescimento de *H. pluvialis* foi de $20 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Kaewpintong *et al.* (2006) testaram diferentes intensidades de luz na superf\u00edcie de um bioreator airlift e observaram aumento da densidade celular e da velocidade espec\u00edfica de crescimento com o aumento da intensidade de luz at\u00e9 $20 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ enquanto quando a intensidade da luz aumentou para $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ n\u00e3o foi observado crescimento celular. Sob intensidade de luz menor que $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ quase todas as c\u00e9lulas estavam na forma vegetativa e em intensidade acima de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ observou-se aus\u00eancia de divis\u00e3o celular.

Katsuda *et al.* (2004) estudou os efeitos do comprimento de onda no crescimento celular do *Haematococcus pluvialis* sobre ilumina\u00e7\u00e3o com LEDs emitindo luz vermelha ($\lambda_{\text{max}}=625\text{nm}$), verde ($\lambda_{\text{max}}=525\text{nm}$), azul ($\lambda_{\text{max}}=470\text{nm}$), azul-violeta ($\lambda_{\text{max}}=410\text{nm}$) e violeta ($\lambda_{\text{max}}=380\text{nm}$) e lâmpada fluorescente e observaram

que LEDs vermelhos em relativa baixa intensidade, são favoráveis ao crescimento celular. Comparando diferentes intensidades de luz (2.8, 8.0 e 12 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) utilizando LEDs, observaram ainda que para cada fonte de luz a velocidade de crescimento na fase logar\u00edtmica foi quase independente da intensidade de luz, mostrando que a intensidade de luz foi acima do n\u00edvel de satura\u00e7\u00e3o. Sob ilumina\u00e7\u00e3o com LED vermelha ou a fluorescente a 2.8 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a concentra\u00e7\u00e3o celular atingiu um patamar mais cedo que a 8.0 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ devido \u00e0 atenua\u00e7\u00e3o da luz pelas c\u00e9lulas. A 12.0 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ um pequeno atraso no crescimento celular foi observado, atribu\u00edda a indu\u00e7\u00e3o da mudan\u00e7a da morfologia pela luz de baixo comprimento de onda e alta intensidade, causando tamb\u00e9m supress\u00e3o do crescimento celular (KATSUDA *et al.*, 2004).

Condi\u00e7\u00f5es de stress ambiental visando a produ\u00e7\u00e3o de astaxantina

- Alta intensidade de luz

Submeter a alga, *H. pluvialis*, a altas densidades de fluxo de f\u00f3tons \u00e9 o fator isolado mais importante em termos de indu\u00e7\u00e3o da carotenog\u00e9nese (HARKER *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 1993; CIFUENTES *et al.*, 2003; BOUSSIBA *et al.*, 2000). Segundo Kim *et al.*, (2006) uma ilumina\u00e7\u00e3o apropriada com uma adequada intensidade \u00e9 requerida para a obten\u00e7\u00e3o de altos n\u00edveis de astaxantina. Segundo Jeon *et al.* (2005) a intensidade da luz e a concentra\u00e7\u00e3o de acetato foram selecionadas como os maiores fatores afetando a velocidade de crescimento da alga e Cifuentes *et al.*, (2003) observou uma indu\u00e7\u00e3o da carotenog\u00e9nese muito maior nas culturas induzidas por alto PFD (150 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (33%) que sob limita\u00e7\u00e3o de nitrog\u00e9nio (12.8-18.5% em nitrato de am\u00f4nio sob 85 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente). Adicionalmente, Kobayashi *et al.* (1993) reportaram que a ilumina\u00e7\u00e3o continua \u00e9 mais favor\u00e1vel \u00e0 forma\u00e7\u00e3o de astaxantina que ciclo de ilumina\u00e7\u00e3o claro/escuro (foto-per\u00edodo).

Kaewpintong *et al.* (2006) testou diferentes intensidades de luz na superf\u00edcie de um bioreator airlift e observou que sob intensidade acima de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ houve mudan\u00e7a na morfologia e ac\u00famulo de astaxantina enfatizando o fato de que o ac\u00famulo de astaxantina em *H. pluvialis* poderia ser induzido por alta intensidade de luz. Boussiba e Vonshak (1991) relataram o ac\u00úmulo de astaxantina somente sob

intensidade acima de $90\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Fabregas *et al.* (2001) reportaram indu\u00e7\u00e3o da forma\u00e7\u00e3o de astaxantina em *H. pluvialis* sob $240\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Segundo o estudo feito por Katsuda *et al.* (2004) citado anteriormente (pg. 68 - 69) sobre ilumina\u00e7\u00e3o com LEDs, al\u00e9m do efeito sob o crescimento celular, LEDs emitindo luz de baixo comprimento de onda (380-470nm) induziram o ac\u00famulo de astaxantina de 5-6% por c\u00e9lula seca, por\u00e9m observou-se supress\u00e3o do crescimento celular ap\u00f3s 4-5 dias de cultivos. Comparando diferentes intensidades de luz de 2,8, 8,0 e $12,0\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, Katsuda *et al.* (2004) observaram ainda sob $12,0\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ um pequeno atraso no crescimento celular foi observado, enquanto houve maior produ\u00e7\u00e3o de astaxantina, atribu\u00edda a indu\u00e7\u00e3o da mudan\u00e7a da morfologia pela luz de baixo comprimento de onda e alta intensidade, causando tamb\u00e9m supress\u00e3o do crescimento celular (KATSUDA *et al.*, 2004).

Assim Katsuda *et al.* (2004) propuseram uma nova estrat\u00e9gia de cultivo de *Haematococcus pluvialis* sobre ilumina\u00e7\u00e3o com LEDs vermelhos a relativamente baixa intensidade de luz induzindo a produ\u00e7\u00e3o de biomassa (e com substitui\u00e7\u00e3o do meio para evitar indu\u00e7\u00e3o da mudan\u00e7a da morfologia), sem induzir um alto n\u00edvel de ac\u00famulo de astaxantina, mas favorecendo o crescimento celular, e ap\u00f3s a concentra\u00e7\u00e3o celular atingir um valor determinado, mudar para ilumina\u00e7\u00e3o com LEDs azuis em alta intensidade de luz (acima de $10\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para induzir alto n\u00edvel de ac\u00úmulo de astaxantina.

Segundo Fabregas *et al.* (2001) o uso de ilumina\u00e7\u00e3o cont\u00ednua em vez de ciclos de ilumina\u00e7\u00e3o escuro/claro pode ser uma fonte de stress adicional e poderia ser usada para acelerar o processo de ac\u00úmulo de astaxantina, uma vez que a quantidade de luz tem sido demonstrada ser mais importante que a intensidade para a forma\u00e7\u00e3o de astaxantina. Kim *et al.* (2006) comparam os efeitos da ilumina\u00e7\u00e3o em "flashes" na produ\u00e7\u00e3o de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*, com o m\u00e9todo convencional de ilumina\u00e7\u00e3o cont\u00ednua. Os resultados mostraram que, fornecendo luz em flashes de baixa intensidade induziu-se a s\u00edntese de astaxantina mais eficientemente que fornecendo a mesma quantidade de luz de maneira cont\u00ednua. A produ\u00e7\u00e3o de astaxantina em *H. pluvialis* com ilumina\u00e7\u00e3o intermitente externa ou interna foi muito mais eficiente e econ\u00f4mica que sob luz cont\u00ednua com a mesma intensidade de luz m\u00e9dia (a mesma quantidade de f\u00f3tons). A ilumina\u00e7\u00e3o interna em "flashes" apresentou-se mais eficiente que externamente. Os resultados indicaram que o uso de luz em "flashes", principalmente quando usado internamente, \u00e9 uma

forma promissora para induzir acúmulo de astaxantina em *H. pluvialis* no aspecto da iluminação.

- pH do meio de cultura

Segundo Sarada *et al.* (2002) a produção de carotenóide é significativamente afetada pelo pH do meio. A influência do pH na produção de astaxantina foi determinada por esses autores através da indução de stress nutricional em meio basal com diferentes pHs (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0), que levou a concentração de pigmento (clorofila e carotenóide) alta em pH 7.0-8.0 e significativamente menor em pH 6.0. No entanto, culturas que cresceram em pH 7.0 apresentaram maior produção de astaxantina que aquelas que cresceram em pH 6.0, 8.0 e 9.0. Os resultados indicaram que a resposta ao stress varia com o pH do meio e que pH 7.0 foi o melhor em termos de produção de astaxantina.

- Alta Temperatura

Segundo Boussiba *et al.* (2000) para o estado de encistamento o limite máximo de temperatura poderia ser de até 35°C, enquanto o limite mínimo poderia ser tão baixo quanto 2°C. Os melhores resultados foram obtidos quando a temperatura foi mantida em 32°C.

2.5.2.4 Recuperação e Purificação do Pigmento Astaxantina

Extração

Segundo Olaizola (2003), as revisões de diferentes técnicas de colheita disponíveis para obtenção de microalgas, incluindo floculação, filtração, centrifugação e flotação com ar têm indicado que a centrifugação é possivelmente a técnica mais confiável e apenas ligeiramente mais cara que outras técnicas, em escala industrial. A biomassa de *H. pluvialis* é comumente obtida em escala laboratorial, por centrifugação (GUERIN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005; KATSUDA *et al.*, 2004; OROSA *et al.*, 2006; KAMATH *et al.*, 2005, MIAO *et al.*, 2006).

Devido os haematocistos serem mais densos que a água a obtenção dos haematocistos em escala industrial é facilmente realizada por sedimentação e subsequente centrifugação (BOUSSIBA *et al.*, 2000, LORENZ e CYSEWSKI, 2000) ou filtração a vácuo (BOUSSIBA *et al.*, 2000). Segundo Olaizola (2003), no caso da

biomassa de *H. pluvialis* para produção de astaxantina (Mera Pharmaceuticals), tem-se a vantagem das células tornarem-se grandes e pesadas durante a carotenogênese e formação de cistos sedimentando rapidamente no meio de crescimento. Tem-se observado velocidade de sedimentação celular do *H. pluvialis* maior que 1 cm/min (OLAIZOLA, 2003).

A biomassa celular deve ser rompida para aumentar a biodisponibilidade da astaxantina (GUERIN *et al.*, 2003). O extrato bruto de pigmento pode ser rompido por moagem dos “pellets” com almofariz (GARCIA-MALEA *et al.*, 2006; LORENZ e CYSEWSKI, 2000; CIFUENTES *et al.*, 2003, YUAN e CHEN, 2000), por homogenizadores de tecidos (LABABPOUR e LEE, 2006; CIFUENTES *et al.*, 2003; YUAN e CHEN 1998), French press (SCHOEFS *et al.*, 2001) ou nitrogênio líquido em almofariz (para cistos) (CIFUENTES *et al.*, 2003), aquecimento a 60°C (XYLANDER e BRAUNE, 1994 *apud* YUAN e CHEN, 2000) ou 70° C (BAR *et al.* 1994 *apud* YUAN e CHEN, 2000) ou ainda usando partículas de sílica e solvente agitados vigorosamente (KATSUDA *et al.*, 2004). Em escala laboratorial Yuan e Chen (2000) observaram que a moagem em almofariz com pistilo foi simples, rápido e eficiente para a extração de pigmentos da alga *H. pluvialis* especialmente para uma grande quantidade de células algais. Olaizola (2003) sugere o uso de moinho de bolas e homogeneizadores de alta pressão para ruptura das células de *H. pluvialis* e recuperação da astaxantina em escala industrial, mas outros métodos são possíveis, embora, segundo Lorenz e Cysewski (2000), detalhes exatos das técnicas de moagem sejam exclusivos das companhias produtoras de *H. pluvialis*.

O próximo passo pode ser a redução do conteúdo de água da biomassa. Ausência de água na biomassa melhora a recuperação de componentes lipossolúveis como a astaxantina. No entanto, como a astaxantina é um composto sensível ao calor, produtores comerciais têm desenvolvido tecnologias que limitam a exposição da astaxantina a condições que causam degradação (OLAIZOLA, 2003). A liofilização pode ser uma alternativa para remediar o problema causado por tratamentos com altas temperaturas que podem degradar os carotenóides (TANG e CHEN, 2000; YUAN e CHEN, 1998; BOUSSIBA *et al.*, 2000), outra técnica relatada é a secagem sob fluxo de nitrogênio (FABREGAS *et al.*, 2001), embora a secagem por spray tenha provado ser efetiva (BOUSSIBA *et al.*, 2000).

Atualmente produtores comerciais de astaxantina não purificam astaxantina a partir do extrato bruto (OLAIZOLA, 2003). Neste caso, o extrato de células secas é,

preferencialmente, estocado sob baixas temperaturas (-80°C) ou ainda sob ausência de oxigênio, como embalagens a vácuo ou bolsas com introdução de nitrogênio. O estágio final da produção de um produto com astaxantina na forma de partículas facilmente digeridas por peixes, pode ser realizada de várias formas, mas comumente envolve procedimentos de moagem em que as células secas são moídas sob condições criogênicas na presença de antioxidante (etoxiquina, BHA, BHT, tocoferol, di-tert-butil-*p*-cresol e galato de propila) para prevenir a oxidação da astaxantina. O antioxidante preferencial tem sido o BHT, o qual é aprovado pela FDA nos casos em que o produto final é utilizado como aditivo alimentar para peixes que, normalmente, são destinados ao consumo humano. Normalmente, dependendo do antioxidante usado, a quantidade adicionada durante a moagem é em torno de 0,05 a 5% (p/p) da quantidade de pó seco sendo moído (BOUSSIBA *et al.*, 2000).

No entanto, para análises laboratoriais, quantitativas ou qualitativas, ou para obtenção de astaxantina purificada com aplicação em alimentos ou farmacêutica, o processo continua após a desidratação, com a recuperação da astaxantina usando extração por CO₂ supercrítico ou outras técnicas de extração de óleos, conforme a utilização final da astaxantina.

Após o rompimento, o pigmento pode ser extraído com solventes orgânicos como acetona (LABABPOUR e LEE, 2006; SARADA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2005; SUH *et al.*, 2006; CIFUENTES *et al.*, 2003; HARKER *et al.*, 1995; KAMATH *et al.*, 2005; GARCIA-MALEA *et al.*, 2006; OROSA *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 1993), dimetil sulfóxido (DMSO) (TRIPATHI *et al.*, 1998; BOUSSIBA e VONSHAK 1991; CORDERO *et al.*, 1996), metanol (KATSUDA *et al.*, 2004; SCHOEFS *et al.*, 2001), diclorometano:metanol (25:75 v/v) (YUAN e CHEN 1998, 2000), acetona:metanol (1:2 v/v) (FABREGAS *et al.*, 2001). Segundo Lababpour e Lee (2006) a extração por acetona tem boa sensibilidade, além de ser consideravelmente menos tóxica que outros solventes como metanol, hexano, clorofórmio, *n*-propanol e acetonitrila. Segundo Johnson e An (1991) o diclorometano (~30g/L), clorofórmio (~10g/L), dimetilsulfoxido (~ 0.5g/L) e acetona (~ 0.2g/L) poderiam facilmente dissolver astaxantina a temperatura ambiente. Foi reportado que 1L de diclorometano pode dissolver 30g de astaxantina à temperatura ambiente e a solubilidade é maior que em clorofórmio, acetona e DMSO (JOHNSON e AN, 1991; YUAN e CHEN, 2000). Porém, Yuan e Chen (2000) observaram que apesar de o diclorometano ser um bom solvente para extração de astaxantina, as células, debris e a solução extrato de

diclorometano não puderam ser separadas completamente por centrifugação e algumas células e debris restaram ainda suspensas na solução de extrato. Quando diclorometano foi misturado com metanol as células e debris suspensas na solução de extrato poderiam ser completamente precipitadas por centrifugação a 10000g por 5-10 min. Além disso, Yuan e Chen (2000) observaram que mistura de metanol e diclorometano foi um extrator efetivo para ésteres de astaxantina.

A Mera Pharmaceuticals (<http://www.aquasearch.com/>) tem desenvolvido um método exclusivo de extração utilizando óleos comestíveis como solvente de extração, uma vez que para aplicação humana o uso de solventes petroquímicos pode causar preocupações com a saúde e/ou aceitabilidade devido possíveis resíduos no produto final.

Análises

A análise de astaxantina tem sido realizada em experimentos laboratoriais por HPLC com alta eficiência e sensibilidade (FABREGAS *et al.*, 2001; SARADA *et al.*, 2002; CIFUENTES *et al.*, 2003; SCHOEFS *et al.*, 2001; GARCIA-MALEA *et al.*, 2006; OROSA *et al.*, 2005; DONG e ZHAO, 2004) ou pela medida da absorvância com espectrofotômetro (SARADA *et al.*, 2002; SUH *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2005; KAMATH *et al.*, 2005; OROSA *et al.*, 2005). A astaxantina tem sido determinada em vários experimentos entre 474-480 nm (SARADA *et al.*, 2002; OROSA *et al.*, 2005; CIFUENTES *et al.*, 2003; SCHOEFS *et al.*, 2001; KAMATH *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 1993; DONG e ZHAO, 2004) que é a faixa do máximo de absorção da astaxantina (MIAO *et al.*, 2006). Alguns autores têm utilizado o HPLC equipado com detector PDA (matriz de fotodiodos) para a análise qualitativa e quantitativa dos carotenóides (OROSA *et al.*, 2005; BRINDA *et al.*, 2004; KATSUDA *et al.*, 2004).

Diversas fases móveis para eluição têm sido usadas, por exemplo, solvente isocrático consistindo de acetonitrila, metano e água (75:25:10) (SARADA *et al.*, 2002), ou a seqüência metanol 100%/acetonitrila:água (90:10)/ acetato de etila 100% (CORDERO *et al.*, 1996), metanol puro (KATSUDA *et al.*, 2004), etc.

Purificação

A complexidade da composição de pigmentos no extrato da alga faz com que seja difícil separar todos os pigmentos numa única corrida cromatográfica, bem

como é difícil separar todos os ésteres de astaxantina (YUAN e CHEN, 1998; MIAO *et al.*, 2006). Segundo Yuan e Chen (1998), apesar de inúmeros métodos de HPLC para separação de pigmento do *H. pluvialis* serem reportados, poucos são apropriados para a separação simultânea de astaxantina, isômeros de astaxantina, ésteres de astaxantina, outros carotenóides e clorofilas na alga.

- Saponificação

Segundo Yuan e Chen (2000) para a obtenção de astaxantina purificada a partir de ésteres de astaxantina (presente em grande quantidade no *H. pluvialis*) é necessário inicialmente fazer-se a saponificação do extrato para hidrólise dos ésteres. O processo de saponificação descrito Yuan e Chen, 2000 por consiste basicamente na hidrólise do extrato bruto de astaxantina com uma solução previamente preparada de NaOH 0,107M dissolvido em metanol. O processo é realizado sob atmosfera de nitrogênio e a seguir a mistura é evaporada e concentrada sob nitrogênio e novamente adicionado NaOH e então é mantido 12 horas em banho de água, no escuro e sob nitrogênio.

Segundo Yuan e Chen (1999) alta temperatura favorece a hidrólise dos ésteres de astaxantina mas também promove a degradação da astaxantina. Logo com o objetivo de estudar o efeito da temperatura na hidrólise dos ésteres de astaxantina e a na degradação da astaxantina durante a saponificação Yuan e Chen (2000) monitoraram diferentes temperaturas (5, 10 e 15°C) observando que a alta temperatura (ex. 15°C) a velocidade inicial de hidrólise é maior (8h), mas a concentração final de astaxantina livre é menor, apresentando maior degradação, enquanto em baixa temperatura (5°C) a velocidade de hidrólise foi mais lenta, mas a concentração final de astaxantina livre foi maior (94,3% de astaxantina livre após 12horas de saponificação).

A concentração da solução metanólica de NaOH é importante para promover a hidrólise e minimizar a degradação da astaxantina durante esta etapa (YUAN e CHEN, 1999). Yuan e Chen (2000) também avaliaram diferentes concentrações de NaOH (0.018, 0.021, 0.026, 0.032 M) na reação a 5°C e observou que a 0.021M foi a concentração ótima para completa hidrólise após 12horas sem causar degradação da trans-astaxantina a 5°C. Com este método e saponificação ésteres de trans-astaxantina no extrato de pigmento foi quase completamente hidrolisado e 94.4% de

trans-astaxantina livre foram produzidas do total de ésteres de trans-astaxantina, e a degradação foi de 5.6% .

- Separação

Após a saponificação o extrato passa pela etapa de separação. Yuan e Chen (1998) descreveram um método de HPLC em gradiente de fase reversa usando uma coluna semipreparativa 250x10mm Beckman Ultrasphere C₁₈ (5µm) a 25°C e a fase móvel descrita na tabela 7, para separação dos ésteres de astaxantina e isômeros de astaxantina a partir de extratos saponificados e insaponificados do pigmento em *Haematococcus pluvialis*. Observou-se que em comparação com os ésteres de astaxantina, a astaxantina e a luteína são pouco retidos por colunas C₁₈ comercialmente disponíveis, sendo estes dificilmente separados, o que poderia ser melhorado pelo ajuste da proporção de água, metanol e acetonitrila. Os resultados mostraram que 4 tipos de isômeros de astaxantina e ésteres de astaxantina, (3S,3`S)-trans-astaxantina, (3S,3`S)-9-cis-astaxantina, (3S,3`S)-13-cis-astaxantina, (3R,3`R)-trans-astaxantina e seus ésteres foram separados e identificados. Ainda estabeleceram um método cromatográfico de purificação para obtenção preparação de trans-astaxantina natural a partir do extrato saponificado de *H. pluvialis* isolando 3.7mg de astaxantina de 1g de biomassa seca de *H. pluvialis*. A astaxantina purificada continha aproximadamente 97,7% de trans-astaxantina, 1,1% de cis-astaxantina e 1,2% de impurezas.

Posteriormente, Yuan e Chen (2000) usaram um método cromatográfico semipreparativo para purificação da trans-astaxantina usando coluna semipreparativa 250x10mm Beckman Ultrasphere ODS (5µm) e a fase móvel descrita na tabela 7. Os resultados indicaram que trans-astaxantina e cis-astaxantina foram bem separadas na coluna de fase reversa e os carotenóides cantaxantina, echinenona, e betacaroteno foram rapidamente eluídos pelo solvente B.

TABELA 7 - Fases móveis utilizadas para purificação e análises da astaxantina

Fase Móvel	Função	Autor
Diclorometano:metanol: acetonitrila:água 6,5:82:7,5:4 v/v	Separação de trans-astaxantina, luteína e cis isômeros de astaxantina	Yuan <i>et al.</i> (1997)
A: diclorometano:metanol:acetonitrila:água, 5,0: 85:5,5:4,5 v/v B: diclorometano:metanol:acetonitrila:água, 22:28:45,5:4,5 v/v	A: separação de trans-astaxantina, adonirubina, luteína e cis isômeros de astaxantina. B: eluição dos ésteres de astaxantina e o β - caroteno	Yuan e Chen (1998)
A: metanol:água:diclorometano 90:8:2 v/v B: diclorometano e metanol 25:75 v/v	A: separação e purificação da trans- astaxantina B: lavagem da coluna e eluição da trans- astaxantina	Yuan e Chen (2000)

Segundo Yuan e Chen (1998) o comportamento de retenção e separação dos carotenóides e clorofilas são significativamente afetados para proporção relativa do diclorometano, metanol, acetonitrila e água na fase móvel. A presença de água poderia aumentar a separação de carotenóides e clorofilas por aumento do tempo de retenção destes e a presença de diclorometano melhorar a resolução obtida pela adição de água. Para a purificação de trans-astaxantina Yuan e Chen (1998) aumentaram o conteúdo de água e diminuíram a quantidade de diclorometano, aumentando a separação de trans-astaxantina e adonirubina.

Segundo Yuan e Chen (1997) usando a fase móvel diclorometano: metanol:acetonitrila: água (5.0: 85:5,5:4,5 v/v) é possível a separação de trans-astaxantina, adonirubina, luteína e cis isômeros da astaxantina, enquanto os ésteres de astaxantina e betacaroteno não poderia ser eluídos.

Miao *et al.* (2006) desenvolveram um método para melhorar a separação e identificação dos carotenóides em *H. pluvialis*. O método de HPLC consistiu de um Agilent serie 1100 com detector do tipo matriz de fotodiodos (PDA). Uma coluna analítica YMC 250 x 4.6mm equipada com fase reversa de 5 μ m C₁₈, incluindo uma pré-coluna 10 x 4.6mm, usada a 20°C. A fase móvel consistiu de um gradiente de 60 min de 83:17 para 98:2 (acetona/água), fluxo 0.8ml/min e injeção de 1,0 μ l. A faixa de varredura foi de 300 para 800nm. Os resultados mostraram diferentes tempos de retenção em cada componente do extrato de *H. pluvialis*. Carotenóides livres foram eluídos em um tempo (time window) entre 6 e 15min, enquanto monoésteres de astaxantina tipicamente levaram 20 a 34min e diésteres foram eluídos após 45min. Como detectado por HPLC-PDA, a maioria dos compostos teve absorbância máxima em aproximadamente 480nm, a qual é uma absorção característica do esqueleto da astaxantina. O método melhorou a separação dos extratos pela desaceleração do

gradiente de acetona. Os resultados mostraram melhor separação dos ésteres de astaxantina. Miao *et al.* (2006) identificou os ésteres de astaxantina em *H. pluvialis* de acordo com a massa molecular e padrões de fragmentação característicos, analisando em seguida os resultados pelo tempo de retenção em HPLC e LC-(APCI)MS. Após análise por HPLC, 4 carotenóide livres, 15 monoésteres de astaxantina e 12 diésteres de astaxantina foram identificados em *H. pluvialis* por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI)MS).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

A linhagem de microrganismo utilizada foi o *Haematococcus pluvialis* SAG 34-1b, obtido da coleção de microrganismos SAG (Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen – Göttingen, Alemanha).

Taxonomia (Fonte: AlgaBase, 2007):

Reino: <i>Plantae</i>	Ordem: <i>Volvocales</i>
Sub-Reino: <i>Viridaeplantae</i>	Família: <i>Haematococcaceae</i>
Filo: <i>Chlorophyta</i>	Gênero: <i>Haematococcus</i> Flotow
Sub-Filo: <i>Chlorophytina</i>	Espécie: <i>pluvialis</i> Flotow
Infra-Filo: <i>Tetraphytae</i>	Nome botânico: <i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow
Classe: <i>Chlorophyceae</i>	

A cepa foi mantida em meio inclinado ESP com incubação a $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias e em seguida refrigerado. Os repiques foram realizados mensalmente.

3.2 MEIOS DE CULTURA

3.2.1 Meios de Cultivo para *Haematococcus pluvialis* SAG 34-1b

- **Meio SAG** (SAG, 2006)

Componentes	Solução Estoque (g/100ml)	Solução Nutriente
KNO ₃	1	20
K ₂ HPO ₄	0.1	20
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.1	20
Extrato de Solo *		30
Solução de Micronutrientes **		5
Água Destilada		905

O pH inicial foi ajustado em 6.0 utilizando-se soluções 0,1N NaOH e/ou 0,1N HCl e em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a $121^\circ\text{C}/1\text{ atm}$, por 20 minutos.

* Preparo do Extrato de Solo:

Preencheu-se um frasco de 6L com 1/3 de terra de jardim, sem fertilizante ou agentes protetores de plantas. Adicionou-se água deionizada até 5cm acima do nível de terra e esterilizou-se por aquecimento com vapor fluente duas vezes durante 1 hora em um intervalo de 24 horas. O extrato foi decantado por centrifugação e descartou-se o sedimento. O sobrenadante foi armazenado em frascos, autoclavado por 15 minutos a 121°C/1atm e estocado em refrigerador.

** Preparo da solução de micronutrientes

Componentes	Solução Estoque (g/100ml)	Quantidade
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.1	1ml
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.1	2ml
H ₃ BO ₃	0.2	5ml
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0.02	5ml
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.02	5ml
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0005	1ml
Água Destilada	-	981ml
FeSO ₄ . 7H ₂ O	-	0,7g
EDTA	-	0,8g

Os componentes foram autoclavados separadamente em duas soluções (I e II) que foram misturadas após resfriamento:

Solução I: 881ml de água destilada + Soluções estoque de todos os sais exceto FeSO₄ + 0.4 g EDTA

Solução II: 100 ml água destilada + 0.7 g FeSO₄ + 0.4 g EDTA

- **Meio MBBM (Meio Bold's Basal Modificado)**

Componentes	Quantidade
CaCl ₂ . 2H ₂ O	25mg
NaNO ₃	249mg
K ₂ HPO ₄	75mg
KH ₂ PO ₄	175mg
NaCl	25mg
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	75mg
EDTA Na.	45mg
Solução de micronutrientes	5ml/L
Extrato de Solo	30ml
Água Destilada	970ml

O pH inicial foi ajustado em 6.0 com soluções 0,1N NaOH e/ou 0,1N HCl e, em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C/1 atm, por 20 minutos.

- **Meio mixotrófico**

O cultivo mixotrófico foi realizado pela adição de 2g/L de acetato de sódio ao meio de cultivo MBBM. O pH inicial foi ajustado em 6.0 utilizando-se soluções 0,1N NaOH e/ou 0,1N HCl e em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C/1 atm, por 20 minutos.

3.2.2 Meio de Manutenção para *Haematococcus pluvialis* SAG 34-1b

Culturas estoque foram mantidas em tubos inclinados contendo meio ESP (SAG, 2006).

Meio ESP = Meio SAG + 0,1% proteose-peptona + 1,5% ágar

O meio foi distribuído em tubos e esterilizado em autoclave a 121°C/1 atm, por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram inclinados até a solidificação.



FIGURA 15: Tubos com meio inclinado ESP com colônias de *H. pluvialis*.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

- **Temperatura**

A temperatura foi mantida constante em todos os experimentos a 25 ±1°C.

- **Aeração**

Os experimentos realizados em fotobioreator foram mantidos sob aeração de por borbulhamento de ar de 400ml/min (0,08 vvm). Nos experimentos realizados em erlenmeyer, os frascos foram agitados manualmente uma vez ao dia.

- **Fotobioreator:**

Desenvolveu-se um fotobioreator vertical (figura 16) com 5 lâmpadas fluorescentes brancas independentes entre si, para que fosse possível manipular as condições de crescimento vegetativo (baixa intensidade de luz) e indução de stress (alta intensidade de luz) à cultura. O cultivo foi realizado em garrações de 15L, com 5L de meio de cultura. A indução de stress por alta intensidade de luz foi realizada pela adaptação de lâmpadas fluorescentes brancas junto às paredes do garrafão de cultivo.



FIGURA 16: Fotobioreator vertical utilizado para cultivo de *H. pluvialis*

- **Fotoperíodo**

Todos os experimentos foram realizados sob fotoperíodo de 12:12h.

- **Iluminação**

As iluminações usadas para os diferentes experimentos foram:

1º) Cinética de crescimento do *H. pluvialis* com diferentes meios de cultivo:

Lâmpada fluorescente, intensidade de 1,5 Klux;

2º) Cinética de crescimento do *H. pluvialis* com diferentes intensidades de luz:

Lâmpada fluorescente, intensidade de 1,5 Klux e 2,7Klux;

3º) Estudo do ciclo evolutivo e alterações morfológicas das células do *H. pluvialis*:

Crescimento vegetativo: Lâmpada fluorescente, intensidade de 1,5 Klux;

Indução da produção de astaxantina: Lâmpada fluorescente, intensidade de 4,2 Klux

4º) Análise da influência de diferentes pHs iniciais no crescimento vegetativo do *H. pluvialis* e na produção de astaxantina:

Crescimento vegetativo: Lâmpada fluorescente, intensidade de 2,5 Klux;

Indução da produção de astaxantina: Lâmpada fluorescente, intensidade de 4,2 Klux

5º) Análise da influencia de diferentes pHs controlados no crescimento vegetativo e produção de astaxantina:

Crescimento vegetativo: Lâmpada fluorescente, intensidade de 2,5 Klux;

Indução da produção de astaxantina: Lâmpada fluorescente, intensidade de 4,2 Klux.

6º) Avaliação da influencia de diferentes pHs contínuos e diferentes concentrações de sal sob o crescimento celular e produção de astaxantina:

Lâmpada fluorescente, intensidade de 2,5 Klux

7º) Cinética de crescimento do *H. pluvialis* com diferentes cores e influência sobre a produção de astaxantina:

LEDs de coloração vermelha, laranja, branca, violeta verde e azul.

8º) Teste de sensibilidade a antibióticos como método alternativo de inibição da contaminação em cultivos mixotróficos de *H. pluvialis*.

Lâmpada fluorescente, intensidade de 2,0 Klux

9º) Planejamento experimental da produção de astaxantina por *H. pluvialis* em diferentes concentrações de sal e intensidades de luz:

Lâmpada fluorescente, intensidades de 3,5 Klux, 5,3 Klux, 7,0 Klux.

- **LEDs**

Foram adaptados 6 LEDs de cada cor (vermelha, laranja, branca, violeta verde e azul) às paredes de frascos erlenmeyer de 1L contendo 300ml de meio de cultura. Os frascos foram colocados em uma caixa com divisórias para evitar a passagem de luz de um frasco para outro e recoberto com papel alumínio para aumentar a intensidade da iluminação, conforme mostra a figura 17.



FIGURA 17: Cultivo de *H. pluvialis* em erlenmeyers, com LEDs de diferentes cores.

- **pH**

Os experimentos de análise da influência do pH (4º, 5º e 7º) foram ajustados inicialmente (4º) ou continuamente (5º e 7º) em pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0 com a adição diária de soluções 0,1N NaOH e/ou 0,1N HCl.

- **Salinidade**

A salinidade foi ajustada nos experimentos com diferentes concentrações de sal, pela adição de NaCl.

- **Inóculo**

Os inóculos foram obtidos pela inoculação com suspensão de microalgas (obtida pela adição de água estéril à cultura em meio inclinado ESP) em erlenmeyer contendo meio SAG e incubados de 8-10 dias, para que estivessem em fase de crescimento vegetativo. Os inóculos foram utilizados na proporção de 10% em relação ao volume de meio de cultivo.

- **Antibióticos:**

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado em placas de Petri com discos de papel comerciais nas concentrações de antibióticos padronizados pela OMS e FDA para uso humano. Utilizou-se os antibióticos descritos na tabela 7:

TABELA 7 - Nome genérico e concentração dos discos de antibiograma utilizados.

Amoxicilina 10mcg	Cefotaxima 30mcg	Estreptomicina 10 mcg	Ofloxacina 5 mcg
Ampicilina 10mcg	Cefepime 30mcg	Gentamicina 10mcg	Penicilina G 10mcg
Bacitracina 20mcg	Ciprofloxacina 5mcg	Licomina 2mcg	Sulfonamida 30mcg
Cefazolina 30mcg	Cloranfenicol 30mcg	Neomicina 30mcg	Vancomicina 30mcg
Cefalexina 30mcg	Eritromicina 15mcg	Norfloxacina 10mcg	

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

- **Análise de Biomassa**

A análise da biomassa foi realizada por coleta diária de amostra, em duplicata, para determinação da turbidez, peso seco e densidade celular.

Através da absorbância:

Coletou-se 2 ml de amostra e determinou-se medida da absorbância nos comprimentos de onda de 550nm (JEON *et al.*, 2006), 680nm e 750nm (KATSUDA *et al.*, 2004), utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1601PC, Kyoto, Japan).

A partir dos resultados obtidos pela análise turbidimétrica a 680nm e 750nm pode-se calcular o peso seco pelo método de Katsuda *et al.* (2004) a partir da fórmula:

$$\text{Peso Seco Calculado} = \frac{[-4,2 \times (\text{OD}_{680} - \text{OD}_{750}) + 1,4] \times \text{OD}_{680}}{\text{OD}_{680}}$$

Onde, OD_{680} é a densidade óptica a 680nm e OD_{750} é a densidade óptica a 750nm.

Peso Seco:

Foram centrifugados 10ml de amostra, a 3500rpm (2034 x g) por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco em estufa a 100°C por 24h.

Contagem de Células:

O número de células foi estimado por contagem em câmara de Neubauer, sendo:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

- **Análise de Pigmento**

Extração

Foram centrifugados 2ml de amostra em tubo Falcon a 3500rpm (2034 x g) por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pigmento foi extraído do sedimento

pelo método de Sedmak (SEDMAK *et al.*, 1990), adicionando-se ao sedimento 0,5ml de DMSO pré-aquecido a 55°C, a mistura é agitada em vórtex por 20-30 segundos, 0,1ml de fosfato de sódio 0.01M pH 7.0 foram adicionados para a separação dos carotenóides em 1ml de solvente orgânico, adicionado em seqüência. Os tubos foram então agitados em vórtex por 30-40 segundos para misturar a fase aquosa e a fase orgânica. As fases foram então separadas por centrifugação por 5 minutos. A fase orgânica foi removida e determinou-se a absorbância a 480nm.

Procurou-se evitar o contato com a luz, recobrando-se os tubos Falcon com papel alumínio e armazenando-se o extrato em frascos âmbar fechados com tampa de borracha.

Através da absorbância:

Foi realizada a medida da absorbância no comprimento de onda de 480nm, para determinação da astaxantina e 680nm, para determinação da clorofila (MIAO *et al.*, 2006), utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1601PC, Kyoto, Japan). A análise de astaxantina foi realizada em ambiente escuro para evitar a sua degradação.

Microscópica

A produção de pigmento, mudança de morfologia e eficiência da extração foram avaliados microscopicamente.

- **Comparação entre solventes**

A comparação entre os solventes extratores (acetona, acetonitrila, clorofórmio, hexano e diclorometano:metanol 25:75v/v) após extração pelo método de Sedmak *et al.* (1990) utilizando-se os diferentes solventes e a seguir foi realizada a determinação em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1601PC, Kyoto, Japan) por varredura espectral nos comprimentos de onda de 400nm a 700nm e por análise microscópica.

- **Tratamento de Dados**

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados apresentados correspondem à média dos valores obtidos de cada amostra.

a) Velocidades Específicas de Crescimento:

Foram analisadas as curvas obtidas pela determinação de um modelo de regressão polinomial utilizando o software Microsoft Excel 2007, com os valores experimentais de peso seco e/ou contagem de células em função do tempo (d^{-1}) e, a seguir, o modelo foi usado para determinação analítica da velocidade específica de crescimento (μ) por dia (d^{-1}), expressa pela equação.

$$\mu = 1/X \cdot dX/dt$$

Onde: dX/dt é a derivada da biomassa (g/L ou número de células/ml) em relação do tempo e X é a concentração celular (g/L ou número de células/ml), em função do tempo de crescimento.

b) Velocidade de encistamento:

A partir dos dados obtidos de um modelo de regressão polinomial, calculou-se a velocidade de encistamento celular através da formula:

$$\mu_{\text{encistamento}} = dAx:chl/dt$$

Onde: $dAx:chl/dt$ é a derivada da relação entre a concentração de astaxantina (480nm) e clorofila (680nm) em relação do tempo de indução de stress para formação de cistos.

c) Produtividade Média de Astaxantina:

A produtividade média foi calculada por:

$$\text{Produtividade média} = \frac{\Delta N}{\Delta t}$$

Onde ΔN é a variação na densidade celular e Δt o intervalo de tempo considerado para os respectivos valores de N .

d) Conversão de unidades de luz (para lâmpada branca fluorescente)

1 mol de fótons = 6.022×10^{23} fótons.

$\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1} = 74 \times \text{Lux}$

$\text{Lux} = 0.014 \times \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fonte: Environmental Growth Chambers, 2007)

d) Planejamento experimental:

Para a confecção dos gráficos de planejamento experimental transferiu-se os dados tabulados no software Microsoft Excel 2007 para o Software Statistica 4.3 (STASOFT).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO FISIO-MORFOLÓGICO

Com o objetivo de aprofundar os conhecimentos do ciclo de vida do *H. pluvialis*, acompanhou-se as mudanças morfológicas da microalga durante o crescimento vegetativo e após indução de stress por alta intensidade de luz.

O *H. pluvialis* é uma microalga eucarionte, unicelular, que vive em colônias e se reproduz assexuadamente por formação de esporos móveis, chamados zoósporos (esporos flagelados). Possui forma elipsoidal, esférica ou formato de pêra (CANTER-LUND e LUND, 1995).

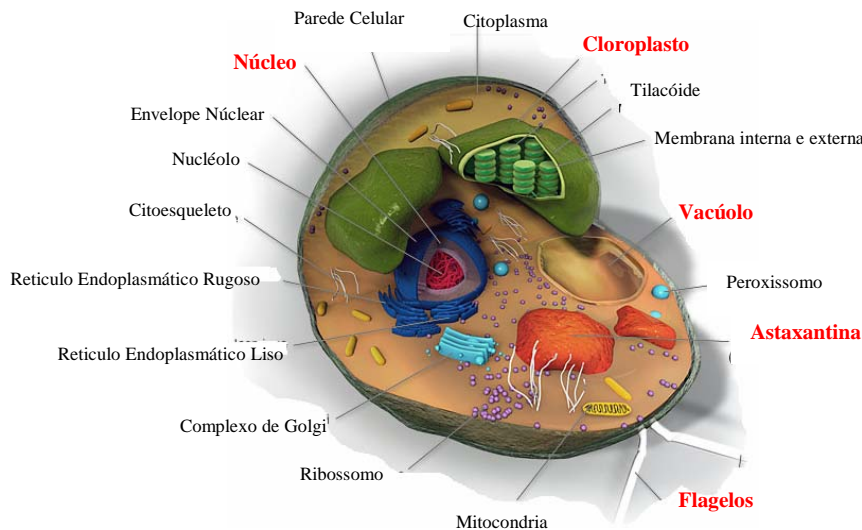


FIGURA 18: Corte esquemático da Célula vegetativa de *Haematococcus pluvialis* (LGPM, 2007).

O ciclo celular descrito na figura 19 compõe-se de células vegetativas verdes flageladas (1), começo da perda do flagelo (2) e formação de aplanosporos (3) aumentando de tamanho e reproduzindo-se por divisão celular no interior da célula mãe (4). No entanto, sob condições desfavoráveis é inibida a divisão celular, formando-se cistos resistentes vermelhos (5), ricos em astaxantina.

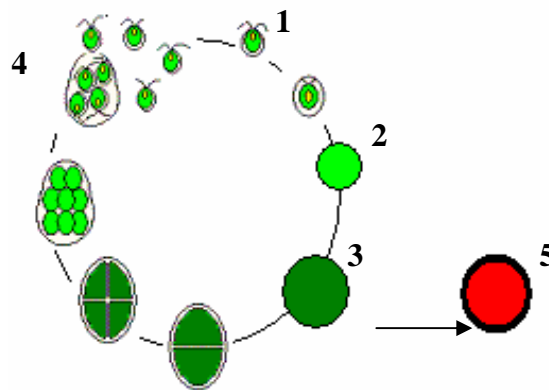


FIGURA 19: Ciclo de vida do *H. pluvialis*.

Do 1º dia até, aproximadamente, o 16º de cultivo, observou-se células esféricas, verdes, móveis (biflageladas), de tamanho relativamente pequeno e parede celular fina, com material gelatinoso adjacente ligando-se ao citoplasma localizado na região central, como pode ser visualizado na figura 20. É possível visualizar no citoplasma a presença de vacúolos que, segundo Canter-Lund e Lund (1995) é comumente presente em microalgas flageladas e todas as algas de água doce e responsável pelo equilíbrio osmótico. No interior do citoplasma encontram-se os cloroplastos contendo tilacóides, no interior dos quais se encontra o pigmento clorofila, que conferem coloração verde à alga e tornam a fotossíntese possível, como está esquematizado na figura 18 (CANTER-LUND e LUND, 1995).

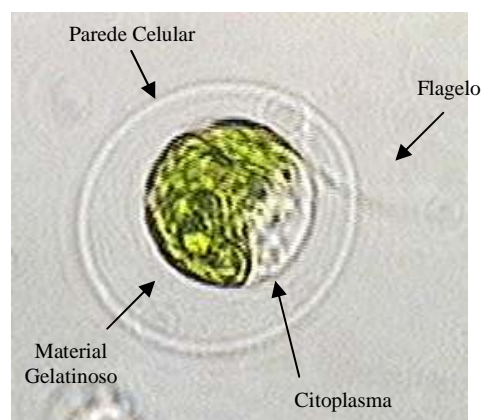


FIGURA 20: Célula vegetativa de *H. pluvialis* (100x).

A partir do 16º dia, observaram-se células verdes, porém sem flagelo (aplanosporos) e de tamanho aumentado (formação de cistos verdes), demonstrado na figura 21. Isso foi observado também por Kobayashi *et al.* (2001) que relatou a

mudança na morfologia com aumento de tamanho da parede celular durante a maturação celular.



FIGURA 21: Formação de aplanósporos de *H. pluvialis* (100x).

Nos dias subseqüentes (18^o - 20^o dia), algumas células iniciaram a produção de astaxantina, o que foi observado pelo conteúdo celular vermelho no citoplasma celular. Nota-se que a formação da astaxantina se inicia na região central e se expande para o resto da célula radialmente, demonstrado na figura 22.



FIGURA 22: Início da formação de astaxantina no interior da célula de *H. pluvialis* (100x).

No 23^o dia de cultivo foi realizada a indução de stress por alta intensidade de luz, observando-se a formação de cistos vermelhos após o 5^o dia de indução (Figura 23). No entanto, têm se relatado diferentes tempos de indução da formação de cistos, variando com as condições de stress (OROSA *et al.*, 2005, HARKER *et al.*, 1996, CIFUENTES *et al.*, 2003). Segundo Lorenz e Cysewski (2000) dentro de 2 a 3 dias após o stress da cultura os haematocistos são formados e dentro de 3 a 5 dias após a formação dos haematocistos, eles estão prontos para colheita. Segundo Canter-Lund e Lund (1995) a formação de astaxantina é um indicativo de condições

desfavoráveis no meio e os cistos podem reverter para a forma vegetativa sob condições favoráveis. Acredita-se ainda que na natureza a produção de astaxantina esteja relacionada à proteção a luz ultravioleta ou deficiência de nutrientes (CANTER-LUND e LUND, 1995). Segundo Harker *et al.* (1996) os cetocarotenóides estão presentes em glóbulos lipídicos citoplasmáticos dentro do cloroplasto.

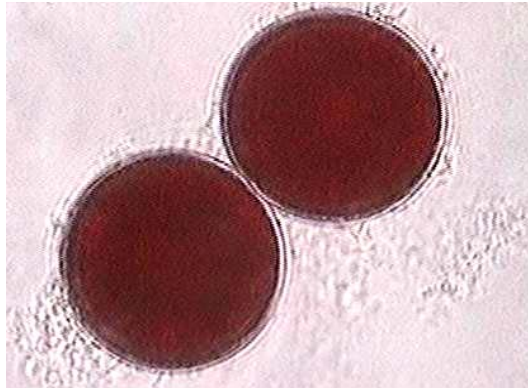


FIGURA 23: Cistos vermelhos de *H. pluvialis*

Observou-se que, quando não foi realizada a indução de stress para formação de cistos vermelhos, as células “envelheceram” antes da formação de cistos, visualizando-se algumas células em degradação, células brancas e/ou morte celular (figura 24), sem que houvesse formação de cistos vermelhos. Isso indica que a indução gradual não é efetiva para a formação dos cistos, sendo necessária uma indução abrupta, logo que se atinge a fase estacionaria de crescimento, para obter-se o máximo rendimento de formação de astaxantina.

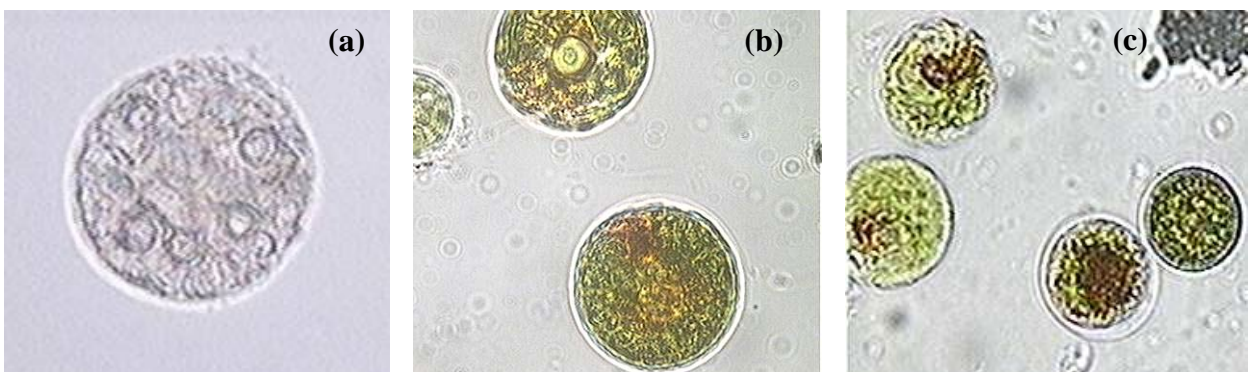


FIGURA 24: (a) morte celular, com completa degradação da clorofila (100x). (b) e (c) degradação celular em aumento de 100 e 40x, respectivamente.

Com relação ao tamanho das células, observou-se um aumento gradativo durante o ciclo evolutivo (Figura 25). Segundo é relatado por alguns autores, as células vegetativas de *H. pluvialis* medem em torno de 15-20 μm (GARCIA-MALEA

et al., 2006; LABABPOUR e LEE, 2005) chegando a 35- 50 μm (KOBAYASHI *et al.*, 2001; LABABPOUR e LEE, 2005) após a formação dos cistos vermelhos. Segundo Kobayashi *et al.* (2001) o diâmetro dos cistos celulares varia com a condição de stress e está diretamente relacionada à quantidade de astaxantina.

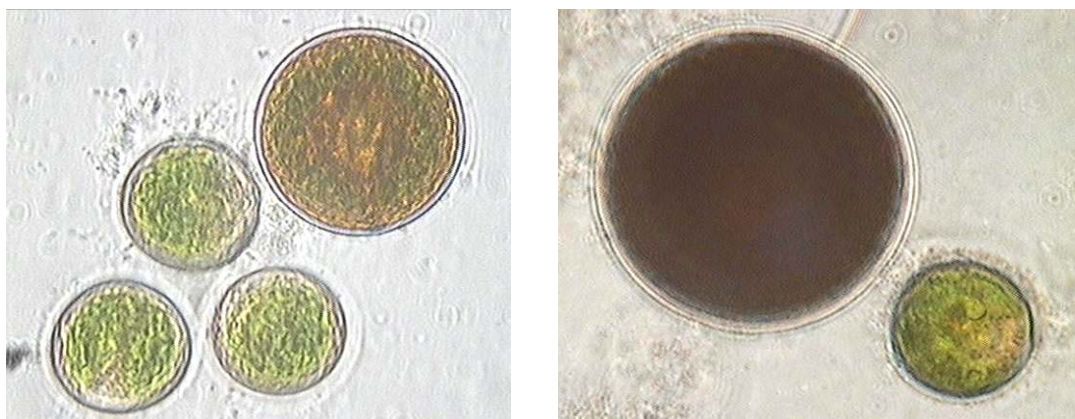


FIGURA 25: Relação entre o tamanho da célula vegetativa e do cisto do *H. pluvialis*.

4.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.

O estudo da cinética de crescimento do *H. pluvialis* SAG 34-1b em diferentes meios de cultivos, foi realizado com o objetivo de verificar a influência deste no crescimento vegetativo e selecionar o meio a ser utilizado nos experimentos seguintes.

Monitorou-se o crescimento vegetativo do *H. pluvialis* em meios de cultura autotróficos (SAG e MBBM) e mixotrófico (MBBM + acetato de sódio) por um período de 27 dias e os resultados obtidos estão representadas nas figuras 26, 27, 28 e 29. A determinação da biomassa foi realizada por 4 métodos de análise, para que futuramente fosse realizada a correlação e avaliação destes.

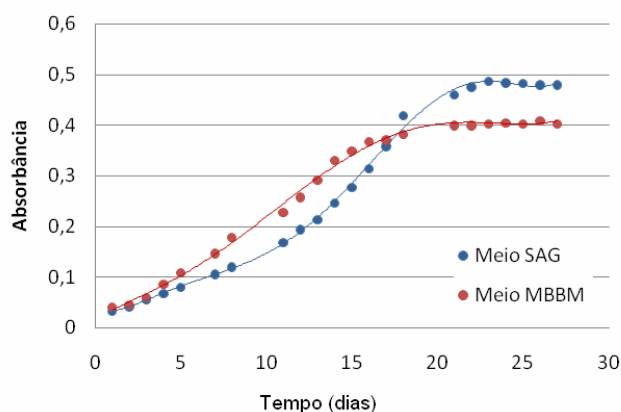


FIGURA 26: Resultados da cinética de crescimento em meio SAG e MBBM, obtidos pela análise da turbidez, no comprimento de onda de 550nm.

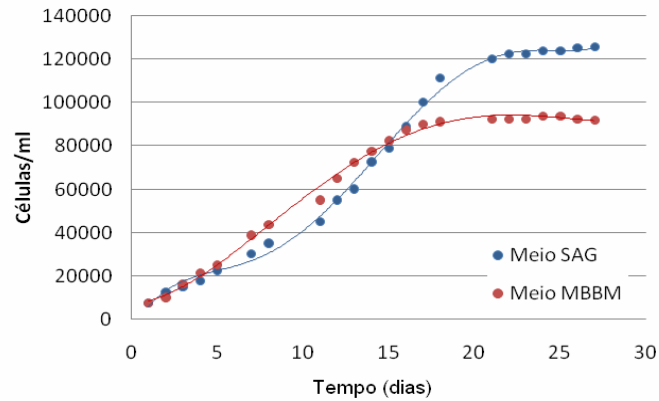


FIGURA 27: Resultados da cinética de crescimento em meio SAG e MBBM, obtidos por contagem celular.

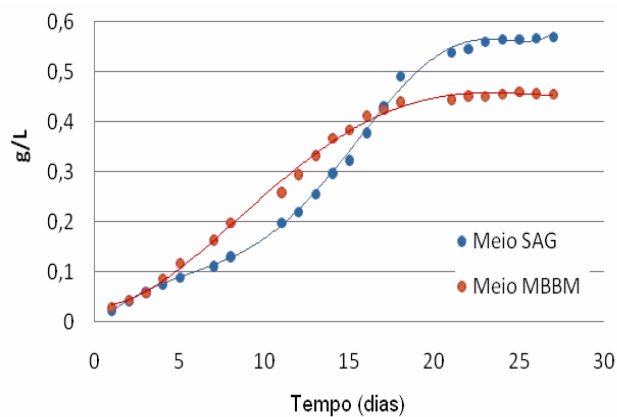


FIGURA 28: Resultados da cinética de crescimento em meio SAG e MBBM, obtidos pela determinação do peso seco.

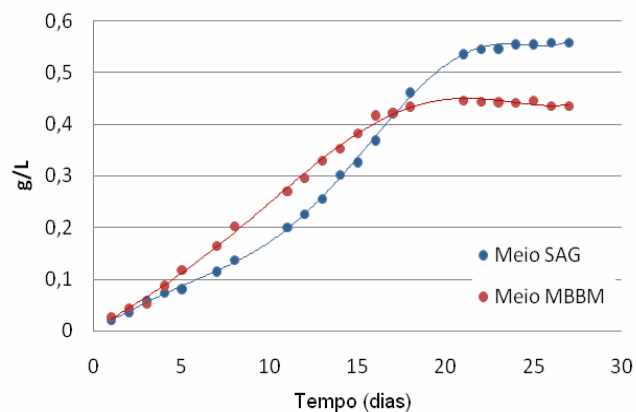


FIGURA 29: Resultados da cinética de crescimento em meio SAG e MBBM, obtidos pelo cálculo do peso seco com o método de Katsuda *et al.* (2004).

Dentre os meios de cultivo autotróficos, MBBM e SAG, estimou-se a velocidade específica média de crescimento de $0.35d^{-1}$ e $0.27 d^{-1}$, respectivamente, sendo as curvas de crescimento logarítmico e velocidade específica de crescimento dos respectivos meios, representadas pelas figuras 30 e 31. Vários autores têm reportado velocidade de crescimento do *H. pluvialis* sob diferentes condições de

cultivo autotróficos, variando de $0.21d^{-1}$ em cultivos em escala comercial (OLAIZOLA, 2000) e laboratorial (KAEWPINTONG *et al.*, 2006, CIFUENTES *et al.*, 2003) a $0.64d^{-1}$ (OROSA *et al.*, 2005, CIFUENTES *et al.*, 2003) e excepcionalmente $0,9d^{-1}$ em cultivos laboratoriais (GRUNGEWALD *et al.*, 1997, HAGEN *et al.*, 1993). Logo, a velocidade específica de crescimento obtida em nosso estudo ficou dentro da faixa esperada, embora próximo ao limite inferior.

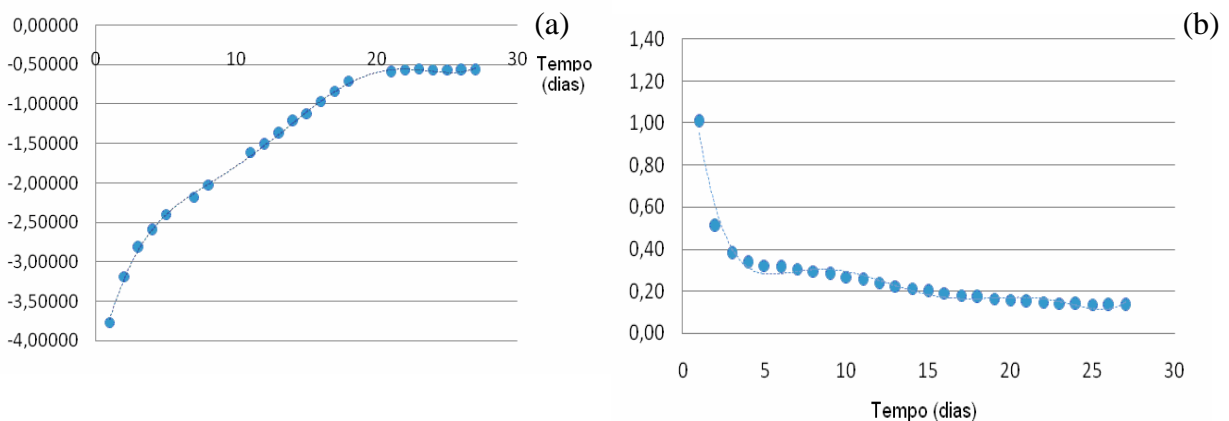


FIGURA 30: (a) Gráfico do logaritmo do peso seco (g/L) em função do tempo, obtido em meio de cultivo SAG; (b) Curva de velocidade específica de crescimento em meio de cultivo SAG, baseado na determinação do peso seco.

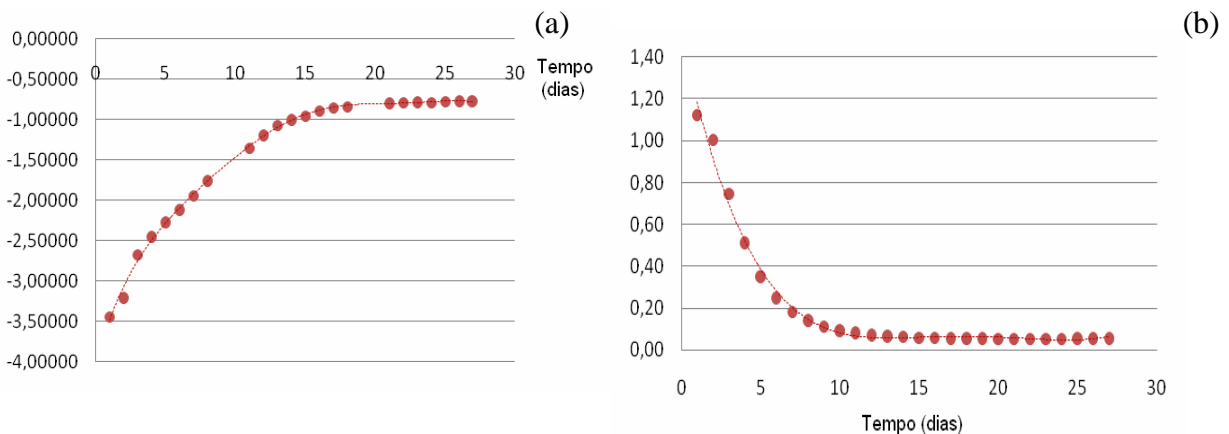


FIGURA 31: (a) Gráfico do logaritmo do peso seco (g/L) em função do tempo, obtido em meio de cultivo MBBM; (b) Curva de velocidade específica de crescimento em meio de cultivo MBBM, baseado na determinação do peso seco.

Os dados de biomassa obtidos pela determinação do peso seco (g/L) no meio SAG e MBBM, foram utilizados para gerar modelos polinomiais com regressão (R^2) de 0,998 e 0,997 respectivamente, representados pelas seguintes equações:

Para o meio SAG:

$$\text{Biomassa (g/L)} = 5E-08x^6 - 3E-06x^5 + 7E-05x^4 - 0,000x^3 - 4E-05x^2 + 0,023x - 0,002$$

Para o Meio MBBM:

$$\text{Biomassa (g/L)} = 4\text{E-}06x^4 - 0,000x^3 + 0,005x^2 - 0,012x + 0,049$$

Onde, x corresponde ao tempo (dias) em que foi determinada a biomassa.

Não foi possível analisar o crescimento em meio mixotrófico, devido a problemas recorrentes de contaminação bacteriana, possivelmente decorrentes de contaminação no próprio inóculo e/ou presença de fonte de carbono orgânica no meio. A dificuldade em controlar-se a contaminação em cultivos mixotróficos já tem sido relatada por alguns autores (GARCIA-MALEA *et al.*, 2006; KAEWPINTONG *et al.*, 2006), contudo não tem se observado mudança significativa na velocidade de crescimento nos cultivos mixotróficos em relação aos cultivos autotróficos, sendo que os valores relatados em cultivo mixotróficos têm variado de $0,25\text{d}^{-1}$ (TJAJONO *et al.*, 1994) a $0,58\text{d}^{-1}$ (KATSUDA *et al.*, 2004, KOBAYASHI *et al.*, 1993). Assim sendo, optou-se por continuar os estudos com meios autotróficos.

Em nossos experimentos, a máxima contagem celular foi obtida no meio SAG ($1,26 \times 10^5$ céls/ml) no 20º dia de análise enquanto o meio MBBM apresentou máxima contagem celular de $0,92 \times 10^5$ céls/ml, no 21º dia de cultivo. Tem-se relatado baixa densidade máxima celular exibida por esta microalga em diferentes condições de cultivo autotróficas, o menor valor relatado foi $0,54 \times 10^5$ céls/ml em meio autotrófico F1 (KAEWPINTONG *et al.*, 2006) no entanto, a grande maioria dos resultados relatam densidade celular de $1,0\text{-}2,5 \times 10^5$ células/ml (GRUNGEWALD *et al.*, 1997; HAGEN *et al.*, 1993; CIFUENTES *et al.*, 2003, TRIPATHI *et al.*, 1998) e excepcionalmente $5,5 \times 10^5$ células/ml (KOBAYASHI *et al.*, 1993; SUH *et al.*, 2006). No entanto, tem se observado crescimento vegetativo de 12 – 15 dias (FABREGAS *et al.*, 2001; TRIPATHI *et al.*, 1999; KAEWPINTONG *et al.*, 2006; SUH *et al.*, 2006).

Logo, a densidade celular obtida nos dois meios de cultivo testados (SAG e MBBM) foi relativamente baixa e observou-se prolongada fase vegetativa nos meios selecionados em comparação aos relatados em literatura, provavelmente em função da menor concentração do inóculo e ainda indicando a necessidade de otimização das condições de cultivo durante a fase vegetativa de crescimento, visando obter-se maior concentração de biomassa e menor tempo de cultivo.

O meio SAG apresentou, durante todo o período de análise, células vegetativas verdes móveis, enquanto as células em meio MBBM começaram a apresentar aplanosporos a partir do 17º dia de análise. No entanto, apesar das

células comecem a perder o flagelo e aumentarem de tamanho, não houve acúmulo aparente de astaxantina nos meios SAG e MBBM mesmo após 27 dias de cultivo, indicando que as células podiam manter-se neste meio, mas não tão ativas quanto as células vegetativas.

Têm-se relatado que o crescimento do *H. pluvialis* é bastante influenciado pelo tipo de meio de cultura (Kaewpintong et al., 2006); nossos resultados também demonstram diferença na cinética de crescimento do *H. pluvialis* nos meios SAG e MBBM, embora vários fatores ambientais possam afetar o crescimento da microalga. O meio SAG apresentou maior produtividade média (7.23×10^3 céls. $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$) embora tenha menor velocidade específica de crescimento celular, mas apresentou maior tempo de crescimento exponencial. Enquanto o meio MBBM, apresentou maior velocidade específica de crescimento, mas menor período de crescimento exponencial, apresentando produtividade média de (4.71×10^3 céls. $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$). Uma vez que as condições de crescimento foram as mesmas, esta variação na cinética de crescimento microalgal nestes meios, possivelmente deve-se às maiores concentrações de nitrato e fosfato no meio MBBM, apresentando-se mais “rico” que o meio SAG.

A fonte de nitrogênio também pode ser responsável pela diferença na cinética observada entre os meios SAG (KNO_3) e MBBM (NaNO_3), uma vez que vários autores têm reportado a importância da fonte de nitrogênio e/ou sua concentração na divisão celular (CIFUENTES *et al.*, 2003; OROSA *et al.*, 2005; SARADA *et al.*, 2002). Sarada *et al.* (2002) testou diferentes fontes de nitrogênio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , NH_4NO_3 e NaNO_3), observando máxima concentração celular em nitrato de potássio e a menor em nitrato de amônio. Segundo Sarada et al., 2002 as células que cresceram em KNO_3 foram menores que as que cresceram nas outras fontes de nitrato, enquanto o conteúdo de clorofila foi maior em nitrato de sódio e menor em nitrato de potássio. Cifuentes *et al.* (2003) também observaram variação na velocidade de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio de $0,44\text{d}^{-1}$ (uréia), $0,59\text{d}^{-1}$ (NaNO_3) e $0,70\text{d}^{-1}$ (NH_4Cl).

4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO COM DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ.

Em virtude da maior produtividade obtida no meio SAG em relação ao meio MBBM no experimento anterior, optou-se pela utilização do meio SAG para os

experimentos seguintes. Visando-se verificar a influência da irradiação no crescimento vegetativo, comparou-se a cinética de crescimento do *H. pluvialis* em meio autotrófico SAG sob diferentes intensidades de luz (1,5 e 2,7 Klux). Analisando-se as curvas de crescimento, representadas pela figura 32, é possível visualizar claramente a influência deste fator ambiental no crescimento vegetativo desta microalga.

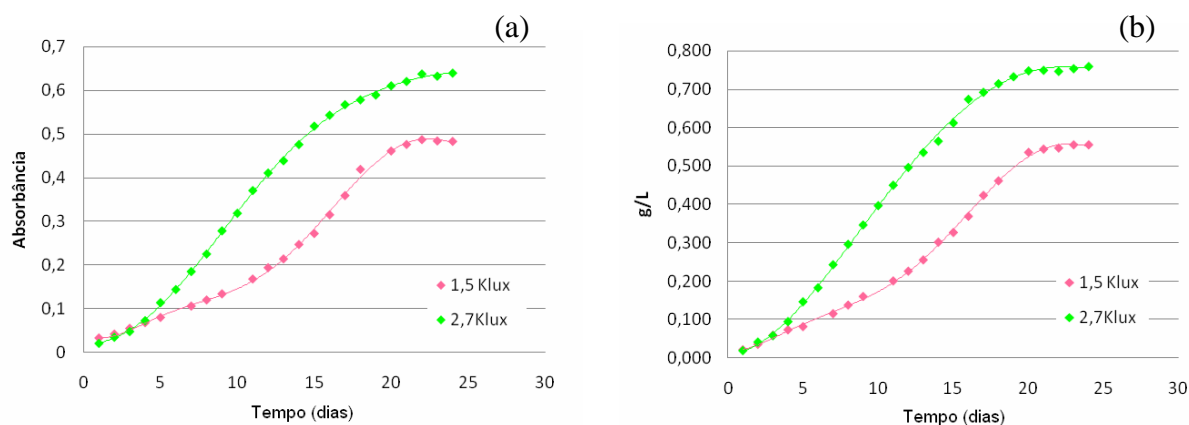


FIGURA 32: (a) Gráfico da absorbância a 550nm em função do tempo em cultivos sob diferentes intensidades de luz; (b) Gráfico do peso seco calculado (método de Katsuda *et al.*, 2004) em função do tempo, em cultivos sob diferentes intensidades de luz.

A partir de modelos criados com os dados da determinação do peso seco, obteve-se as seguintes equações:

Para crescimento em 2,7Klux ($R^2 = 0,999$):

$$\text{Biomassa (g/L)} = 2\text{E-}06x^4 - 0,000x^3 + 0,004x^2 + 0,006x + 0,007$$

Para crescimento em 1,5Klux ($R^2 = 0,999$):

$$\text{Biomassa (g/L)} = 6\text{E-}08x^6 - 5\text{E-}06x^5 + 0,000x^4 - 0,001x^3 + 0,004x^2 + 0,010x + 0,008$$

A velocidade específica média de crescimento sob intensidade de luz 1,5Klux foi de $0,27\text{d}^{-1}$, apresentando máxima contagem celular de $1,26 \times 10^5$ céls/ml no 21º dia, enquanto no cultivo sob intensidade de luz de 2,7 Klux obteve-se velocidade de crescimento de aproximadamente $0,54 \text{d}^{-1}$ e a máxima contagem celular foi de $2,62 \times 10^5$ céls/ml no 17º dia de cultivo, sendo as curvas de crescimento logarítmico observadas na figura 33. A produtividade média obtida no cultivo sob maior intensidade de luz foi $12,9 \times 10^3$ céls. $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, representando um aumento de 89% em relação à produtividade média obtida no meio sob 1,5 Klux ($7,23 \times 10^3$ céls. $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$).

Conforme os valores descritos na literatura e citados anteriormente, os resultados obtidos no cultivo sob intensidade de luz de 2,7 klux está entre os melhores resultados relatados em meio de cultivo autotrófico, refletindo a influência da intensidade de luz sob o cultivo autotrófico do *H. pluvialis*.

Contudo sabe-se que a intensidade de luz deve ser controlada para evitar fotoinibição e indução da formação de cistos. A intensidade de luz ideal para crescimento vegetativo diverge entre os diferentes autores variando de 1,48 Klux (KAEWPINTOG *et al.*, 2006) a 4,44-8,14 Klux (BOUSSIBA *et al.*, 2000). Além disso, Kaewpintog *et al.* (2006) relatou inibição de crescimento a partir de 3,7 Klux. Logo, as intensidades testadas estão dentro dos valores encontrados na literatura.

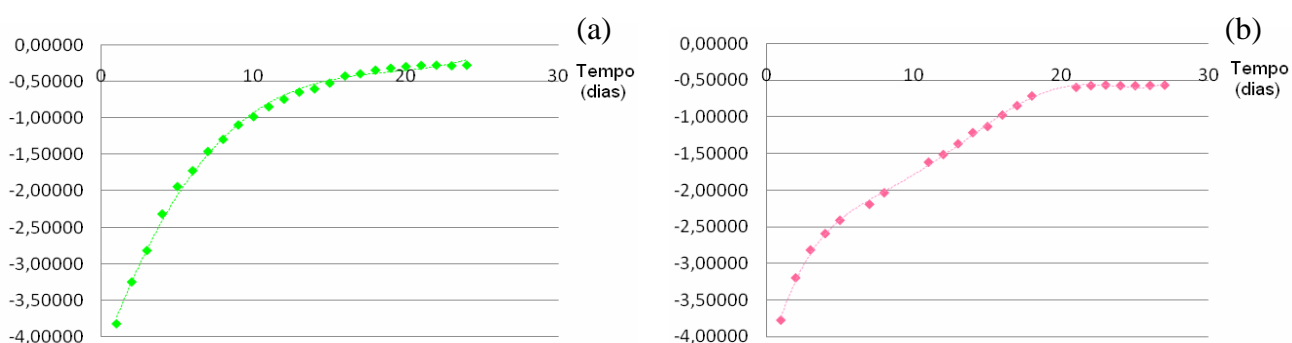


FIGURA 33: (a) Gráfico do logaritmo do peso seco em função do tempo, obtido em meio de cultivo SAG 2,7 Klux. (b) Gráfico logaritmo do peso seco em função do tempo, obtido em meio de cultivo SAG 1,5 Klux .

4.4 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

A relação entre as 4 técnicas utilizadas para análise da biomassa nos experimentos de cinética de crescimento, estão representadas na figura 34, podendo-se observar que as técnicas apresentam excelente proporcionalidade, no entanto considerando-se os valores de peso seco como referência observou-se leve superestimação nos valor obtidos pela determinação da absorbância (550nm). Assim, em razão da praticidade e proporcionalidade da técnica em relação às outras determinações, optou-se por utilizar o peso seco calculado (pelo método de Katsuda *et al.*, 2004), para as medidas de biomassa nos experimentos seguintes.

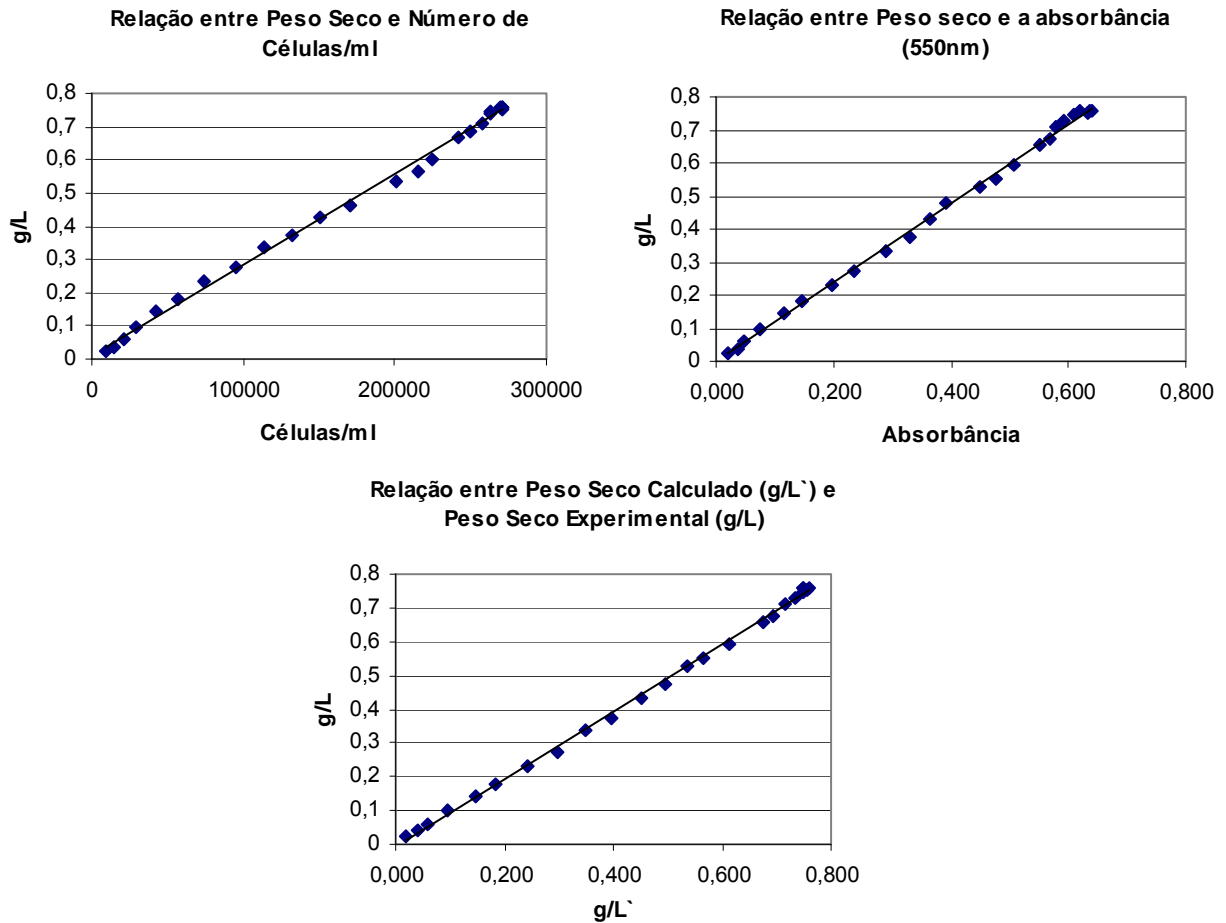


Figura 34: Relação entre as técnicas de determinação da produção de biomassa

4.5 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES pHs INICIAIS

De forma a continuar os estudos de crescimento vegetativo e indução da produção de astaxantina, investigou-se o efeito de diferentes pHs iniciais, visando-se a otimização da produção de biomassa e de pigmento.

A análise do crescimento vegetativo sob diferentes pHs iniciais apresentou velocidade específica média, em cada um dos meios de cultivo, de $0.38d^{-1}$, $0,43 d^{-1}$, $0.45 d^{-1}$, $0.40d^{-1}$ e $0.39d^{-1}$ nos pHs 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0, respectivamente. As curvas de crescimento podem ser visualizadas nas figuras 35 e 36.

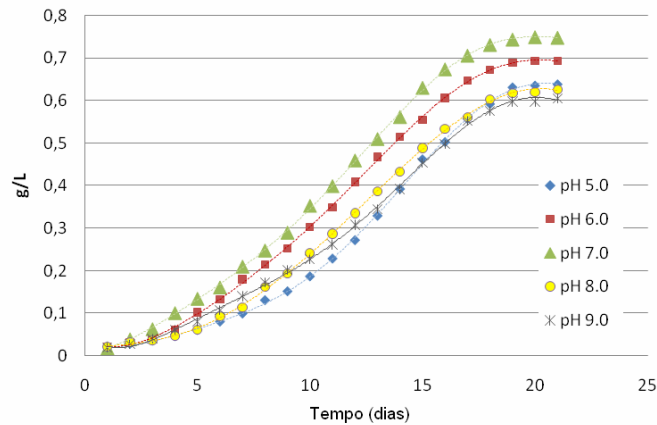


FIGURA 35: Resultados da determinação do peso seco calculado em função do tempo, em meios com diferentes pHs iniciais.

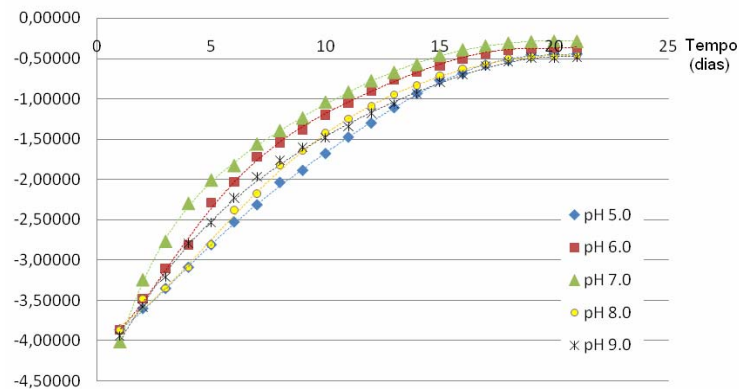


FIGURA 36: Curva logarítmica do peso seco calculado (g/l) em função do tempo, em meios com diferentes pHs iniciais.

Observou-se durante o crescimento um considerável e rápido aumento no pH do meio, como pode ser visualizado na figura 37, com estabilização após o 11º dia de cultivo, possivelmente devido ao consumo, pela microalga, dos ânions que são nutrientes. Mesmo assim, o pH inicial teve influência sobre o crescimento vegetativo. As produtividades médias obtidas nos meios sob pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0 foram respectivamente $0,035 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, $0,040 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, $0,043 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, $0,034 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, $0,034 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$. Logo, a faixa de pH inicial de 6.0 -7.0 apresentou os melhores resultados de velocidade de crescimento e produtividade média em relação aos outros cultivos, embora se tenha observado pouca influência do pH inicial sob o crescimento vegetativo. Os resultados obtidos são semelhantes aos relatados por Labapour *et al.* (2004) que testou diferentes pHs iniciais (6,8, 7,8 e 8,8) e observou aumento do pH para 10.0 após 150 horas de cultivo e crescimento semelhante em todos os meios de cultivo. Sarada *et al.* (2002), utilizando meio BBM sob diferentes pHs iniciais

observaram máxima contagem celular em culturas a pH 7.0, não havendo crescimento em pH 5.0 e a menor contagem celular observada foi em pH 9.0.

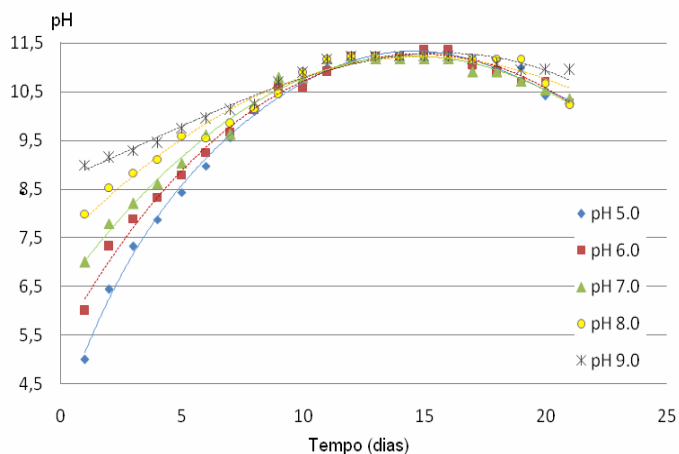


FIGURA 37: Mudança do pH durante o cultivo em meios de cultura com diferentes pHs iniciais.

A indução da produção de astaxantina foi realizada no 21º dia de cultivo, expondo as culturas a condições de stress, por alta intensidade de luz. Conforme é observado na figura 38, o pH inicial do meio teve influência significativa sob a indução de stress no cultivo de *H. pluvialis*. Os meios com pH 8.0 e 9.0 foram os primeiros a apresentar produção de astaxantina com rápida degradação da clorofila. Os demais meios mostraram lenta produção de astaxantina e degradação da clorofila, mostrando-se de coloração verde-amarronzada, embora microscopicamente, observou-se a formação de cistos celulares, mas sem acúmulo aparente de astaxantina. Possivelmente este resultado se deva aos meios em pH 8.0 e 9.0 terem entrado em fase de declínio antes dos demais, mostrando-se como um fator de stress importante para produção de cistos com astaxantina. Nossos resultados foram contrários aos relatados por Sarada *et al.* (2002), que observaram maior produção de astaxantina nas culturas que cresceram em pH inicial 7.0 em relação às que cresceram em pH 6.0, 8.0 e 9.0. No entanto, Sarada *et al.*, 2002 também observaram que a melhor produção de astaxantina por condição de stress precede drástica degradação da clorofila.

Os resultados mostraram que a resposta ao de stress varia com o pH inicial do meio e os pHs 8.0 e 9.0 foram os melhores em termos de produção de astaxantina.

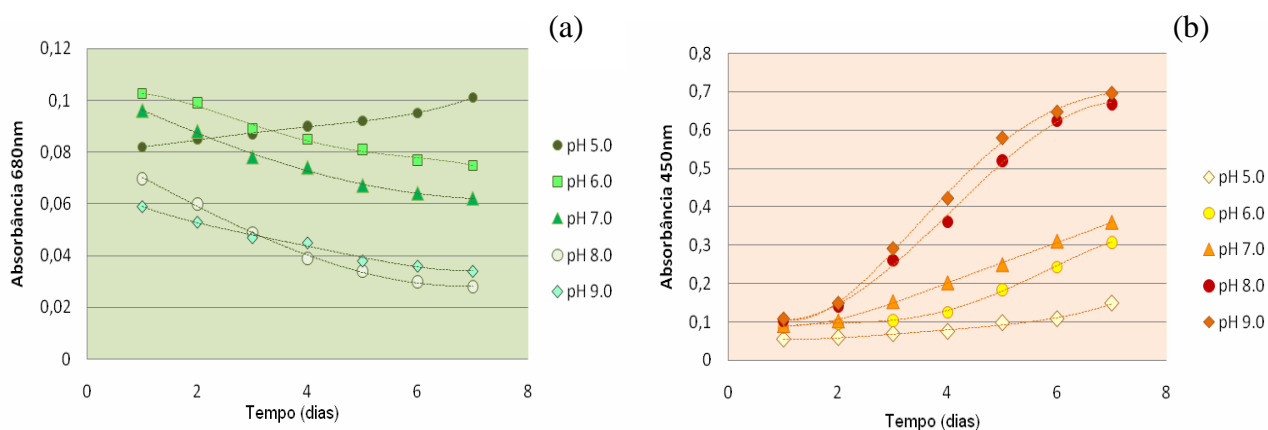


FIGURA 38: (a) Gráfico da absorbância a 680 nm (proporcional à concentração de clorofila);
(b) Gráfico da absorbância a 480 nm (proporcional à concentração de astaxantina).

4.6 ANÁLISE DA INFLUENCIA DE DIFERENTES pHs CONTROLADOS

O crescimento vegetativo sob pH controlado apresentou resultados significativamente melhores, além de ter apresentado maior influência sobre o crescimento vegetativo, que o experimento anterior com pHs iniciais. Conforme é visualizado nas figuras 39 e 40, o cultivo em pH 7.0 apresentou novamente os melhores resultados para obtenção de biomassa, contudo observou-se fácil contaminação do cultivo sob esta condição. As velocidades específicas médias estimadas em cada um dos meios de cultivo foram de $0,18d^{-1}$; $0,45 d^{-1}$; $0,58 d^{-1}$; $0,40d^{-1}$ e $0,39d^{-1}$ nos pHs 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0, respectivamente. Todos os cultivos comportaram-se melhor sobre pH controlado que sob pH inicial, com exceção do cultivo em pH 5.0 que tem se mostrado inadequado para produção de biomassa de *H. pluvialis*. As produtividades obtidas foram de $0,028 g.L^{-1}d^{-1}$, $0,053 g.L^{-1}d^{-1}$, $0,076 g.L^{-1}d^{-1}$, $0,045 g.L^{-1}d^{-1}$ e $0,043 g.L^{-1}d^{-1}$. Não foi encontrado, nas referências consultadas, relatos na literatura utilizando cultivo com pH controlado, por isso não foi possível comparar nossos resultados.

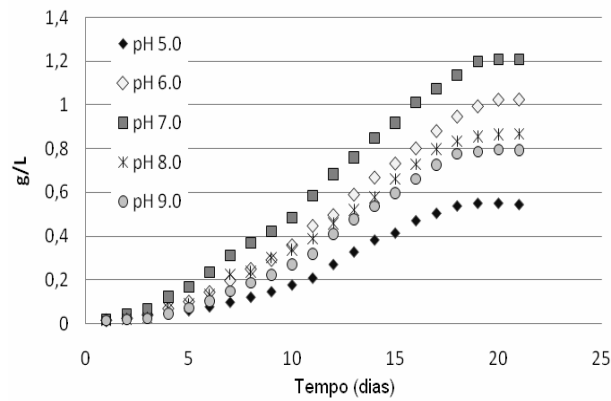


FIGURA 39: Gráfico de crescimento vegetativo, obtido pela determinação do peso seco em função do tempo, em meios de cultivo com diferentes pHs controlados.

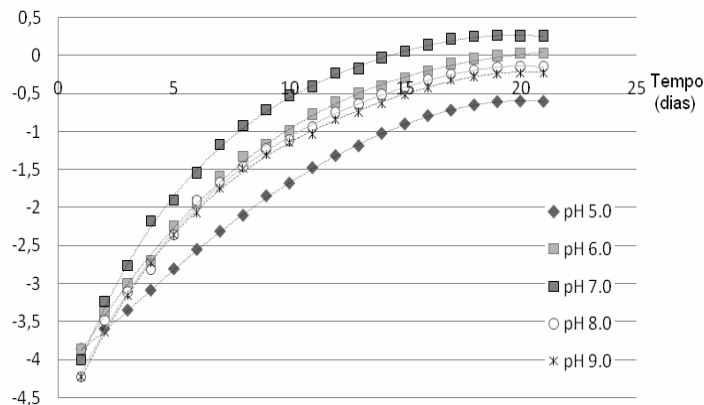


FIGURA 40: Gráfico do logaritmo do peso seco em função do tempo, em meios de cultivo com diferentes pHs controlados.

Os resultados obtidos pela indução da produção de astaxantina sob alta intensidade de luz em cultivos com pH controlado foram os mesmos observados anteriormente nos cultivos com diferentes pHs iniciais. A figura 41 mostra nitidamente a produção de astaxantina nos cultivos em pH 8.0 e 9.0 no 6º dia de indução enquanto os outros cultivos (pH 5.0, 6.0 e 7.0) permaneceram verdes. Logo, os cultivos em pH 8.0 e 9.0 mostraram-se novamente como condição alternativa para indução de stress na biomassa de *H. pluvialis*, destacando-se o cultivo em pH 8.0 em que a degradação da clorofila foi mais rápida que o cultivo em pH 9.0.



FIGURA 41: Da esquerda para direita estão os cultivos em pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0, respectivamente, após a indução de stress por alta intensidade de luz.

4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES pHs E SALINIDADES

Realizou-se um planejamento experimental com duas variáveis independentes, pH e salinidade, visando-se avaliar as melhores condições de crescimento vegetativo e produção de astaxantina sob estes parâmetros, além de verificar a sensibilidade desta microalga à salinidade. O planejamento contou com 9 pontos e foi analisado por 21 dias para crescimento vegetativo e por 6 dias após a indução para avaliação da produção de astaxantina.

Plotando-se os dados de crescimento vegetativo, por determinação do peso seco, em função do tempo (figura 42), verificou-se um máximo de população em pH 7.0 e 0% de sal, havendo inibição do crescimento nos meios sob concentração de sal a partir de 0,4% .

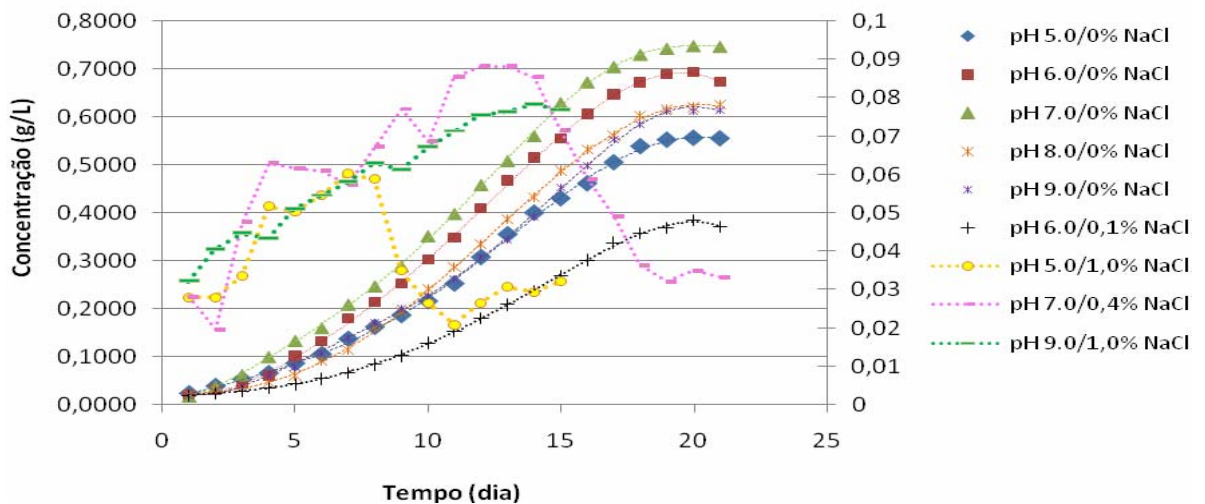


Figura 42: Gráfico da concentração de biomassa em função do tempo, para diferentes pHs e concentrações de NaCl durante o cultivo. Utilizou-se a escala secundária para os cultivos em pH 5.0/1,0% NaCl, pH 7.0/0,4% NaCl e pH 9.0/1,0% NaCl.

O maior crescimento em pH 7.0/0% NaCl era esperado; quanto ao comportamento da microalga em outros pHs e salinidades, utilizou-se os dados para gerar modelos (Figura 43), a partir dos quais foi determinada a velocidade e produtividade da biomassa; estes dados foram, por sua vez, usados para gerar uma superfície de resposta usando o software Statistica, que podem ser visualizados a seguir (Figuras 44, 45 e 46).

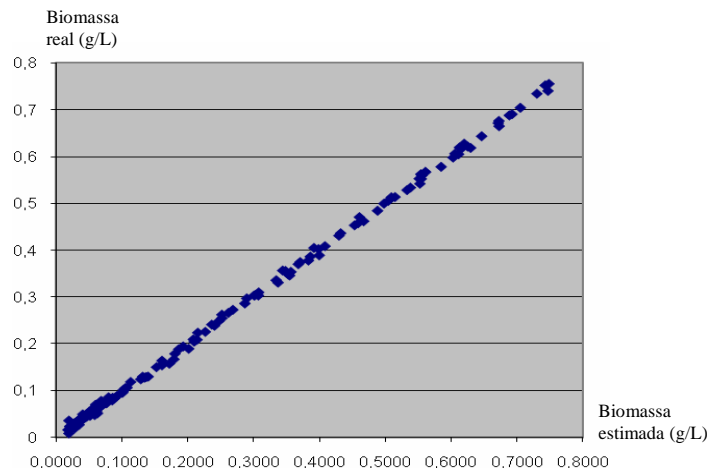


Figura 43: Relação entre a biomassa estimada e a biomassa real para todos os modelos, indicando boa correlação entre valor real e estimado.

Tabela 8: Dados do modelo de crescimento utilizados para avaliação estatística.

<i>pH</i>	<i>Salinidade</i>	μ (d^{-1})	<i>Produtividade máxima</i> ($g.L^{-1}d^{-1}$)
5,0	0	0,27	0,041
6,0	0	0,41	0,053
7,0	0	0,49	0,059
8,0	0	0,35	0,050
9,0	0	0,34	0,046
5,0	1	0,34	0,012
6,0	0,1	0,21	0,031
7,0	0,4	0,15	0,007
9,0	1	0,07	0,003

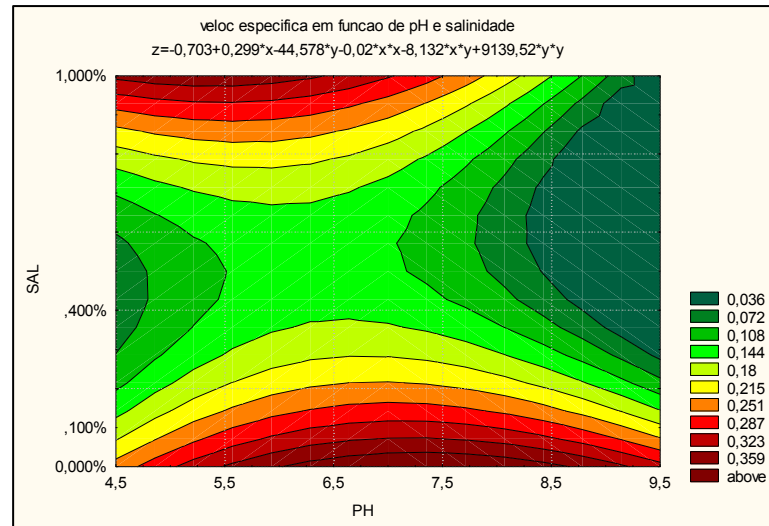


FIGURA 44: Velocidade específica de crescimento em função do pH e salinidade.

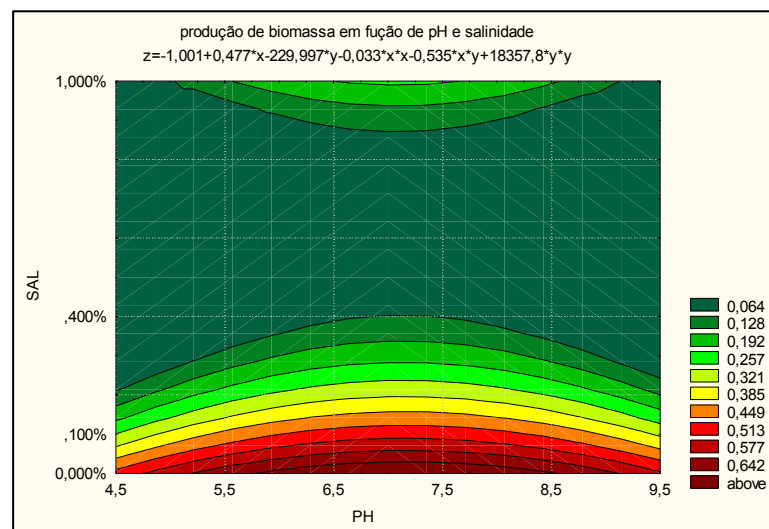


FIGURA 45: Diagrama da produção de biomassa em função do pH e salinidade.

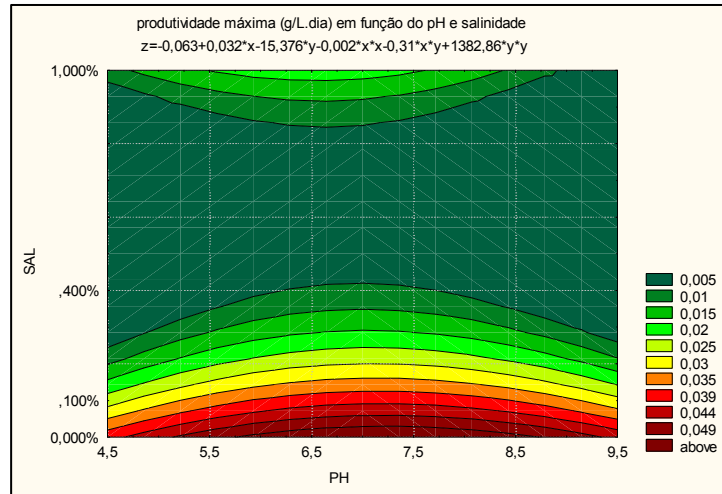


FIGURA 46: Diagrama da produtividade máxima de biomassa em função do pH e salinidade.

Estatisticamente, os pontos de salinidade e pH analisados foram insuficientes para definir com precisão o ponto ótimo para crescimento vegetativo do *H. pluvialis*, logo, os gráficos obtidos apresentaram um elevado grau de incerteza à análise. De acordo com a análise do Statistica, não é possível afirmar que haja efeito significativo do pH ou da salinidade na velocidade específica máxima de crescimento, na faixa analisada, no entanto, houve significativo efeito linear negativo da salinidade na produtividade de biomassa, ficando clara a sensibilidade do *H. pluvialis* a altas salinidades. Contudo, conforme era esperado, verificou-se que altas salinidades são inibitórias ao crescimento vegetativo, sendo os melhores resultados obtidos em ausência de sal e o pH ideal provavelmente encontra-se na faixa de 6,5 e 7,5.

Para avaliar a influência do pH e salinidade sob a produção de astaxantina inicialmente analisou-se a absorvância em 480nm em função do tempo, conforme a figura 47, e a relação entre a clorofila e astaxantina, conforme a figura 48.

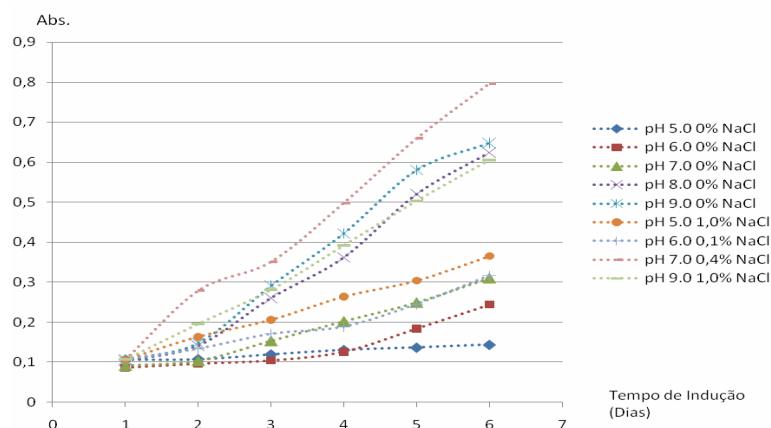


Figura 47: Gráfico da absorvância a 480nm em função do tempo, sob diferentes condições de pH e salinidade

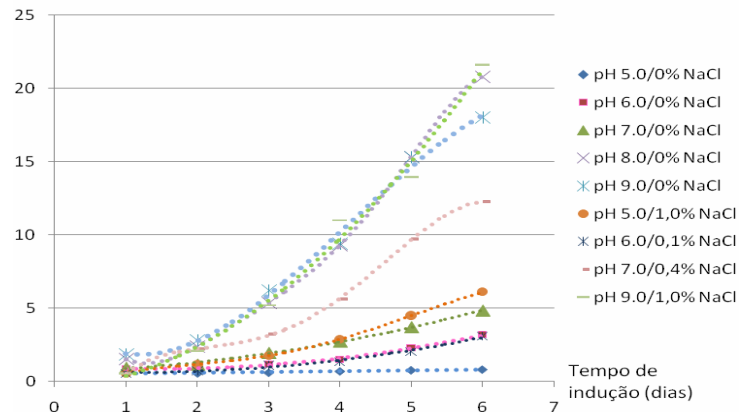


Figura 48: Gráfico da relação 480:680nm (proporcional a relação Ax/Chl) em função do tempo, sob diferentes condições de pH e salinidades.

A partir dos dados de produção de astaxantina, razão abs 480/ abs 680 (proporcional a relação Ax/Chl) e a velocidade de variação dessa razão, descritos na tabela 9, foram criados modelos utilizados para gerar gráficos 3D no Statistica, que são visualizados nas figuras 49, 50 e 51.

Tabela 9: Dados do modelo de indução da astaxantina, utilizados para avaliação estatística.

<i>pH</i>	<i>salinidade</i>	<i>abs 450</i>	<i>ax/chl max</i>	<i>veloc. Encistamento (d⁻¹)</i>
5	0	0,144	0,625429	0,091732
6	0	0,244	3,18776	1,1688839
7	0	0,31	4,829979	0,6131642
8	0	0,624	20,87525	5,9063904
9	0	0,648	18,17157	4,5766495
5	1	0,365	6,118066	1,9073098
6	0,1	0,316	3,063188	1,307575
7	0,4	0,796	12,54532	3,4426714
9	1	0,605	21,55705	8,6497445

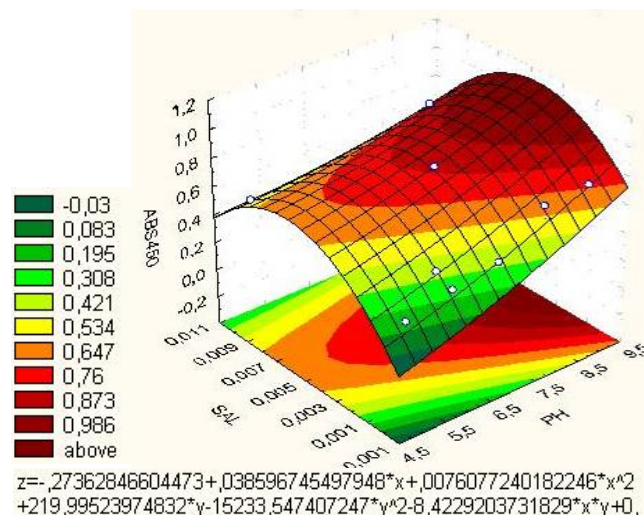


FIGURA 49: Gráfico 3D da absorvância a 480nm em função do pH e salinidade.

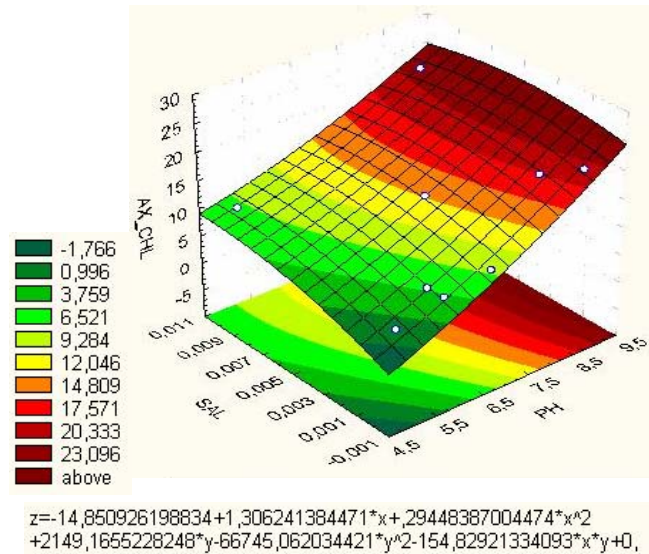


Figura 50: Gráfico 3D da razão Ax/Chl em função do pH e salinidade.

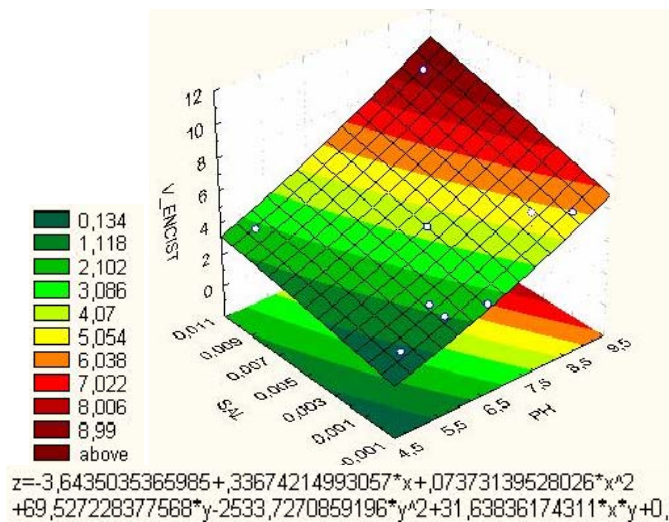


Figura 51: Gráfico 3D da velocidade de encistamento [d(Ax/Chl)/dt] em função do pH e salinidade.

A regressão feita utilizando o software mostrou significativo efeito linear positivo do pH e quadrático negativo da salinidade sobre a variação da absorbância a 480nm, o que significa que maiores pHs induziram a produção de astaxantina enquanto a salinidade apresentou efeito positivo até um limite a partir do qual observou-se efeito negativo. A velocidade de encistamento e a relação Ax/Chl variaram linearmente com o pH. Possivelmente, o ponto ótimo de obtenção de astaxantina está num intervalo de salinidade entre 0,5 e 0,7% e pH maior que 8,0. Fica claro, que tanto os valores de pH quanto salinidade têm importante influência sobre a produção de astaxantina.

Não se encontrou, nas referências consultadas relatos da avaliação simultânea destes parâmetros sobre o crescimento vegetativo e produção de astaxantina para comparação dos resultados obtidos, no entanto várias pesquisas têm apresentado concentração de sal entre 0,2% e 0,4% (CORDEIRO *et al.*, 1996; HARKER *et al.*, 1996) como ideal para encistamento, sendo observado branqueamento celular sob concentrações superiores a 0,8% (CIFUENTES *et al.*, 2003; HARKER *et al.*, 1996).

4.8 CINÉTICA DE CRESCIMENTO COM DIFERENTES LEDS E INFLUÊNCIA SOBRE A PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA.

O LED é um diodo semiconductor que quando energizado emite luz visível monocromática, produzida pelas interações energéticas do elétron. Vários artigos tem relatado a utilização de LEDs para a fotossíntese em plantas com mais eficiência do que as lâmpadas fluorescentes e incandescentes (TENNESSEN *et al.*, 1995; SMITH, 1982; GOINS *et al.*, 1997). Logo, uma vez que o *H. pluvialis* é um microrganismo fotossintético, testamos 6 diferentes cores de LEDs (vermelho, branco, alaranjado, azul, verde e violeta) em cultivo autotrófico, para avaliar a influencia sobre o crescimento do vegetativo e formação de cistos.

Os resultados obtidos no cultivo sob diferentes LEDs estão ilustrados nas figuras 52, 53, 54 e 55. Observou-se inibição do crescimento e/ou morte celular nos cultivos sob iluminação verde, violeta e laranja. No entanto nos cultivos com LEDs branco, vermelho e azul observou-se velocidades específicas médias de crescimento de $0.34d^{-1}$, $0.50d^{-1}$ e $0,38d^{-1}$ e produtividade média de $0.019 g.L^{-1}d^{-1}$, $0,030 g.L^{-1}d^{-1}$ e $0,016 g.L^{-1}d^{-1}$, respectivamente. Já foi reportado por Katsuda *et al.* (2004) a indução do crescimento vegetativo com a utilização de LED vermelho em cultivo de *H. pluvialis*, no entanto este observou supressão do crescimento vegetativo sob LED azul e a indução de intenso acúmulo de astaxantina. Além disso, observamos crescimento vegetativo sob LED branco, que atualmente não são vendidos emitindo luz branca pura resultando da mistura de azul, vermelho e verde (General Electrical Company, 2007), justificando o crescimento intermediário entre o LED vermelho e o azul em nosso experimento.

Contudo, a velocidade de crescimento relatada por Katsuda *et al.* (2004) em cultivo mixotrófico com LEDs vermelho foi de $0,60d^{-1}$ e, em detrimento com nossas

cinéticas anteriores, acreditamos que nossos resultados de crescimento vegetativo podem ser melhorados com aplicação de maior intensidade de luz vermelha e associando-se estratégias como pH controlado ou cultivo mixotrófico para otimização da produção de biomassa.

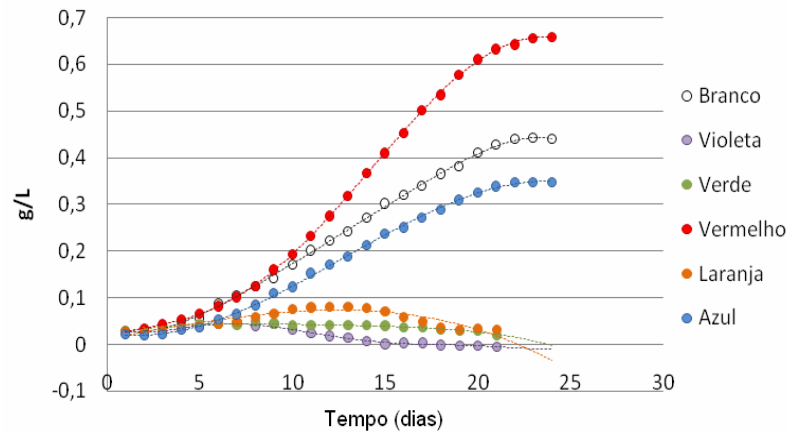


FIGURA 52: Gráfico de crescimento vegetativo, obtido pela determinação do peso seco calculado, em meios sob iluminação com diferentes LEDs.

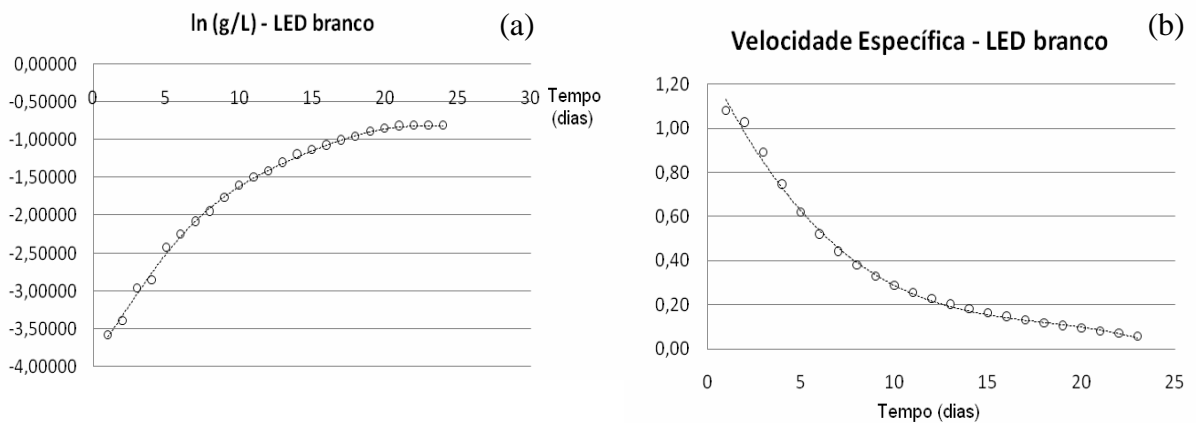


FIGURA 53: (a) Gráfico do logaritmo do peso seco calculado, obtido em cultivo sob iluminação de LED branco; (b) Curva de velocidade específica de crescimento em cultivo sob iluminação de LED branco, baseado na determinação do peso seco calculado.

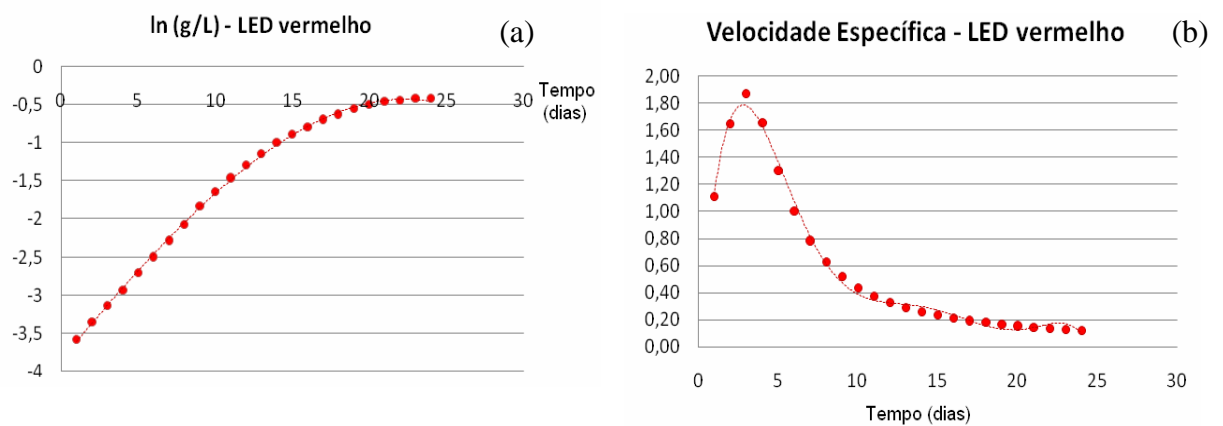


FIGURA 54: (a) Gráfico do logaritmo do peso seco calculado obtido em cultivo sob iluminação de LED vermelho; (b) Curva de velocidade específica de crescimento em meio de cultivo sob iluminação de LED vermelho, baseado na determinação do peso seco calculado.

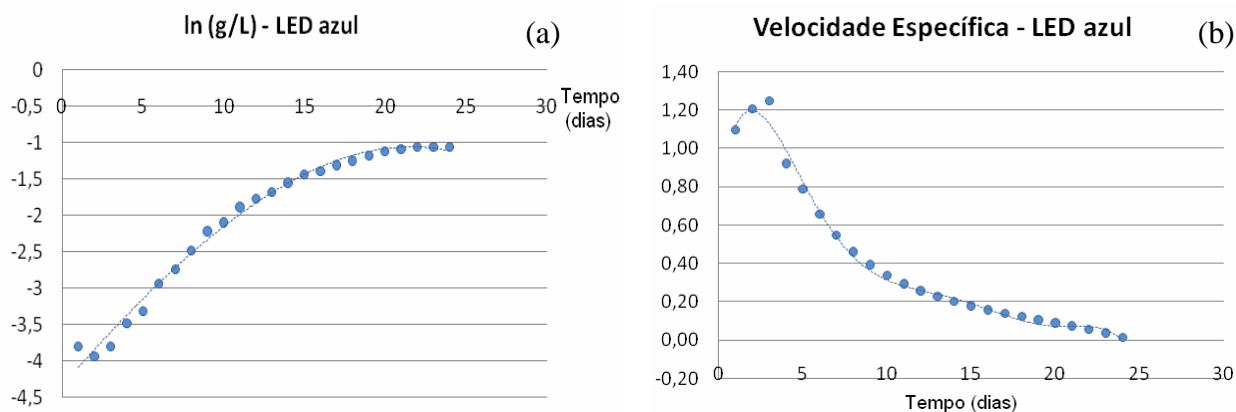


FIGURA 55: (a) Gráfico do logaritmo do peso seco calculado, obtido em cultivo sob iluminação de LED azul; (b) Curva de velocidade específica de crescimento em meio de cultivo sob iluminação de LED azul, baseado na determinação do peso seco.

Os dados de biomassa obtidos pela determinação do peso seco calculado no meios com LEDs branco, vermelho e azul, foram utilizados para gerar modelos polinomiais, representados pelas seguintes equações:

Para o cultivo com LED branco ($R^2 = 0,999$):

$$\text{Biomassa (g/L)} = -6\text{E-}05x^3 + 0,002x^2 - 0,001x + 0,023$$

Para o Cultivo com LED vermelho ($R^2 = 0,998$):

$$\text{Biomassa (g/L)} = -0,000x^3 + 0,005x^2 - 0,024x + 0,065$$

Para o Cultivo com LED azul ($R^2 = 0,999$):

$$\text{Biomassa (g/L)} = -6\text{E-}05x^3 + 0,002x^2 - 0,007x + 0,025$$

Quanto a influência dos LEDs na indução de produção de astaxantina não observou-se produção aparente de astaxantina em nenhum dos cultivos por 10 dias. No entanto no cultivo sob iluminação azul verificou-se a formação de pequenas incrustações de cistos vermelhos nas paredes do erlenmeyer exatamente nas posições onde o LED estava fixado, assim possivelmente o LED azul exerça influência sobre a produção de astaxantina, como relatado por Katsuda *et al.* (2004), mas é provável que em nossos experimentos a intensidade utilizada tenha sido inferior a necessária. Ou ainda, supõe-se que a indução da produção de astaxantina não esteja diretamente relacionada à emissão de LED azul e sim ao stress pela intensidade de luz aplicada, uma vez que, tem-se relatado que o espectro de absorção na luz visível da clorofila concentra-se na faixa da luz vermelha (660nm) e azul (430nm) (GOINS *et al.*, 1997), melhorando o processo de fotossíntese em

plantas com a aplicação de “reforços” nessa faixa espectral com LEDs (TENNESSEN *et al.*, 1995; SMITH, 1982; GOINS *et al.*, 1997) o que possivelmente, seria aplicável à estimulação do crescimento microalgal.

4.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES SALINIDADES E INTENSIDADES DE LUZ

Aplicando-se três diferentes intensidades de luz (3,5, 5,3, 7,0 Klux), a 5 diferentes concentrações de sal (0, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,0%) sob células de *H. pluvialis* na fase estacionária de crescimento, realizou-se um planejamento experimental com 2 variáveis independentes (em 3 e 5 níveis) e 15 pontos. O aumento da absorbância a 480nm em função do tempo de indução em cada ponto é visualizado na figura 56, onde observa-se aumento da absorbância em todos os níveis de indução e as figuras 57 e 58 mostram a absorbância a 680nm e a relação Ax/Chl em função do tempo de indução, respectivamente.

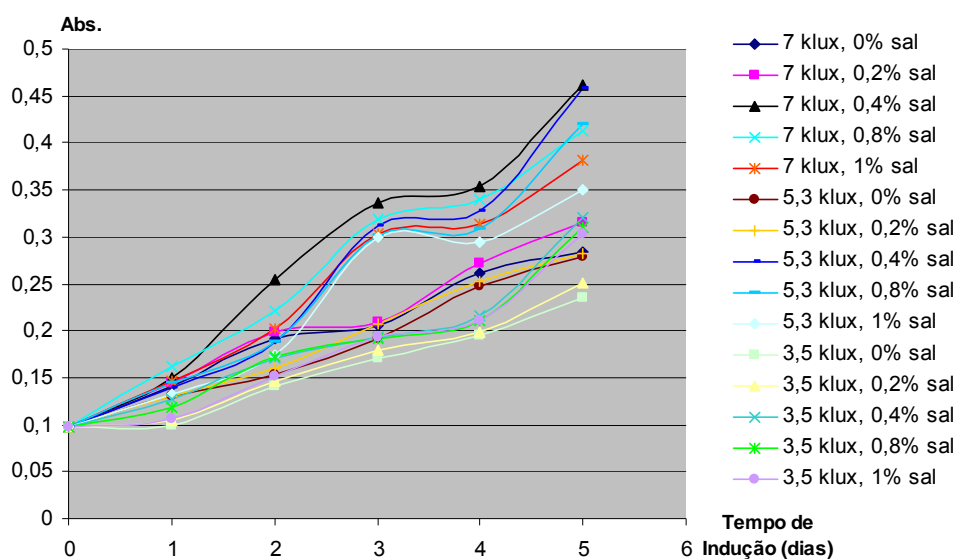


Figura 56: Gráfico da absorbância a 480nm em função do tempo, sob diferentes condições de irradiação e salinidade.

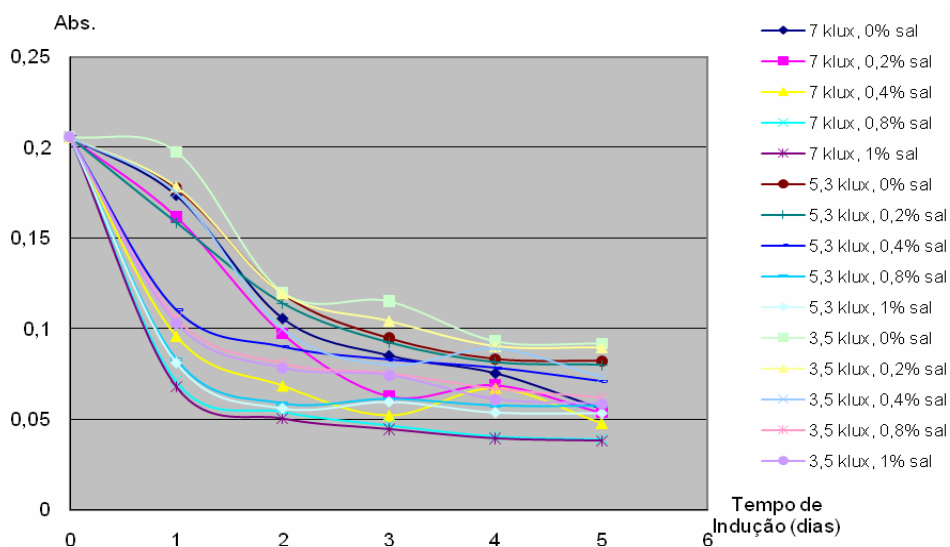


Figura 57: Gráfico da absorvância a 680nm em função do tempo, sob diferentes condições de irradiação e salinidade.

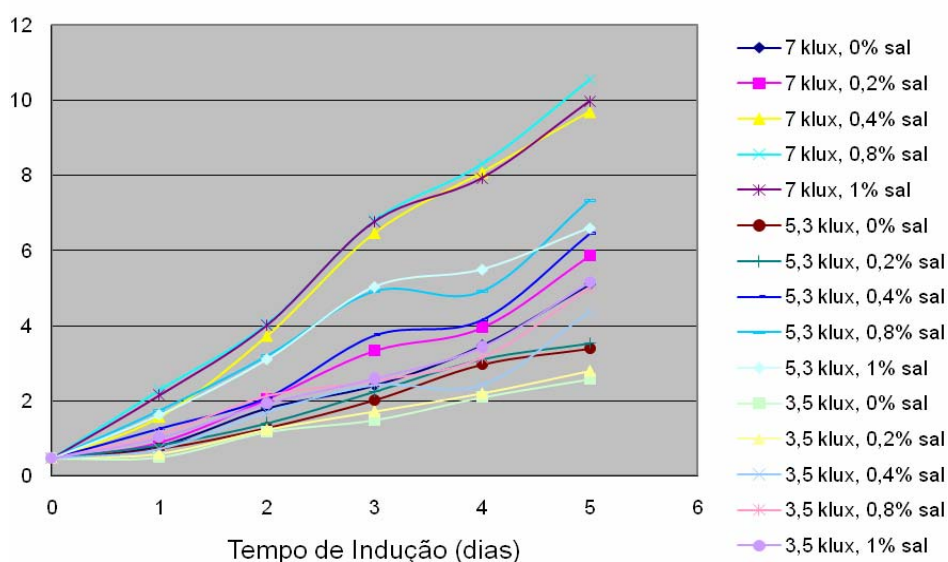
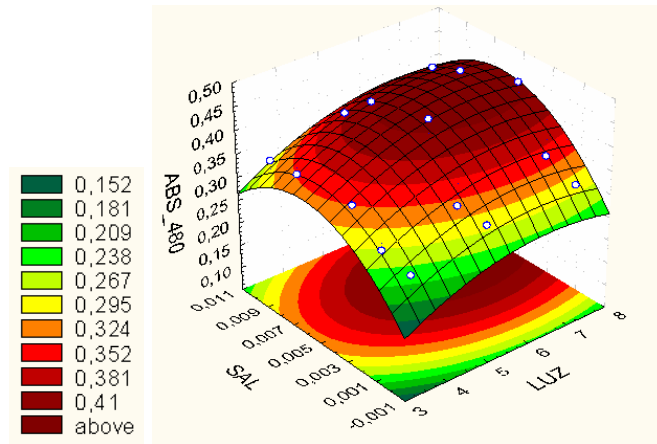


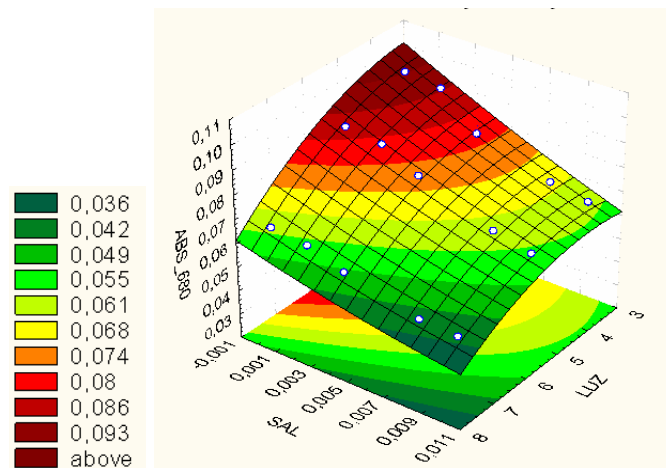
Figura 58: Gráfico da relação Ax/Chl em função do tempo, sob diferentes condições de irradiação e salinidade.

A partir dos dados acima, criou-se modelos que foram utilizados para gerar superfícies de resposta, por regressão, no Statistica, da absorvância 480nm, 680nm e relação Ax/Chl em função da salinidade e intensidade de luz que são visualizados nas figuras 59, 60 e 61.



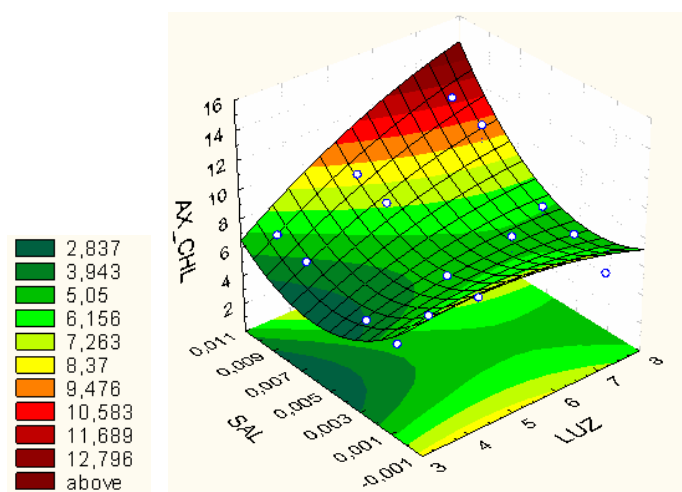
$$z = -.0921 + .1149 * x - .0088 * x^2 + 43.75 * y - 3820 * y^2 + .7559 * x * y$$

FIGURA 59: Gráfico 3D da absorvância a 480nm em função da salinidade e intensidade de luz.



$$z = .0828 + .0087 * x - .0016 * x^2 - 5.760 * y + 56.63 * y^2 + .4228 * x * y$$

FIGURA 60: Gráfico 3D da absorvância a 680nm em função da salinidade e intensidade de luz.



$$z = 2.880 + 1.594 * x - .1687 * x^2 - 2031 * y + 1195 * y^2 + 192.7 * x * y$$

FIGURA 61: Gráfico 3D da relação Ax/Chl em função da salinidade e intensidade de luz.

Estatisticamente, o modelo proposto apresentou influência positiva linear da intensidade de luz e salinidade sob a absorbância 450nm, no entanto a salinidade apresentou influência negativa (quadrática), refletindo um intervalo ótimo de salinidade para indução da produção de astaxantina. Aproximadamente no intervalo entre 0,5 e 0,7% as NaCl e intensidade de luz a partir de 7,0 Klux estariam as melhores condições de encistamento e salinidades; a partir de 0,7% diminuiria a concentração de astaxantina, possivelmente devido ao aumento da mortalidade celular. Tanto o aumento da intensidade de luz quanto de salinidade têm efeito negativo sobre a concentração de clorofila (absorbância 680nm) e positivo sobre a razão Ax/Chl.

Nossos resultados indicam que tanto a intensidade de luz quanto a concentração de sal foram fatores significativos na indução da produção de astaxantina em *H. pluvialis*, contudo, o Statistica indicou maior efeito do aumento da intensidade de luz sobre a carotenogênese que a salinidade. Vários estudos têm sido publicados utilizando-se isoladamente altas intensidades de luz e diferentes salinidades para a indução da produção de astaxantina. Dentre eles, tem-se relatado que o efeito da luz é o fator indutivo isolado mais importante para a indução da astaxantina (KIM *et al.*, 2006) em relação à indução por salinidade, deficiência de nitrogênio (HARKER *et al.*, 1996, CINFUENTES *et al.*, 2003) e altos níveis de ferro (HARKER *et al.*, 1996).

Os valores ótimos de intensidade de luz para indução de astaxantina, encontrados nas referências consultadas varia de 6,3 a 11,1 Klux (CIFUENTES *et al.*, 2003; HARKER *et al.*, 1996). Quanto a salinidade, embora muitos autores tenha relatado bons resultados na carotenogênese com concentrações menores de sal (0,2%) (CORDEIRO *et al.*, 1996) e alta taxa de mortalidade sob stress salino a 0.8% (CIFUENTES *et al.*, 2003, HARKER *et al.*, 1996). Logo, os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados em literatura.

Tem-se relatado também drástica degradação da clorofila durante a carotenogênese em vários artigos (CIFUENTES *et al.*, 2003, SARADA *et al.*, 2002). Do inicio da indução (fase estacionaria de crescimento com presença de aplanósporos) ao sexto dia de análise, observamos degradação de 82% sob o conteúdo de clorofila na condição de 7,0 klux/1,0% NaCl e 57% sob 3,5 klux e 0% NaCl.

4.10 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

A facilidade de contaminação de cultivos mixotróficos por bactérias, nos levou a verificar a resistência do *H. pluvialis* a diversos antibióticos. Dentre os 24 antibióticos testados observou-se resistência da microalga *H. pluvialis* aos antibióticos listados na tabela 10, pela observação de colônias do *H. pluvialis* próximas ao disco, enquanto nos demais, observou-se halo de inibição. A adição de antibióticos ao meio de cultivo possibilitaria o cultivo mixotróficos, heterotrófico e, ainda, cultivo autotrófico aberto, com menor potencial ou ausência de contaminação.

TABELA 10 - Antibióticos para os quais observou-se resistência do *H. pluvialis* é resistente.

Ampicilina 10 mcg	Cefazolina 30 mcg	Gentamicina 10 mcg
Amoxicilina 10 mcg	Cefepime 30 mcg	Ofloxacina 5 mcg
Bacitracina 20 mcg	Cefotaxima 30 mcg	

Recentemente, um estudo da aplicação de antibiótico para cultivo axênico de *H. pluvialis* foi publicado por Joo e Lee (2007) que testaram 12 diferentes antibióticos (cefalosporina, griseofulvina, bacitracina, polimixina B, anfotericina B, eritromicina, neomicina, tetraciclina, gentamicina, rifamicina, ampicilina e canamicina) e observaram resistência com cefalosporina, griseofulvina, anfotericina B e ampicilina. No entanto Joo e Lee, 2007 observaram que a cefalosporina e a anfotericina B afetaram o crescimento da cultura e induziram a formação de astaxantina, por outro lado, a adição de griseofulvina ou ampicilina não afetou o metabolismo celular e permitiu aumento da produtividade, com resultados de densidade celular comparáveis as obtidas em cultivo fechado, o qual é 10-30% maior que as obtidas em cultivos abertos sem esterilidade.

Logo, acredita-se que a suplementação de antibióticos apropriados aos meio de cultivo pode ser uma ferramenta eficiente, podendo reduzir a contaminação sem afetar o crescimento ou outros metabolismos, embora mais estudos devem ser realizados para verificar a influência destes sobre a microalga.

4.11 AVALIAÇÃO DE MÉTODO QUÍMICO DE EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA

O método de Sedmak *et al.* (1990), é um método químico utilizado para extração de astaxantina na levedura *X. dendrorhous*. Segundo Sedmak *et al.* (1990)

este método é rápido, quantitativo, reproduzível e pode ser usado em pequenos volumes de amostra. Devido à praticidade deste método em pequenas quantidades de amostra tentou-se adaptá-lo para a extração da astaxantina na microalga *H. pluvialis* evitando-se assim, utilizar-se métodos mecânicos que requerem maiores quantidades de amostra e são mais lentos.

Pode-se observar na figura 62, que o método de Sedmak foi eficiente na extração do pigmento astaxantina nos cistos de *H. pluvialis*, sendo observado completa extração do sedimento (2ml de amostra) após 2 repetições do método utilizando acetona como solvente extrator. Embora se tenha observado microscopicamente o rompimento de algumas células, a figura 63 indica que, possivelmente, a extração ocorra por permeabilização da membrana celular. A ruptura com DMSO é um método rápido e reproduzível em comparação aos métodos mecânicos, logo é um método alternativo que pode ser usado com eficiência para a extração da astaxantina em células de *H. pluvialis*.

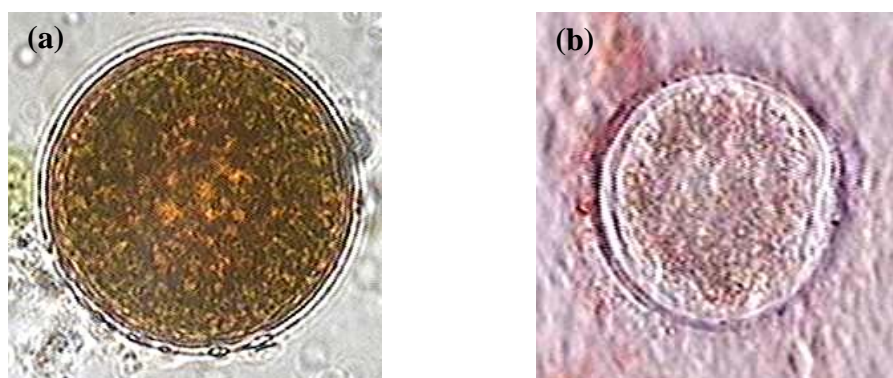


FIGURA 62: (a) Cisto integro de *H. pluvialis*; (b) Cisto de *H. pluvialis* durante extração pelo método de Sedmak.



FIGURA 63: Células de *H. pluvialis* após a primeira extração pelo Método de Sedmak, utilizando acetona como solvente extrator

4.12 COMPARAÇÃO ENTRE SOLVENTES EXTRATORES

Como foi apresentado na revisão bibliográfica (pg. 73), tem se observado a extração da astaxantina utilizando-se diversos solventes extratores e, dentre eles, a acetona tem sido um dos solventes orgânicos mais relatados em artigos para extração de astaxantina.

Avaliou-se o potencial extrator dos solventes orgânicos: acetona, acetonitrila, clorofórmio, hexano e mistura de diclorometano:metanol (25:75 v/v). Segundo os resultados expostos na figura 64, dentre os solventes analisados, o de maior potencial extrator da astaxantina foi a mistura de diclorometano:metanol e em seguida a acetona. No entanto, comparando-se as absorbâncias obtidas a 680nm e 455nm observou-se maior extração das clorofilas *a* e *b*, respectivamente, pela acetona que pela mistura de diclorometano:metanol. Para a completa extração do pigmento astaxantina das células de *H. pluvialis* o método de Sedmak precisou ser repetido 2 vezes com a mistura diclorometano:metanol, 4 vezes com a acetona, 6 vezes com acetonitrila, 7 vezes com clorofórmio e mais de 8 vezes com o hexano.

Lababpour e Lee (2005) testaram diversos solventes orgânicos (metanol, hexano, clorofórmio, *n*-propanol e acetonitrila) e selecionaram a acetona como o melhor para a extração do pigmento devido sua boa sensibilidade e baixa toxicidade em relação aos demais testados. Lababpour e Lee (2005), também observaram máxima absorbância da clorofila em acetona e mínima em clorofórmio, enquanto a astaxantina mostrou máxima absorbância em acetonitrila e mínima em *n*-propanol. Em nosso estudo a astaxantina apresentou menor absorção em acetonitrila que em acetona.

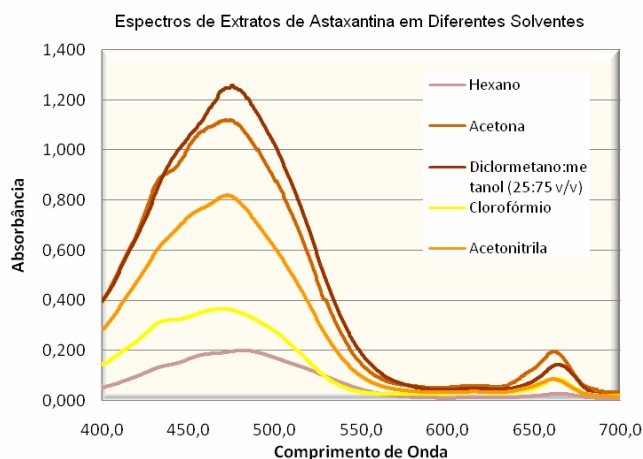


FIGURA 64: Gráfico da extração da astaxantina com diferentes solventes (amostra diluída 1:2).

A eficiência do diclorometano:metanol (25:75 v/v) já havia sido relatado anteriormente por Johnson e An, 1991 observando que 1L de diclorometano pode dissolver 30g de astaxantina a temperatura ambiente e a solubilidade é maior que do clorofórmio, acetona e DMSO. Yuan e Chen (1998) observaram a eficiência do diclorometano como solvente extrator para a extração da astaxantina, mas observaram que as células, debris e a solução extrato de diclorometano não puderam ser separadas completamente por centrifugação e algumas células e debris foram ainda suspensas na solução de extrato. Quando diclorometano foi misturado com metanol às células e debris suspensos no extrato, poderiam ser completamente precipitada por centrifugação a 10000g por 5-10 min. Além disso, Yuan e Chen (2000) observaram que mistura de metanol e diclorometano foi um extrator efetivo para ésteres de astaxantina.

Testou-se ainda a estabilidade da astaxantina e da clorofila nos extratos obtidos com cada solvente por um período de 12 dias armazenado em frascos âmbar a temperatura ambiente. Verificou-se boa estabilidade em acetona e na mistura de diclorometano:metanol, não apresentando degradação (mesma absorbância) até o último dia de análise. Os extratos com acetonitrila e clorofórmio começaram a apresentar diminuição na absorbância gradativamente a partir do 6º dia de armazenamento e no hexano, devido à sua alta taxa de evaporação, não foi possível realizar o teste de estabilidade.

4.13 ALTERAÇÕES NO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUÍMICA

Tentando-se simplificar o método de Sedmak e verificar a possível degradação da astaxantina pelo calor do DMSO pré-aquecido a 55°C, comparou-se os resultados obtidos com diferentes solventes utilizando-se DMSO aquecido (método de Sedmak) e DMSO a temperatura ambiente (Sedmak modificado). Os resultados demonstrados nas figuras 65 e 66 mostram melhores resultados utilizando o Método de Sedmak modificado, indicando um a possibilidade de degradação da astaxantina pela adição do DMSO aquecido, uma vez que tem-se relatado a sensibilidade deste pigmento ao calor.

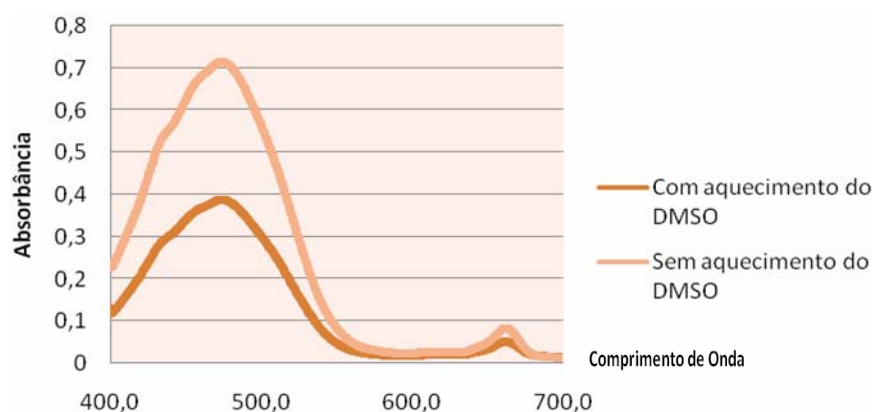


FIGURA 65: Comparativo entre o método de Sedmak e Sedmak modificado utilizando acetona como solvente extrator (amostra diluída 1:2).

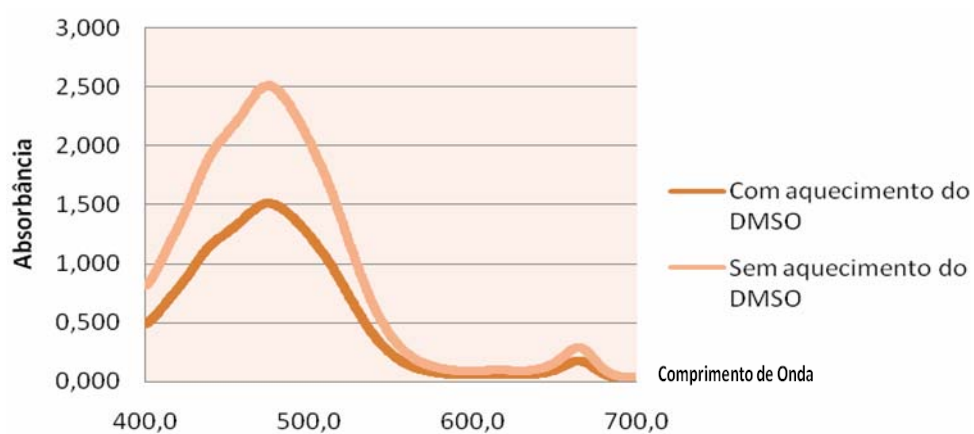


FIGURA 66: Comparativo entre o método de Sedmak e Sedmak modificado utilizando diclorometano:metanol (25:75 v/v) como solvente extrator.

Os resultados obtidos indicam que a extração da astaxantina poderia ser feita pelo método de Sedmak modificado usando DMSO à temperatura ambiente.

5 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho fornecem dados bastante úteis para os estudos com *H. pluvialis*, permitindo concluir que é possível otimizar a produção de biomassa com condições que propiciem o aumento da velocidade de crescimento vegetativo e produtividade média, além das condições de indução de astaxantina com a aplicação de fatores de stress, isoladamente ou associados, tornando a produção biotecnológica de astaxantina competitiva à síntese química. As melhores condições de crescimento vegetativo obtidas em nosso estudo foram crescimento em meio de cultivo SAG, iluminação com lâmpada fluorescente com intensidade de 2,7 klux e pH controlado 7.0, visualizados na tabela 11.

São vários os fatores responsáveis pelo acúmulo de astaxantina que podem ser estudados e testados isoladamente ou associados. Em nossos resultados podemos concluir que o stress é um fator acumulativo do estado fisiológico da cultura e das condições de cultivo. Os melhores resultados foram obtidos nos intervalos de entre 0,5 e 0,7% de NaCl e intensidade de luz a partir de 7,0 Klux, além de observarmos influência do pH a partir de 8,0 sobre a carotenogênese.

TABELA 11 - Condições de cultivo do *H. pluvialis* e indução da produção de astaxantina.

Fator	Condição Ideal	Condição Aceitável
Para crescimento vegetativo		
Meio de cultivo	-	SAG
Temperatura	-	25±1
pH	Controlado 7.0	Inicial 6.0 – 7.0
Iluminação	2,7 Klux	1,5 Klux
Aeração	-	400ml/min
Salinidade	0%	Até 0,1%
Para indução da produção de astaxantina		
Iluminação	A partir de 7,0 Klux	A partir de 3,5 Klux
Salinidade	0,5 – 0,7%	>0 % e < 0,7%
pH	8.0	8.0 – 9.0

O método químico de Sedmak *et al.* (1990) demonstrou ser um método eficiente e prático para extração da astaxantina em células de *H. pluvialis*, embora tenham sido obtidos melhores resultados sem o aquecimento do DMSO a 55°C. Dentre os solventes extratores testados a mistura de diclorometano:metanol (25:75 v/v) apresentou maior potencial extrator de astaxantina e boa estabilidade durante o armazenamento.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Estudar e controlar os parâmetros de agitação e aeração nos cultivos de *Haematococcus pluvialis*.
2. Analisar a condições de cultivo para formação de líquens por cultivo associado de *Xanthophylomyces dendrorhous* e *Haematococcus pluvialis*
3. Seleção de cepas mutantes com maior velocidade de crescimento.
4. Avaliar os efeitos da astaxantina na proteção à radiação ultravioleta em humanos, com possibilidade de aplicação em indústria de cosméticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGABASE. Disponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 2007.
- ALGA TECHNOLOGIES. Disponível em: <<http://www.algatech.com/astax.htm>>. Acesso em: 2007.
- AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS F.A.C.; FARO, Z.P. Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. **Revista de Nutrição**, v.19, n.2, p. 233-243, 2006.
- AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/Fungi/details.asp1472>>. Acesso em: 2007.
- AN, G-H.; SCHUMAN, D. B.; JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n.1, p.116-124, Jan. 1989.
- ANDREWES, A.G.; PHAFF, H.J., STARR, M.P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1003-1007, 1976.
- ANVISA – Resolução nº44, de 2 de novembro de 1977. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 2006.
- ANVISA – Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 2006.
- AR D-B.; PONCE-NOYOLA T.; TORRES-MUÑOZ J.A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75. n.4. p.783-91, Mar. 2007.
- ARMSTRONG, G.A.; HEARST, J.E. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **FASEB J.**, v. 10, p. 228-237, 1996.
- ARMSTRONG, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 51, p. 629-659, 1997.
- ATCC. Disponível em: <www.atcc.org>. Acesso em: 2006.
- AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Appl. Chem.**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997.
- BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Food Science e Technology**, v.15, p. 484-488, 2004.
- BASF THE CHEMICAL COMPANY. Disponível em: < E:\Astaxantina\BASFGroup 2002-09-04> Acesso em: 2006.
- BLANC, P. J. Les Pigments Rouges de *Monascus*. **Biofutur.**, v.184, p.13-17, 1998.

BOROWITZKA, M. A.; JOHN M.; HUISMAN, J. M.; OSBORN, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of nutrients on growth and cell type **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 4, Dec. 1991.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A. **Procedure for large-scale production of astaxanthin from haematococcus**. U S Patent 6022701, Feb. 2000

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, n. 7, p.1077-1082, 1991.

BRINDA, B.R.; SARADA, R.; KAMATH, B.S.; RAVISHANKAR, G.A.; Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1290-1295, Nov. 2004.

CALO, P. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 6, p.575-578, 1995.

CANTER-LUND, H.; LUND, J.W.G. **Freshwater Algae: Their Microscopic World Explored**. Hong Kong: Bio press Limited, 1995

CARLOS, E.E.; JOHNSON, E.A. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p.511–519, 2004.

CHEN C.J.; TSAI C.C.; HSIEH J.F.; CHIEN C.M.; WU T.H.; CHEN S.T. A screening platform for compounds with potential immuno-regulatory activities using human cord blood mononuclear cells. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 9, n.10, p.777-84, Dec. 2006.

CHONG E.W.; WONG T.Y.; KREIS A.J.; SIMPSON J.A.; GUYMER R.H. Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. **BMJ.**, v.13, n.335, p 723:729, Oct. 2007.

CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZÁLEZ, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. **Biol Res.**, v. 36, p. 343-357, 2003.

CORDERO, B.; OTERO, A.; PATINO, M.; ARREDONDO, B. O.; FABREGAS, J. Astaxanthin Production from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* with Different Stress Conditions. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 2, p. 213-218, Feb. 1996.

CSERHATIA, T.; FORGACS, E.; MORAIS, M. H.; MOTA, T.; RAMOS, A. Separation and quantitation of colour pigments of chili powder (*Capsicum frutescens*) by high-performance liquid chromatography–diode array detection. **Journal of Chromatography**, v. 896, p. 69–73, 2000.

CYANOTECH CORPORATION. Disponível em: < <http://cyanotech.com>> Acesso em: 2007.

DONG, Q-L; ZHAO, X-M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today**, v. 98, p. 537–544, 2004.

DOWNHAM A.; COLLINS., P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p 5-22, 2000.

EUROPEAN COMMISSION. Disponível em: < http://ec.europa.eu/index_en.htm> Acesso em: 2006.

ENVIRONMENTAL GROWTH CHAMBERS: Disponível em: < <http://www.egc.com/index.php>> Acesso em: 2007

FABREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMINGUEZ A. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 65–71, May 2001.

FAN L.; VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S. Effect of the temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **J. Phycol**, v. 30, p. 829-833, 1994.

FDA (1993). Disponível em: < E:\outros\FDA-CFSANFood.nutrition,cosmetics/questions.htm>. Acesso em: 2006.

FDA (1998). Disponível em: < www.cfsan.fda.gov/~lrd/colorfact.html>. Acesso em: 2006.

FELL, J. W.; BLATT G. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. **Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.23, p. 677-681, 1999.

FISHACE ECOLOGICAL ENGINEERING. Disponível em: < www.fishace.com.au/algae.html>. Acesso em: 2007.

FONTANA, J. D.; CZECZUGA, B.; BONFIM, T. M. B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H., GUIMARFIES, M. F.; BARON, M. Bioproduction of Carotenoids: The Comparative Use of Raw Sugarcane Juice and Depolymerized Bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 121-125, 1996.

FONTANA, J.D. Disponível em: < www.herbario.com.br/dataherb06/1112/carotenoid.htm>. Acesso em: 2007.

FRANCIS, J. Food Colorants Today: How the emphasis on “natural” affects the most important quality factor in food. **The World of Ingredients**, p. 8-11, 1999.

FUENTE J.L.B., Vitatene Antibioticos: Disponível em: <www.leon.es/opencms/export>

/lcd/biblioteca/Documentos/Produccion_de_vitaminas_JLBarredo.pdf >. Acesso em: 2006.

GARCÍA-MALEA, M.C.; ACIÉN, F.G.; FERNÁNDEZ, J.M.; CERON, M.C.; MOLINA, E. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 981–989, August 2006.

GENERAL ELECTRIC COMPANY. Disponível em: < <http://www.ge.com/index.htm>>. Acesso em 2007.

GOINS, G.D., YORIO N.C., SANWO, M.M. BROWUN, C.S. Photomorphogenesis, Photosynthesis and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 312, p.1407-1413, Jul, 1997.

GOLUBEV, W.I., Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, v.11, p. 101-110, 1995.

GONZALEZ, M.S. La astaxantina y su biossíntesis. **Contactos**, v. 36, p. 61-64, 2000.

GRIFFITHS, J.C. Coloring Foods e Beverages. **Food Technology**, v. 59, n. 5, p. 38-44, May 2005.

GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 1998.

GOODWIN, T.W. **The biochemistry of the carotenoids**. London: Chapman and Hall, v.1, ed 2, 1980.

GRUNG M.; D'SOUZA, F.M.L.; BOROWITZKA, M.; LIAAEN-JENSEN, S. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. **J. Appl. Phycol.**, v. 4, p. 165-171, 1992,

GRUNEWALD K.; HAGEN, C.; BRAUNE, W. Secondary Carotenoids accumulation in flagellates of green alga *Haematococcus lacustris*. **J. Phycol.**, v.32, p. 387-392, 1997.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **TRENDS in Biotechnology**, v.21, n. 5, p. 210-216, May 2003.

HAGEN C.; BRAUNE W.; GREULICH. F. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris*. Protection from photodynamic damage. **J. Photochem Photobiol**, v. 20, p. 153-160, 1993.

HARKER, M.; TSAVALOS, A. J.; YOUNG, A. J. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 207-214, 1996.

HENRIQUES, N.M.; NAVALHO, J.C.; VARELA, J.C.; CANCELA, M.L. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n 61, p 12-18, Dezembro 1998.

HOISCHEN, D., COLMENARES, L.U, LIU, J, SIMMONS, C.J., BRITTON, G. LIU, R.S.H Fluorinated Analogs of the Carotenoprotein, α -Crustacyanin. **Bioorganic Chemistry**, v. 26, p. 365-374, 1998.

HU, Z-C; ZHENG, Y-G; WANG, Z.; SHEN, Y-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

HUI, N.; HE, G-Q; RUAN, H.; CHEN, Q-H; CHEN, F. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. **Journal of Zhejiang University Science**, p. 514-522, 2005.

INSTITUTO DE PESCA - APTA - SAA – SP. Disponível em: < <http://ftp.sp.gov.br/ftppesca/pg.pdf> >. Acesso em: 2007.

IP, P-F; CHEN, F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 733-738, February 2005.

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**, 2006.

JOHNSON, E.A.; LEWIS, M.J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, v. 115, p. 173–183, 1979.

JOHNSON, E.A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 297-326, 1991.

JOO, H-N., LEE, C-G., Antibiotics Addition as na Alternative Sterilization Method for Axenic Cultures in *Haematococcus pluvialis*. **J. Ind.Eng Chem**, v. 13, n. 1 p. 110-115, 2007.

KAEWPINTONG, K.; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, 2006.

KAMATH, S. B.; CHIDAMBAR, S.; BRINDA, B.R.; KUMAR, M.A.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Digital image processing—an alternate tool for monitoring of pigment levels in cultured cells with special reference to green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 768–773, 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.

KIM, Z-H; KIM, S-H; LEE, H-S; LEE, C-G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 867-873, Mar. 1993.

KOBAYASHI, M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Enlarged and Astaxanthin-Accumulating Cyst Cells of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 565-568, Oct. 2001.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G. BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n.10, p. 929-934, Oct. 1998.

LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; DEL VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, p. 90-95, 2006.

LABABPOUR, A., LEE, C-G., Simultaneous Measurement of Chlorophyll and Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* Cells by First-Order Derivative Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **J. of Biocience and Bioengineering**, v. 101, n. 2 p. 101-104, Oct. 2006.

LATSCHA, T. "Carotenoids their nature and significance in animal feeds", Department of Animal Nutrition and Health, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland, 1990.

LEE Y. K.; DING S.Y. Cell cycle and accumulation of astaxathin in *Haematococcus pluvialis*. **J. Phycol**, v. 30, p. 445-449, 1994.

LEE, S.H.; SUN, N.K.; JANG, J.W.; AN, G.H.; WON, M.; SONG K. B. Characterization of *Phaffia rhodozyma* 3A 4-8. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. 258-261, Dec. 2004.

LGPM. Disponível em: <www.lgpm.ecp.fr/.../bioprocedes/galerie>. Acesso em: 2007.

LIM, G-B; LEE, S-Y; LEE, E-K; HAAM, S-J; KIM, W-S. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 181-187, 2002,

LIU, Y-S; WU, J-Y, HO, K-P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 331-335, 2006.

LIU, B-H; LEE, Y-K. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p. 3-5, October, 2000.

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

LYONS, N.M.; O'BRIEN N. M., Modulatory effects of algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. **Journal of Dermatological Science**, v 30, p 73-84, May 2002,

MAHMOUD, F.F.; HAINES , D. D.; ABUL, H. T.; ABAL, A.T.; ONADEKO, B. O.; WISE J. A. In Vitro Effects of Astaxanthin Combined With Ginkgolide B on T Lymphocyte Activation in Peripheral Blood Mononuclear Cells From Asthmatic Subjects. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 129 – 136, 2004.

MAIMOM, D. Estudo de mercado de matéria-prima: Corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bioinseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica): PROJETO BRA/96/025 - Acordo SUDAM/PNUD, 2000: Disponível em: www.genamaz.org.br/forums/aca/dispatch.exe/livro/showFile/100004/d20000521/No/RelWorkshopveget.doc. Acesso em: 2007

MAPARI, S. A.; NIELSEN, F.N.; LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Exploding fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potencial natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p. 231-238, 2005.

MCCOY, M. Astaxanthin market a hard one to crack. **Chem. & Eng. News**, v. 77, p. 15-17, 1999.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; BRITTON, G.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Relationship Between The Colour And The Chemical Structure Of Carotenoid Pigments. **Food Chem.**, v. 101, n.3, p.1145-1150, 2007.

MERA PHARMACEUTICALS. Disponível em: < <http://www.aquasearch.com/>>. Acesso em: 2007.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J.C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 9, p. 919-924, 1993.

MIAO, F.; LU, D.; LI ,Y.; ZENG, M. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 352, p. 176–181, Mar. 2006.

MICROGAIA INC. Disponível em: < <http://www.microgaia.com>>. Acesso em: 2007.

O` CARROL, P. Naturally Exiting Colours. **The World of Ingredients**, p. 39-42, Mar/Apr 1999.

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

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. **J. Appl Phycol**, v. 12, p. 499-506, 2000.

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.

PALOZZA P.; KRINSKY N.I. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. **Arch Biochem Biophys.**, v..297, n. 2, p.291-5, Sep.1992,

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xilose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.

PASSOS, R.; MORIEL D.G.; LAGREZE F.; GOUVEIA, F.; MARASCHIN, M.; BEIRÃO, L.H.. Fontes Naturais de Carotenóides de Interesse para a Aqüicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. 2, n. 1 - Janeiro 2007.

PAZMINO-DURAN, E. A.; GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; GLORIA M. B. A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. **Food Chemistry**, v. 75, p. 211–216, 2001.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Ljapanese Island and on the West Coast of North America. Proceedings of the IV IFS: **Fermentation Tecnology Today**, p 759-774, 1972,

RAMÍREZ , J.; GUTIERREZ, H.; GSCHAEDLER, A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 259–268, 2001.

RENSTROM, B.; BORCH, G.; SKUIBERG, O. M.; LIAAEN-JENSEN, S. Optical purity of (3S,3'S)-astaxantina from *Haematococcus pluvialis*. **Phytochem**, v. 20, p. 2561-2564, 1981.

RISE, M.; COHEN, E.; VISHKAUTSAN, M.; COJOCARUM, M.; GOTTLIEB, H. E.; ARAD, S. Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 287-292, 1994.

SAG. Disponível em: < <http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/sag.html>>. Acesso em: 2006.

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,

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.

SCHOEFS, B.; RMIKI, N-E; RACHADI, J.; LEMOINE, Y. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. **FEBS Letters**, v. 500, p. 125-128, June 2001.

SCHOROEDER, W.A.; JOHNSON, E.A., Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **J. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 502-507, 1995.

SKIBSTED L.H.; DRAGSTED L.O.; DYERBERG J.; HANSEN H.S.; KIENS B.; OVESEN L.F.; TJØNNELAND A.M. Antioxidants and health. **Ugerkr Laeger**, v. 168, n. 41, Oct. 2006.

SMITH H. Light quality, phytoperception and plant strategy. **Plant Physiology**, v. 33, p. 1882-1888, 1982,

SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **TIBTECH**, v. 6, p. 283-288, Nov. 1988.

STEPNOWSKI, P.; O' LAFSSON, G.; HELGASON, H.; JASTORFF, B. Preliminary study on chemical and physical principles of astaxanthin sorption to fish scales towards applicability in fisheries waste management. **Aquaculture**, v. 232, p. 293-303, 2004.

STOREBAKKEN, T.; SORENSEN, M.; BJERKENG, B.; HARRIS, J., MONAHAN, P.; HIU, STEPHEN, H. Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. **Aquaculture**, v. 231, p. 489-500, 2004.

SUH, I. S.; JOO, H-N; LEE, C-G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. **Journal of Biotechnology**, March 2006.

TENNESSEN, D. J.; BULA, R.J.; SHARKEY, T. D. Efficiency of photosynthesis in continuous and pulsed light emitting diode irradiation. **Photosynthesis Research**, v. 44, p. 261-269, 1995.

TJAHJONO, A.E.; KAKIZONO, T.; HAYAMA, Y.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 77, n. 4, p. 352-357, 1994.

THE FRESHWATER ALGAL FLORA OF THE BRITISH ISLES (2002). Disponível em: <www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/alga>. Acesso em: 2007.

TORRISEN, O.J. Strategies for salmonid pigmentation. **J. Appl. Ichthyol**, v. 11, p. 276-281, 1995.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G.A. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v 68, p.197-199, 1998.

TURUJMAN, S. A.; WAMER, W. G.; WEI, R. R.; ALBERT, R. H. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. **Journal of AOAC International**, v. 80, n.3, p.622-632, 1997.

VISSER, H.; OUYEN, J.J.; VERDOES, J.C. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 221-231, 2003.

YAMANE, Y-I; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO N. Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4471–4478, Aug. 1997.

YOKOYAMA, A.. MIKI, W. Composition and presumed biosynthetic pathway fo carotenoids in the astaxnthin-producing bacterium *Agrobacterium auranticum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p 139-144, 1995.

YUAN, J-P; GONG, X-D; CHEN, F. Separation and identification of astaxanthin esters and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by HPLC. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 9, Sept. 1996.

YUAN, J-P; GONG X-D; CHEN F. Separation and Analysis of Carotenoids and Chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. **J.Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 1952-1956, 1997.

YUAN, J-P; CHEN, F. Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 3371-3375, Jul. 1998.

YUAN, J-P; CHEN, F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 47, p 31-35, 1999.

YUAN, J-P; CHEN, F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Food Chemistry**, v. 68, p. 443-448, 2000.

YUAN, J-P; CHEN, F.; LIU X.; LI X-Z. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. **Food Chemistry**, v. 76, p.319–325, 2002,

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K., Prospects for new natural food colorants **Trends in Food Science & Technology**, v. 43, p. 54-70, 1996.

ZHEKISHEVA, M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. **J. Phycol**, v.38, p 325-331, Jan. 2002.