

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HENRIQUE VECHIO

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
VIA HIDRÓLISE ÁCIDA

CURITIBA

2021

HENRIQUE VECHIO

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
VIA HIDRÓLISE ÁCIDA

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira
Coorientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

V411o

Vechio, Henrique

Otimização da extração de astaxantina da *Haematococcus Pluvialis* via hidrólise ácida [recurso eletrônico] / Henrique Vechio. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2021.

Orientador: Rafael Bruno Vieira – Coorientador: André Bellin Mariano

1. Hidrólise. 2. Carotenoides. 3. Antioxidantes. 54. Microalga. 5. Astaxantina. 6. *Haematococcus pluvialis*. I. Universidade Federal do Paraná. II. Vieira, Rafael Bruno. III. Mariano, André Bellin. IV. Título.

CDD: 547.2

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

No dia vinte e seis de fevereiro de dois mil e vinte e um às 08:00 horas, na sala Microsoft Teams, Plataforma online, em função da portaria 754/2020 da Reitoria - UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **HENRIQUE VECHIO**, intitulada: **Otimização da extração de astaxantina da *Haematococcus Pluvialis* via hidrólise ácida**, sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL BRUNO VIEIRA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: RAFAEL BRUNO VIEIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), VICELMA LUIZ CARDOSO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, RAFAEL BRUNO VIEIRA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica

26/02/2021 10:04:16.0

RAFAEL BRUNO VIEIRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/02/2021 10:06:06.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/02/2021 10:07:15.0

VICELMA LUIZ CARDOSO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **HENRIQUE VECHIO** intitulada: **Otimização da extração de astaxantina da *Haematococcus Pluvialis* via hidrólise ácida**, sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL BRUNO VIEIRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica

26/02/2021 10:04:16.0

RAFAEL BRUNO VIEIRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/02/2021 10:06:06.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/02/2021 10:07:15.0

VICELMA LUIZ CARDOSO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio e carinho dispensados ao longo de toda minha vida.

Aos professores Dr. Rafael Bruno Vieira e Dr. André Bellin Mariano por todo conhecimento compartilhado, questionamentos, paciência, e pela indispensável orientação na realização deste trabalho.

A todos os colegas do Mestrado em Engenharia Química da UFPR, que, de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Ao NPDEAS e todos os colegas de laboratório, que tão bem me receberam.

Ao PPGEQ e todos os seus funcionários e docentes, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná pela formação.

RESUMO

O papel dos antioxidantes na prevenção e tratamento de doenças tem adquirido crescente importância nos últimos anos. Nesse contexto, a astaxantina tem se destacado devido ao seu alto poder inibitório de stress oxidativo em seres humanos. A astaxantina pode ser produzida biotecnologicamente através da microalga *Haematococcus pluvialis*. Entretanto, sua parede celular de alta resistência físico-química impõe elevada dificuldade na extração de compostos intracelulares. Somado a isso, a etapa de extração pode resultar na degradação e redução da biodisponibilidade da astaxantina. Diante desse problema, esta pesquisa estudou e otimizou o emprego da hidrólise ácida na ruptura celular da *H. pluvialis*, seguido de extração sólido-líquido com solventes GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Foi realizado um delineamento composto central para obter a superfície de resposta da recuperação de astaxantina, em função das variáveis: concentração de ácido, tempo e temperatura de hidrólise. Os resultados indicaram que o emprego de ácido clorídrico na hidrólise da parede celular de *H. pluvialis* obteve a maior taxa de recuperação de astaxantina (> 98%), quando comparado aos ácidos acético (\approx 4%) e láctico (\approx 6%). Os resultados sugerem que a recalcitrância química da parede celular da *H. pluvialis* seja o fator limitante do processo de ruptura, e que a hidrofobicidade da parede não seja elevada o suficiente para favorecer ácidos de menor polaridade, como o acético e láctico. Dentre os solventes avaliados na extração sólido-líquido, a acetona resultou na maior recuperação de astaxantina (> 98%), quando comparado ao etanol (\approx 30%) e acetato de etila (\approx 12%). Apesar da alta solubilidade da astaxantina em solventes não polares, como o acetato de etila, a camada de água que recobre a parede e membrana celular favoreceu a difusão de solventes com maior miscibilidade em água, como a acetona e etanol. A otimização da extração resultou em $99 \pm 0,48\%$ de recuperação de astaxantina, com as seguintes condições na hidrólise ácida: 71 °C, 17 min e ácido clorídrico à 3,7 N. Foi possível confirmar a hipótese de que existe uma condição ótima de hidrólise que atende a severidade necessária para romper suficientemente as células e que, ao mesmo tempo, não degrada o carotenoide. Constatou-se que é possível usar menores concentrações de ácido aumentando a temperatura de hidrólise, porém houve declínio na recuperação de astaxantina a partir de 80 °C, sugerindo o início da degradação do carotenoide. A hidrólise ácida, mesmo nas condições ótimas, não causou a ruptura total da parede celular, indicando que a acessibilidade do solvente ao interior da célula provavelmente ocorreu através de microperfurações na parede celular, diferentemente dos métodos físicos e mecânicos, que resultam na ruptura total da mesma. Conservar a integridade da parede celular torna possível a filtração da biomassa tratada, pois a astaxantina permanece contida no meio intracelular. Desta forma, é possível reduzir o teor de água presente na extração sólido-líquido. Em paralelo, a reutilização da solução ácida filtrada

permite reduzir custos, além de aumentar a sustentabilidade do processo.

Palavras-chaves: astaxantina, carotenoides, antioxidantes, microalga, *Haematococcus pluvialis*, extração, ruptura celular, hidrólise ácida.

ABSTRACT

The role of antioxidants in preventing and treating diseases has gained increased value in recent years. In this regard, astaxanthin has been standing out due to its high oxidative stress inhibitory capacity in humans. Astaxanthin can be biotechnologically produced from the microalgae *Haematococcus pluvialis*. However, its high physicochemical resistance establishes an important obstacle to the extraction of intracellular compounds. In addition, the extraction phase can lead to degradation and reduced bioavailability of astaxanthin. Faced with this issue, this research investigated and optimized the use of acid hydrolysis in *H. pluvialis* cell disruption, followed by the solid-liquid extraction by GRAS (Generally Recognized as Safe) solvents. A central composite design was performed in order to obtain the response surface of astaxanthin recovery, according to the variables: acid concentration, time and temperature of hydrolysis. Results showed that the use of hydrochloric acid on *H. pluvialis* cell wall hydrolysis had the highest astaxanthin recovery rate (>98%) when compared to acetic acid (≈4%) and lactic acid (≈6%). The *H. pluvialis* cell wall chemical recalcitrance may be the limiting factor of its rupture process, and its hydrophobicity is not high enough to favor acids of lower polarity, such as acetic and lactic acid. Among the solvents evaluated on the solid-liquid extraction, acetone had the highest astaxanthin recovery rate (>98%), when compared to ethanol (≈30%) and ethyl acetate (≈12%). Despite astaxanthin's high solubility in non-polar solvents, such as ethyl acetate, the water layer that recovers the cell wall and its membrane favoured the diffusion of solvents with higher miscibility in water, such as acetone and ethanol. The extraction's optimization resulted in $99 \pm 0,48\%$ of astaxanthin recovery, at the following acid hydrolysis conditions: 71 °C, 17 min and hydrochloric acid at 3,7 N. It was possible to confirm that an optimal hydrolysis condition exists, in which the severity needed to sufficiently rupture the cells is achieved, while the carotenoid is not degraded. It was verified that it is possible to use lower acid concentrations by rising the hydrolysis temperature. However, this method implicated in astaxanthin recovery decay above 80 °C, suggesting a starting point in carotenoid degradation. Acid hydrolysis, even in optimal conditions, did not cause total cell wall disruption, indicating that the solvent probably accessed the intracellular space by micro perforations on the cell wall, differently from physical and mechanical disruption methods. The preservation of the cell wall integrity enables the filtration of the treated biomass, since astaxanthin remains in the intracellular space. Thus, it is possible to reduce the water content in the solid-liquid extraction process. In addition, reutilizing the filtered acid solution enables the reduction of costs and increases the process sustainability.

Key-words: astaxanthin, carotenoids, antioxidants, microalgae, *Haematococcus pluvialis*, extraction, cell disruption, acid hydrolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ASTAXANTINA	16
FIGURA 2 – ESTRUTURA DOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS DA ASTAXANTINA (A) TRANS-ASTAXANTINA, (B) 9-CIS-ASTAXANTINA, (C) 13-CIS-ASTAXANTINA	17
FIGURA 3 – ESTRUTURA DOS ISÔMEROS ÓPTICOS DA TRANS-ASTAXANTINA: (D) (3S,3'S) ASTAXANTINA, (E) (3R,3'S) ASTAXANTINA, (F) (3R,3'R) ASTAXANTINA	18
FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS DIFERENTES GRAUS DE ESTERIFICAÇÃO DA ASTAXANTINA: LIVRE, MONOÉSTER E DIÉSTER	19
FIGURA 5 – IMAGEM MICROSCÓPICA DE CÉLULAS DE <i>H. PLUVIALIS</i> EM DIFERENTES FASES DO SEU CICLO DE VIDA. (A) CÉLULAS FLAGELADAS; (B) CÉLULAS INTERMEDIARIAS IMÓVEIS; (C) HEMATOCISTOS	22
FIGURA 6 – IMAGEM DA PAREDE CELULAR DA <i>H. PLUVIALIS</i> NO ESTÁGIO HEMOCÍSTICO OBTIDA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA POR TRANSMISSÃO, CARACTERIZADA PELA ESPESSA PAREDE SECUNDARIA (SW) E INTERESPAÇO (IS), ENVOLVIDA PELA CAMADA TRILAMINAR (TLS), PAREDE PRIMARIA (PW) E REMANESCENTES DA MATRIX EXTRACELULAR (W1, W2)	22
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DOIS ESTÁGIOS CELULARES DA <i>H. PLUVIALIS</i> . (A) ESTRUTURA DA CÉLULA FLAGELADA. (B) ESTRUTURA DO HEMATOCISTO. (C) COMPOSIÇÃO DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DO HEMATOCISTO	23
FIGURA 8 – (A) REPRESENTAÇÃO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL DE 3 FATORES; (B) EXEMPLO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	32
FIGURA 9 – CULTIVOS DE <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i> EM ERLLENMEYER DE 2 L. (A) CULTIVO DE 7 DIAS, EM CRESCIMENTO VEGETATIVO; (B) CULTIVO DE 20 DIAS, COM PREDOMINÂNCIA DE HEMATOCISTOS RICOS EM ASTAXANTINA	33
FIGURA 10 – APARATO EXPERIMENTAL DA RUPTURA CELULAR VIA HIDRÓLISE ÁCIDA. (A) BIOMASSA ANTES DA RUPTURA CELULAR; (B) BIOMASSA DURANTE A HIDRÓLISE; (C) BIOMASSA APÓS HIDRÓLISE E NEUTRALIZAÇÃO	35

FIGURA 11 – APARATO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA. (A) EXTRATOR SOXHLET; (B) ROTO-EVAPORADOR	36
FIGURA 12 – RESULTADO DA RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA USANDO DIFERENTES ÁCIDOS NA HIDRÓLISE (4 N, 70 °C E 10 min) DE BIOMASSA DE <i>H. PLUVIALIS</i>	41
FIGURA 13 – RESULTADO DA RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE BIOMASSA PRÉ-TRATADA	43
FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA NO DCC	47
FIGURA 15 – VALORES PREDITOS EM FUNÇÃO DOS OBSERVADOS PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA NO DCC	47
FIGURA 16 – CURVAS DE CONTOURNO PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA. (A) $[HCl]$ VERSUS T COM $t = 17$ min ; (B) $[HCl]$ E T COM $t = 71$ °C ; (C) T VERSUS T COM $[HCL] = 3,7$ N	49
FIGURA 17 – IMAGEM MICROSCÓPICA DE CÉLULAS DA <i>H. PLUVIALIS</i> EM DISTINTAS CONDIÇÕES DO DCC ORDENADAS PELA RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA: (A) SEM TRATAMENTO; (B) $R_{ast} = 0,57\%$; (C) $R_{ast} = 30,48\%$; (D) $R_{ast} = 99,16\%$	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FONTES NATURAIS DE ASTAXANTINA E SUAS VARIAÇÕES ESTRUTURAIS	21
TABELA 2 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA <i>H. PLUVIALIS</i> SEM RUPTURA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO DIRETA COM SOLVENTE	25
TABELA 3 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA <i>H. PLUVIALIS</i> COM RUPTURA QUÍMICA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE	27
TABELA 4 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA <i>H. PLUVIALIS</i> COM RUPTURA MECÂNICA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE	29
TABELA 5 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA <i>H. PLUVIALIS</i> COM RUPTURA FÍSICA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE	30
TABELA 6 – NÍVEIS E FATORES DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL	38
TABELA 7 – EXPERIMENTOS E VALORES DOS FATORES DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL	39
TABELA 8 – ENSAIOS E VALORES DOS FATORES DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL	45
TABELA 9 – RESULTADO DA REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA DO DCC, COM TODAS AS VARIÁVEIS E SEUS RESPECTIVOS PARÂMETROS E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA	46
TABELA 10 – RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA (PREDITA E OBSERVADA) NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS ($T = 71\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T = 17\text{ min}$; $[HCL] = 3,7\text{ N}$) DO DCC	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	ASTAXANTINA	16
3.1.1	Propriedades físico-químicas	16
3.1.2	Propriedades farmacológicas	19
3.1.3	Fontes naturais de astaxantina	20
3.2	<i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i>	21
3.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA <i>H. PLUVIALIS</i>	24
3.3.1	Métodos de extração direta	24
3.3.2	Métodos químicos	26
3.3.3	Métodos mecânicos	28
3.3.4	Métodos físicos	28
3.4	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA ASTAXANTINA	31
3.5	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC)	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	CULTIVO DA MICROALGA	33
4.2	OBTENÇÃO DA BIOMASSA	33
4.3	PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	34
4.4	REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS	34
4.5	RUPTURA CELULAR VIA HIDRÓLISE ÁCIDA	34
4.6	EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA	35
4.7	TESTES PRELIMINARES	36
4.7.1	Efeito de diferentes ácidos na ruptura celular	36
4.7.2	Efeito de diferentes solventes na extração sólido-líquido	37
4.8	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL	37
4.9	ANÁLISES QUANTITATIVAS	39
4.9.1	Teor total de astaxantina	39
4.9.2	Recuperação de astaxantina	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA RUPTURA CELULAR	41
5.2	EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	42
5.3	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL	44
5.3.1	Modelagem matemática	45
5.3.2	Validação do modelo	48
5.3.3	Curvas de contorno	48

5.3.4	Análise microscópica	51
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento do stress oxidativo como mecanismo fundamental do processo de envelhecimento e fisiopatologia de diversas doenças tem conferido aos antioxidantes crescente importância no mundo atual, tanto no aspecto preventivo como terapêutico (DAVINELLI; NIELSEN; SCAPAGNINI, 2018).

Nesse contexto, a astaxantina, carotenoide com poder inibitório de peroxidação lipídica de até 500 vezes superior à vitamina E (KURASHIGE et al., 1990), vem ganhando destaque entre os antioxidantes devido às suas múltiplas aplicabilidades: na saúde cardiovascular (CHEN; LI et al., 2020), oftalmológica (GIANNACCARE et al., 2020), gastrointestinal (NISHIKAWA et al., 2005), dermatológica (ITO; SEKI; UEDA, 2018), prevenção de neoplasias (MCCALL et al., 2018), resistência muscular (BARALIC et al., 2015), tratamento adjuvante de doenças neurodegenerativas (FAKHRI et al., 2019) e doenças autoimunes (PARK et al., 2010).

Comercialmente a astaxantina proveniente de fontes naturais pode chegar a 7 vezes o valor (US\$ 7.000/kg) da astaxantina sintética (RAMMUNI et al., 2019; EXPERTS, 2018), visto que sua particular composição estereoisomérica somado à sua forma predominantemente esterificada lhe conferem superior biodisponibilidade e poder antioxidante, quando comparada à astaxantina sintética (LIU; LUO et al., 2016; YANG, C. et al., 2019; SU; YU; LIU, 2020).

A *Haematococcus pluvialis*, microalga de água doce, é considerada a fonte natural mais rica em astaxantina, produzindo este carotenoide quando submetida a condições de stress. No entanto, o ambiente fisiologicamente desfavorável também induz à formação de uma parede celular de alta resistência físico-química, o que impõe dificuldades importantes à extração de compostos de interesse (HAN; LI; HU, 2013).

Diversas abordagens têm sido estudadas para extrair astaxantina da *H. pluvialis*, contudo, esse processo ainda apresenta desafios em relação à eficiência, custo, garantia de biodisponibilidade deste carotenoide e prevenção de sua degradação (RAMMUNI et al., 2019; SAINI; KEUM, 2018).

Diante de tais desafios, este trabalho almeja contribuir com inovações tecnológicas relacionadas ao processo de ruptura celular e extração de astaxantina da *Haematococcus pluvialis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver tecnologia para a recuperação de astaxantina da *Haematococcus pluvialis* através de hidrólise ácida da parede celular, seguida de extração sólido-líquido com solventes GRAS (geralmente reconhecido como seguro).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumprir o objetivo geral do trabalho alguns objetivos específicos são necessários:

- Avaliar a eficiência de diferentes ácidos (ácido clorídrico, ácido acético e ácido láctico) na ruptura celular da *H. pluvialis*.
- Avaliar a eficiência de diferentes solventes (acetona, acetato de etila e etanol) na extração de astaxantina da *H. pluvialis*.
- Otimizar os parâmetros tempo, temperatura e concentração de ácido no processo de extração de astaxantina da *H. pluvialis* através de metodologia de superfície de resposta.

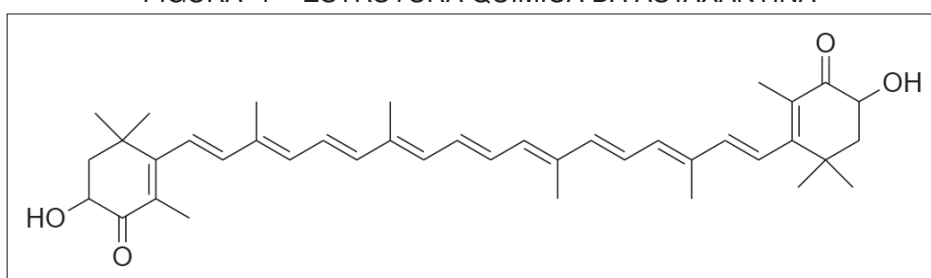
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASTAXANTINA

3.1.1 Propriedades físico-químicas

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) (Figura 1) é um carotenoide pertencente a subclasse das xantofilas, conhecidos assim os carotenoides que possuem um ou mais átomos de oxigênio na sua estrutura.

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ASTAXANTINA



FONTE: Adaptado de Hussein et al. (2006).

A capacidade de ser esterificada, o alto poder antioxidante e maior polaridade em relação a outros carotenoides são características singulares da astaxantina, devido aos anéis β -ionona, providos dos grupos hidroxila (OH) e carbonila (C=O), que apresentam elevada capacidade de sequestrar radicais livres ou outros agentes oxidantes, tanto em meio aquoso, como em meio lipofílico. Além disso, a série de ligações duplas conjugadas entre os anéis β -ionona proporciona à molécula a capacidade de remover elétrons de alta energia a partir de radicais livres e transferir a sua energia eletrônica via cadeia carbônica (HUSSEIN et al., 2006).

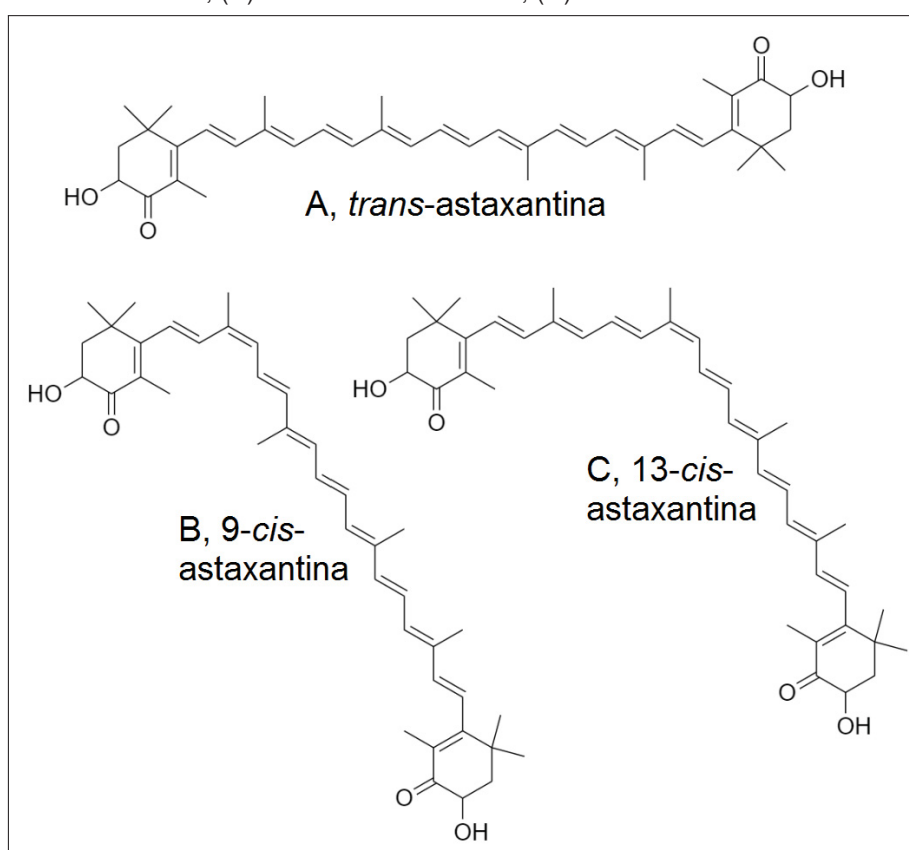
A estrutura polar-apolar-polar também permite que a molécula de astaxantina se alinhe junto à bicamada lipídica da membrana celular, expondo os grupamentos hidrofílicos terminais ao meio aquoso, estendendo assim a área de captação de radicais livres (PASHKOW; WATUMULL; CAMPBELL, 2008).

Além disso, existem 3 fatores que determinam biodisponibilidade, estabilidade e poder antioxidante da astaxantina: isomeria geométrica, isomeria óptica, e grau de esterificação (LIU; LUO et al., 2016).

Em termos de isomeria geométrica, a astaxantina se encontra em diversas formas de isômeros geométricos (cis e trans) (Figura 2), devido à longa cadeia de duplas ligações conjugadas entre os dois anéis β -ionona. Termodinamicamente, a trans-astaxantina é mais estável que seus isômeros cis (BRITTON, 1995), porém estudos mostram que a proporção dos isômeros pode ser controlada através de solventes

(YUAN; CHEN, 1999), assim como pela temperatura e foto irradiação (HONDA; SOWA; KAWASHIMA, 2020), dependendo da finalidade desejada para a astaxantina. Caso o destino seja a pigmentação de alimentos, sugere-se submeter a astaxantina à foto irradiação para a geração da forma *trans*, a qual possui intensa coloração vermelha. Ao passo que se o destino for farmacológico, pode-se aplicar tratamento térmico para promover a formação dos isômeros *cis*, de coloração alaranjada, que possuem melhor biodisponibilidade (YANG, C. et al., 2019; CORAL-HINOSTROZA et al., 2004) e atividade antioxidante (LIU; OSAWA, 2007).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS DA ASTAXANTINA (A) TRANS-ASTAXANTINA, (B) 9-CIS-ASTAXANTINA, (C) 13-CIS-ASTAXANTINA

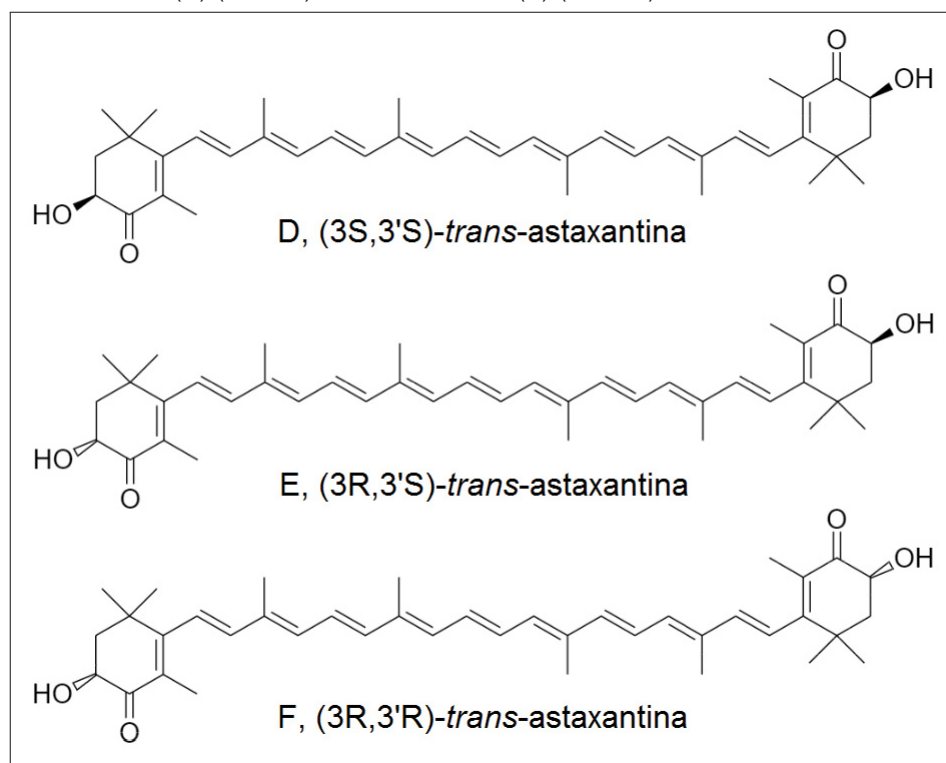


FONTE: Adaptado de Wang, Armstrong e Chang (2008).

Em termos de isomeria óptica, visto a presença de dois átomos de carbono estereogênicos nas posições C-3 e C-3', a astaxantina se encontra na forma de 3 isômeros ópticos (Figura 3): um par de enantiômeros (3R,3'R- e 3S,3'S-astaxantina) e a forma meso (3R,3'S-astaxantina), sendo esta última opticamente inativa.

Apesar de não haver diferenças na absorção entre os isômeros ópticos (3S,3'S) (3R,3'S) (3R,3'R) no corpo humano (ØSTERLIE; BJERKENG; LIAAEN-JENSEN, 2000), o estudo de Liu, Luo et al. (2016) realizado in vivo em nematódeos, demonstrou que após absorção o isômero (3S,3'S) apresenta poder antioxidante superior às demais formas.

FIGURA 3 – ESTRUTURA DOS ISÔMEROS ÓPTICOS DA TRANS-ASTAXANTINA: (D) (3S,3'S) ASTAXANTINA, (E) (3R,3'S) ASTAXANTINA, (F) (3R,3'R) ASTAXANTINA



FONTE: Adaptado de Wang, Armstrong e Chang (2008).

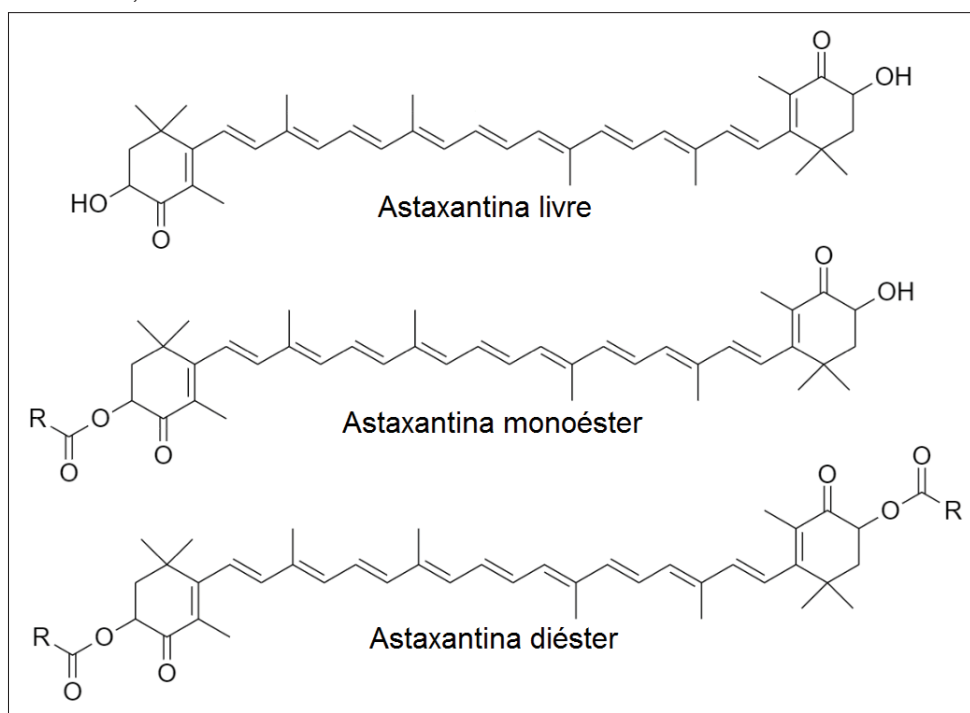
No que se refere ao grau de esterificação, a astaxantina produzida por fontes naturais frequentemente se encontra conjugada com diversos ácidos graxos, como os ácidos oleico, eicosanóico, palmítico e esteárico. Existem ao todo 3 possíveis variações (Figura 4): a astaxantina na forma livre (grupos -OH ocupam ambas as posições 3 e 3'), a astaxantina monoéster (um ácido graxo ligado na posição 3) e a astaxantina diéster (dois ácidos graxos ocupando as posições 3 e 3') (ZHOU et al., 2019).

Diversos estudos tem mostrado que a astaxantina nas formas monoéster e diéster possui superior biodisponibilidade quando comparada à forma livre (BOWEN et al., 2002; ZHOU et al., 2019; SU; YU; LIU, 2020).

Em termos de degradação, diversos fatores já foram avaliados no que tange a astaxantina. A exposição a álcalis (ZHAO, L.-Y. et al., 2006; CHEN; HUANG; OUYANG, 2005), tratamentos térmicos (CASELLA et al., 2020; AHMED et al., 2015) e exposição à luz (HONDA; SOWA; KAWASHIMA, 2020) resultaram em significativa degradação. Enquanto a exposição a ácidos não resultou em degradação (SARADA et al., 2006; DONG et al., 2014).

Apesar da sensibilidade deste carotenoide a diversas condições, o grau de esterificação possui efeito positivo na estabilidade da astaxantina. A forma esterificada, monoéster ou diéster, agrega a este carotenoide significativa estabilidade térmica, em comparação à forma livre (ZHOU et al., 2019).

FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS DIFERENTES GRAUS DE ESTERIFICAÇÃO DA ASTAXANTINA: LIVRE, MONOÉSTER E DIÉSTER



FONTE: Adaptado de Shu Yang et al. (2015).

Relacionando as propriedades físico-químicas expostas nessa seção ao processo de extração de astaxantina, pode-se concluir que para se obter um produto com a maior biodisponibilidade, poder antioxidante e estabilidade possível, é necessário que o método de extração favoreça ou mantenha as seguintes propriedades:

- Isomeria geométrica 9-cis e 13-cis (pela biodisponibilidade e atividade antioxidante);
- Isomeria óptica 3S,3'S (pela atividade antioxidante);
- Grau de esterificação monoéster e diéster (pela biodisponibilidade e estabilidade térmica).

3.1.2 Propriedades farmacológicas

A astaxantina oferece diversos benefícios à saúde humana e possui múltiplas aplicações nutracêuticas (YUAN; PENG et al., 2011; PALOZZA et al., 2009; HIGUERA-CIAPARA; FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006; GUERIN; HUNTLEY; OLAI-ZOLA, 2003). Aliado ao seu alto poder antioxidante, a estrutura singular da astaxantina permite que sua molécula se alinhe junto à bicamada lipídica das membranas celulares, expondo seus terminais hidrofílicos também ao meio aquoso. Assim, a astaxantina é capaz de reduzir e estabilizar radicais livres tanto nas membranas fosfolipídicas, como no meio aquoso intracelular. Essa característica lhe confere excelente poder inibitório

de estresse oxidativo, e assim atuar benéficamente no processo de envelhecimento celular e fisiopatologia de diversas doenças (DAVINELLI; NIELSEN; SCAPAGNINI, 2018; HUSSEIN et al., 2006; LIU; OSAWA, 2007).

Na saúde cardiovascular, a astaxantina é um potencial agente terapêutico contra aterosclerose (FASSETT; COOMBES, 2011). Além disso, a suplementação de astaxantina pode ser benéfica para pessoas com risco aumentado de ataques cardíacos. Estudos mostraram que a astaxantina é carregada através do VLDL, LDL e HDL no sangue e protege o colesterol LDL contra oxidação (IWAMOTO et al., 2000). Também é capaz de reduzir o nível de plasma no sangue (KARPPI et al., 2007), aumentar o fluxo arterial basal (MIYAWAKI et al., 2008) e reduzir hipertensão arterial (CHEN; LI et al., 2020).

Diversos benefícios foram observados na oftalmologia, como melhoria na fadiga ocular e acomodação visual (GIANNACCARE et al., 2020). Igualmente, na saúde gastrointestinal, foram reportados efeitos positivos na proteção contra úlceras gástricas e tratamento de desconforto gastrointestinal (NISHIKAWA et al., 2005).

A proteção contra radicais livres também preserva as defesas do sistema imunológico. A capacidade imunomoduladora da astaxantina foi reportada como superior ao β -caroteno e cantaxantina e seu efeito imunológico foi observado em inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* em humanos (PARK et al., 2010). Também se observou efeito positivo na resistência muscular de atletas, visto que atividades físicas intensas geram altos níveis de radicais livres (BARALIC et al., 2015).

A inibição do estresse oxidativo confere à astaxantina potencial da aplicação em diversas outras fisiopatologias nas áreas: dermatológica (ITO; SEKI; UEDA, 2018), prevenção de neoplasias (MCCALL et al., 2018) e tratamento adjuvante de doenças neurodegenerativas (FAKHRI et al., 2019).

3.1.3 Fontes naturais de astaxantina

Diversos microrganismos são capazes de sintetizar astaxantina, como as microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e *Chlorococcum sp.*, as leveduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Candida utilis*, e as bactérias *Agrobacterium aurantiacum*, *Halobacterium salinarum*, *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium spp.* (AMBATI et al., 2014). A partir desses microrganismos, a astaxantina é transportada na cadeia alimentar pelos plânctons, crustáceos (ex. krill) e peixes (ex. salmão) (HIGUERA-CIAPARA; FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006; RAO; SINDHUJA et al., 2013).

Dentre os microrganismos mais ricos em astaxantina e de elevada produtividade, temos como destaque a microalga *Haematococcus pluvialis*, com teor médio de 1 a 4% (em peso seco), e a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, com aproxima-

damente 2%. Nota-se que a estrutura química da astaxantina varia consideravelmente dependendo de sua fonte produtora, como exibido na Tabela 1.

TABELA 1 – FONTES NATURAIS DE ASTAXANTINA E SUAS VARIAÇÕES ESTRUTURAIS

Fonte	Astaxantina (ppm)	Isômeros Ópticos (%)			Isômeros Geométricos (%)		Grau de Esterificação (%)		
		3R,3'R	3R,3'S	3S,3'S	Trans	Cis	Livre	Mono-éster	Di-éster
Salmão de cativeiro	2-8	25	50	25					
Salmão selvagem	5-30	12-17	2-6	78-85					
Krill	120	9-55	7-21	38-70	75	25	4-5	31-35	61-64
<i>Phaffia rhodozyma</i>	5.000-10.000	98	-	2	70-90	10-30	100	-	-
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	20.000	-	-	100	95	5	100	-	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10.000-40.000	4	8	88	70	30	5	85	15
Sintética	100.000	25	50	25	65-75	25-35	100	-	-

FONTE: Mimoun-Benarroch et al. (2016)

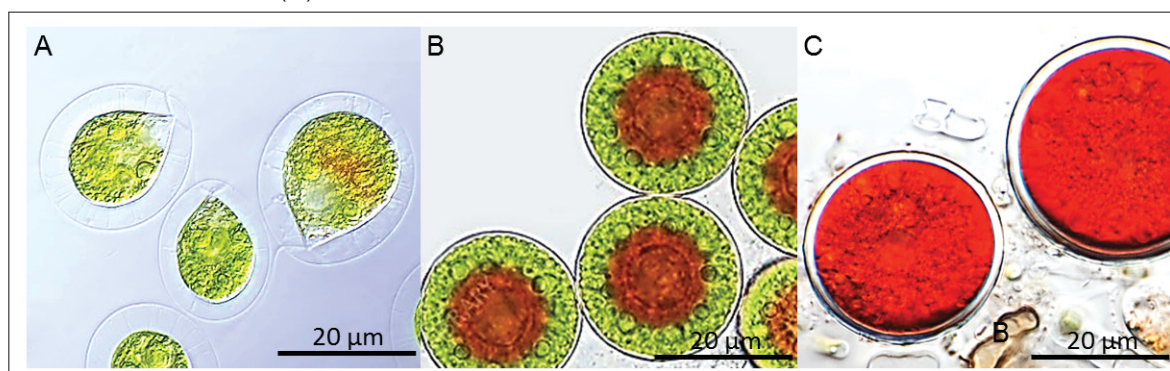
3.2 HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS

A microalga *Haematococcus pluvialis* pertence à divisão Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem *Volvocales* e família *Haematococcaceae*. É caracterizada como microalga verde de água doce, unicelular, móvel e biflagelada (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Como muitas outras espécies da ordem *Volvocales*, condições de estresse induzem uma drástica transformação morfológica na *H. pluvialis*, a qual perde os flagelos e se transforma em cistos chamados de hematocistos, como mostra a Figura 5, nos quais se estabelece intensa produção de astaxantina como mecanismo de proteção celular (BOUSSIBA; VONSHAK, 1991).

A transformação em hematocistos é acompanhada pela formação de uma espessa parede celular de alta resistência físico-química (HAN; LI; HU, 2013). Diante do desafio de melhorar a acessibilidade do conteúdo intracelular da *H. pluvialis*, é essencial conhecer a morfologia da parede celular, sobretudo sua composição bioquímica, para desenvolver eficientes métodos e condições de ruptura celular e difusão de solventes. Para tanto, Hagen, Siegmund e Braune (2002) verificaram sua morfogênese

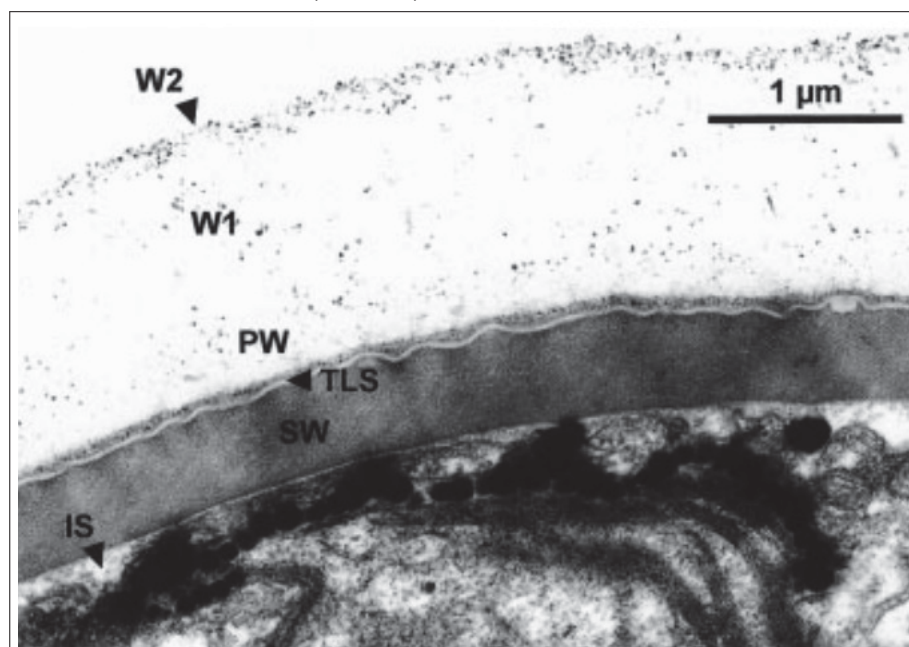
FIGURA 5 – IMAGEM MICROSCÓPICA DE CÉLULAS DE *H. PLUVIALIS* EM DIFERENTES FASES DO SEU CICLO DE VIDA. (A) CÉLULAS FLAGELADAS; (B) CÉLULAS INTERMEDIARIAS IMÓVEIS; (C) HEMATOCISTOS



FONTE: Adaptado de Fox (2011).

e ultraestrutura através de microscopia eletrônica por transmissão. As imagens obtidas no estudo, como a Figura 6, mostram nitidamente que a parede celular do hematocisto é morfologicamente composta por diversas camadas.

FIGURA 6 – IMAGEM DA PAREDE CELULAR DA *H. PLUVIALIS* NO ESTÁGIO HEMOCÍSTICO OBTIDA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA POR TRANSMISSÃO, CARACTERIZADA PELA ESPESSE PAREDE SECUNDÁRIA (SW) E INTERESPAÇO (IS), ENVOLVIDA PELA CAMADA TRILAMINAR (TLS), PAREDE PRIMÁRIA (PW) E REMANESCENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR (W1, W2)



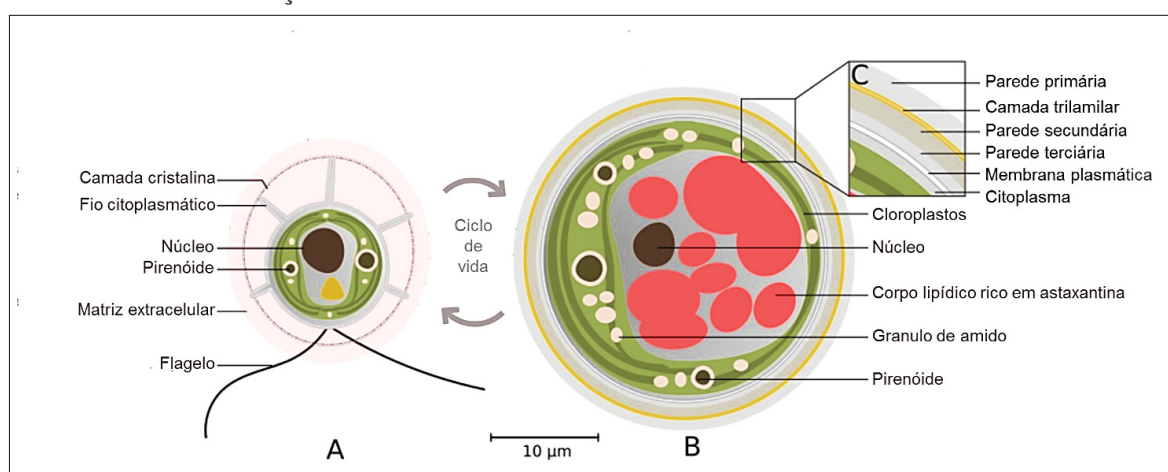
FONTE: Hagen, Siegmund e Braune (2002)

Segundo os autores, a morfogênese da célula móvel para o hematocisto ocorre em quatro fases: (i) arredondamento dos protoplastos e perda de mobilidade; (ii) deposição e formação da parede primária; (iii) formação da camada trilaminar; (iv) produção de grande quantidade de polissacarídeos para formação de uma espessa parede secundária. Demais diferenças morfológicas entre a célula móvel e o hematocisto estão

melhor representadas no esquema ilustrado na Figura 7.

Em relação à composição química da parede celular dos hematocistos, embora possa depender das condições de cultivo e estresse, análises bioquímicas realizadas por Hagen, Siegmund e Braune (2002) indicam que a parede celular nesse estágio representa aproximadamente 16% da massa celular seca. É composta predominantemente por carboidratos não celulósicos (70%), além de celulose (3%), proteínas (6%) e materiais resistentes a acetólise (3%). Dentre os carboidratos, grande parte é composta por manose (89,4%), seguido de glucose (6,4%), arabinose (1,6%) e xilose (1,3%).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DOIS ESTÁGIOS CELULARES DA *H. PLUVIALIS*. (A) ESTRUTURA DA CÉLULA FLAGELADA. (B) ESTRUTURA DO HEMATOCISTO. (C) COMPOSIÇÃO DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DO HEMATOCISTO



FONTE: Traduzido e adaptado de Baudalet et al. (2017)

Quanto à elevada resistência físico-química da parede celular de *Haematococcus pluvialis*, não há ainda estudos que comprovem a origem dessa característica. Inicialmente, estudos verificaram que a parede é constituída por esporopolenina, um polímero muito resistente à degradação que normalmente protege esporos de pólen (BURCZYK, 1986). Posteriormente, a formação da parede do hematocisto foi descrita por Montsant, Zarka e Boussiba (2001) como uma camada trilaminar com material semelhante à esporopolenina, o algenano (biopolímero resistente existente nas paredes celulares de algumas algas verdes que facilita a sua preservação e registro fóssil).

Apesar da recalcitrância característica do algenano, Montsant, Zarka e Boussiba (2001) observaram que a quantidade de algenano presente na parede da *H. pluvialis* não é suficiente para causar, de forma isolada, o aumento de espessura da parede celular após o encistamento. Os autores levantaram a hipótese de que a rigidez e espessamento da parede poderiam ser justificados por mudanças no arranjo molecular (diferentes ligações cruzadas) entre o algenano e outros componentes, como os polissacarídeos. No entanto, carecem estudos que comprovem essa hipótese.

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *H. PLUVIALIS*

Ao longo das últimas décadas, diversas tecnologias foram desenvolvidas para extração de astaxantina a partir da *H. pluvialis*. Os métodos que resultaram nos melhores rendimentos são baseados sistematicamente em duas etapas: ruptura celular (por meios químicos, mecânicos ou físicos) e subsequente extração sólido-líquido com solventes de baixa polaridade. Tal constatação está baseada nos rendimentos dos métodos que realizaram extração direta sem ruptura celular, expostos na Tabela 2, em comparação com os demais métodos expostos nas Tabelas 3 – 5.

Como já detalhado na Seção 3.2, a *H. pluvialis* se transforma em hematocistos em resposta a condições de estresse como depleção de nutrientes ou intensa foto irradiação. Conforme Hagen, Siegmund e Braune (2002), a espessa parede celular do hematocisto é caracterizada por uma extraordinária resistência a agentes mecânicos e químicos, bem como uma permeabilidade muito baixa. Este fato decresce substancialmente a biodisponibilidade dos carotenoides acumulados no meio intracelular, havendo então a necessidade de aplicar técnicas de ruptura celular, as quais em geral elevam consideravelmente o custo do processo (ZGHEIB et al., 2018).

3.3.1 Métodos de extração direta

Na literatura, os métodos publicados de extração direta de astaxantina da *H. pluvialis* usam o contato sólido-líquido da biomassa com solventes pouco polares, como exposto na Tabela 2. Mendes-Pinto et al. (2001) e Sarada et al. (2006) submeteram células de *H. pluvialis* ao contato com acetona por 16 e 24 h, respectivamente, à temperatura ambiente, e obtiveram recuperação de 21% e 14% de astaxantina. Já na faixa de 50 °C, Molino et al. (2018) obtiveram recuperação de apenas 1% com 20 min de tratamento. Ao passo que Ruen-ngam et al. (2011) obtiveram 70% com 4 h a 56 °C. Usando dois ciclos de 4 h cada com CO₂ supercrítico foi possível aumentar a recuperação para 81% (KWAN et al., 2018). Recentemente, Samorì et al. (2019) obtiveram 88% de recuperação usando acetato de etila por 30 min. No entanto, tal resultado desperta alguns questionamentos, visto que esse solvente possui limitação de transferência de massa em meios aquosos, como a biomassa úmida.

TABELA 2 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *H. PLUVIALIS* SEM RUPTURA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO DIRETA COM SOLVENTE

Método	Agente	Condições	Solvente	Condições	Recuperação de astaxantina	Referência
Extração direta com solvente	-	-	Acetato de Etila	30 min	88%	Samorì et al. (2019)
	-	-	SC-CO ₂	45 °C, 116/483 bar, 2x 4 h	81%	Kwan et al. (2018)
	-	-	Acetona	56.5 °C, 4 h	70%	Ruen-ngam et al. (2011)
	-	-	Acetona	25 °C, 16 h	21%	Mendes-Pinto et al. (2001)
	-	-	Acetona	24 h	14.13%	Sarada et al. (2006)
	-	-	Acetona	50 °C, 100 bar, 20 min	< 1%	Molino et al. (2018)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: SC-CO₂, Dióxido de carbono supercrítico.

3.3.2 Métodos químicos

Os métodos químicos já publicados sobre extração de astaxantina da *H. pluvisalis* consistem no uso de álcalis, ácidos, enzimas e líquidos iônicos para ruptura celular, seguido do contato sólido-líquido da biomassa com solventes pouco polares, como exposto na Tabela 3. Quanto ao tratamento enzimático, Mendes-Pinto et al. (2001) avaliaram o potencial das enzimas Proteinase K⁺ e Driselase na ruptura celular, obtendo 26% de recuperação de astaxantina em 1 h. Machado Jr. et al. (2015) obtiveram significativa melhora na recuperação (79%) usando Glucanex, por 30 min.

Já o emprego de líquidos iônicos (LI) resultou em alta taxa de recuperação (99%), reportada recentemente por Choi et al. (2019) ao usar 6.7% [Bmim] HSO₄ (30 °C, 1 h). Contudo, além do alto custo de aquisição dos LI, fatores como toxicidade, recuperação e reciclagem devem ser melhor avaliados em futuras aplicações (KUNZ; HÄCKL, 2016).

O tratamento alcalino foi avaliado por Mendes-Pinto et al. (2001), com NaOH (0.1 M, 30 min), onde obteve recuperação de 32%. A baixa recuperação pode ser parcialmente explicada pela degradação da astaxantina durante o processo, efeito observado por Li-Yan Zhao et al. (2006) e Chen, Huang e Ouyang (2005).

Em relação ao tratamento ácido, este método foi avaliado primeiramente por Mendes-Pinto et al. (2001), com HCl (0.1 M, 30 min, 25 °C), o qual observou recuperação de 42%. Melhores resultados (96%) foram obtidos por Sarada et al. (2006) ao usar HCl em concentração mais elevada e menor tempo (2 M, 10 min, 70 °C). As análises em TLC e HPLC mostraram ausência de degradação da astaxantina, havendo conservação da estereoisomeria e grau de esterificação. Recentemente, Liu, Zeng et al. (2018), realizaram o tratamento com HCl em condições mais severas (4 M, 60 min, 70 °C), e obtiveram 80% de recuperação. Tais estudos corroboram para a hipótese de que possa existir um ponto ótimo de recuperação de astaxantina ao usar condições brandas de concentração de ácido e tempo. Contudo, o efeito da interação dessas variáveis, além de outras como temperatura, ainda não foi estudado na literatura.

De modo geral, os métodos químicos possuem vantagens como: dispensar a secagem da biomassa, baixo custo energético e fácil scale-up, porém os reagentes devem ser cuidadosamente selecionados e otimizados considerando suas biotoxicidades e reatividades com a astaxantina.

TABELA 3 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *H. PLUVIALIS* COM RUPTURA QUÍMICA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE

Método	Agente	Condições	Solvente	Condições	Recuperação de astaxantina	Referência
	LI	6.7% [Bmim] HSO ₄ , 30 °C, 1 h	Hexano	25 °C, 2 h	99%	Choi et al. (2019)
	HCl	2 M, 70 °C, 10 min	Acetona	1 h	96%	Sarada et al. (2006)
	LI	40% [Bmim] Cl, 65 °C, 1 h	Metanol	60 °C, 2x 1 h	91%	Liu, Yue et al. (2019)
	LI /SHS	DMCHA + CO ₂	DMCHA	24 h	87.2%	Huang et al. (2018)
Ruptura química	LI	40% [Bmim] Cl, 60 °C, 1 h	Metanol	50 °C, 2x 1 h	85.42%	Liu, Zeng et al. (2018)
+ Extração com solvente	Glucanex + Ultrassom	pH 4.5, 55 °C, 40 kHz, 30 min	DCM	25 °C, 16 h	83.90%	Machado Jr. et al. (2015)
	HCl	4 M, 70 °C, 1 h	Acetona	25 °C, 1 h	80.12%	Liu, Zeng et al. (2018)
	Glucanex	pH 4.5, 55 °C, 30 min	DCM	25 °C, 16 h	79.34%	Machado Jr. et al. (2015)
	LI	40% [Emim] DBP, 45 °C, 90 min	ETAC	2x 1 h	77%	Desai et al. (2016)
	HCl	0.1 M, 25 °C, 30 min	Acetona	25 °C, 16 h	42%	Mendes-Pinto et al. (2001)
	NaOH	0.1 M, 25 °C, 30min	Acetona	25 °C, 16 h	32%	Mendes-Pinto et al. (2001)
	Proteinase K + Driselase	pH 5.8 , 30 °C, 1 h	Acetona	25 °C, 16 h	26%	Mendes-Pinto et al. (2001)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: HCl, Ácido clorídrico; NaOH, Hidróxido de sódio; [Bmim] Cl, Cloreto de 1-butil-3-metil-imidazol; DCM, Diclorometano; SC-CO₂, Dióxido de carbono supercrítico, [Emim] DBP, Dibutilfosfato de 1-etil-3-metil-imidazol; DMCHA, Dimetilciclohexilamina; LI, Líquidos iônicos; SHS, *Switchable hydrophilicity solvents*.

3.3.3 Métodos mecânicos

Os métodos mecânicos já estudados para extração de astaxantina da *H. pluvialis* consistem no emprego de moedores, moinho de bolas, maceração e microfluidização de alta pressão, para ruptura celular, seguido do contato sólido-líquido da biomassa com solventes pouco polares, como exposto na Tabela 4.

Em geral, as taxas de recuperação obtidas nesses métodos são altas, entre 91% a 98%, visto que a força de cisalhamento gerada por tais técnicas é geralmente suficiente para romper a parede celular (DI SANZO et al., 2018). Por trabalharem com biomassa na forma seca, se torna tecnicamente viável usar CO₂ supercrítico como solvente no processo de extração (MOLINO et al., 2018).

No entanto, a viabilização econômica desses processos ainda depende de melhorias com respeito ao alto consumo energético, à dificuldade de scale-up e à necessidade de empregar gases inertes, como N₂, para evitar a oxidação da astaxantina durante o processo (KIM et al., 2016).

3.3.4 Métodos físicos

Os métodos físicos já investigados para extrair astaxantina da *H. pluvialis* consistem na utilização de autoclave, tratamento hidrotérmico, micro-ondas, ultrassom, campo magnético, *spray-dryer* e campo elétrico pulsado (PEF) para ruptura celular, seguido do contato sólido-líquido da biomassa com solventes pouco polares, como exposto na Tabela 5.

De forma similar aos métodos químicos, os métodos físicos também possuem a vantagem de trabalhar com a biomassa úmida, dispensando o processo de secagem. Quanto à recuperação, os melhores resultados foram observados por Cheng et al. (2017) usando tratamento hidrotérmico (99%), seguido do emprego de autoclave (92%) por Mendes-Pinto et al. (2001). Os demais métodos não alcançaram recuperação satisfatória (<75%).

Apesar da alta taxa de recuperação obtida, a alta temperatura (200 °C) praticada no tratamento hidrotérmico converteu grande parte da astaxantina originalmente esterificada para a forma livre (CHENG et al., 2017), a qual é mais instável (ZHOU et al., 2019) e possui menor biodisponibilidade (SU; YU; LIU, 2020).

TABELA 4 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *H. PLUVIALIS* COM RUPTURA MECÂNICA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE

Método	Agente	Condições	Solvente	Condições	Recuperação de astaxantina	Referência
	Moinho de bolas	5 min	SC-CO ₂	50 °C, 550 bar, 120 min	98.6%	Di Sanzo et al. (2018)
	Moedor	-	SC-CO ₂ + EtOH	60 °C, 300 bar	97%	Valderrama et al. (2003)
	Homogeneizador	-	Acetona	-	96%	Mendes-Pinto et al. (2001)
Ruptura mecânica	Homogeneizador	-	Dodecano / NaOH-MeOH	2 estágios, 48 h	95%	Kang e Sim (2007)
+	Homogeneizador	-	Olive oil	25 °C, 48 h	93.9%	Kang, Sim et al. (2008)
Extração com solvente	Moinho de bolas	5 min	SC-CO ₂	65 °C, 550 bar, 20 min	92%	Molino et al. (2018)
	Moinho de bolas	-	SC-CO ₂ + EtOH	60 °C, 300 bar	92%	Nobre et al. (2006)
	HPMF	100 MPa	Acetato de Etila	2x 30 min	91.43%	Liu, Zeng et al. (2018)
	Moinho de bolas	5 min	Acetona	40 °C, 100 bar, 20 min	86%	Molino et al. (2018)
	Maceração	45 °C, 15 min	Acetona	simultâneo	57%	Ruen-ngam et al. (2011)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: SC-CO₂, Dióxido de carbono supercrítico; EtOH, Etanol; MeOH, Metanol; NaOH, Hidróxido de sódio; HPMF, Microfluidização de alta pressão.

TABELA 5 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA *H. PLUVIALIS* COM RUPTURA FÍSICA DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE

Método	Agente	Condições	Solvente	Condições	Recuperação de astaxantina	Referência
	Hidrotérmico	200 °C, 6 MPa, 10 min	Acetona	20 min	99%	Cheng et al. (2017)
	Hidrotérmico	200 °C, 8 MPa, 10 min	SC-CO ₂ + EtOH	55 °C, 8 MPa, 30 s	98%	Cheng et al. (2018)
	Autoclave	30 min, 121 °C	Acetona	-	92%	Mendes-Pinto et al. (2001)
Ruptura física +	Micro-ondas	720 W, 2450 MHz, 75 °C, 5min	Acetona	simultâneo	74%	Ruen-ngam et al. (2011)
Extracção com solvente	Ultrassom	270 W, 38.5 kHz, 45 °C, 60 min	Acetona	simultâneo	73%	Ruen-ngam et al. (2011)
	Campo magnético	18 mT, 25 °C, 50 min	Acetato de Etila	40 °C, 30 min	62.72%	Xiaoyan Zhao et al. (2016b)
	Campo magnético	20 mT, 25 °C, 60 min	Acetato de Etila	simultâneo	40.27%	Xiaoyan Zhao et al. (2016a)
	Ultrassom	100 W, 40 °C, 60 min	Acetato de Etila	simultâneo	37.23%	Xiaoyan Zhao et al. (2016a)
	Micro-ondas	2450 MHz, 40 °C, 40 min	Acetato de Etila	simultâneo	36.88%	Xiaoyan Zhao et al. (2016a)
	Ultrassom	600 W, 20 kHz, 30 min	Metanol	25 °C, 2 h	11.79%	Liu, Zeng et al. (2018)
	Spray dryer	Entrada 180 °C, Saída 115 °C	Acetona	-	7%	Mendes-Pinto et al. (2001)
	PEF	30 kV/cm, 30 min	Metanol	25 °C, 2 h	6.52%	Liu, Zeng et al. (2018)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: SC-CO₂, Dióxido de carbono supercrítico; EtOH, Etanol; PEF, Campo elétrico pulsado.

3.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA ASTAXANTINA

Boussiba, Fan e Vonshak (1992) publicaram o primeiro método para extração e quantificação de astaxantina obtida da *Haematococcus*, através da espectrofotometria. Tal método consiste na hidrólise alcalina da clorofila com 5% KOH em 30% metanol, seguido de múltiplas imersões da biomassa em DMSO para extração da astaxantina sem romper a parede celular, e por fim, realizada quantificação via absorvância em 492 nm – comprimento de maior absorvância da astaxantina. Devido à sua simplicidade e rapidez, esse método tem sido amplamente aplicado na análise de carotenoides provenientes da *Haematococcus* (AFLALO et al., 2007; FAN; VONSHAK; BOUSSIBA, 1994; MIAO et al., 2008; OLAIZOLA, 2000; YU et al., 2004; ZHEKISHEVA et al., 2002).

No entanto, Chen, Huang e Ouyang (2005), assim como outros autores (ZHAO, L.-Y. et al., 2006), reportaram considerável instabilidade e degradação da astaxantina em tratamentos alcalinos, mesmo em condições brandas. Recentemente, Su, Xu et al. (2018) observaram 11% de redução no teor de astaxantina em 30 min de hidrólise a 5°C com 0,021 M de NaOH em metanol, chegando a 71,8% de redução aos 195 min de reação. O mesmo estudo identificou que durante o tratamento alcalino, a degradação da astaxantina produziu diversos pigmentos como semi-astaceno e astaceno, assim como modificou substancialmente a proporção entre seus isômeros. Além disso, esses pigmentos possuem importante nível de absorvância na região de 492 nm, o que torna o método proposto por Boussiba, Fan e Vonshak (1992) inadequado para quantificar astaxantina. Sarada et al. (2006) também reportaram redução de 40% na astaxantina após tratamento com 5% KOH em metanol por 10 min a 4°C. Portanto, o uso de álcalis fortes deve ser restrito para quando somente necessita-se obter astaxantina pura para fins qualitativos, porém não é adequado para quantificar astaxantina.

Li et al. (2012) propuseram um método para quantificar astaxantina usando espectrofotometria que contorna a interferência causada pela clorofila, assim como pelos pigmentos derivados da degradação da astaxantina. Tal método não utiliza o pré-tratamento alcalino para remoção da clorofila e consiste em medir absorvância do extrato em 530 nm, onde, apesar de não ser a faixa de sua absorvância máxima, somente a astaxantina apresenta absorvância em nível relevante, eliminando ruídos de leitura por outros compostos. Desde então, diversos autores adotaram esse método para quantificar astaxantina (MOLINO et al., 2018; LIYANAARACHCHI et al., 2020; WANG; GAO et al., 2019).

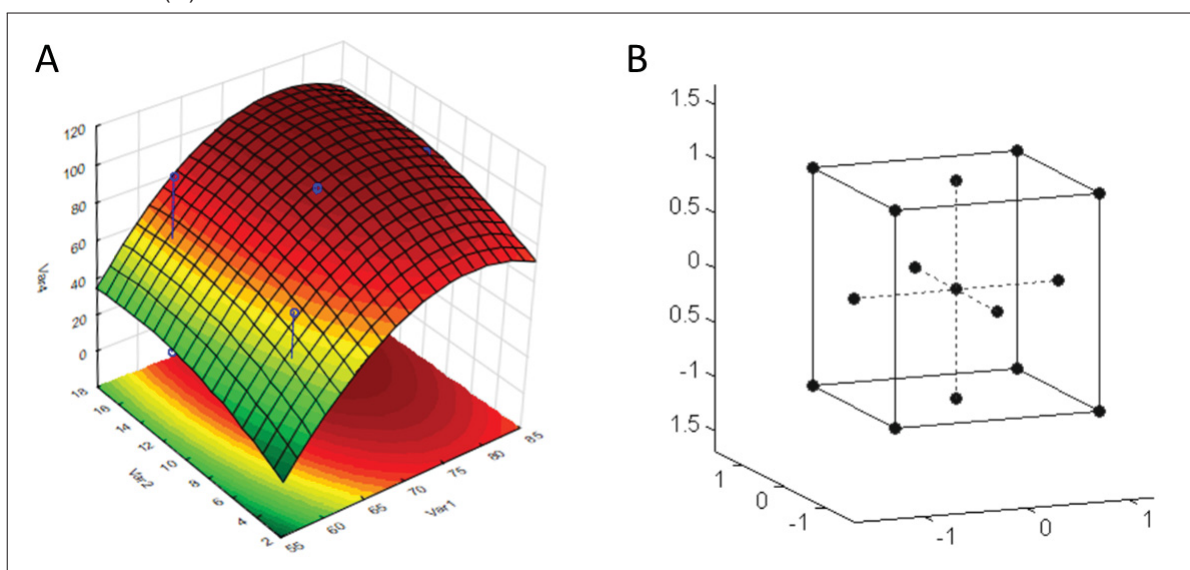
3.5 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC)

O delineamento de experimentos representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. O resultado obtido quando a variável resposta é representada graficamente em função dos fatores avaliados é chamado de superfície de resposta, como ilustra a Figura 8 A. Dentre os diversos benefícios das técnicas de delineamento experimental, destacam-se a redução do número de ensaios e o estudo simultâneo de diversas variáveis.

O delineamento composto central (DCC) introduzido por Box, Hunter e Hunter (1978) é um dos delineamentos mais populares para o ajuste de modelos de superfície de resposta. Ele consiste, geralmente, em n_f pontos de um fatorial de 2^k , mais $2k$ pontos axiais e n_c pontos centrais (nível intermediário “0” de cada fator), sendo k o número de fatores. Os pontos centrais fornecem uma estimativa do erro puro e informam sobre a existência, ou não, de curvatura no sistema. Caso exista, a adição de pontos axiais permite uma estimação eficiente dos termos quadráticos puros.

Os pontos axiais são colocados a uma distância α do centro do delineamento. A escolha do α e n_c depende das propriedades exigidas pelo delineamento, tais como ortogonalidade ou rotacionalidade. A Figura 8 B mostra um DCC para $k = 3$ fatores, com os níveis codificados em -1 e 1. Os pontos axiais têm coordenadas $(\pm\alpha, 0, 0)$, $(0, \pm\alpha, 0)$, $(0, 0, \pm\alpha)$ e o ponto central, $(0, 0, 0)$.

FIGURA 8 – (A) REPRESENTAÇÃO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL DE 3 FATORES; (B) EXEMPLO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA



FONTE: O autor (2020).

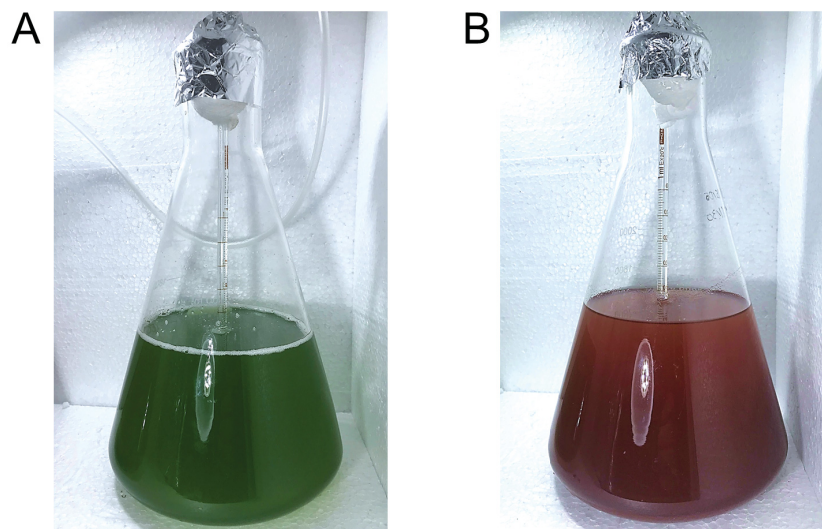
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DA MICROALGA

A *H. pluvialis* foi obtida do banco de cepas do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), localizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR). O cultivo da microalga foi realizado no meio de cultura autotrófico BBM (Bold Basal Medium) com composição: NaNO_3 2,94 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,17 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,30 mM; K_2HPO_4 0,43 mM; KH_2PO_4 1,29 mM; NaCl 0,43 mM; elementos traço: EDTA 8,5 μM ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,9 μM ; H_3BO_3 9,0 μM ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,50 μM ; $\text{MnCl} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,36 μM ; MoO_3 0,26 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,31 μM ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,084 μM . O meio foi ajustado para o pH 7,5 e autoclavado a 121 °C por 15 min.

Os cultivos foram incubados em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 1,6 L de cultivo a 23 ± 1 °C, em fotoperíodo integral, com aeração constante e intensidade luminosa de 1,5 klux (lâmpadas fluorescentes de 40 W), como mostra a Figura 9. O crescimento foi acompanhado diariamente através de microscópio óptico (40x de aumento). A indução de estresse foi aplicada a partir do sétimo dia pelo aumento de lâmpadas fluorescentes.

FIGURA 9 – CULTIVOS DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* EM ERLLENMEYER DE 2 L. (A) CULTIVO DE 7 DIAS, EM CRESCIMENTO VEGETATIVO; (B) CULTIVO DE 20 DIAS, COM PREDOMINÂNCIA DE HEMATOCISTOS RICOS EM ASTAXANTINA



FONTE: O autor (2020).

4.2 OBTENÇÃO DA BIOMASSA

A microalga foi coletada com 20 dias de cultivo na fase de estresse com predominância de hemacistos ricos em astaxantina. A biomassa foi obtida através da

decantação dos cultivos, remoção do sobrenadante e armazenamento na forma de suspensão concentrada a 4 °C.

4.3 PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Visando padronizar a quantidade de biomassa tratada em todos os experimentos, a biomassa na forma de suspensão concentrada foi fracionada em tubos de ensaio. Para isso, ajustou-se a concentração da suspensão de biomassa para 2,50% (massa seca de biomassa/massa suspensão) empregando o método gravimétrico (GIANNELLI et al., 2015). Transferiu-se 4 g da suspensão em cada tubo de ensaio. A quantidade final de biomassa nas amostras ($100 \pm 0,1$ mg) foi verificada empregando o método gravimétrico em três amostras.

4.4 REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS

Os ácidos (clorídrico, acético e láctico), solventes (acetona, acetato de etila, etanol e DMSO), usados nos experimentos de ruptura celular, extração de astaxantina e determinação espectrofotométrica, foram todos adquiridos com grau analítico de pureza.

Os equipamentos usados nos experimentos consistiam em: extrator Soxhlet (Phox, Brasil), rotaevaporador (modelo 802, Fisatom, Brasil) e agitador magnético (modelo HJ-4, Ionlab, Brasil).

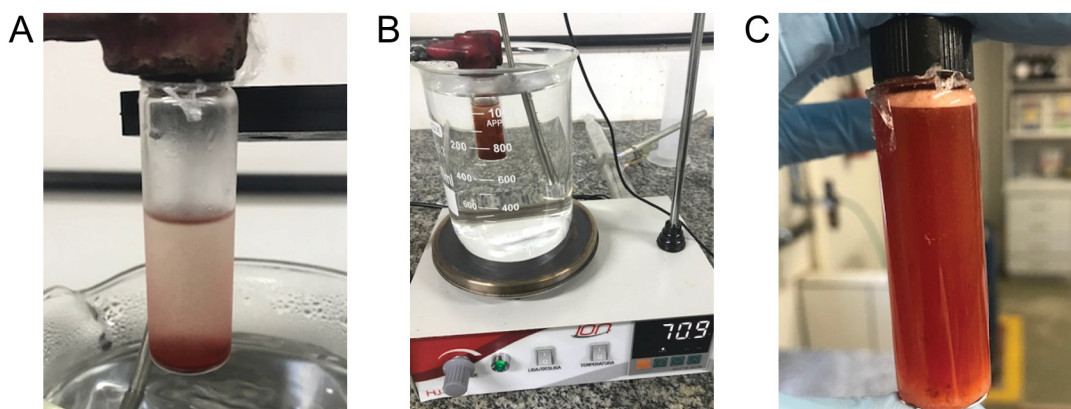
Os métodos analíticos foram conduzidos usando: espectrofotômetro (modelo Lambda 25 UV/VIS, PerkinElmer, EUA), banho ultrassom (modelo L200, Schuster, Brasil), microfiltros de fibra de vidro (GF-1, Macharey-Nagel, Alemanha) e balança analítica de precisão 0,01 mg (modelo AUW220D, Shimadzu, Japão).

4.5 RUPTURA CELULAR VIA HIDRÓLISE ÁCIDA

O procedimento de ruptura celular da *H. pluvialis* se iniciou com a padronização do volume dos tubos de ensaio previamente preparados, usando água destilada, com a finalidade de igualar o volume final (8 mL) de todos os tubos após a adição de diferentes volumes de ácido. Assim, padroniza-se a transferência de calor no banho térmico e a transferência de massa entre ácido e biomassa ao longo dos experimentos.

Para cada experimento, a amostra no tubo de ensaio foi pré-aquecida por 2 min em banho térmico para alcançar a temperatura delineada. Em seguida, o volume de ácido corresponde ao experimento foi adicionado juntamente com breve agitação. Vedou-se o tubo de ensaio no banho térmico e iniciou-se a contagem do tempo previamente delineado, com leve agitação a cada minuto (Figura 10).

FIGURA 10 – APARATO EXPERIMENTAL DA RUPTURA CELULAR VIA HIDRÓLISE ÁCIDA. (A) BIOMASSA ANTES DA RUPTURA CELULAR; (B) BIOMASSA DURANTE A HIDROLISE; (C) BIOMASSA APÓS HIDRÓLISE E NEUTRALIZAÇÃO



FONTE: O autor (2020).

Ao final do tempo de hidrólise, o tubo de ensaio foi imergido imediatamente em banho a 20 °C, seguida da adição de quantidade necessária de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para completa neutralização do ácido. A etapa de neutralização é necessária tanto para garantir o tempo de reação delineado, como para evitar reações indesejadas com os solventes (ex. hidrólise do acetato de etila formando ácido acético). O uso de NaHCO_3 como agente neutralizante é uma forma de evitar o uso de álcalis fortes como KOH e NaOH que, segundo Chen, Huang e Ouyang (2005) e Su, Xu et al. (2018), degradam facilmente a astaxantina.

4.6 EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA

A extração da astaxantina de todos os experimentos iniciou através da transferência do conteúdo de cada tubo de ensaio para o extrator Soxhlet (Figura 11), juntamente com a adição de 200 mL do solvente correspondente ao experimento.

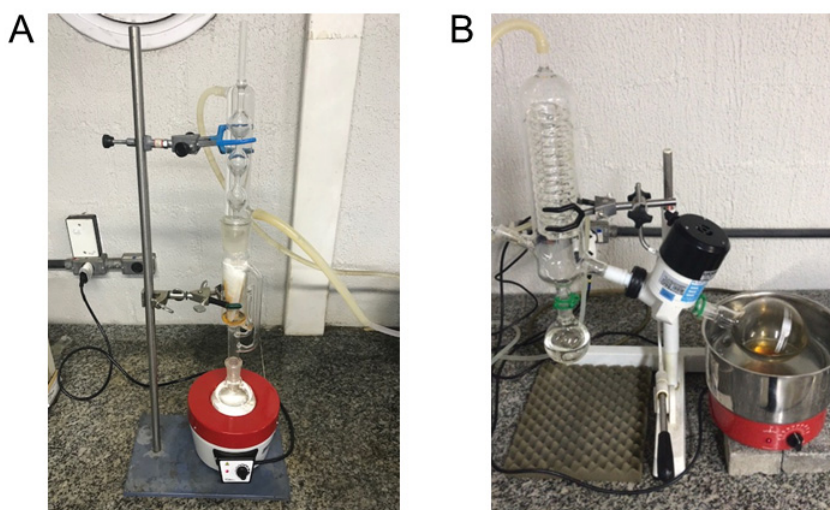
A fim de isolar o efeito químico que cada solvente exerce na extração, foi necessário padronizar os três parâmetros a seguir:

1. Temperatura de extração: padronizada em 56 °C (temperatura de ebulição da acetona à pressão ambiente) para evitar a influência da degradação da astaxantina em temperaturas diferentes. Foi utilizado uma bomba a vácuo para reduzir e igualar a temperatura de ebulição dos demais solventes.
2. Quantidade de ciclos: como forma de igualar o potencial de transferência de massa de cada solvente, estabeleceu-se dois ciclos, pois foi o suficiente para que a biomassa ficasse incolor ao usar acetona em ensaios prévios.

3. Tempo de extração: padronizou-se o tempo de todos os experimentos em 30 min, igualando o tempo de transferência de massa de cada solvente e evitando a influência da degradação da astaxantina em tempos diferentes. Essa definição está baseada no tempo necessário que o solvente com maior calor latente de vaporização, nesse caso o etanol, leva para completar 2 ciclos no extrator no Soxhlet na potência máxima de aquecimento. Para os demais solventes, foi reduzido a potência do aquecimento para atingir o mesmo tempo de extração com 2 ciclos.

As condições definidas para os três parâmetros citados acima foram empregadas tanto nos testes preliminares, como nos experimentos do DCC. Ao fim de cada extração Soxhlet, os extratos foram transferidos para o roto-evaporador (Figura 11), onde recuperou-se o solvente e obteve-se o óleo de astaxantina.

FIGURA 11 – APARATO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA. (A) EXTRATOR SOXHLET; (B) ROTO-EVAPORADOR



FONTE: O autor (2020).

4.7 TESTES PRELIMINARES

4.7.1 Efeito de diferentes ácidos na ruptura celular

Este teste preliminar consistiu em avaliar o efeito de diferentes ácidos (clorídrico, acético e láctico) na ruptura celular da *H. pluvialis*. Os ácidos foram selecionados com o interesse em investigar o efeito de distintos pKa e polaridades sobre a parede celular. Os experimentos foram realizados submetendo as amostras de biomassa, previamente padronizadas, à hidrólise com cada ácido a 4 N (com base no resultado obtido com HCl por Sarada et al. (2006)), por 10 min, a 70 °C, em duplicata. A recuperação da astaxantina foi realizada através do extrator Soxhlet, usando acetona como solvente,

nas condições de processo (temperatura, quantidade de ciclos e tempo) definidas na Seção 4.6. A análise comparativa entre os ácidos foi realizada através da quantificação de astaxantina recuperada.

4.7.2 Efeito de diferentes solventes na extração sólido-líquido

Este teste preliminar consistiu em avaliar o efeito de diferentes solventes (acetona, acetato de etila e etanol), classificados como GRAS (geralmente reconhecido como seguro), na extração sólido-líquido da biomassa pré-tratada de *H. pluvialis*. Os solventes foram selecionados em razão de suas distintas polaridades, e por possuírem calor de vaporização relativamente baixo.

Os experimentos foram realizados submetendo as amostras de biomassa, previamente padronizadas e pré-tratadas (hidrolisadas com HCl a 4 N, 10 min, 70 °C (SARADA et al., 2006)), à extração sólido-líquido no extrator Soxhlet com cada solvente, em duplicata, nas condições de processo (temperatura, quantidade de ciclos e tempo) definidas na Seção 4.6. A análise comparativa entre os solventes foi realizada através da quantificação de astaxantina recuperada.

4.8 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Neste estudo foi realizado um delineamento composto central (DCC) para otimizar a recuperação de astaxantina de *H. pluvialis*, avaliando os efeitos da concentração de ácido, tempo e temperatura de hidrólise na ruptura da parede celular.

O desenvolvimento do DCC consistiu em um delineamento fatorial de 3 variáveis em dois níveis (2^3) com 8 experimentos, com mais 6 experimentos nos pontos axiais e mais 3 réplicas no ponto central, com α de 1,353, totalizando 17 experimentos. As variáveis independentes deste processo foram: T - Temperatura da hidrólise, t - Tempo da hidrólise e, $[HCl]$ - Concentração de ácido. Foi adotado como resposta (variável dependente) a concentração de astaxantina do extrato.

Para o desenvolvimento do delineamento, os valores reais das variáveis foram fixados da seguinte forma: temperatura da hidrólise com nível superior (+1) de 80 °C e nível inferior (-1) de 60 °C; tempo de hidrólise com nível superior (+1) de 15 min e inferior (-1) de 5 min; concentração de ácido com nível superior (+1) de 4 N e inferior (-1) de 1 N. O intervalo de valores da concentração de ácido usado na hidrólise foi baseado no estudo de Sarada et al. (2006), os quais notaram maior recuperação de astaxantina ao usar 4 N de HCl, em relação a 2 e 6 N. Os autores mantiveram a temperatura e tempo de ruptura constantes a 70 °C e 10 min, respectivamente. Essa condição foi definida como o ponto central.

O valor de α empregado neste estudo ($\alpha = 1,353$) foi calculado pela Equação

4.1 para que o DCC fosse ortogonal, isto é, um delineamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não estão correlacionados entre si (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

$$\alpha = \sqrt{\frac{\sqrt{N_f \cdot \bar{N}} - N_f}{2}} \quad (4.1)$$

Sendo N = número total de ensaios do DCC; N_f = número de ensaios do delineamento fatorial; k = número de fatores, N_0 = número de ensaios no ponto central.

Na Tabela 6, estão relacionadas as variáveis do processo e seus respectivos valores, de acordo com os níveis fatoriais (+1 e -1), juntamente com os níveis axiais (+1,353 e -1,353) e nível central (0).

TABELA 6 – NÍVEIS E FATORES DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Níveis	Fatores		
	$T(^{\circ}C)$	$t(min)$	$[HCl](N)$
+1,353	84	16,8	4,5
+1	80	15,0	4,0
0	70	10,0	2,5
-1	60	5,0	1,0
-1,353	56	3,2	0,5

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: T : Temperatura de hidrólise; t : Tempo de hidrólise; $[HCl]$: Concentração de ácido; (C): Ponto central

As 3 réplicas no ponto central foram realizadas visando aumentar a uniformidade da precisão no DCC, isto é, igualar a variância da predição do ponto central para todos os pontos fatoriais e axiais. Essas réplicas foram distribuídas uniformemente no início, meio e fim do experimento, detectando assim possíveis instabilidades no processo. Todos os demais ensaios (pontos fatoriais e axiais) foram randomizados. Na Tabela 7 está apresentada a matriz do delineamento composto central com os valores reais das variáveis estudadas.

Os experimentos do DCC foram realizados submetendo as amostras de biomassa, previamente padronizadas, à hidrólise com HCl nas diferentes condições definidas. A recuperação da astaxantina foi realizada através do extrator Soxhlet, usando acetona como solvente.

As seguintes análises foram realizadas: análise microscópica de alterações morfológicas das células após extração, e quantificação da astaxantina.

Os resultados experimentais foram analisados no software STATISTICA® 8.0 (StatSoft, EUA), onde foram ajustados a um modelo matemático através de regressão

TABELA 7 – EXPERIMENTOS E VALORES DOS FATORES DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Experimentos	Fatores		
	$T(^{\circ}C)$	$t(min)$	$[HCl](N)$
1	60 (-1)	5,0 (-1)	1,0 (-1)
2	60 (-1)	5,0 (-1)	4,0 (1)
3	60 (-1)	15,0 (1)	1,0 (-1)
4	60 (-1)	15,0 (1)	4,0 (1)
5	80 (1)	5,0 (-1)	1,0 (-1)
6	80 (1)	5,0 (-1)	4,0 (1)
7	80 (1)	15,0 (1)	1,0 (-1)
8	80 (1)	15,0 (1)	4,0 (1)
9	56 ($-\alpha$)	10,0 (0)	2,5 (0)
10	84 (α)	10,0 (0)	2,5 (0)
11	70 (0)	3,2 ($-\alpha$)	2,5 (0)
12	70 (0)	16,8 (α)	2,5 (0)
13	70 (0)	10,0 (0)	0,5 ($-\alpha$)
14	70 (0)	10,0 (0)	4,5 (α)
15	70 (0)	10,0 (0)	2,5 (0)
16	70 (0)	10,0 (0)	2,5 (0)
17	70 (0)	10,0 (0)	2,5 (0)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: T : temperatura de hidrólise (nível codificado); t : tempo de hidrólise (nível codificado); $[HCl]$: concentração de ácido clorídrico (nível codificado); (C): Ponto central.

múltipla e otimizou-se a recuperação de astaxantina em termos de T , t e $[HCl]$. Os níveis de significância do modelo e de cada fator avaliado foram obtidos por meio da análise de variância (ANOVA). A condição ótima predita pelo modelo foi verificada experimentalmente em triplicata.

4.9 ANÁLISES QUANTITATIVAS

4.9.1 Teor total de astaxantina

O teor total de astaxantina das amostras foi determinado empregando o método de extração e quantificação publicado por Li et al. (2012). Foram selecionadas aleatoriamente três amostras previamente padronizadas. Cada amostra foi centrifugada a 4000 g, o sobrenadante foi descartado e 5 mL de DMSO foram adicionados. O material foi tratado por 10 min em banho ultrassom a 60°C e centrifugado a 4000 g por 5 min e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento se repetiu até que a biomassa ficasse incolor. Os sobrenadantes coletados foram misturados e ajustados com DMSO

até 25 mL, seguido de diluição 1:30. A determinação da concentração de astaxantina total (C_{AT}) foi feita através da leitura da absorbância a 530 nm no espectrofotômetro e calculada pela Equação 4.2.

$$C_{AT}(mg \cdot g^{-1}) = \frac{(A \cdot V \cdot FD \cdot 10)}{(A_{1cm}^{1\%} \cdot m_{amostra})} \quad (4.2)$$

Onde, C_{AT} = concentração de astaxantina, A = absorbância, V = volume de extrato (mL); FD = fator de diluição; $m_{amostra}$ = biomassa seca (g) e $A_{1cm}^{1\%} = 1556$ (absortividade específica da astaxantina a 530 nm em DMSO).

4.9.2 Recuperação de astaxantina

A astaxantina recuperada nos experimentos foi quantificada empregando o método espectrofotométrico publicado por Li et al. (2012). O extrato rico em astaxantina obtido em cada experimento foi diluído em 25 mL de DMSO, seguido de outra diluição 1:30, obtendo assim leituras de absorbância na faixa de 0,2 a 0,8. A determinação da concentração de astaxantina recuperada (C_{AR}), assim como (C_{AT}), foi feita através da leitura da absorbância a 530 nm no espectrofotômetro e calculada pela Equação 4.2. A recuperação de astaxantina (R_{ast}) foi calculada pela Equação 4.3.

$$R_{ast}(\%) = \frac{C_{AR}}{C_{AT}} \cdot 100 \quad (4.3)$$

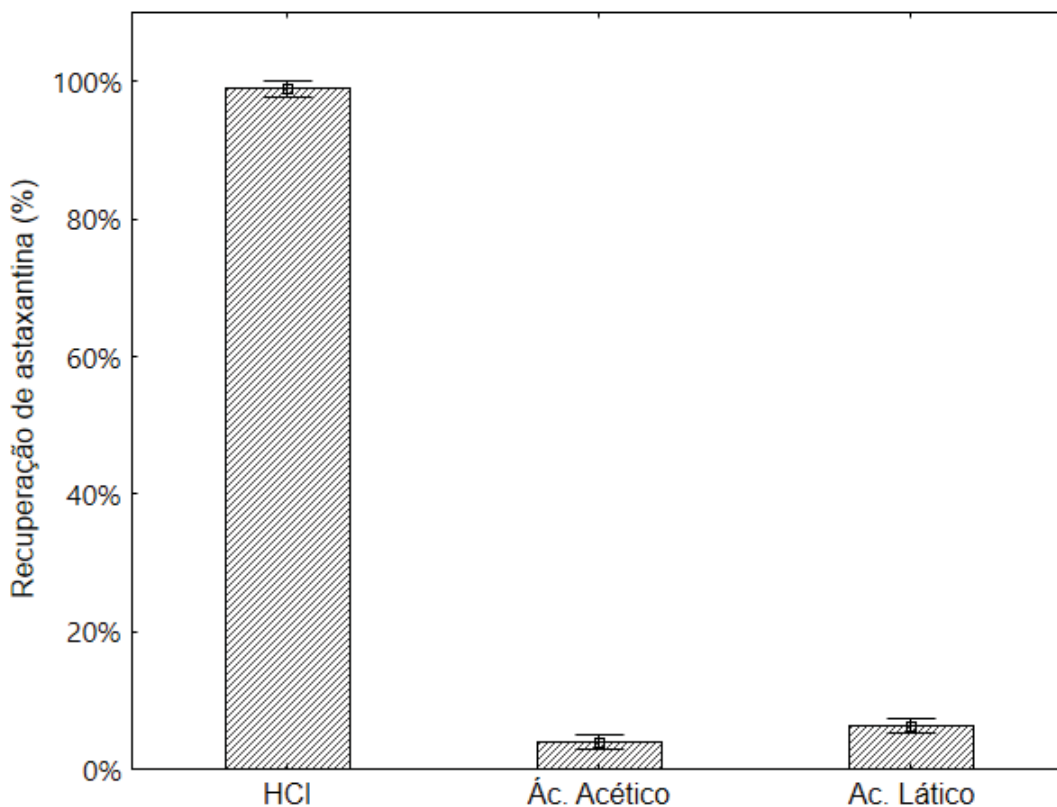
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão abordados: i) os efeitos de diferentes ácidos (clorídrico, acético e láctico) na ruptura da parede celular da *H. pluvialis*; ii) os efeitos de diferentes solventes (acetona, acetato de etila e etanol) na extração de astaxantina da *H. pluvialis*; iii) os efeitos da concentração de ácido, tempo e temperatura de hidrólise na ruptura da parede celular, aplicando um delineamento composto central (DCC), e avaliando a resposta de recuperação de astaxantina da *H. pluvialis*.

5.1 EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA RUPTURA CELULAR

A ruptura da parede celular da *H. pluvialis* empregando diferentes ácidos (clorídrico, acético e láctico) foi realizada, conforme descrito na seção 4.5.1. Os experimentos, realizados em duplicata, forneceram as recuperações de astaxantina para cada condição, como mostra a Figura 12

FIGURA 12 – RESULTADO DA RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA USANDO DIFERENTES ÁCIDOS NA HIDRÓLISE (4 N, 70 °C E 10 min) DE BIOMASSA DE *H. PLUVIALIS*



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: A barra de erro representa o desvio padrão.

Observa-se na Figura 12 que o ácido clorídrico se mostrou consideravelmente

mais adequado para romper a parede celular da *H. pluvialis*, resultando em $98,95 \pm 1,19\%$ de recuperação de astaxantina, ao passo que os ácidos acético e láctico resultaram em $3,94 \pm 0,95\%$ e $6,24 \pm 1,09\%$, respectivamente.

Esse fenômeno demonstra que a recalcitrância química da camada trilaminar da *H. pluvialis*, descrita por Hagen, Siegmund e Braune (2002), exige elevada concentração hidrogeniônica para que a hidrólise possa criar aberturas na parede celular que permitam a difusão do solvente e da astaxantina. Tal concentração hidrogeniônica foi atingida com o ácido clorídrico (o qual possui $pK_a = -6,3$), porém não foi suficiente nos casos dos ácidos láctico ($pK_a = 3,8$) e acético ($pK_a = -4,7$), mesmo empregando uma concentração relativamente alta de 4 N.

Diante de tais resultados, observa-se que a *H. pluvialis* possui um comportamento diferente na ruptura celular, empregando hidrólise ácida, quando comparada a outros microrganismos produtores de astaxantina. Ni et al. (2008) observaram que a presença de cadeia carbônica em ácidos, como o acético e láctico, favoreceu a difusão deles na parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*, o que resultou em maior ruptura celular quando comparado ao emprego de ácidos sem cadeia carbônica, como o clorídrico.

Tal fenômeno sugere a existência de diferentes etapas limitantes para cada microrganismo durante a hidrólise ácida. Estudos indicam que a levedura *Phaffia rhodozyma* possui parede celular relativamente lábil (XIAO et al., 2009; YIN et al., 2013), porém de maior hidrofobicidade (NI et al., 2008). Assim, a parede hidrolisa facilmente com menores concentrações hidrogeniônicas, fazendo com que a etapa limitante seja a transferência de massa do ácido pela parede celular. Já no caso da *H. pluvialis*, a parede celular exibe baixa hidrofobicidade, porém sua elevada recalcitrância química exige maior concentração hidrogeniônica para que a reação de hidrólise avance (DAMIANI et al., 2006; HAGEN; SIEGMUND; BRAUNE, 2002).

A taxa de recuperação obtida usando ácido clorídrico indica ausência de degradação da astaxantina, fato já observado por Sarada et al. (2006), ao usar HCl nas mesmas condições.

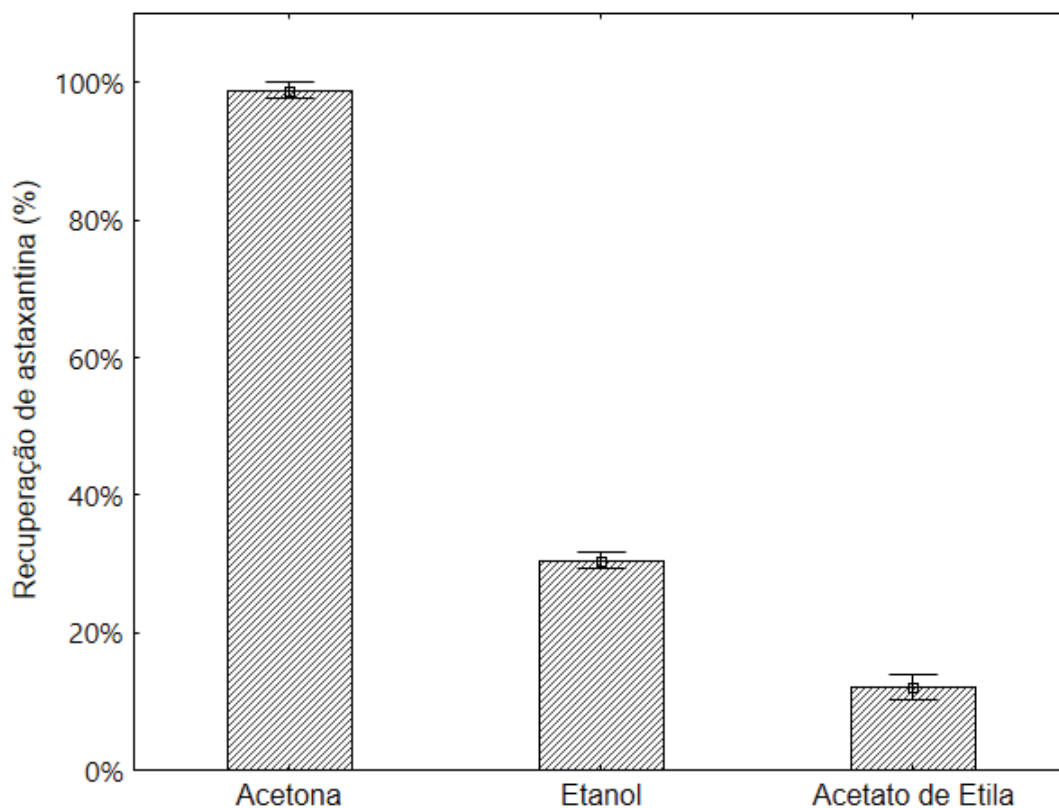
Portanto, dentre os ácidos avaliados, o uso de ácido clorídrico para a ruptura da parede celular da *H. pluvialis* demonstra ser a escolha mais apropriada para o método de hidrólise ácida e obtenção de astaxantina.

5.2 EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

A extração sólido-líquido da biomassa pré-tratada de *H. pluvialis* empregando diferentes solventes (acetona, acetato de etila e etanol) foi realizada, conforme descrito na seção 4.5.2. Os experimentos, realizados em duplicata, forneceram as recuperações

de astaxantina para cada condição, como mostra a Figura 13.

FIGURA 13 – RESULTADO DA RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE BIOMASSA PRÉ-TRATADA



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: A barra de erro representa o desvio padrão.

Os resultados expostos na Figura 13 mostram que, frente aos demais solventes, a acetona apresenta a maior recuperação de astaxantina, alcançando $98,89 \pm 1,20\%$. Enquanto o etanol e acetato de etila resultaram em $30,50 \pm 1,12\%$ e $12,09 \pm 1,39\%$, respectivamente.

Em termos de polaridade molecular, os resultados obtidos se posicionam, em um primeiro momento, de forma contraditória: o acetato de etila resultou na pior taxa de recuperação, apesar do caráter predominantemente lipofílico da astaxantina e sua alta solubilidade em solventes apolares.

Esse fenômeno poderia ser explicado devido à camada de água que recobre toda a parede e membrana celular. Se o solvente é imiscível em água, sua difusão através das aberturas criadas pela hidrólise da parede celular é impedida. Dessa forma, observa-se baixa eficiência de solventes pouco polares, como o acetato de etila, quando em contato com a biomassa úmida.

Ao se optar pelo emprego de processos de secagem da biomassa previamente à extração, é possível obter taxas de recuperação de astaxantina superiores a 90%

usando acetato de etila (LIU; ZENG et al., 2018). No entanto, além do aumento do custo, processos de secagem implicam em taxas significativas de degradação de astaxantina (AHMED et al., 2015).

Ainda, tecnologias adicionais, como o ultrassom, micro-ondas, e campo magnético, podem ser aplicadas conjuntamente no processo de extração para auxiliar solventes imiscíveis em água a permear a célula e aumentar a taxa de recuperação. Contudo, a recuperação máxima já obtida empregando esses métodos, por Xiaoyan Zhao et al. (2016b), foi na ordem de 63%, como mostra a Tabela 5.

De outro lado, solventes solúveis em água, como a acetona e etanol, conseguem permear facilmente a camada de água presente na parede e membrana celular. Nesse caso, a diferença entre as taxas de recuperação obtidas se deve, provavelmente, às distintas solubilidades que a astaxantina apresenta nos dois solventes. Apesar de não ter sido possível encontrar esses dados de forma consistente na literatura, é possível inferir que a solubilidade da astaxantina será consideravelmente maior em acetona do que etanol, por possuírem polaridade relativa de 0,355 e 0,654, respectivamente (REICHARDT, 2002).

Vale ressaltar que o resultado obtido está intrinsecamente relacionado com o número de ciclos, tempo e temperatura aplicados no extrator Soxhlet. Nesse experimento, como foi limitado a somente 2 ciclos, solventes com maior gradiente de transferência de massa, como a acetona, apresentam melhor produtividade de extrato. Caso o número de ciclos fosse aumentado, provavelmente os demais solventes apresentariam taxas de recuperação similares a da acetona, exigindo conseqüentemente mais tempo de processamento.

Portanto, dentre os solventes avaliados, o uso da acetona demonstra ser a escolha mais apropriada para a extração sólido-líquido da biomassa hidrolisada de *H. pluvialis* e obtenção de astaxantina.

5.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

A ruptura da parede celular da *H. pluvialis* empregando diferentes condições experimentais foi realizada, variando a concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura de hidrólise, conforme descrito na seção 4.6. Os experimentos, realizados em duplicata, forneceram as recuperações de astaxantina para cada condição, como exposto na Tabela 8.

Observa-se na Tabela 8 que os valores de recuperação de astaxantina variaram de 0,57% (ensaio 1) a 99,24% (ensaio 16). No ensaio 1, onde a condição de hidrólise dos 3 fatores era branda, correspondendo ao nível -1 do DCC ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t = 5\text{ min}$; $[\text{HCl}] = 1\text{ N}$), foi obtido o valor mais baixo de recuperação, indicando que esta condição

TABELA 8 – ENSAIOS E VALORES DOS FATORES DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Experimentos	Fatores			Resposta
	$T(^{\circ}C)$	$t(min)$	$[HCl](N)$	$R_{ast}(\%)$
1	60 (-1)	5,0 (-1)	1,0 (-1)	0,57 ± 0,49
2	60 (-1)	5,0 (-1)	4,0 (1)	74,21 ± 1,32
3	60 (-1)	15,0 (1)	1,0 (-1)	5,46 ± 1,25
4	60 (-1)	15,0 (1)	4,0 (1)	99,18 ± 0,63
5	80 (1)	5,0 (-1)	1,0 (-1)	72,77 ± 1,09
6	80 (1)	5,0 (-1)	4,0 (1)	76,51 ± 0,77
7	80 (1)	15,0 (1)	1,0 (-1)	85,05 ± 1,10
8	80 (1)	15,0 (1)	4,0 (1)	95,30 ± 0,90
9	56 (- α)	10,0 (0)	2,5 (0)	30,48 ± 1,01
10	84 (α)	10,0 (0)	2,5 (0)	96,12 ± 1,21
11	70 (0)	3,2 (- α)	2,5 (0)	71,70 ± 1,18
12	70 (0)	16,8 (α)	2,5 (0)	94,28 ± 0,47
13	70 (0)	10,0 (0)	0,5 (- α)	25,06 ± 0,79
14	70 (0)	10,0 (0)	4,5 (α)	98,60 ± 1,21
15	70 (0)	10,0 (0)	2,5 (0)	99,08 ± 1,04
16	70 (0)	10,0 (0)	2,5 (0)	99,24 ± 1,01
17	70 (0)	10,0 (0)	2,5 (0)	99,17 ± 0,95

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: T : temperatura de hidrólise (nível codificado); t : tempo de hidrólise (nível codificado); $[HCl]$: concentração de ácido clorídrico (nível codificado); R_{ast} : recuperação de astaxantina; (C): Ponto central. Valores médios de recuperação ($n = 2$) ± desvio padrão.

não rompeu suficientemente a parede celular da *H. pluvialis*.

Em condições mais severas, como no ensaio 8 ($T = 80$ °C; $t = 15$ min; $[HCl] = 4$ N), onde todos os fatores estão no nível 1 do DCC, houve um aumento expressivo na recuperação (95,30%). Já no ponto central do DCC ($T = 70$ °C; $t = 10$ min; $[HCl] = 2,5$ N), ensaios 15 a 17, foram obtidos valores máximos na ordem de 99%.

5.3.1 Modelagem matemática

O delineamento composto central permitiu o ajuste de um modelo quadrático significativo ($p < 0,01$) para a resposta da recuperação de astaxantina, apresentado na Equação 5.1. O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,98$) indica que o modelo quadrático é apropriado para explicar fenômeno estudado.

$$R_{ast}(\%) = -1091 + 25,7T + 3,54t + 135,36[HCl] - 0,15T^2 - 0,15t^2 - 6,85[HCl]^2 - 1,28T \cdot [HCl] + 0,44t \cdot [HCl] \quad (5.1)$$

Sendo T = temperatura de hidrólise em °C, t = tempo de hidrólise em min e $[HCl]$ = concentração de ácido clorídrico em N.

Os parâmetros significativos do modelo e seus valores de nível de significância, apresentados na Tabela 9, corroboram o efeito significativo da concentração de ácido clorídrico na ruptura da parede celular observado por Sarada et al. (2006) e Liu, Zeng et al. (2018). Além disso, foi possível identificar que a temperatura e o tempo de hidrólise possuem efeitos significativos na recuperação de astaxantina, devendo, assim, serem considerados no modelo.

A otimização da Equação 5.1 visando a maior recuperação possível, de 100%, resultou nas seguintes condições: temperatura de hidrólise de 71 °C, tempo de hidrólise de 17 min e concentração de ácido clorídrico de 3,7 N.

TABELA 9 – RESULTADO DA REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA DO DCC, COM TODAS AS VARIÁVEIS E SEUS RESPECTIVOS PARÂMETROS E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante β	-1091	<0,0001
T	25,7	<0,0001
T^2	-0,146	<0,0001
t	3,54	<0,0001
t^2	-0,154	0,0194
$[HCl]$	135,36	<0,0001
$[HCl]^2$	-6,85	<0,0001
$T \cdot [HCl]$	-1,28	<0,0001
$t \cdot [HCl]$	0,443	0,0270
R ² = 0,98		

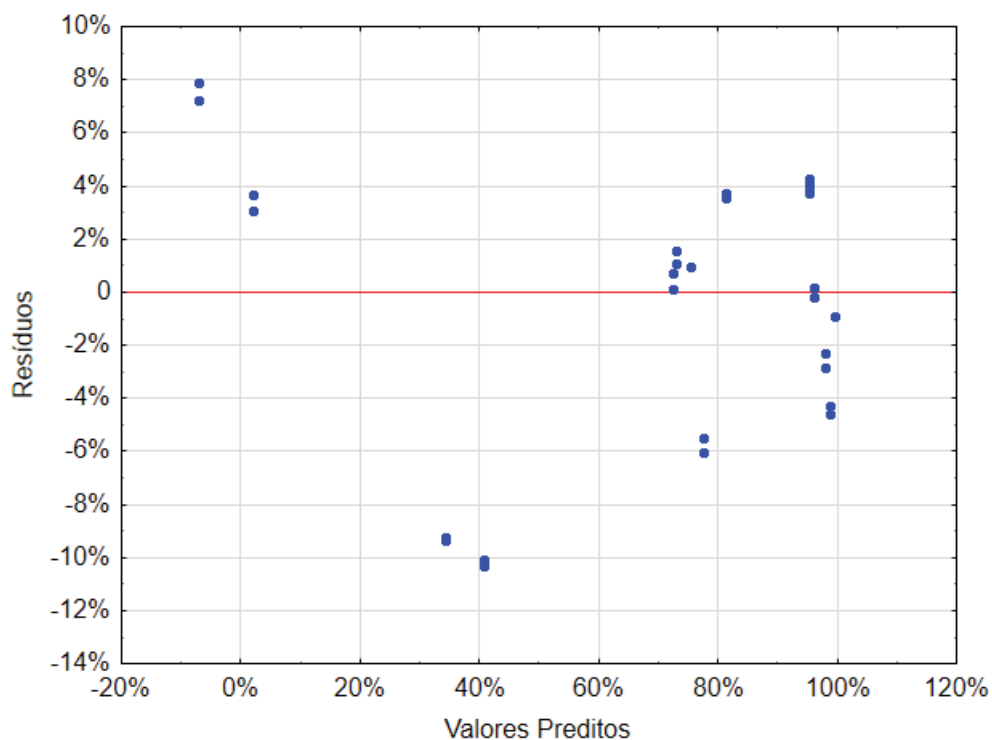
FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: T : temperatura de hidrólise; t : tempo de hidrólise; $[HCl]$: concentração de ácido clorídrico. Valores significativos quando $p < 0,05$.

Analisando a distribuição dos resíduos (Figura 14), nota-se tendência positiva dos resíduos para valores preditos abaixo de 20%, e negativa para os valores preditos entre 20% e 60%. Acima de 60%, os valores preditos se comportam aleatoriamente em torno de zero, não apresentando tendências quanto à distribuição. Com isso, avalia-se que o modelo possui melhor predição para as condições de processo que resultam em recuperações de astaxantina acima de 60%.

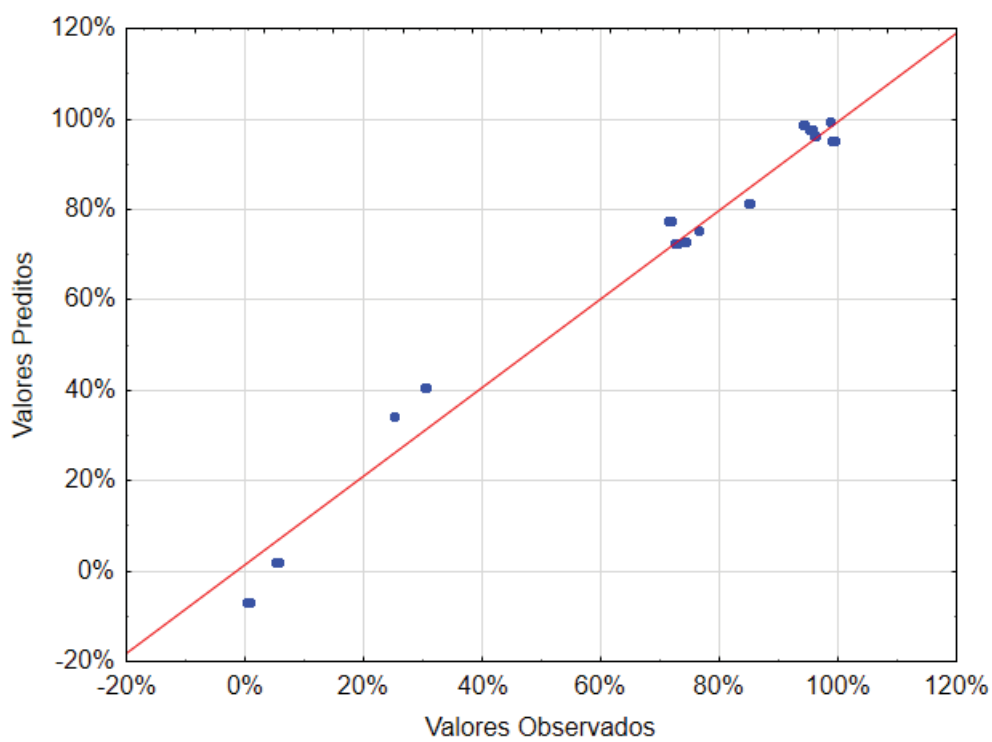
Diante da representação dos valores preditos em função dos observados (Figura 15), na qual a maioria dos valores experimentais são próximos aos fornecidos pela equação empírica, verifica-se que o modelo ajustado representou satisfatoriamente o comportamento da recuperação de astaxantina observada.

FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA NO DCC



FONTE: O autor (2020).

FIGURA 15 – VALORES PREDITOS EM FUNÇÃO DOS OBSERVADOS PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA NO DCC



FONTE: O autor (2020).

5.3.2 Validação do modelo

A fim de validar o modelo quadrático obtido no DCC, representado pela Equação 5.1, realizou-se a verificação experimental da recuperação de astaxantina nas condições ótimas previstas, resultando nos valores apresentados na Tabela 10. Não houve diferença significativa entre o valor predito e o experimental, validou-se, assim, a capacidade de predição do modelo.

TABELA 10 – RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA (PREDITA E OBSERVADA) NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS ($T = 71\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T = 17\text{ min}$; $[HCL] = 3,7\text{ N}$) DO DCC

Recuperação Predita (%)	Recuperação Observada (%)	Nível de significância (p)
100 \pm 5,66	99,05 \pm 0,48	0,7857

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Valores médios de recuperação ($n = 3$) \pm desvio padrão. A validação estatística dos valores predito e observado está representada na forma do valor p obtido na ANOVA. Valores idênticos quando $p > 0,05$.

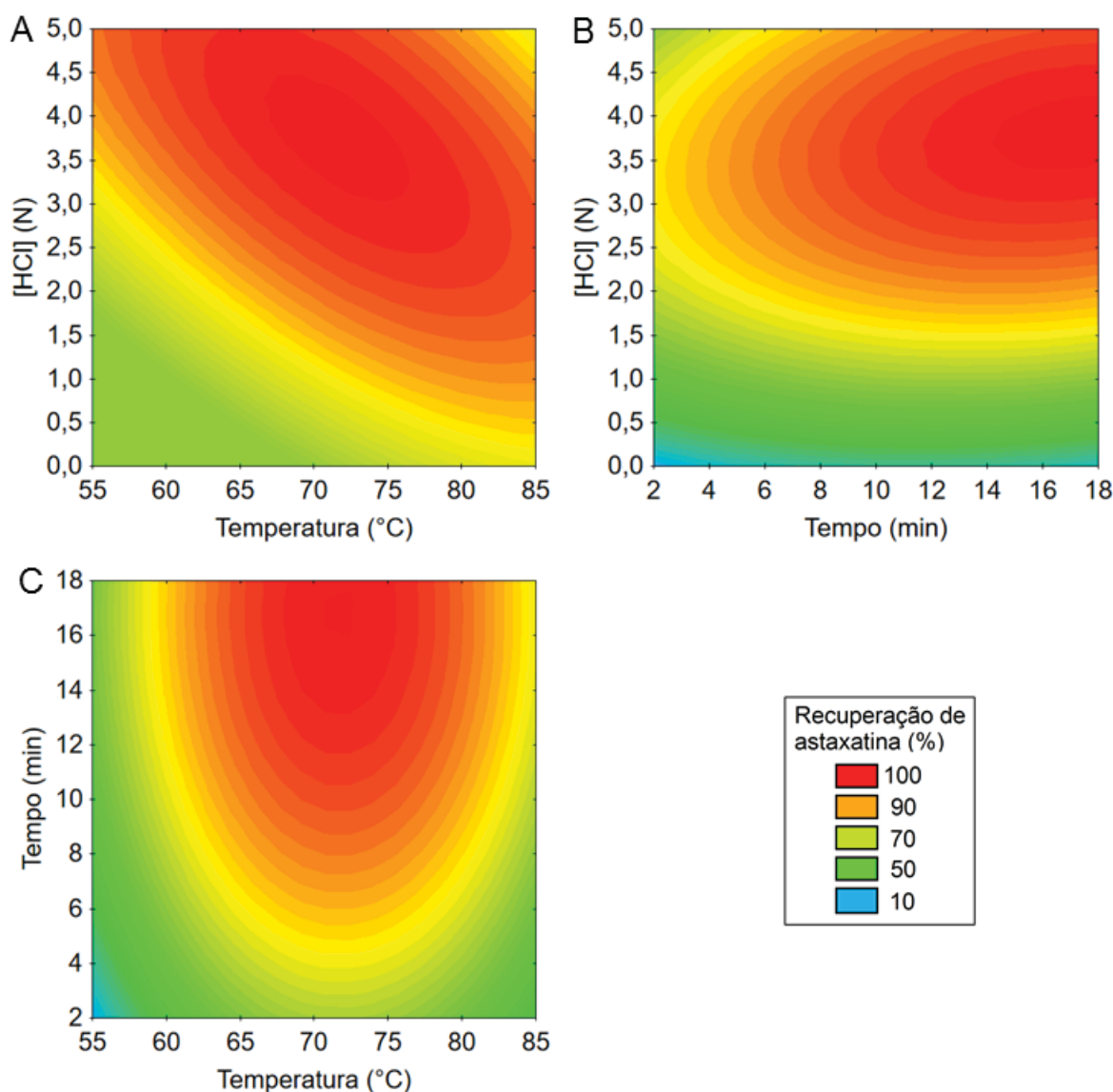
5.3.3 Curvas de contorno

A partir do modelo quadrático ajustado, representado pela Equação 5.1, gerou-se as curvas de contorno apresentadas na Figura 16, as quais ilustram o efeito dos fatores (concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura de hidrólise) na recuperação de astaxantina. Para que as regiões de recuperação máxima estivessem presentes nos gráficos, o fator constante correspondente a cada gráfico foi fixado na condição ótima predita ($T = 71\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 17\text{ min}$ e $[HCl] = 3,7\text{ N}$).

A respeito da influência dos três fatores na ruptura celular de *H. pluvialis*, nota-se algumas tendências na resposta da recuperação de astaxantina. Em termos de concentração de ácido clorídrico, as curvas de contorno geradas pelo modelo, apresentadas na Figura 16 B com temperatura constante a $71\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicam que é necessário concentração mínima de 2 N para obter recuperações superiores a 90%. Essa condição contribui para mensurar a recalcitrância química da parede celular da *H. pluvialis*, propriedade essa já morfológicamente avaliada por Damiani et al. (2006) e Hagen, Siegmund e Braune (2002), mas que ainda carece de estudos que a quantifiquem.

Diante disso, seria possível justificar a baixas recuperação publicada por Mendes-Pinto et al. (2001), de 42% ao usar baixas concentrações de HCl (0,1 N), a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 30 min. Ressalta-se, porém, que as diferenças nas condições e metodologias empregadas pelos autores tornam difícil a comparação dos resultados. Dentre as principais diferenças, destacam-se a baixa temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o longo tempo de extração em acetona (16 h), que possivelmente influenciaram o resultado publicado pelos autores.

FIGURA 16 – CURVAS DE CONTORNO PARA A RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA. (A) $[HCl]$ VERSUS T COM $t = 17$ min ; (B) $[HCl]$ E T COM $t = 71$ °C ; (C) T VERSUS T COM $[HCL] = 3,7$ N



FONTE: O autor (2020).

Sob condições mais severas, valores de $[HCl]$ superiores a 4,5 N resultaram em diminuição na recuperação. No decorrer da hidrólise a 4,5 N, notou-se que as células rapidamente emergiram e se concentraram na superfície da suspensão, fenômeno também observado por Sarada et al. (2006) em concentrações superiores a 4 N. Esse fato pode ter reduzido a taxa de transferência de massa de H^+ através da biomassa, uma vez que as células não estão dispersas em toda a suspensão, como é visto em condições com menores concentrações de HCl.

Apesar da faixa de recuperação máxima se situar entre 3,5 e 4 N (a 71 °C e 17 min), o modelo também indica a possibilidade de operar em condições substancial-

mente mais brandas em termos de [HCl], empregando 2,3 N, e ainda assim manter recuperações do carotenoide na ordem de 97%, impactando positivamente o custo e segurança desse método.

Observa-se também que o perfil de recuperação versus [HCl], no qual a recuperação máxima ocorre a 3,7 N, possui pouca dependência do tempo de hidrólise. Na literatura, pode-se notar esse fenômeno ao comparar os tempos empregados em diferentes estudos. Sarada et al. (2006) ao realizar a hidrólise por 2 min, e Liu, Zeng et al. (2018), por 60 min, reportam maior recuperação a 4 N, quando comparado a 2 e 6 N de HCl (ambos os estudos a 70 °C).

Assim, a análise conjunta do perfil predito pelo modelo e dos dados da literatura anteriormente citados indica que não há possibilidade de compensar o uso de baixas concentrações de ácido pelo aumento do tempo de hidrólise, e vice-versa, o que acaba penalizando a flexibilidade operacional, caso fosse desejado, por exemplo, reduzir o uso de ácido no processo as custas de um aumento no tempo de reação.

Com relação ao efeito do tempo de hidrólise na ruptura celular, observado nas Figuras 16 B e C, as curvas de contorno apontam queda substancial na recuperação ao empregar tempos inferiores a 6 min. No entanto, na literatura, resultados satisfatórios de extração já foram alcançados com menos tempo de tratamento, na ordem de 96% com apenas 2 min, a 70 °C e 4 N (SARADA et al., 2006). Divergências de metodologia podem justificar o desvio entre os resultados anteriormente expostos. Diferentemente do presente estudo, que utilizou células oriundas diretamente da decantação do cultivo, os autores utilizaram biomassa previamente liofilizada. O processo de liofilização afeta significativamente as características da parede celular da *H. pluvialis* e facilita o processo de extração de astaxantina (TAUCHER; BAER, 2016).

O modelo também indica declínio na recuperação ao empregar tempo de hidrólise superior a 28 min, favorecendo a hipótese de que a exposição prolongada às condições do tratamento pode degradar a astaxantina. O intervalo de tempo avaliado no DCC, entre 3,2 e 16,8 min, não foi grande o suficiente para se observar degradação relevante do carotenoide. Contudo, Liu, Zeng et al. (2018) corroboram essa hipótese ao empregar 60 min de hidrólise ácida, a 70 °C e 4 N, e obterem apenas 80% de recuperação de astaxantina. Assim, o tempo ótimo sugerido pelo modelo de 17 min (com $T = 71$ °C e $[HCl] = 3,7$) pode servir como uma nova referência de condição operacional visando mitigar a degradação do carotenoide e reduzir custos.

A respeito do efeito da temperatura de hidrólise na ruptura celular, observa-se na Figura 16 A que é possível compensar o uso de menores concentrações de ácido pelo aumento da temperatura. No entanto, a partir de 80 °C observa-se um declínio inicial na recuperação, onde possivelmente a degradação térmica da astaxantina começa a ocorrer em níveis relevantes.

Diante dos estudos publicados avaliando a estabilidade térmica da astaxantina, nota-se que o solvente usado na diluição do carotenoide tem influência considerável na degradação. Casella et al. (2020) reportaram 11,4% de degradação ao submeter astaxantina dissolvida em clorofórmio a 70 °C por 2 h. Em contra partida, nas mesmas condições, Rao, Sarada e Ravishankar (2007) obtiveram menores taxas de degradação (4,6%) ao dissolver astaxantina em óleo de palma. Outros óleos vegetais, como o óleo de soja, também já foram avaliados na função de agente estabilizante da astaxantina e apresentaram resultados satisfatórios (CALVO et al., 2020).

Portanto, o fato da ruptura celular via hidrólise ácida ocorrer em meio aquoso poderia favorecer a estabilidade térmica da astaxantina, visto que a mesma permanece dissolvida na fase oleosa presente nas vesículas lipídicas da microalga durante o processo (WAYAMA et al., 2013). O método do tratamento hidrotérmico corrobora tal hipótese, uma vez que Cheng et al. (2017) obtiveram altas recuperações de astaxantina submetendo a biomassa a 200 °C por 10 min. Apesar do resultado promissor obtidos pelos autores, a alta temperatura empregada no método converteu grande parte da astaxantina originalmente esterificada para a forma livre, de menor biodisponibilidade (SU; YU; LIU, 2020) e armazenamento dificultado por ser mais instável (ZHOU et al., 2019). Em contra partida, tratamentos térmicos podem promover a formação dos isômeros geométricos *cis*, que possuem melhor biodisponibilidade e atividade antioxidante (HONDA; SOWA; KAWASHIMA, 2020).

Diante disso, visando reduzir a quantidade de ácido usado no processo, a investigação da ruptura celular em temperaturas mais altas que as empregadas no DCC poderia ser objeto de estudo em futuros trabalhos.

5.3.4 Análise microscópica

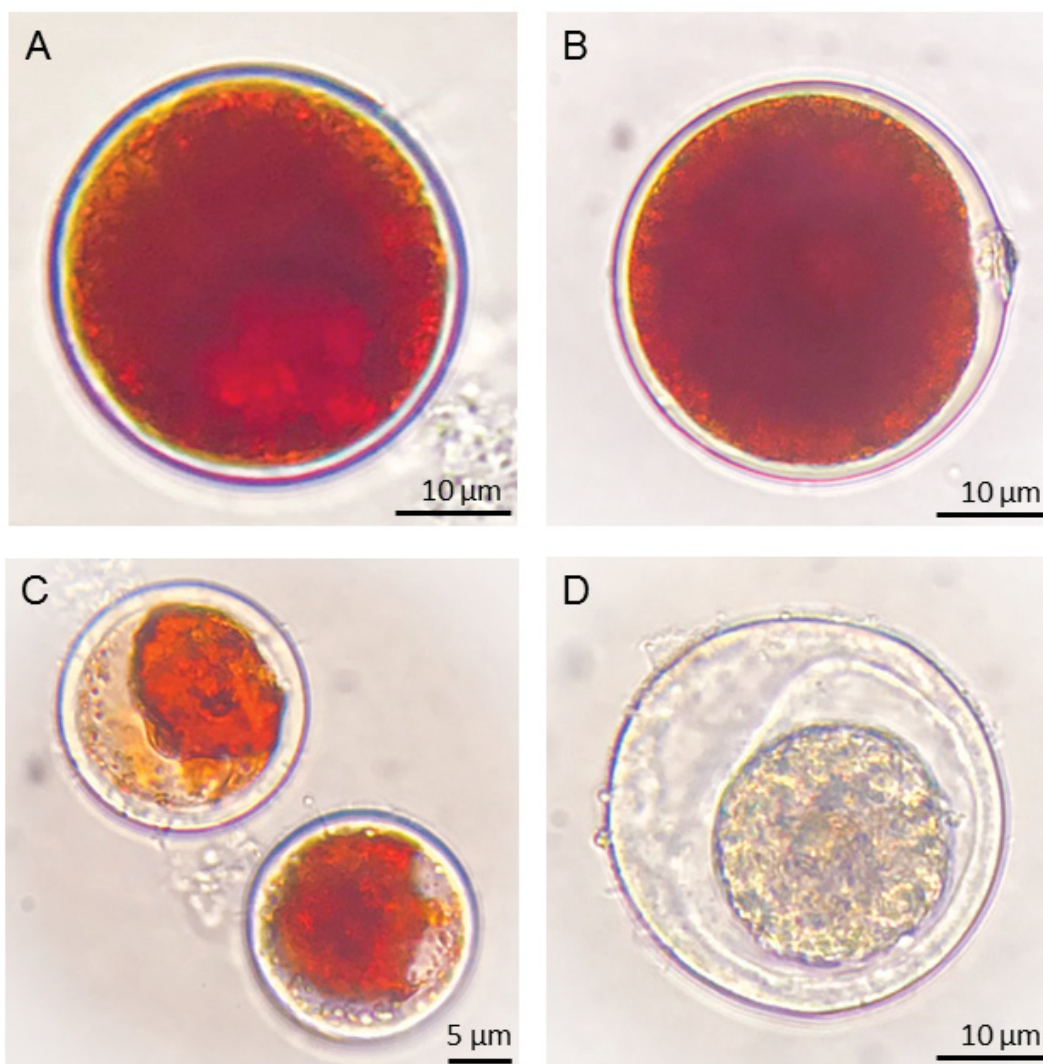
As biomassas residuais de cada experimento do DCC foram analisadas microscopicamente para verificar os possíveis efeitos das condições empregadas sobre as células de *H. pluvialis*. Observou-se que o estado final das células (Figura 17) varia conforme o valor da recuperação de astaxantina obtida, não sendo possível identificar qualquer efeito específico em relação aos três fatores (T ; t ; $[HCl]$).

As células submetidas às condições mais brandas do DCC ($T = 60$ °C; $t = 5$ min; $[HCl] = 1$ N), representadas na Figura 17 B, não sofreram alterações visíveis quando comparadas as células sem tratamento (Figura 17 A), resultando em menos de 1% de recuperação.

Ao aumentar a severidade das condições, observou-se células com extração parcial de astaxantina ($\approx 30\%$), como mostra a Figura 17 C. Sob condições próximas da faixa de recuperação ótima, ainda mais severas, obteve-se células incolores, sem resquícios de astaxantina (Figura 17 D).

Notou-se que não houve ruptura total da parede celular em nenhuma das condições aplicadas no DCC, indicando que a acessibilidade do solvente ao interior da célula provavelmente ocorreu através de microperfurações na parede celular causadas pela hidrólise ácida, fenômeno igualmente observado por Mendes-Pinto et al. (2001) e Sarada et al. (2006).

FIGURA 17 – IMAGEM MICROSCÓPICA DE CÉLULAS DA *H. PLUVIALIS* EM DISTINTAS CONDIÇÕES DO DCC ORDENADAS PELA RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA: (A) SEM TRATAMENTO; (B) $R_{ast} = 0,57\%$; (C) $R_{ast} = 30,48\%$; (D) $R_{ast} = 99,16\%$



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: (A) Sem tratamento; (B) $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 5,0\text{ min}$, $[HCl] = 1,0\text{ N}$; (C) $T = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 10,0\text{ min}$, $[HCl] = 2,5\text{ N}$; (D) $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 10,0\text{ min}$, $[HCl] = 2,5\text{ N}$.

A ruptura total da parede celular somente foi observada por Liu, Zeng et al. (2018), possivelmente por consequência da longa exposição (60 min) da biomassa às condições de 4 N e 70 °C. Além disso, é possível que a centrifugação da biomassa aplicada na metodologia do estudo tenha contribuído ainda mais para este fenômeno, visto a fragilidade que a parede celular possui ao final do tratamento.

O fato da condição ótima de hidrólise ácida, apresentada no presente trabalho, resultar em células com paredes integras oferece a vantagem tecnológica de permitir a filtração da biomassa tratada, pois a astaxantina permanece contida no meio intracelular. Desta forma, é possível reduzir o teor de água na extração sólido-líquido. Em paralelo, a reutilização da solução ácida filtrada permite reduzir custos, além de aumentar a sustentabilidade do processo.

6 CONCLUSÃO

O emprego de ácido clorídrico na hidrólise da parede celular de *H. pluvialis* resultou nas maiores recuperações de astaxantina (> 98%), quando comparado aos ácidos acético (\approx 4%) e láctico (\approx 6%). Os resultados sugerem que a recalcitrância química da parede celular da *H. pluvialis* seja fator limitante do processo de ruptura, e que a hidrofobicidade da parede não seja alta o suficiente para favorecer ácidos de menor polaridade, como o acético e láctico.

Dentre os solventes avaliados para a extração sólido-líquido da biomassa pré-tratada de *H. pluvialis*, a acetona resultou nas maiores recuperações de astaxantina (> 98%), quando comparado ao etanol (\approx 30%) e acetato de etila (\approx 12%). Apesar da alta solubilidade da astaxantina em solventes não polares, como o acetato de etila, a camada de água que recobre a parede e membrana celular favoreceu a difusão de solventes com maior miscibilidade em água, como a acetona e etanol.

A metodologia de superfície de resposta permitiu, sem precedentes descritos na literatura, evidenciar conjuntamente os efeitos do tempo, temperatura e concentração de ácido sobre a recuperação de astaxantina.

A otimização da extração de astaxantina de *H. pluvialis* possibilitou obter $99 \pm 0,48\%$ de recuperação do carotenoide, empregando as seguintes condições na hidrólise ácida: 71 °C, 17 min e ácido clorídrico à 3,7 N. Foi possível confirmar a hipótese de que existe uma condição ótima de hidrólise, que atende a severidade necessária para romper suficientemente as células e que, ao mesmo tempo, não degrada o carotenoide.

O modelo também indicou a possibilidade de operar em condições substancialmente mais brandas em termos de [HCl], empregando 2,3 N (a 71 °C e 17 min), e ainda assim manter recuperações do carotenoide na ordem de 97%, beneficiando o custo e segurança do processo.

Na análise conjunta dos fatores observou-se que indica que não há possibilidade de compensar o uso de baixas concentrações de ácido pelo aumento do tempo de hidrólise. Contudo, constatou-se que é possível usar menores concentrações de ácido aumentando a temperatura de hidrólise. Verificou-se o início do declínio na recuperação de astaxantina a partir de 80 °C, sugerindo o início da degradação do carotenoide. Porém, é necessário investigar uma faixa de temperatura superior a deste trabalho para modelar mais precisamente esse fenômeno.

A hidrólise ácida, mesmo nas condições ótimas, não causou a ruptura total da parede celular, indicando que a acessibilidade do solvente ao interior da célula provavelmente ocorreu através de microperfurações na parede celular, diferentemente

dos métodos físicos e mecânicos, que resultam na ruptura total da parede celular. Conservar a integridade da parede celular oferece a vantagem tecnológica de permitir a filtração da biomassa tratada, pois a astaxantina permanece contida no meio intracelular. Desta forma, é possível reduzir o teor de água presente na extração sólido-líquido. Em paralelo, a reutilização da solução ácida filtrada permite reduzir custos, além de aumentar a sustentabilidade do processo.

REFERÊNCIAS

- AFLALO, Claude et al. On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. eng. **Biotechnology and bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 300–305, set. 2007. ISSN 0006-3592 (Print). DOI: 10.1002/bit.21391. Citado na p. 31.
- AHMED, Faruq et al. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*. **Food Research International**, Elsevier Ltd, v. 74, p. 231–236, 2015. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.021. Citado nas pp. 18, 44.
- AMBATI, Ranga et al. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 128–152, jan. 2014. ISSN 1660-3397. DOI: 10.3390/md12010128. Citado na p. 20.
- BARALIC, Ivana et al. Effect of Astaxanthin Supplementation on Salivary IgA, Oxidative Stress, and Inflammation in Young Soccer Players. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2015, p. 783761, 2015. ISSN 1741-427X (Print). DOI: 10.1155/2015/783761. Citado nas pp. 14, 20.
- BAUDELET, Paul Hubert et al. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, v. 25, July, p. 333–371, 2017. ISSN 22119264. DOI: 10.1016/j.algal.2017.04.008. Citado na p. 23.
- BOUSSIBA, Sammy; FAN, Lu; VONSHAK, Avigad. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. In: **CAROTENOIDS Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation**. [S.I.]: Academic Press, 1992. v. 213. P. 386–391. ISBN 0076-6879. DOI: 10.1016/0076-6879(92)13140-S. Citado na p. 31.
- BOUSSIBA, Sammy; VONSHAK, Avigad. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*1. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, n. 7, p. 1077–1082, out. 1991. ISSN 0032-0781. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171. Citado na p. 21.
- BOWEN, J. et al. Utilization of (3S,3S)-astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 59–68, 2002. ISSN 13535773. DOI: 10.1046/j.1365-2095.2002.00190.x. Citado na p. 18.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley e Sons, 1978. Citado nas pp. 32, 38.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. eng. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 15, p. 1551–1558, dez. 1995. ISSN 0892-6638 (Print). Citado na p. 16.

BURCZYK, Jan. Cell wall carotenoids in green algae which form sporopollenins. **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p. 121–128, 1986. ISSN 0031-9422. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81494-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81494-6). Citado na p. 23.

CALVO, N. S. et al. Thermal stability of astaxanthin in oils for its use in fish food technology. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, April 2018, 2020. ISSN 03778401. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114668. Citado na p. 51.

CASELLA, Patrizia et al. Smart Method for Carotenoids Characterization in *Haematococcus pluvialis* Red Phase and Evaluation of Astaxanthin Thermal Stability. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 422, 2020. ISSN 2076-3921. DOI: 10.3390/antiox9050422. Citado nas pp. 18, 51.

CHEN, X C; HUANG, W G; OUYANG, Q. Saponification of astaxanthin esters from *Haematococcus pluvialis* and purification of free astaxanthin. **J. Fuzhou. Univ.(Natural Sciences)**, v. 33, p. 264–268, 2005. Citado nas pp. 18, 26, 31, 35.

CHEN, Yuqiong; LI, Su et al. Astaxanthin Attenuates Hypertensive Vascular Remodeling by Protecting Vascular Smooth Muscle Cells from Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction. eng. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, p. 4629189, 2020. ISSN 1942-0994 (Electronic). DOI: 10.1155/2020/4629189. Citado nas pp. 14, 20.

CHENG et al. Hydrothermal disruption of algae cells for astaxanthin extraction. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 19, n. 1, p. 106–111, 2017. ISSN 14639270. DOI: 10.1039/c6gc02746f. Citado nas pp. 28, 30, 51.

CHENG et al. Low pressure supercritical CO₂ extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip. **Bioresource Technology**, Elsevier, v. 250, October 2017, p. 481–485, 2018. ISSN 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.11.070. Citado na p. 30.

CHOI, Sun A. et al. High-efficiency cell disruption and astaxanthin recovery from *Haematococcus pluvialis* cyst cells using room-temperature imidazolium-based ionic liquid/water mixtures. **Bioresource Technology**, Elsevier, v. 274, November 2018, p. 120–126, 2019. ISSN 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.082. Citado nas pp. 26, 27.

CORAL-HINOSTROZA, Gladis N. et al. Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 139, n. 1-3, p. 99–110, 2004. ISSN 15320456. DOI: 10.1016/j.cca.2004.09.011. Citado na p. 17.

DAMIANI, Maria Cecilia et al. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): Wall development and behaviour during cyst germination. **Phycologia**, v. 45, n. 6, p. 616–623, 2006. ISSN 00318884. DOI: 10.2216/05-27.1. Citado nas pp. 42, 48.

DAVINELLI, Sergio; NIELSEN, Michael E; SCAPAGNINI, Giovanni. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. eng. **Nutrients**, MDPI, v. 10, n. 4, p. 522, abr. 2018. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu10040522. Citado nas pp. 14, 20.

DESAI, Rupali K et al. Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1261–1267, 2016. ISSN 14639270. DOI: 10.1039/c5gc01301a. Citado na p. 27.

DI SANZO, Giuseppe et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from *haematococcus pluvialis* microalgae. **Marine Drugs**, v. 16, n. 9, 2018. ISSN 16603397. DOI: 10.3390/md16090334. Citado nas pp. 28, 29.

DONG, Shengzhao et al. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–7, 2014. ISSN 2356-6140. DOI: 10.1155/2014/694305. Citado na p. 18.

EXPERTS, Industry. Global Astaxanthin Market — Sources, Technologies and Applications, 2018. Citado na p. 14.

FAKHRI, Sajad et al. The Neuroprotective Effects of Astaxanthin: Therapeutic Targets and Clinical Perspective. eng. **Molecules (Basel, Switzerland)**, MDPI, v. 24, n. 14, p. 2640, jul. 2019. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules24142640. Citado nas pp. 14, 20.

FAN, Lu; VONSHAK, Avigad; BOUSSIBA, Sammy. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, p. 829–833, out. 1994. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1994.00829.x. Citado na p. 31.

FASSETT, Robert G; COOMBES, Jeff S. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. eng. **Marine drugs**, Molecular Diversity Preservation International, v. 9, n. 3, p. 447–465, mar. 2011. ISSN 1660-3397. DOI: 10.3390/md9030447. Citado na p. 20.

FOX, Frank. *Haematococcus pluvialis*, Chlorophyta. **Microscopic Recording with Differential Interference Contrast**, In M. d.-B, 2011. Citado na p. 22.

GIANNACCARE, Giuseppe et al. Clinical Applications of Astaxanthin in the Treatment of Ocular Diseases: Emerging Insights. eng. **Marine drugs**, Switzerland, v. 18, n. 5, mai. 2020. ISSN 1660-3397 (Electronic). DOI: 10.3390/md18050239. Citado nas pp. 14, 20.

GIANNELLI, Luca et al. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 345–350, 2015. ISSN 13474421. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.002. Citado na p. 34.

GUERIN, Martin; HUNTLEY, Mark E; OLAIZOLA, Miguel. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210–216, 2003. ISSN 0167-7799. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7). Citado na p. 19.

HAGEN, Christoph; SIEGMUND, Stefan; BRAUNE, Wolfram. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 217–226, 2002. DOI: 10.1017/S0967026202003669. Citado nas pp. 21–24, 42, 48.

HAN, Danxiang; LI, Yantao; HU, Qiang. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. **ALGAE**, The Korean Society of Phycology, v. 28, n. 2, p. 131–147, jun. 2013. ISSN 1226-2617. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131. Citado nas pp. 14, 21.

HIGUERA-CIAPARA, I; FÉLIX-VALENZUELA, L; GOYCOOLEA, F M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. eng. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185–196, 2006. ISSN 1040-8398 (Print). DOI: 10.1080/10408690590957188. Citado nas pp. 19, 20.

HOEK, V.D.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. *Algae: an introduction to phycology*. **Cambridge University Press**, 623 p, 1995. Citado na p. 21.

HONDA, Masaki; SOWA, Toshiyasu; KAWASHIMA, Yuki. Thermal- and Photo-Induced Isomerization of All-E- and Z-Isomer-Rich Xanthophylls: Astaxanthin and Its Structurally-Related Xanthophylls, Adonirubin, and Adonixanthin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 5, p. 1900462, mai. 2020. ISSN 14389312. DOI: 10.1002/ejlt.201900462. Citado nas pp. 17, 18, 51.

HUANG, Wen Can et al. Effective Astaxanthin Extraction from Wet *Haematococcus pluvialis* Using Switchable Hydrophilicity Solvents. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 2, p. 1560–1563, 2018. ISSN 21680485. DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b04624. Citado na p. 27.

HUSSEIN, Ghazi et al. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society, v. 69, n. 3, p. 443–449, mar. 2006. ISSN 0163-3864. DOI: 10.1021/np050354+. Citado nas pp. 16, 20.

ITO, Naoki; SEKI, Shinobu; UEDA, Fumitaka. The Protective Role of Astaxanthin for UV-Induced Skin Deterioration in Healthy People-A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. eng. **Nutrients**, v. 10, n. 7, jun. 2018. ISSN 2072-6643 (Electronic). DOI: 10.3390/nu10070817. Citado nas pp. 14, 20.

IWAMOTO, Tamami et al. Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation by Astaxanthin. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 7, p. 216–222, fev. 2000. DOI: 10.5551/jat1994.7.216. Citado na p. 20.

KANG, C.D.; SIM, S.J. Selective Extraction of Free Astaxanthin from Haematococcus Culture Using a Tandem Organic Solvent System. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 4, p. 866–871, 2007. ISSN 8756-7938. DOI: 10.1021/bp0700354. Citado na p. 29.

KANG, Chang Duk; SIM, Sang Jun et al. Direct extraction of astaxanthin from Haematococcus culture using vegetable oils. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 441–444, 2008. ISSN 01415492. DOI: 10.1007/s10529-007-9578-0. Citado na p. 29.

KARPPI et al. Effects of Astaxanthin Supplementation on Lipid Peroxidation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 77, n. 1, p. 3–11, jan. 2007. ISSN 0300-9831. DOI: 10.1024/0300-9831.77.1.3. Citado na p. 20.

KIM, Dong-yeon et al. Bioresource Technology Cell-wall disruption and lipid / astaxanthin extraction from microalgae : Chlorella and Haematococcus. **Bioresource Technology**, Elsevier Ltd, v. 199, p. 300–310, 2016. ISSN 0960-8524. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.107. Citado na p. 28.

KUNZ, Werner; HÄCKL, Katharina. The hype with ionic liquids as solvents. **Chemical Physics Letters**, Elsevier B.V., v. 661, p. 6–12, 2016. ISSN 00092614. DOI: 10.1016/j.cpllett.2016.07.044. Citado na p. 26.

KURASHIGE, M et al. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. eng. **Physiological chemistry and physics and medical NMR**, v. 22, n. 1, p. 27–38, 1990. ISSN 0748-6642 (Print). Citado na p. 14.

KWAN, Thomas Alan et al. Selectively biorefining astaxanthin and triacylglycerol co-products from microalgae with supercritical carbon dioxide extraction. **Bioresource Technology**, 2018. ISSN 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.08.081. Citado nas pp. 24, 25.

LI, Yeguang et al. Accurate quantification of astaxanthin from Haematococcus crude extract spectrophotometrically. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 30, n. 4, p. 627–637, 2012. ISSN 02544059. DOI: 10.1007/s00343-012-1217-5. Citado nas pp. 31, 39, 40.

LIU, Xiaojuan; LUO, Qingxin et al. Antioxidation and anti-ageing activities of different stereoisomeric astaxanthin in vitro and in vivo. **Journal of Functional Foods**, Elsevier Ltd, v. 25, p. 50–61, 2016. ISSN 17564646. DOI: 10.1016/j.jff.2016.05.009. Citado nas pp. 14, 16, 17.

LIU, Xuebo; OSAWA, Toshihiko. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 1, p. 187–193, 2007. ISSN 0006291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.120. Citado nas pp. 17, 20.

LIU, Zhi-Wei; YUE, Zhou et al. Ionic liquid as an effective solvent for cell wall deconstructing through astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 583–590, fev. 2019. ISSN 09505423. DOI: 10.1111/ijfs.14030. Citado na p. 27.

LIU, Zhi-Wei; ZENG, Xin-An et al. The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 9, p. 2212–2219, set. 2018. ISSN 09505423. DOI: 10.1111/ijfs.13810. Citado nas pp. 26, 27, 29, 30, 44, 46, 50, 52.

LIYANAARACHCHI, Vinoj Chamilka et al. Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. **Biotechnology Reports**, Elsevier B.V., v. 28, e00538, 2020. ISSN 2215017X. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00538. Citado na p. 31.

MACHADO JR., Francisco et al. Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, Elsevier B.V., v. 218, p. 108–114, 2015. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.12.004. Citado nas pp. 26, 27.

MCCALL, Buckley et al. Effects of Astaxanthin on the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells In Vitro. eng. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, MDPI, v. 7, n. 10, p. 135, out. 2018. ISSN 2076-3921. DOI: 10.3390/antiox7100135. Citado nas pp. 14, 20.

MENDES-PINTO, M. M. et al. Evaluation of different cell disruption process on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 19–24, 2001. ISSN 09218971. DOI: 10.1023/A:1008183429747. Citado nas pp. 24–30, 48, 52.

MIAO, FengPing et al. The synthesis of astaxanthin esters, independent of the formation of cysts, highly correlates with the synthesis of fatty acids in *Haematococcus pluvialis*. eng. **Science in China. Series C, Life sciences**, v. 51, n. 12, p. 1094–1100, dez. 2008. ISSN 1006-9305 (Print). DOI: 10.1007/s11427-008-0141-6. Citado na p. 31.

MIMOUN-BENARROCH, Myriam et al. The Bioavailability of Astaxanthin Is Dependent on Both the Source and the Isomeric Variants of the Molecule. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology**, v. 73, n. 2, p. 61, nov. 2016. ISSN 2344-5300. DOI: 10.15835/buasvmcnfst:12350. Citado na p. 21.

MIYAWAKI, Hiromi et al. Effects of astaxanthin on human blood rheology. eng. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 43, n. 2, p. 69–74, set. 2008. ISSN 0912-0009 (Print). DOI: 10.3164/jcbtn.2008048. Citado na p. 20.

MOLINO, Antonio et al. Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. **Journal of Biotechnology**, Elsevier, v. 283, July, p. 51–61, 2018. ISSN 18734863. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.010. Citado nas pp. 24, 25, 28, 29, 31.

MONTSANT, Anton; ZARKA, Aliza; BOUSSIBA, Sammy. Presence of a nonhydrolyzable biopolymer in the cell wall of vegetative cells and astaxanthin-rich cysts of *haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). **Marine Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 515–521, 2001. ISSN 14362228. DOI: 10.1007/s1012601-0051-0. Citado na p. 23.

NI, Hui et al. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 1, p. 51–59, 2008. ISSN 1673-1581. DOI: 10.1631/jzus.b061261. Citado na p. 42.

NISHIKAWA, Yoshiyuki et al. Effects of Astaxanthin and Vitamin C on the Prevention of Gastric Ulcerations in Stressed Rats. **Journal of Nutritional Science and Vitamins**, v. 51, n. 3, p. 135–141, 2005. DOI: 10.3177/jnsv.51.135. Citado nas pp. 14, 20.

NOBRE, Beatriz et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 6, p. 787–790, 2006. ISSN 14382377. DOI: 10.1007/s00217-006-0270-8. Citado na p. 29.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 499–506, 2000. ISSN 1573-5176. DOI: 10.1023/A:1008159127672. Citado na p. 31.

ØSTERLIE, Marianne; BJERKENG, Bjørn; LIAAEN-JENSEN, Synnøve. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 10, p. 482–490, 2000. ISSN 09552863. DOI: 10.1016/S0955-2863(00)00104-2. Citado na p. 17.

PALOZZA, Paola et al. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. eng. **Cancer letters**, v. 283, n. 1, p. 108–117, set. 2009. ISSN 1872-7980 (Electronic). DOI: 10.1016/j.canlet.2009.03.031. Citado na p. 19.

PARK, Jean Soon et al. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 18, 2010. ISSN 1743-7075. DOI: 10.1186/1743-7075-7-18. Citado nas pp. 14, 20.

PASHKOW, Fredric J; WATUMULL, David G; CAMPBELL, Charles L. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. **American Journal of Cardiology**, Elsevier, v. 101, n. 10, s58–s68, mai. 2008. ISSN 0002-9149. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.02.010. Citado na p. 16.

RAMMUNI, M.N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 277, October 2018, p. 128–134, mar. 2019. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.066. Citado na p. 14.

RAO, Ambati Ranga; SARADA, Ravi; RAVISHANKAR, Gokare Aswathanarayana. Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 6, p. 957–965, abr. 2007. ISSN 00225142. DOI: 10.1002/jsfa.2766. Citado na p. 51.

RAO, Ambati Ranga; SINDHUJA, H N et al. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3842–51, 2013. ISSN 1520-5118. DOI: 10.1021/jf304609j. Citado na p. 20.

REICHARDT, Christian. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. Edição: Wiley-VCH Publishers. 3rd ed. [S.l.]: Wiley, dez. 2002. ISBN 9783527306183. DOI: 10.1002/3527601791. Citado na p. 44.

RUEN-NGAM, Duangkamol et al. Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 64–70, 2011. ISSN 01496395. DOI: 10.1080/01496395.2010.493546. Citado nas pp. 24, 25, 29, 30.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young Soo. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 240, July 2017, p. 90–103, 2018. ISSN 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.099. Citado na p. 14.

SAMORÌ, Chiara et al. Extraction and milking of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* cultures. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, 2019. ISSN 1463-9262. DOI: 10.1039/C9GC01273G. Citado nas pp. 24, 25.

SARADA, R. et al. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7585–7588, 2006. ISSN 00218561. DOI: 10.1021/jf060737t. Citado nas pp. 18, 24–27, 31, 36, 37, 42, 46, 49, 50, 52.

SU, Fang; XU, Huarong et al. Hydrolytic efficiency and isomerization during de-esterification of natural astaxanthin esters by saponification and enzymolysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 34, p. 37–42, 2018. ISSN 07173458. DOI: 10.1016/j.ejbt.2018.05.002. Citado nas pp. 31, 35.

SU, Fang; YU, Wenjie; LIU, Jianguo. Comparison of effect of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* powder and synthetic astaxanthin on carotenoid composition, concentration, esterification degree and astaxanthin isomers in ovaries, hepatopancreas, carapace, epithelium of adult. **Aquaculture**, Elsevier, v. 523, November 2019, p. 735146, 2020. ISSN 00448486. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735146. Citado nas pp. 14, 18, 28, 51.

TAUCHER, Josef; BAER, Sascha. Cell Disruption and Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids from Microalgae. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, v. 07, n. 01, p. 1–7, 2016. DOI: 10.4172/2157-7544.1000158. Citado na p. 50.

VALDERRAMA, José O. et al. Extraction of Astaxantine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. In: 4. JOURNAL of Chemical and Engineering Data. [S.l.: s.n.], 2003. v. 48, p. 827–830. DOI: 10.1021/je020128r. Citado na p. 29.

WANG, Chunlei; ARMSTRONG, Daniel W.; CHANG, Chau Dung. Rapid baseline separation of enantiomers and a mesoform of all-trans-astaxanthin, 13-cis-astaxanthin, adonirubin, and adonixanthin in standards and commercial supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, n. 2, p. 172–177, 2008. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.04.063. Citado nas pp. 17, 18.

WANG, Feifei; GAO, Baoyan et al. A novel strategy for the hyper-production of astaxanthin from the newly isolated microalga *Haematococcus pluvialis* JNU35. **Algal Research**, Elsevier, v. 39, February, p. 101466, 2019. ISSN 22119264. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101466. Citado na p. 31.

WAYAMA, Marina et al. Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. Edição: Meng-xiang Sun. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, e53618, jan. 2013. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0053618. Citado na p. 51.

XIAO, An Feng et al. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 2029–2034, 2009. ISSN 09593993. DOI: 10.1007/s11274-009-0104-5. Citado na p. 42.

YANG, Cheng et al. Anti-Inflammatory Effects of Different Astaxanthin Isomers and the Roles of Lipid Transporters in the Cellular Transport of Astaxanthin Isomers in Caco-2 Cell Monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 22, p. 6222–6231, 2019. ISSN 15205118. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02102. Citado nas pp. 14, 17.

YANG, Shu et al. Effect of Thermal Processing on Astaxanthin and Astaxanthin Esters in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 3, p. 243–253, 2015. Citado na p. 19.

YIN, Chunhua et al. Efficient extraction of astaxanthin from *phaffia rhodozyma* with polar and non-polar solvents after acid washing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, Chemical Industry, Engineering Society of China (CIESC) e Chemical Industry Press (CIP), v. 21, n. 7, p. 776–780, 2013. ISSN 10049541. DOI: 10.1016/S1004-9541(13)60510-8. Citado na p. 42.

YU, Zhang Bao et al. Selection of *Haematococcus* strains suitable for mass culture. **Acta Hydrobiologica Sinica** ; v. 28, n. 3, p. 289–293, jan. 2004. Citado na p. 31.

YUAN, Jian Ping; CHEN, Feng. Isomerization of trans-astaxanthin to cis-isomers in organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3656–3660, 1999. ISSN 00218561. DOI: 10.1021/jf981319u. Citado na p. 17.

YUAN, Jian-Ping; PENG, Juan et al. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. eng. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 1, p. 150–165, jan. 2011. ISSN 1613-4133 (Electronic). DOI: 10.1002/mnfr.201000414. Citado na p. 19.

ZGHEIB, Nancy et al. Extraction of astaxanthin from microalgae: Process design and economic feasibility study. In: 1. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. [S.l.: s.n.], 2018. v. 323, p. 866–871. DOI: 10.1088/1757-899X/323/1/012011. Citado na p. 24.

ZHAO, Xiaoyan et al. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food and Bioproducts Processing**, Institution of Chemical Engineers, v. 99, n. 13, p. 197–203, 2016. ISSN 09603085. DOI: 10.1016/j.fbp.2016.05.007. Citado na p. 30.

ZHAO, Xiaoyan et al. Food and Bioproducts Processing Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food and Bioproducts Processing**, Institution of Chemical Engineers, v. 99, n. 13, p. 197–203, 2016. ISSN 0960-3085. DOI: 10.1016/j.fbp.2016.05.007. Citado nas pp. 30, 44.

ZHAO, Li-Yan et al. Study on Extraction Conditions of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food Science**, v. 27, n. 3, p. 110–114, 2006. Citado nas pp. 18, 26, 31.

ZHEKISHEVA, Mirash et al. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. **Journal of Phycology**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 38, n. 2, p. 325–331, abr. 2002. ISSN 0022-3646. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2002.01107.x. Citado na p. 31.

ZHOU, Qingxin et al. Thermal stability and oral absorbability of astaxanthin esters from *Haematococcus pluvialis* in Balb/c mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 7, p. 3662–3671, 2019. ISSN 10970010. DOI: 10.1002/jsfa.9588. Citado nas pp. 18, 28, 51.