UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

SABRINA DA SILVA MESQUITA

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-CAROTENO POR *Dunaliella bardawil*

Orientadores:
Profa. Dra. Eliana Flavia Camporese Sérvulo
Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Rio de Janeiro
2013

SABRINA DA SILVA MESQUITA

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-CAROTENO POR *Dunaliella bardawil*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Rio de Janeiro
2013

SABRINA DA SILVA MESQUITA

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-CAROTENO POR *Dunaliella bardawil*

Dissertação submetida ao corpo docente da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como requisito necessário a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 27 de março de 2013.

Aprovada por:

_____

Profa. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo EQ/UFRJ (Orientadora)

_____

Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira DIEN/INT (Co-orientadora)

_____

Prof. Dr. Ricardo Moreira Chaloub IQ/UFRJ

_____

Profa. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite EQ/UFRJ

_____

Prof. Dr. Paulo Sérgio Salomon IB/UFRJ

Mesquita, Sabrina.
Avaliação de estratégias para a indução da produção de β-caroteno por *Dunaliella bardawil* / Sabrina da Silva Mesquita. – 2013.
73f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Eliana Flávia Camporese Sérvulo

1. *Dunaliella bardawil*. 2. Pigmentos naturais. 3. Carotenoides. 4. β-caroteno. I. Sérvulo, Eliana Flávia. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Avaliação de estratégias para a indução da produção de β-caroteno por *Dunaliella bardawil*.

Dedico este trabalho ao meu pai, por todo o seu amor, esforço, dedicação e credibilidade que me deu.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me dar a vida e forças para lutar e conseguir realizar este trabalho;
- Ao meu pai pelo incentivo constante e apoio nos momentos difíceis, por me acompanhar nos finais de semana e feriados para que eu pudesse realizar os experimentos deste trabalho;
- Ao Rafael, meu namorado, pelas palavras amigas, pela compreensão e incentivo constante;
- A estagiária Natália pela amizade e por toda sua dedicação nas etapas experimentais;
- Aos amigos do LABIM, especialmente, Aninha, Diego, Carlinha e Márcia pelas deliciosas gargalhadas proporcionadas e por estarem sempre dispostos a ajudar;
- A orientadora Cláudia por me receber em seu laboratório, pelos valiosos conhecimentos compartilhados e pelo incentivo constante, principalmente nos momentos mais difíceis deste trabalho;
- A orientadora Eliana Flávia por acreditar neste trabalho, por estar sempre disposta a ajudar diante às dificuldades e pelo conhecimento compartilhado;
- Ao Pedro por todas as dicas dadas;
- Ao Vinnicius Brant por sua paciência e ajuda;
- A professora Silvana Viana por todo o seu conhecimento e por ter aberto as portas de seus laboratórios, permitindo que as análises cromatográficas pudessem ser realizadas;
- A FAPERJ e ao CNPq pelo apoio financeiro.

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-CAROTENO POR *Dunaliella bardawil*

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Brasil

Sabrina da Silva Mesquita
Março, 2013

Orientadores: Profa. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Estudos indicam que muitos corantes artificiais utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas podem ser prejudiciais à saúde humana, sendo uma alternativa o uso de corantes naturais. Dentre os corantes naturais mais utilizados, encontra-se o β-caroteno que pode ser produzido por processos biotecnológicos. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar a produção de β-caroteno pela microalga *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538 a partir dos fatores mais reportados na literatura como indutores da carotenogênese. Inicialmente, foram realizadas duas cinéticas de extração de carotenoides totais utilizando solução de acetona 90% como solvente extrator, para duas condições operacionais de extração encontradas na literatura. A extração de carotenoides totais mostrou-se semelhante para as duas condições testadas, sendo adotado 1 h o tempo necessário para extrair o máximo de carotenoides. Os isômeros 9-cis-β-caroteno e todo-trans-β-caroteno produzidos foram quantificados a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia de CLAE que apresentou melhor resolução cromatográfica foi a metodologia modificada (metanol/acetonitrila, 85:15/metil-terc-butil-éter, 80:20) por nosso grupo a partir de uma metodologia encontrada na literatura. Após estabelecidas as metodologias de extração e quantificação de β-caroteno, foram estudadas as condições de crescimento que favorecessem a obtenção de alta concentração celular na fase estacionária para uso em uma etapa posterior (etapa de indução da carotenogênese). Para isto, realizou-se um planejamento experimental fatorial completo (2^2), onde as variáveis estudadas foram a concentração de NaCl e a intensidade luminosa. Nesta etapa, foi possível observar que o experimento que obteve maior concentração celular ($6x10^5$células/mL) no final do crescimento foi aquele que havia sido cultivado a 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1 M. Depois de conhecer a melhor condição de crescimento da microalga, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo (2^2) visando a indução da carotenogênese. As culturas de células crescidas em 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1 M foram submetidas a estresse nutricional (ausência de nitrato), diferentes concentrações de NaCl e intensidades luminosas. Em 69 h de estresse foi alcançado o máximo de concentração de β-caroteno (12,6 mg/L) em 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1 M. A partir dos resultados obtidos, foi possível determinar as condições favoráveis à produção de β-caroteno por *D. bardawil*.

Palavras-chave: *Dunaliella bardawil*, pigmentos naturais, carotenoides, β-caroteno.

EVALUATION OF STRATEGIES TO INDUCE THE PRODUCTION OF β-CAROTENE BY *Dunaliella bardawil*

Abstract of the M.Sc. Dissertation presented to the graduate program on Technology of Chemistry and Biochemistry Process of the Chemical High School of Federal University of Rio de Janeiro – Brazil

Sabrina da Silva Mesquita
March, 2013

Academic tutors: Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Studies shows that artificial dyes which is used in beverage and food industries can be harmful to human health, but a healthy alternative can be used such as natural dyes. The most natural dyes used in beverage and food industries is β-carotene, which can be synthesized by biotechnological processes. The aim of this study was to evaluate β-carotene production by microalgae *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538 studying the most reported factors from literature. Initially, two extraction kinetics of total carotenoids were accomplished using acetone 90% as extraction solvent for two methodologies that were found in literature. The total carotenoids extraction was similar for the both tested methodologies and 1 h was adopted as the necessary time to extract the maximum carotenoids from biomass. The synthesized isomers 9-cis-β-carotene and all-trans-β-carotene were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC methodology which has shown better resolution was the modified by our group (methanol/acetonitrile, 85:15/metil-terc-butil-ether, 80:20). After have established the extraction and quantification of β-carotene methodologies, the growth conditions which could increase the cellular concentration in stationary phase were studied. To study this conditions a factorial design (2^2) was used and the studied variables were NaCl concentration and light intensities. In this stage, it was possible to observe that the experiment which obtained higher cellular concentration ($6x10^5$cells/mL) in the stationary phase has been cultivated at 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ and NaCl 1 M. After has known the best growth condition, a factorial design (2^2) was used to induce carotenogenesis. The cultures were growth at 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$and NaCl 1 M and were submitted to nitrate starvation, different NaCl concentrations and light intensities. After 69 h of stress the maximum concentration of β-carotene was reached (12,6 mg/L) at 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ and NaCl 1 M. After the obtained results it was possible to determine the favorable conditions to the β-caroteno production by *Dunaliella bardawil*.

Keywords: *Dunaliella bardawil*, natural dyes, carotenoids, β-carotene.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm: centímetro

g: grama

h: hora

IDA: Ingestão Diária Aceitável

Kg: quilograma

L: litro

m: metro

M: molar

mM: milimolar

MDIC: Mistério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio

mg: miligrama

mL: mililitro

ng: nanograma

nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

s: segundo

UTEX: The University of Texas

v: volume

μM: micromolar

μm: micrômetro

μE: microeisten

β: beta

α: alfa

γ: gama

ζ: zeta

ε: epsilon

δ: delta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 1

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1. Corantes em alimentos e bebidas 3

2.1.1. Regulamentação dos corantes no Brasil 3

2.2. Corantes artificiais versus *corantes naturais* 5

2.3. Carotenoides 7

2.3.1. Carotenoides em microalgas 10

2.3.2. β-caroteno 10

2.3.3. O gênero *Dunaliella* 11

2.3.4. Propriedades dos isômeros 9-cis-β-caroteno e todo-trans-β-caroteno 14

2.3.5. Fatores que influenciam a carotenogênese 14

2.3.5.1. Intensidade de luz 14

2.3.5.2. Concentração salina 15

2.3.5.3. Limitação de nutrientes 16

2.3.6. Biossíntese do β-caroteno 16

2.3.7. Cultivo de *Dunaliella* para a produção de β-caroteno 19

3.OBJETIVOS 23

3.1. Objetivo geral 23

3.2. Objetivos específicos 23

4.MATERIAIS E MÉTODOS 24

4.1. Micro-organismo e manutenção da cultura 24

4.2. Meio de cultura 24

4.3. Condições operacionais de cultivo 26

4.4. Preparo do inóculo 27

4.5. Detalhamento experimental 28

4.5.1. Conservação de amostras com biomassa microalgal para extração de carotenoides 28

4.5.2. Definição da metodologia de extração de carotenoides e cinética de extração 28

4.5.3. Padronização da metodologia de quantificação dos isômeros 9-cis-β-caroteno e todo-trans-β-caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência ... 30

4.5.4. Efeito da intensidade de luz e da salinidade no crescimento da microalga 32

4.5.5. Efeito da concentração inicial de nitrato no crescimento celular e no acúmulo de β-caroteno 34

4.5.6. Efeito da intensidade luminosa e salinidade na produção de β-caroteno em ausência de nitrogênio 34

4.6. Determinações analíticas 36

4.6.1. Contagem de células 36

4.6.2. Quantificação de nitrato 36

4.6.3. Quantificação de carotenoides totais 37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

5.1. Padronização da metodologia de extração de carotenoides 38

5.2. Desenvolvimento de metodologia para quantificação dos isômeros de β-caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência 40

5.3. Avaliação do crescimento celular em diferentes salinidades e intensidade de luz 43

5.4. Crescimento e produção de β-caroteno por *D. bardawil* em diferentes concentrações de nitrato 52

5.5. Produção de β-caroteno pela microalga em condição de estresse nutricional e em diferentes intensidade de luz e concentrações de NaCl 58

6. CONCLUSÕES 66

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 67

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Corantes alimentícios utilizados no mercado global 5

Figura 2: Exemplos de estruturas de cadeias de cadeias carbônicas de carotenoides 7

Quadro 1: Exemplos de fontes de carotenoides e os principais carotenoides produzidos 8

Quadro 2: Importações e exportações de carotenoides no Brasil 9

Figura 3: *Dunaliella bardawil* em aumento de 400x..... 13

Figura 4: Estrutura de cadeia carbônica dos isômeros do β-caroteno produzidos por *D. bardawil* 13

Figura 5: Esquema da rota de biossíntese do β-caroteno e demais carotenoides do gênero *Dunaliella* 18

Figura 6: Diferentes sistemas de cultivo de microalgas 19

Quadro 3: Empresas com cultivos comerciais de β-caroteno produzido por *Dunaliella* 21

Quadro 4: Composição do meio utilizado para o cultivo de *Dunaliella bardawil* (Shaish *et al.*,1992) 24

Figura 7: Mesa agitadora e disposição das lâmpadas fluorescentes em condições de menor (a) e maior (b) intensidade luminosa. 26

Figura 8: Ilustração dos cinco pontos onde foram feitas as medições da intensidade luminosa 27

Figura 9: Variações operacionais testadas na extração de carotenoides totais..... 29

Figura 10: Detalhes experimentais da extração de carotenoides totais (a - filtração do extrato de carotenoides obtido por trituração da membrana; b – esquema de extração em tubos de polipropileno; c – ilustração da separação da membrana do extrato de carotenoides após centrifugação) 30

Quadro 5: Metodologias para quantificação dos isômeros de β-caroteno produzidos por *Dunaliella bardawil* 31

Figura 11: Curva de calibração do β-caroteno 32

Quadro 6: Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 completo para a maximização do crescimento celular..... 33

Quadro 7: Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^2 para avaliação da produção de β-caroteno por células em ausência de nitrogênio 35

Figura 12: Curva de calibração de nitrato.....37

Figura 13: Cinéticas de extração de carotenoides totais (a) tratamento com ultrassom (b) tratamento com trituração da membrana. 39

Tabela 1: Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores e repetições 40

Figura 14: Espectro cromatográfico dos isômeros de β-caroteno obtidos por CLAE usando coluna C30 e metanol/acetonitrila/água (84:14:2) em diclorometano (75:25) como fase móvel..... 41

Figura 15: Espectro cromatográfico dos isômeros de β-caroteno obtidos por CLAE usando coluna C30 e fase móvel modificada [metanol/acetonitrila (85:15) / metil-terc-butil-éter (80:20)]. 42

Quadro 8: Resultados de concentração celular e β-caroteno obtidos na fase estacionária das diferentes condições estudadas..... 44

Figura 16: Curvas de crescimento de *D. bardawil* nas diferentes condições de intensidade de luz e salinadade estudadas..... 45

Figura 17: Gráfico de interação entre as variáveis (concetração de NaCl e intensidade luminosa) e sua influência na concentração celular na fase estacionária. 46

Figura 18: Efeito da salinidade e da intensidade de luz na biossíntese de catotenoides totais, de β-caroteno e seus isômeros 9-cis e todo-trans por *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538. 47

Figura 19: Variação da quantidade de pigmentos carotenoides acumulada intracelularmente em função da salinidade e da intensidade de luz. 48

Quadro 9: Consumo de nitrato por *D. bardawil* em função da salinidade e da intensidade luminosa..... 49

Tabela 2: Análise estatística da influência das variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz na concentração celular na fase estacionária de crescimento 50

Tabela 3: Análise estatística da influência das variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz na produção de β-caroteno 51

Figura 20: Gráfico de interação entre as variáveis intensidade de luz e concentração de NaCl e sua influência na produção de β-caroteno por *D. bardawil.* 52

Quadro 10: Concentração teórica e prática de nitrato utilizada no cultivo de *D. bardawil.* 53

Figura 21: Curvas de crescimento de *D. bardawil* em meio de cultura contendo 310 (a); 156 (b); e 53 mg/L (c) de nitrato. 54

Figura 22: Efeito da salinidade e da intensidade de luz na biossíntese de catotenoides totais, β-caroteno e seus isômeros 9-cis e todo-trans. 56

Tabela 4: Produtividade ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) de β-caroteno e carotenoides totais nas diferentes concentrações iniciais de nitrato utilizadas no crescimento de *D.bardawil* 57

Figura 23: Quantidade de carotenoides (ng) acumulados por célula nas diferentes concentrações iniciais de nitrato utilizadas no crescimento de *D. bardawil*. 58

Quadro 11: Resultados do planejamento experimental para a produção de β-caroteno por *D. bardawil* em ausência de nitrato, diferentes intensidades de luz e concentrações de NaCl. 59

Figura 24: Coloração das culturas no início (a) e no final do estresse (b) (69 h). 60

Tabela 5: Análise estatística da influência das variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz na produção de β-caroteno 61

Figura 25: Gráfico de influência da intensidade luminosa na produção de β-caroteno por *D. bardawil.* 62

Figura 26: Gráfico de interação entre a intensidade luminosa e a concentração de NaCl na produção de β-caroteno por *D. bardawil.* 62

Figura 27: Produção de carotenoides totais, β-caroteno e seus isômeros pela microalga *Dunaliella bardawil* em meio descrito por Shaish *et al.* (1992) contendo NaCl 1M e sob intensidade luminosa de 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. 63

Figura 28: Monitoramento da viabilidade celular ao longo do tempo de estresse (a) e da quantidade intracelular de carotenoides totais/célula. 64

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve uma mudança significativa no hábito alimentar da população com o aumento da substituição de alimentos *in natura* por alimentos processados, causando o empobrecimento da dieta alimentar (POLÔNIO & PERES, 2009). Devido ao fato de muitos alimentos industrializados, originalmente, não apresentarem cor e terem a cor afetada durante o processamento e a estocagem (ABRANTES *et al*., 2007), a adição de corantes artificiais nas indústrias de alimentos e bebidas tem sido amplamente utilizada.

A adição de corantes artificiais é um dos mais polêmicos avanços da indústria de alimentos, uma vez que sua utilização não confere valor nutricional e é justificada apenas por questões de hábitos alimentares (GODOY & PRADO, 2003). Sendo assim, a manutenção da cor natural dos alimentos é essencial para a comercialização do produto, em face da primeira avaliação do consumidor frente a um novo produto e, como consequência disso, o uso de corantes na indústria de alimentos tem sido cada vez maior (SATO *et al*., 1992).

Na legislação brasileira, todos os corantes artificiais possuem um valor definido de quantidade diária aceitável de ingestão (IDA) (GODOY & PRADO, 2003). Porém, alguns estudos relatam o uso de produtos comercializados com esses corantes em valores maiores que os indicados pela IDA, o que pode agravar seu efeito à saúde.

Desta forma, os corantes artificiais são sempre pauta das investigações científicas que buscam avaliar seus efeitos adversos à saúde humana. Muitos estudos relatam que os corantes artificiais podem causar câncer, urticária, asma, alterações no sistema renal e hepático, efeitos genotóxicos, entre outros (GODOY & PRADO, 2003; AMIN, HAMEID & ELSTTAR, 2010; MPOUNTOUKAS *et al*., 2010).

Diante deste cenário, há um aumento no interesse do uso de corantes naturais, uma vez que é crescente a demanda atual do mercado consumidor por produtos naturais e saudáveis.

Dentre os corantes naturais, estão os carotenoides, que apresentam coloração amarela, laranja e vermelha. Esses corantes são encontrados em plantas, algas,

microalgas, em algumas espécies de bactérias e fungos (FONTANA *et al*., 2000) e se destacam por serem amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos e ração (VALDUGA *et al*., 2009) e por apresentarem funções biológicas benéficas à saúde.

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio (MDIC), nos últimos anos, grande parte dos carotenoides comercializados no Brasil é proveniente de importação, mostrando sua importância nas indústrias do país.

O β-caroteno é um carotenoide que tem sido muito utilizado desde as indústrias de alimentos até as de nutracêuticos e pode ser produzido em grandes quantidades pela espécie de microalga *Dunaliella bardawil*. O cultivo desta espécie para a obtenção de β-caroteno se mostra vantajoso frente a outros micro-organismos, uma vez que por ser um organismo fotossintetizante, não necessita de carbono orgânico para o seu crescimento, podendo utilizar o CO_2 (dióxido de carbono) atmosférico, favorecendo na redução dos custos de cultivo. Além disso, a produção biotecnológica de β-caroteno por microalgas se destaca da obtenção do mesmo por extração de fontes naturais, pois o produto é obtido em um curto período de tempo, quando comparado a algas e plantas devido ao seu tempo de cultivo, não contribuindo assim com o extrativismo vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Corantes em alimentos e bebidas

Há séculos muitos alimentos vêm sendo coloridos, desde as civilizações antigas que tinham como hábito extrair substâncias da natureza, como as de origem animal, vegetal e mineral para colorir alimentos e melhorar sua aparência. Com o passar dos anos, essas substâncias foram sendo substituídas por substâncias sintéticas (PRADO & GODOY, 2003), a partir do desenvolvimento da química no século XX a qual permitiu que diversos corantes fossem sintetizados a baixo custo, possibilitando o declínio do uso de corantes naturais (SERRANO, LOPES & SERUYA, 2007).

A aparência do produto é essencial para sua aceitabilidade, o que justifica o emprego dos corantes (PRADO & GODOY, 2003). A importância da indústria de corantes deve-se ao fato de existir a alteração da cor natural de alimentos após a colheita, no armazenamento e, principalmente, no processamento quando são expostos a altas temperaturas e variações no nível de acidez (SATO *et al*., 1992).

2.1.1. Regulamentação dos corantes no Brasil

Segundo a resolução nº 44 de 1977 regulamentada pela ANVISA, os corantes permitidos na indústria de alimentos e bebidas brasileira são classificados como:

- Corante orgânico natural – obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante orgânico sintético – aquele obtido por síntese mediante o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante artificial – é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.

- Corante orgânico sintético idêntico ao natural – é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
- Corante inorgânico – aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimentos.
- Caramelo - é o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
- Caramelo (processo amônio) – é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200 mg/kg.

No Brasil os corantes naturais permitidos são: antocianinas, clorofila, carotenos, xantofilas, caramelo, cochonilha, urzela e carvão medicinal. De acordo com a legislação atual (Resolução nº 382 a 388 – ANVISA) são permitidos no Brasil apenas onze corantes artificiais para adição em alimentos e bebidas, são eles: amaranto, vermelho de eritrosina, vermelho 40, ponceau 4R, amarelo crepúsculo, tartrazina, azul de indigotina, azul brilhante, azorrubina, verde rápido e azul patente V. Além disso, a legislação brasileira também exige que os alimentos os quais contenham corantes artificiais apresentem em seu rótulo o aviso “Colorido artificialmente” (PRADO & GODOY, 2003).

De acordo com Downham & Collins (2000) o uso de corantes alimentícios no mercado mundial é encabeçado pelos corantes artificiais, seguido dos corantes naturais, sintéticos idênticos aos naturais e corante caramelo, correspondendo a, respectivamente, 42%, 27%, 20% e 11% (figura 1).

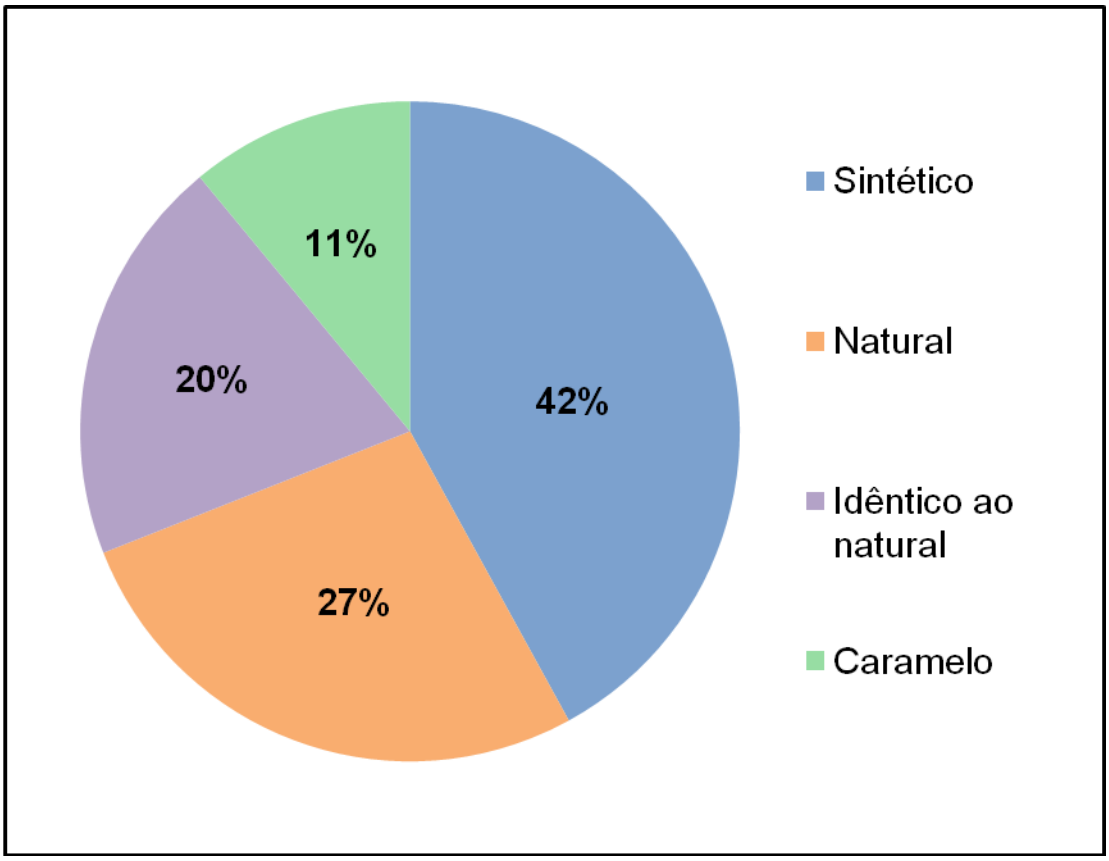

Figura 1: Corantes alimentícios utilizados no mercado global.
Fonte: DOWNHAM & COLLINS (2000).

2.2. Corantes artificiais versus *corantes naturais*

Apesar de todos os corantes artificiais permitidos no Brasil possuírem um valor definido de ingestão diária aceitável (IDA), Prado & Godoy (2007) avaliaram os teores de corantes artificiais presentes em guloseimas comercializadas em nosso país e constataram que muitos dos produtos analisados apresentavam teores acima dos permitidos pela legislação brasileira.

Diversos estudos relatam reações adversas aos aditivos alimentares, como reações tóxicas no metabolismo que se desdobram em alergias, alterações comportamentais e carcinogenicidade (POLÔNIO & PERES, 2009). A parcela do mercado consumidor mais susceptível aos efeitos desses aditivos é formada pelas crianças, uma vez que são muito atraídas por alimentos coloridos.

Estudos com camundongos mostraram que mesmo quando a tartrazina é ingerida em pequenas doses ocorrem mudanças renais e hepáticas, bem como a

indução do estresse oxidativo por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (AMIN, HAMEID & ELSTTAR, 2010). Além disso, experimentos *in vitro* com células de mamífero mostraram que os corantes artificiais eritrosina, tartrazina e amaranto são potencialmente genotóxicos, podendo causar danos ao material genético da célula (MPOUNTOUKAS *et al*., 2010).

Se por um lado os corantes artificiais podem causar problemas à saúde humana, por outro seu uso apresenta vantagens para a indústria de alimentos, já que possuem alta estabilidade à luz, oxigênio, calor e pH; alto potencial de coloração e uniformidade da cor (CONSTANT, STRINGHETA & SANDI, 2002). Porém, a exigência dos consumidores por produtos saudáveis vem aumentando devido aos efeitos adversos que os corantes artificiais podem causar.

Já a maioria dos corantes naturais, atualmente empregados, são altamente insaturados e propensos à degradação por fatores como o calor, oxigênio, luz e variação de pH (MAPARI, MEYER & THRANE, 2009). Entretanto, diversos estudos avaliam os mais variados efeitos dos corantes naturais na saúde humana, dentre estes estão os carotenoides e as antocianinas.

Os benefícios das antocianinas (fitopigmentos flavonoides) à saúde são muito conhecidos por suas propriedades antioxidantes. Recentemente, descobriu-se que esses pigmentos podem atuar com efeito inibitório no acúmulo de gordura corporal e na redução da concentração de glicose no plasma sanguíneo. Além disso, muitos estudos também sugerem que as antocianinas agem contra os efeitos causados pelo avanço de idade, como a neurodegeneração e o declínio cognitivo (TSUDA, 2011). Já os carotenoides se destacam por apresentarem importantes funções biológicas benéficas à saúde, tais como a atividade antioxidante, fortalecimento do sistema imunológico, redução do risco de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular (VALDUGA *et al*., 2009), proteção contra os efeitos nocivos dos raios UV, entre outros benefícios.

2.3. *Carotenoides*

Dentre os corantes naturais permitidos no Brasil, o grupo dos carotenoides é o que apresenta o maior leque de aplicações nas mais variadas indústrias. Os carotenoides são tetraterpenoides hidrofóbicos de cadeia com 40 carbonos. A estrutura química de mais de 600 carotenoides diferentes é derivada da cadeia de carbonos poliênicos (DEL CAMPO, GARCÍA-GONZÁLEZ & GUERRERO, 2007) que consiste em ligações duplas conjugadas, as quais são responsáveis pela variedade de cores e sua habilidade de absorver fótons na região azul-verde do espectro de luz visível (GOODWIN, 1980 apud BEN-AMOTZ *et al*., 2009). De acordo com Jin *et al*. (2003), os carotenoides são divididos em duas classes (figura 2), naturalmente ocorrentes, são elas:

- Carotenos – são hidrocarbonetos não-oxigenados com cadeia linear ou cíclica em uma ou duas extremidades da molécula. Exemplos: β-caroteno, α-caroteno, γ–caroteno, fitoflueno, entre outros;

- Xantofilas – são hidrocarbonetos oxigenados derivados dos carotenos. Exemplos: zeaxantina, luteína, fucoxantina, neoxantina, entre outros.

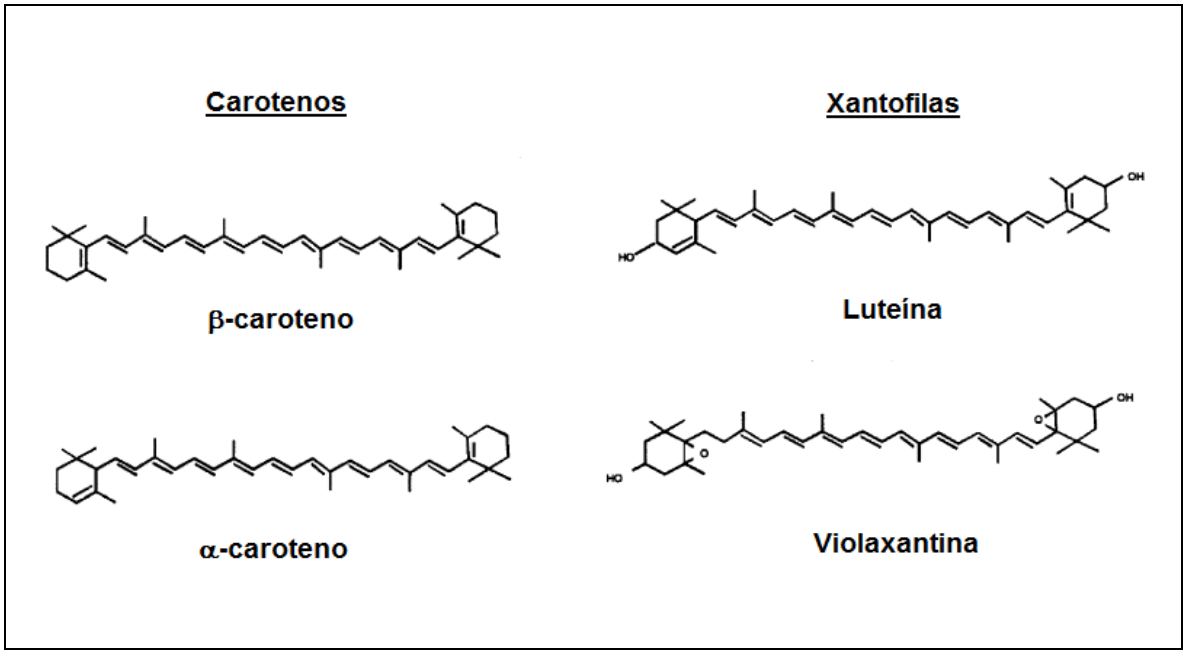

Figura 2: Exemplos de estruturas de cadeias de cadeias carbônicas de carotenoides
Fonte: JIN *et al*. (2003)

Os carotenoides são pigmentos naturais que apresentam coloração desde o amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho intenso que podem ser sintetizados por bactérias, algas, fungos e plantas superiores (FONTANA *et al*., 2000). Estes pigmentos também podem ser encontrados em animais, onde não são sintetizados e sim adquiridos por meio de alimentação rica em carotenoides, como por exemplo, em penas de aves (flamingo), exoesqueletos de crustáceos (krill) e em tecidos de peixes (salmão). No quadro 1, encontram-se reunidas algumas fontes naturais de carotenoides e os principais carotenoides produzidos.

Quadro 1: Exemplos de fontes de carotenoides e os principais carotenoides produzidos

Fonte produtora	**Principal carotenoide produzido**
Microalgas	
Dunaliella salina	β-caroteno
Dunaliella bardawil	β-caroteno
Haematococcus pluvialis	Astaxantina
Chlorella pyrenoidosa	Luteína
Scenedesmus almeriensis	Luteína
Frutos	
Curcubita moschata (Abóbora)	β-caroteno
Lycopersicum esculentum (Tomate)	Licopeno
Raízes	
Daucus carota (Cenoura)	β-caroteno
Fungos	
Rhodotorula glutinis	β-caroteno
Blakeslea trispora	β-caroteno e licopeno
Sporobolomyces roseus	Torularrodina, β-caroteno, toruleno
Bactérias	
Mycobacterium lacticola	Astaxantina
Streptomyces chrestomyceticus	Xantofilas
Mycobacterium brevicaie	Cantaxantina

Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, (2008); VALDUGA *et al*. (2009).

As propriedades antioxidantes dos carotenoides têm estimulado o seu amplo uso na indústria de alimentos, onde eram utilizados anteriormente apenas como corantes. Além disso, espera-se que nos próximos anos, os carotenoides naturais tenham maior aceitação no mercado consumidor, deixando em segundo plano os carotenoides sintéticos (PRWEB, 2011). As duas principais empresas que produzem o β-caroteno sintético são a Roche e a BASF, a primeira atua nessa produção desde 1954 e a segunda desde 1960, mas sua importância econômica aumentou rapidamente a partir dos anos 90 (RIBEIRO, BARRETO & COELHO, 2011).

Atualmente, o mercado de carotenoides é dominado pelos Estados Unidos e Europa, sendo crescente o investimento no ramo de países como a China, Índia, Japão e Malásia. Segundo a projeção feita pela *Global Industry Analysts*, o mercado global de carotenoides movimentará em 2017 cerca de US$ 1,3 bilhões, devido à crescente preferência dos consumidores por produtos naturais (PRWEB, 2011).

O cenário econômico dos carotenoides no Brasil é movimentado, sobretudo por muitas importações. Tal fato sinaliza a importância do uso destes pigmentos nos diversos ramos do mercado e uma produção que não sustenta as demandas do mercado interno. Nos últimos três anos os gastos com importações desses pigmentos foram de US$ 6.208.153, enquanto os lucros obtidos com exportações foram de US$ 385.092 que corresponde em torno de 6% dos gastos com importações (quadro 2).

Quadro 2: Importações e exportações de carotenoides no Brasil

	2010		2011		2012	
	US$	Peso (kg)	US$	Peso (kg)	US$	Peso (kg)
Importação	2.440.475	429.707	2.399.371	101.168	1.368.307	53.601
Exportação	30.379	25	312.956	5.544	41.757	531

Fonte: Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio (MDIC)

O cultivo de microalgas para a produção de carotenoides apresenta vantagens ambientais e pode se mostrar lucrativo, uma vez que não há gastos com fontes de carbono orgânico, pois por ser um micro-organismo fotossintetizante, utiliza CO_2 atmosférico para síntese de suas próprias moléculas orgânicas, contribui com a liberação de O_2 para a atmosfera e utiliza luz solar (nos casos de cultivo ao ar livre), reduzindo os gastos de produção.

2.3.1. Carotenoides em microalgas

Os carotenoides utilizados atualmente são provenientes da obtenção por rota química ou por extração a partir de fontes naturais (plantas e algas). Porém, com o aumento da preocupação do uso de aditivos químicos na indústria de alimentos, houve um crescente interesse na obtenção de carotenoides por processos biotecnológicos. Além do apelo crescente por produtos naturais, os carotenoides sintetizados por micro-organismos podem ser obtidos em um curto tempo, independente da época do ano (VALDUGA *et al*., 2009).

Esses pigmentos naturais apresentam diversas funções em microalgas, dentre essas podemos destacar sua atuação como pigmentos acessórios à fotossíntese, sendo responsáveis pela absorção de energia na região azul-verde do espectro de luz e transferindo a mesma para a clorofila (TELFER, 2002). Também participam na dissipação do excesso de energia absorvida e como “seqüestradores” de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos ao foto-sistema.

Determinadas espécies, como algumas do gênero *Dunaliella,* podem aumentar sua produção de carotenoides em resposta a condições de estresse, como a limitação de nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre), alta salinidade e alta intensidade de luz.

2.3.2. β-caroteno

Na natureza o β-caroteno está presente na maioria das plantas e algas, mas em pequenas quantidades, cerca de 0,2% do peso seco com, aproximadamente, 1/3

do isômero 9-cis-β-caroteno em sua composição. Porém, em espécies de microalgas como *Dunaliella bardawil e Dunaliella salina* o isômero 9-cis-β-caroteno pode representar mais de 50% da composição isomérica do β-caroteno (BEN-AMOTZ *et al*., 2009).

Por muitos anos o β-caroteno tem sido utilizado como corante em alimentos, como pró-vitamina A em alimentos e ração animal, como aditivo em cosméticos, em complexos multivitamínicos e na última década em alimentos como fonte antioxidante (BEN-AMOTZ e*t al*., 2009). A demanda do β-caroteno tem aumentado no mercado global devido às diversas possibilidades de aplicação deste pigmento.

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos do β-caroteno na saúde humana, dentre estes podemos destacar o aumento dos níveis de colesterol HDL (*high density lipoprotein*), proteção solar, redução do risco de doenças do coração, prevenção ao câncer, atividade pró-vitamina A, entre outros benefícios (SHAISH *et al*., 2006; STAHL *et al*., 2000; KRITCHEVSKY, 1998).

2.3.3. O gênero *Dunaliella*

As microalgas do gênero *Dunaliella* pertencem ao filo Chlorophyta, são unicelulares, halotolerantes, biflageladas e com flagelos de tamanho aproximado ao tamanho da célula, são desprovidas de parede celular rígida, mas apresentam um tipo de glicocálix que envolve a célula (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988 apud BEN-AMOTZ *et al*., 2009).

As espécies de *Dunaliella* que apresentam a capacidade de acumular altas concentrações de β-caroteno como *Dunaliella bardawil* e *Dunaliella salina*, podem ser encontradas em locais hipersalinos, como lagos artificiais de produção de sal e lagos naturais (BOROWITZKA & SIVA, 2007). Nestes ambientes essas microalgas são encontradas, predominantemente, com coloração laranja ao invés de verde, devido à grande quantidade produzida de β-caroteno.

Essas microalgas são capazes de sobreviver em faixas de salinidade de 0,5% até 35%, havendo variação do formato da célula conforme a variação da salinidade

devido à ausência de parede celular (BEN-AMOTZ, SHAISH & AVRON, 1991). Também são capazes de sobreviver em condições extremas de temperatura, numa faixa de 5° a 40°C (BEN-AMOTZ *et al*., 2009).

A sobrevivência dessas espécies frente aos choques hiperosmóticos (altas salinidades) é resultante de um mecanismo de osmorregulação, em que há a produção de glicerol (soluto compatível), enquanto que em situações de choques hipo-osmóticos o glicerol presente na célula é eliminado (CHEN & JIANG, 2009). Desta forma, a quantidade de glicerol intracelular é diretamente proporcional à concentração de sal no meio extracelular (BEN-AMOTZ, SHAISH & AVRON, 1991).

Em 1976, Ben-Amotz e Avron isolaram uma cepa microalga do gênero *Dunaliella* de tanques de produção de sal próximos à Laguna Bardawil e denominaram de *Dunaliella bardawil* a espécie isolada (BEN-AMOTZ *et al*., 2009). Segundo Borowitzka & Siva (2007) é provável que a designação correta para a espécie *Dunaliella bardawil* seja *Dunaliella salina*. Porém, muitos pesquisadores mantém o termo específico *bardawil*, apesar de as características taxonômicas sugerirem que se trata de uma cepa de *Dunaliella salina* (BEN-AMOTZ, KATZ & AVRON, 1982).

A microalga *Dunaliella bardawil* (figura 3) é capaz de acumular até cerca de 10% de seu peso seco em β-caroteno sob condições de estresse celular como, alta intensidade de luz, alta concentração salina, baixas temperaturas ou em ambiente com deficiência de nitrato (BEN-AMOTZ & AVRON, 1990). Como organismos fotossintéticos, as algas do gênero *Dunaliella* apresentam carotenoides primários, localizados no complexo antena onde auxiliam na fotossíntese. O processo pelo qual a microalga *D. bardawil* acumula grande quantidade de β-caroteno é denominado de carotenogênese, sendo causado em resposta às condições de estresse celular. Portanto, os pigmentos carotenoides produzidos por estresse apresentam função secundária (BEN-AMOTZ *et al*., 2009).

Figura 3: *Dunaliella bardawil* em aumento de 400x

O β-caroteno produzido em resposta ao estresse celular é armazenado em glóbulos de lipídios localizados nos cloroplastos (BEN-AMOTZ & AVRON, 1983), em espaços entre as membranas tilacóides. Sendo assim, espera-se que o mecanismo de acúmulo de β-caroteno e dos lipídios sejam processos interdependentes (RABANNI *et al*., 1998). A composição dos principais isômeros do β-caroteno produzido por *D. bardawil* que está presente nestes glóbulos é de 42% de todo-trans-β-caroteno, 41% de 9-cis-β-caroteno e 10% de 15-cis-β-caroteno (BEN-AMOTZ, KATZ & AVRON, 1982). Na figura 4, encontram-se as conformações moleculares dos principais isômeros produzidos por *Dunaliella*.

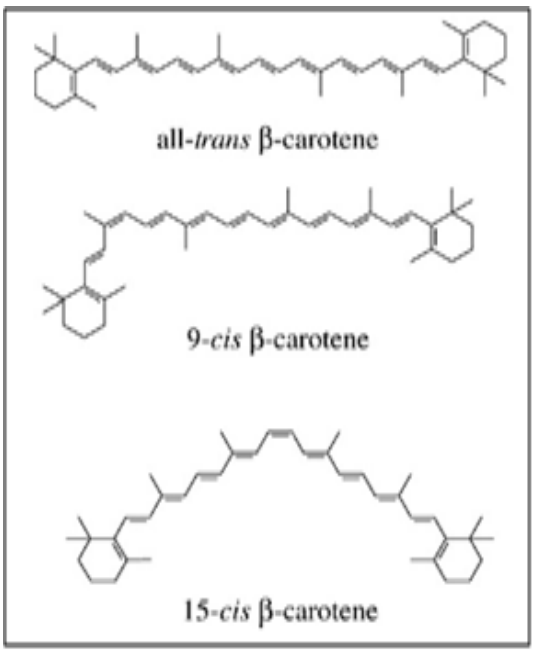

Figura 4: Estrutura de cadeia carbônica dos isômeros do β-caroteno produzidos por *D. bardawil*

Fonte: Ye, Jiang & Wu (2008).

2.3.4. Propriedades dos isômeros 9-cis-β-caroteno e todo-trans-β-caroteno

As propriedades físico-químicas do isômero todo-trans-β-caroteno diferem do 9-cis-β-caroteno, uma vez que o primeiro apresenta baixa solubilidade em óleo e é facilmente cristalizado em baixas temperaturas. Já a forma 9-cis-β-caroteno é mais solúvel em solventes lipofílicos e é dificilmente cristalizado em baixas temperaturas. Desta forma, um mecanismo de sobrevivência de *Dunaliella* em condições de baixas temperaturas é sintetizar uma maior quantidade do isômero 9-cis-β-caroteno para evitar a cristalização do isômero todo-trans-β-caroteno (BEN-AMOTZ & LEVY, 1996). Além disso, a produção do isômero 9-cis-β-caroteno também pode ter relação com a quantidade de luz absorvida pela célula durante o ciclo de divisão (BEN-AMOTZ & AVRON, 1990).

Além disso, alguns estudos relatam que o isômero 9-cis-β-caroteno apresenta uma maior atividade antioxidante do que a forma todo-trans-β-caroteno, atuando como um “sequestrador” de oxigênio singlete e outros radicais livres (BEN-AMOTZ & LEVY, 1996).

2.3.5. Fatores que influenciam a carotenogênese

2.3.5.1. Intensidade de luz

Lers, Biener & Zamir (1990) verificaram que a intensidade de luz é um ativador do gene que está envolvido na indução do acúmulo de β-caroteno por *D. bardawil*. Também foi observado que a quantidade deste pigmento pode aumentar no interior da célula com o decorrer do tempo de exposição à alta intensidade luminosa. Apesar disso, o mecanismo de regulação do acúmulo de β-caroteno sob alta intensidade luminosa ainda não é conhecido.

Há alguns anos, Ben-Amotz, Shaish & Avron (1989) descobriram que o β-caroteno produzido por *D. bardawil* sob condições de estresse atua como filtro da luz azul e oferece proteção contra a fotoinibição causada pela radiação fotossinteticamente ativa.

É possível que uma das sinalizações para a indução da carotenogênese seja a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas a partir do excesso de

luz absorvida (LAMERS *et al*., 2008). Quando as células são expostas a alta intensidade de luz ou radiação UV, o excesso de energia absorvido pode ocasionar uma série de reações que resultam na formação das ERO que têm o potencial de causar a peroxidação de lipídios, bem como a oxidação de proteínas e ácidos nucleicos, alterando as atividades e estruturas celulares (ASADA, 2006).

De acordo com Uenojo, Junior & Pastore (2007), o oxigênio singlete ($^1O_2$ - espécie reativa de oxigênio altamente oxidante) pode ser originado a partir da transferência de energia eletrônica de um composto no estado excitado, como a clorofila, para o oxigênio tripleto ($^3O_2$). No esquema abaixo encontra-se a exemplificação do mecanismo de ação.

$$^1O_2 + \text{Carotenoide} \Longrightarrow {}^3O_2 + {}^*\text{Carotenoide}$$

Fonte: UENOJO, JUNIOR & PASTORE (2007).

Após formado, o carotenoide no estado excitado (*Carotenoide), pode retornar ao seu estado fundamental através da dissipação de energia na forma de calor.

2.3.5.2. Concentração salina

Cowan & Rose (1991) observaram que há uma relação de regulação do acúmulo de β-caroteno e a produção de ácido abcísico (ABA - hormônio vegetal) quando células de *D. bardawil* são submetidas a estresse salino. Os autores relatam que há dois estágios de acúmulo deste pigmento. Num primeiro momento, logo após a exposição das células à alta concentração salina, ocorre o aumento da produção de β-caroteno que coincide com o aumento da produção endógena deste hormônio. Após isto, o nível de β-caroteno é mantido constante até o início do segundo estágio onde há um maior acúmulo. Embora os autores tenham encontrado uma relação entre a produção de β-caroteno e o ABA, quase não se sabe sobre o processo que está relacionado diretamente com a carotenogênese em presença de alta salinidade.

2.3.5.3. Limitação de nutrientes

A carotenogênese também pode ser induzida pela ausência de determinados nutrientes no meio de cultura, tais como: nitrogênio, fósforo e enxofre. Segundo Lamers *et al*. (2010) a deficiência de nitrogênio no meio é, depois da alta intensidade de luz, um dos fatores mais eficientes na indução da carotenogênese em *D. salina*. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo regulatório da carotenogênese na ausência de nitrogênio (LAMERS *et al*., 2008), assim como com os outros nutrientes citados anteriormente.

Com relação ao nitrogênio, sabe-se que sua limitação no meio inibe a síntese proteica e, consequentemente, a produção de clorofila. Em contrapartida, favorece a carotenogênse, permitindo a proteção da clorofila contra possíveis danos causados pela incidência de luz (BEN-AMOTZ *et al.*, 2009).

Em um experimento relatado por Ben-Amotz *et al.* (2009) foi possível verificar que células de *D. bardawil* submetidas a estresse de nitrogênio após o crescimento apresentavam maior expressão do gene PSY do que em células não estressadas, sugerindo assim que a enzima fitoeno sintase está de fato envolvida na regulação da carotenogênese.

2.3.6. Biossíntese do β-caroteno

Atualmente, a rota de biossíntese mais aceita para o gênero *Dunaliella* encontra-se na figura 5. Segundo Ye, Jiang & Wu (2008), de uma maneira geral, a biossíntese de carotenoides é dividida em três etapas, são elas: a biossíntese de geranilgeranil pirofosfato, a biossíntese do licopeno e a geração de carotenoides com anéis de ciclohexano. Já a rota de biossíntese da espécie *D. salina* ainda não é clara devido aos resultados contraditórios encontrados na literatura, envolvendo o efeito de regulação das enzimas fitoeno sintase e fitoeno desaturase (LAMERS *et al*., 2008).

Conforme apresentado na figura 5, os nomes que estão ao lado das setas correspondem às enzimas responsáveis pelas reações que transformam uma molécula em outra. A biossíntese é iniciada com a ação da enzima fitoeno sintase

que catalisa a reação entre duas moléculas de geranilgeranil pirofosfato, originando o primeiro carotenoide, o fitoeno. As próximas etapas são reações de desidrogenação que resultam na conversão do fitoeno em licopeno por meio dos intermediários: fitoflueno, ζ-caroteno e neurosporeno (YE, JIANG & WU, 2008). Após a produção do licopeno existem duas vias, uma que dará origem à luteína como produto final e a outra que originará a neoxantina como o último carotenoide da via. Nesta última via, encontra-se o β-caroteno que é um intermediário.

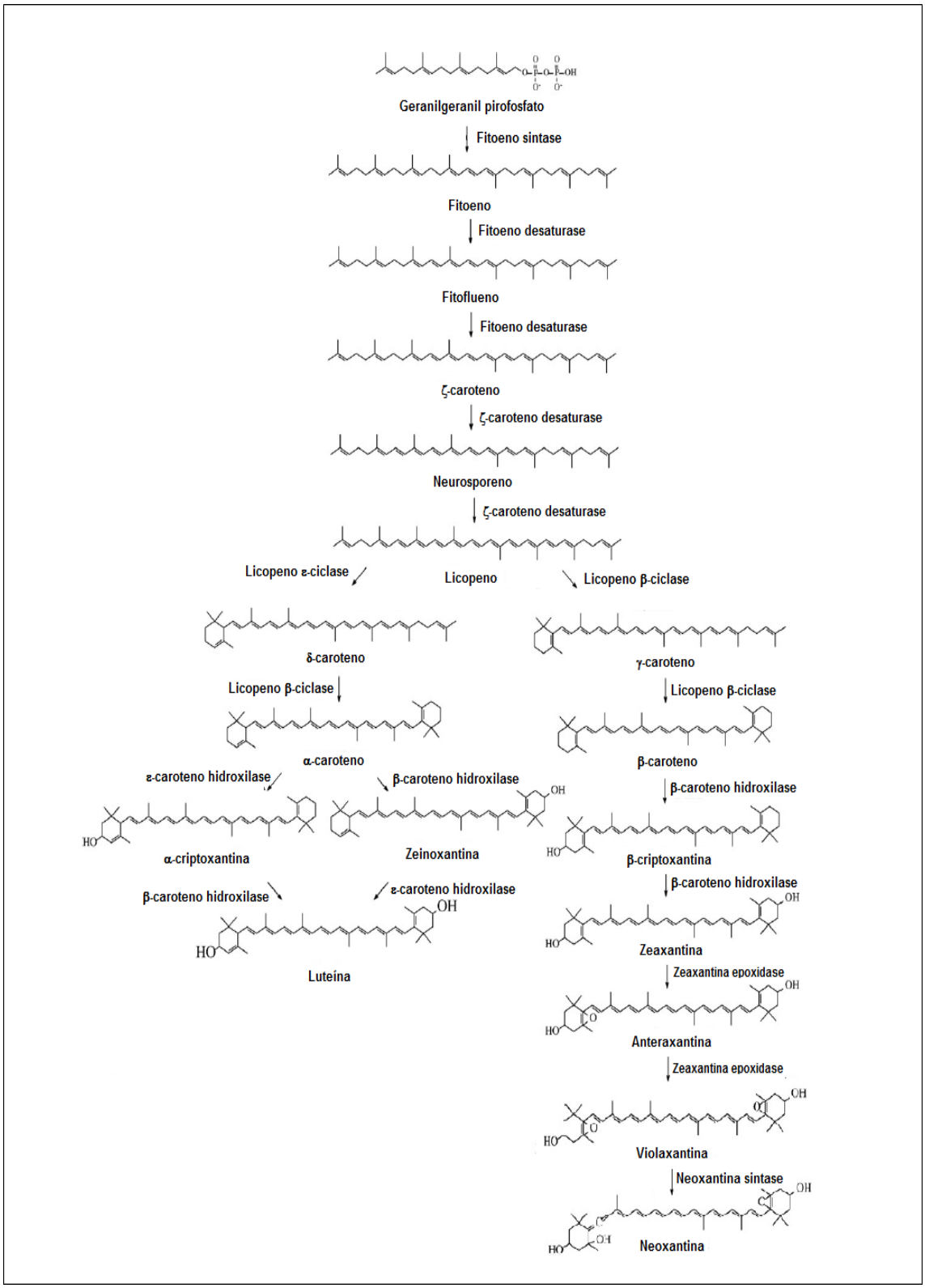

Figura 5: Esquema da rota de biossíntese do β-caroteno e demais carotenoides do gênero *Dunaliella*

Fonte: YE, JIANG & WU (2008)

2.3.7. Cultivo de *Dunaliella* para a produção de β-caroteno

O cultivo de microalgas pode ser realizado em diferentes sistemas de cultivo. Esses sistemas podem ser abertos, como os tanques abertos, tanques do tipo pista de corrida (*raceway ponds*), e podem ser fechados como em diferentes modelos de fotobiorreatores (figura 6).

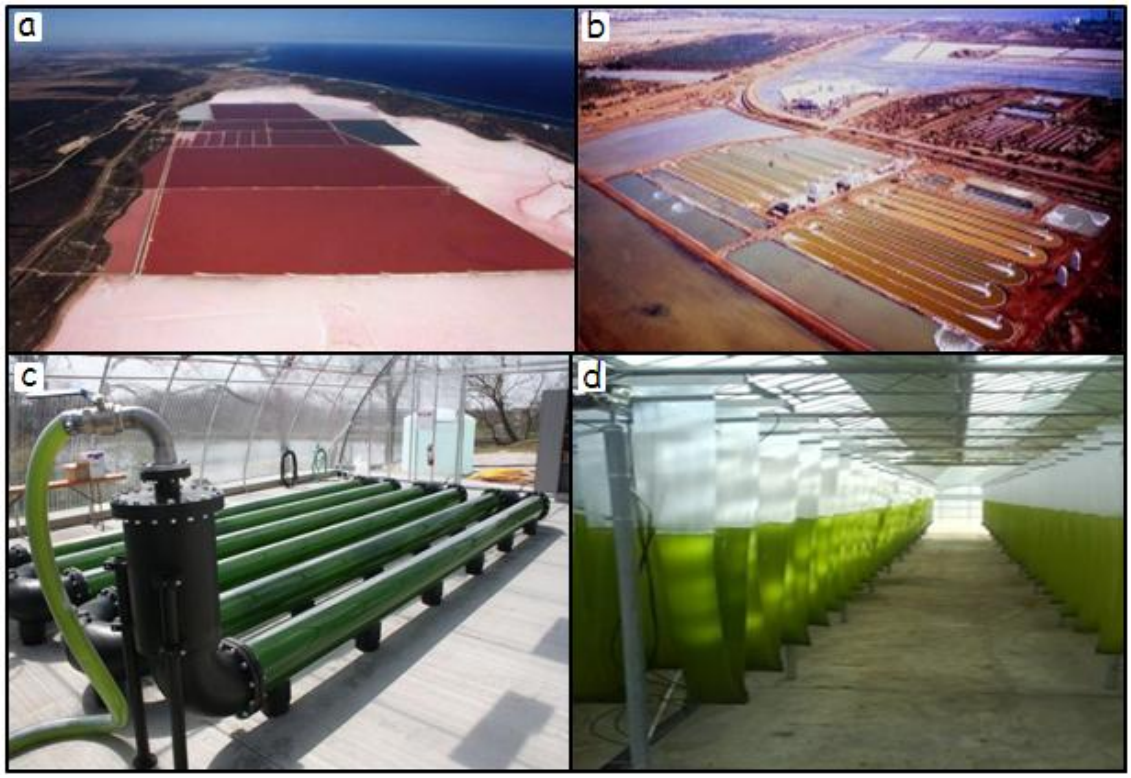

Figura 6: Diferentes sistemas de cultivo de microalgas (a – Cultivo de *Dunaliella salina* em tanques abertos na empresa Cognis Nutrition and Health na Austrália; b - Cultivo de *Dunaliella* em tanques do tipo pista de corrida em Israel; c - Fotobiorreator tubular; d – Fotobiorreator do tipo *plastic bag*)

Fonte: www.bsb.murdoch.edu.au; www.hrc.unlv.edu; www.engineeringnews.co.za.

Os sistemas abertos são os mais utilizados em cultivos em larga escala e comerciais, pois apresentam baixos custos de implementação e operação. Porém, apresentam desvantagens como a baixa produtividade volumétrica em biomassa, difícil controle de processo por serem mais susceptíveis às variações ambientais e

dificuldade de controle com contaminações. Já os sistemas fechados, apresentam como vantagens um maior controle de processo e de contaminações e maior produtividade volumétrica. Em contrapartida, os sistemas fechados apresentam elevados custos de implementação e operação (DEL CAMPO, GARCÍA-GONZÁLEZ & GUERRERO, 2007). Sendo assim, a escolha do sistema de cultivo varia de acordo com o objetivo do produto que se deseja obter, bem como as condições ambientais do local onde será realizado o cultivo.

A maioria dos cultivos comerciais de *Dunaliella* são realizados em tanques abertos (JIN & MELIS, 2003). Esses cultivos podem ser divididos em dois tipos: extensivo e intensivo. O primeiro é encontrado em países como a China e Austrália e controla o mínimo possível as condições ambientais, utiliza altas concentrações salinas no meio como uma forma de evitar predadores naturais da microalga e em consequência disso, o crescimento da microalga é mais lento. Em países como os Estados Unidos e Israel, os cultivos são realizados de forma intensiva, onde se recorre pelo máximo uso de biotecnologia para controlar os fatores que influenciam o crescimento e a composição celular (DEL CAMPO, GARCÍA-GONZÁLEZ & GUERRERO, 2007; BEN-AMOTZ *et al*., 2009).

A produção comercial de *D. salina* se tornou a terceira maior indústria no ramo de microalgas em 1986 por meio da atividade da empresa Western Biotechnology e Betateno (hoje chamada Cognis Nutrition and Health), ambas localizadas na Austrália. Atualmente, países como Israel, Estados Unidos, China, Chile e Portugal cultivam *Dunaliella* em larga escala para a obtenção de β-caroteno, sendo que o preço deste pigmento produzido por *Dunaliella* pode variar de US$ 300 a 3000 por quilo (SPOLAORE, 2006). No quadro 3 são encontradas algumas empresas produtoras de β-caroteno a partir de *Dunaliella*.

Quadro 3: Empresas com cultivos comerciais de β-caroteno produzido por *Dunaliella*

Empresa	País
Cognis Nutrition and Health	Austrália
Cyanotech	EUA
Inner Mongolia Biological	China
Tianjin Lantai Biotechnology	China
Nature Beta Technology	Israel
Parry Agro Industries	India

Fonte: SPOLAORE *et al*. (2006); DEL CAMPO, GARCÍA-GONZÁLEZ & GUERRERO (2007)

Na literatura são encontrados dois tipos de condução de cultivo mais utilizados para a produção de β-caroteno e carotenoides por *D. salina e D. bardawil*, são eles: batelada simples e cultivo em duas etapas. No cultivo em batelada, são impostas condições favoráveis à carotenogênese, entretanto desfavoráveis para o alto desempenho do crescimento celular. Já o cultivo em duas etapas foi proposto após descobrir que a carotenogênese em *Dunaliella* e o crescimento celular são eventos biológicos independentes, podendo a carotenogênese ser induzida em qualquer fase do ciclo celular (SHAISH *et* al., 1992 apud BEN-AMOTZ, 1995). Desta forma, o crescimento celular é dado em uma etapa cujas condições são favoráveis ao crescimento e após isto, as células são submetidas a condições ideais à indução da carotenogênese.

Trabalhos como o de Prieto, Canavate & García-González (2011) mostram que a produtividade de β-caroteno no cultivo em duas etapas em tanques abertos é maior comparada ao cultivo em batelada. Entretanto, a salinidade reduzida utilizada na fase de crescimento pode favorecer o aparecimento de espécies não

carotenogênicas de *Dunaliella* e contaminações, como protozoários que podem predar a população da espécie de microalga cultivada (BOROWITZKA, 1990).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Esta dissertação teve como objetivo geral avaliar algumas condições de cultivo com o propósito de maximizar a produção de β-caroteno pela microalga *Dunaliella bardawil*.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a metodologia de extração de carotenoides e o tempo para alcançar o máximo de extração;
- Definir uma metodologia para análise da composição dos principais isômeros do β-caroteno produzidos por *Dunaliella bardawil* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar o crescimento da microalga em diferentes condições de intensidade de luz e salinidade;
- Avaliar o efeito da concentração de nitrogênio no crescimento microalgal e na carotenogêse em intensidade de luz e salinidade selecionadas como ideais para o crescimento;
- Avaliar o efeito da intensidade de luz e salinidade na indução do acúmulo de β-caroteno por células da fase estacionária de crescimento em ausência de nitrogênio no meio de cultivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo e manutenção da cultura

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a microalga *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538, cultura unialgal, adquirida da coleção de cultura da Universidade do Texas (UTEX).

A cultura estoque da microalga foi mantida por cultivos quinzenais em meio líquido, descrito por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992), em tubos de ensaio, incubados em câmara de germinação com controle de temperatura (21 ± 2°C), com iluminação constante e uma agitação manual diária.

4.2. Meio de cultura

Para o cultivo da linhagem *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538 foi utilizado o meio de cultura artificial desenvolvido por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992), cuja composição é apresentada no quadro 4. Para alguns experimentos, as concentrações de NaCl e $NaNO_3$ variaram em função do objetivo do estudo.

Quadro 4: Composição do meio utilizado para o cultivo de *Dunaliella bardawil* (SHAISH, BEN-AMOTZ & AVRON, 1992)

Composição Química	Concentração
NaCl	1-3 M
$NaHCO_3$	50 mM
KCl	5 mM
$MgCl_2$	5 mM
Na_2SO_4	5 mM

$NaNO_3$	5 mM
$CaCl_2$	0,2 mM
KH_2PO_4	0,2 mM
$FeCl_3$	2 µM
EDTA	5 µM
$MnCl_2$	7 µM
$CuCl_2$	1 µM
$ZnCl_2$	1 µM
$CoCl_2$	1 µM
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1 µM

Os sais foram solubilizados em água destilada, sendo que as soluções preparadas foram misturadas no momento do cultivo da microalga para evitar a formação de precipitados, o que resultaria em alteração da composição química do meio de cultura, e por sua vez, em menor disponibilidade de nutrientes para o crescimento celular. A seguir, segue a descrição de cada solução preparada de um total de onze soluções:

- Soluções de 1 a 8 – NaCl, $MnCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ foram solubilizados em separado;
- Solução 9 – composta da mistura dos dois sais $NaHCO_3$ e KH_2PO_4;
- Solução 10 – composta da mistura dos sais KCl, Na_2SO_4 e $NaNO_3$;
- Solução 11 – $FeCl_3$ e EDTA foram solubilizados em conjunto.

As soluções de $MgCl_2$ e de $CaCl_2$, bem como a solução 10 foram preparadas e esterilizadas imediatamente antes do preparo do meio de cultura, posto que o armazenamento em baixas temperaturas resulta na precipitação dos sais nelas

contidos. As demais soluções foram preparadas previamente (solução estoque) e mantidas sob refrigeração, de cerca 5°C até o momento do uso.

A solução 11 foi esterilizada por filtração a vácuo em membrana de acetato de celulose (Sartorius) de 0,22 µm de porosidade, em condições assépticas. As demais soluções foram esterilizadas por autoclavação à temperatura de 121°C por 20 minutos.

Após a esterilização, as soluções foram transferidas para um recipiente estéril, de modo a compor um meio de cultura de composição idêntica a do quadro 4. Em seguida, o pH do meio foi ajustado para 8,5 utilizando solução 3,6% (v/v) de HCl.

4.3. Condições operacionais de cultivo

Os cultivos foram conduzidos em frascos cônicos de 500 mL, contendo 300 mL de meio, sob agitação de 180 rpm em mesa agitadora orbital (Marconi, MA 140 CFT) e iluminação constante, usando lâmpadas fluorescentes (figura 7), em quantidade variada de acordo com a intensidade de luz desejada no experimento. Os cultivos foram mantidos em sala aclimatada com temperatura ambiente controlada em 25±3°C.

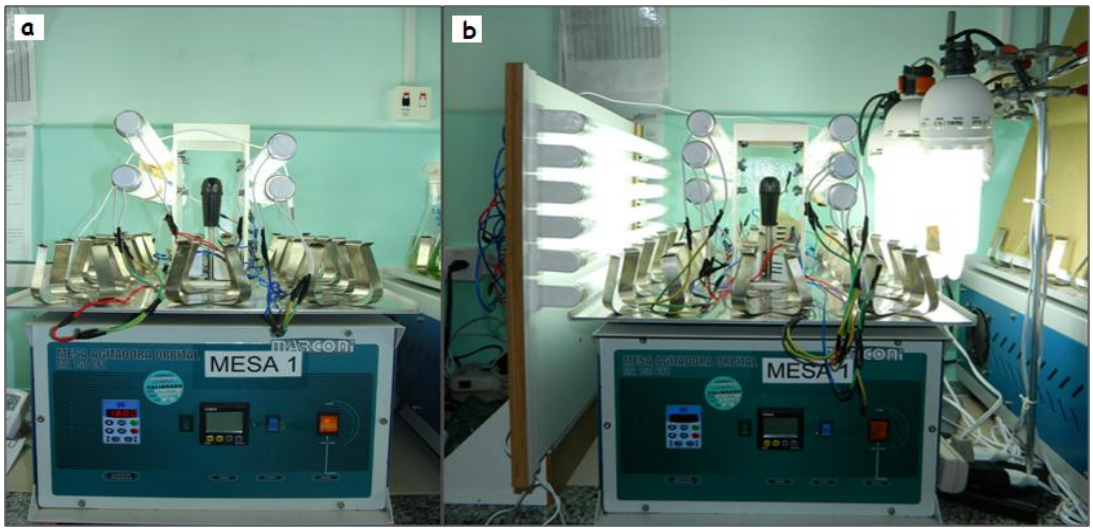

Figura 7: Mesa agitadora e disposição das lâmpadas fluorescentes em condições de menor (a) e maior (b) intensidade luminosa.

A intensidade de luz utilizada no cultivo foi estabelecida a partir da média dos valores obtidos no centro e em quatro pontos ao redor da posição do frasco, conforme ilustrado na figura 8. A intensidade de luz foi determinada com auxílio de um dosimetro (Biospherical Instrument, QSL 2100), sendo os valores expressos em $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

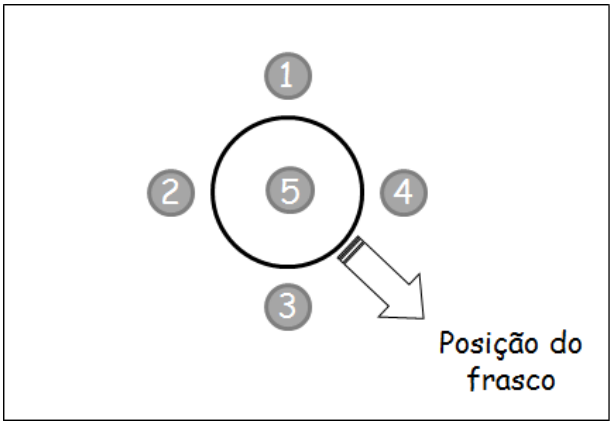

Figura 8: Ilustração dos cinco pontos onde foram feitas as medições da intensidade luminosa

4.4. Preparo do inóculo

Para obtenção do inóculo, a microalga foi primeiramente cultivada em meio de cultura (quadro 4) descrito por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992). Com base nos trabalhos de Kleinegris *et* al. (2011) e León *et* al. (2003), foi feita uma seleção prévia das condições de NaCl e intensidade luminosa a serem utilizadas para o crescimento da microalga. Sendo assim, a concentração de NaCl utilizada foi 1,5 M e a intensidade de luz utilizada no cultivo foi de 100 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

O inóculo consistiu de células de *D. bardawil* UTEX LB 2538 na fase exponencial de crescimento. O número de células alcançado nesta fase foi determinado por contagem em câmara Neubauer. A partir disso, foi calculado o volume de suspensão celular necessário para estabelecer uma concentração inicial de células, metabolicamente ativas, de $6x10^4$ células/mL para início dos experimentos. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada (centrífuga Novatecnica, NT 825) a 3500 rpm, sob refrigeração de 15°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressupenso em 300 mL de meio de cultura, sendo o cultivo realizado em frascos erlenmeyer de 500 mL.

A etapa de centrifugação se fez necessária para garantir a concentração inicial dos sais no meio de cultura, em especial de nitrato de sódio e cloreto de sódio, que em determinados experimentos foram variáveis controladas.

4.5. Detalhamento experimental

4.5.1. Conservação de amostras com biomassa microalgal para extração de carotenoides

Volumes variáveis (10 a 30 mL) de amostras de suspensão celular foram filtrados a vácuo em membrana de fibra de vidro (Sartorius, GF/P) de poro 0,7 µm. Após a filtração, as membranas foram dobradas, acondicionadas em tubos criogênicos e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da extração para evitar a modificação da composição dos pigmentos encontrados nas células.

4.5.2. Definição da metodologia de extração de carotenoides e cinética de extração

Nesta etapa foram avaliados diversos tempos de extração (1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h e 24 h) para duas condições operacionais, uma reportada por Strickland & Parsons (1972) e outra por Wright & Mantoura (1997), visando a máxima extração de carotenoides. As variações nas condições operacionais de extração foram: submissão da mistura reacional (membrana cortada e acetona 90%) ao ultrassom após o tempo de extração; ou trituração (com o bastão de vidro) dos pedaços de membrana cortados em solução de acetona 90% antes de submeter a mistura reacional ao tempo de extração (figura 9). As extrações para cada condição operacional e cada tempo avaliado, foram feitas em triplicata e o volume de suspensão celular filtrado foi de 10 mL.

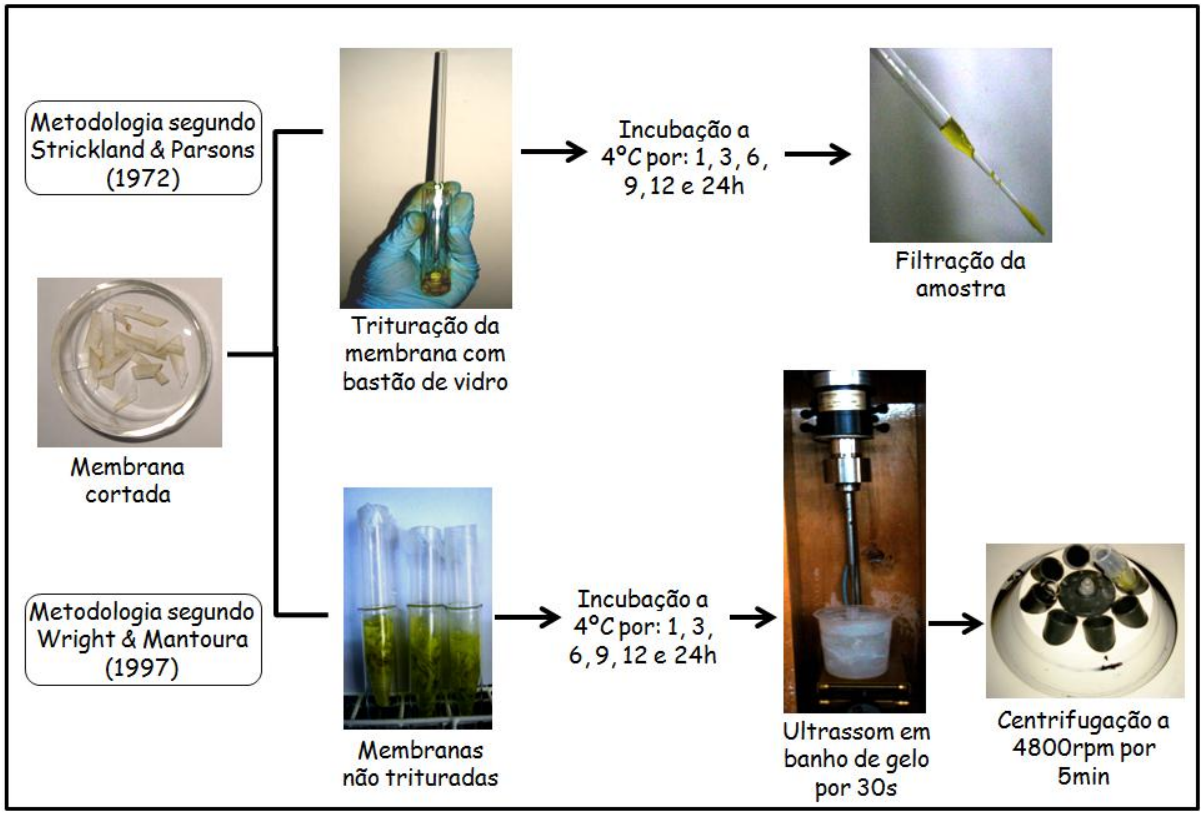

Figura 9: Variações operacionais testadas na extração de carotenoides totais

As membranas conservadas em nitrogênio líquido foram cortadas, ainda congeladas, e aquelas que foram destinadas ao tratamento por trituração foram colocadas em tubos de ensaio de vidro, onde foram adicionados 3 mL de solução de acetona 90% e, em seguida, as membranas foram trituradas com o auxílio de um bastão de vidro. Os tubos foram fechados com Parafilm® e levados ao congelador com temperatura aproximada de 4°C, onde permaneceram até o tempo de extração ter sido completado. Para retirar possíveis resquícios de membrana, o extrato foi filtrado, succionando-o com uma pipeta pasteur, a qual continha um algodão na ponta (figura 10 a).

Já para o outro tratamento, a membrana cortada foi colocada dentro de um tubo de polipropileno que apresentava um orifício em sua extremidade cônica. Em seguida, um pedaço de Parafilm® foi aderido a esta extremidade e 3 mL de solução de acetona foram acrescentados ao tubo. A parte superior do tubo foi vedada com Parafilm® e o tubo de polipropileno foi colocado dentro de um tubo de centrífuga (figura 10 b) e foi levado ao congelador, onde permaneceu até o término do tempo

de extração. Decorrido o tempo de extração, o extrato foi submetido ao tratamento com sonda ultrassônica com potência de 50 W (Bandelin, Sonopuls HD2200) em banho de gelo por 30 segundos. O extrato foi separado da membrana após a centrifugação (centrífuga Hettich, EBA 8S) a 4800 rpm por 5 minutos. No momento da centrifugação, o Parafilm® presente no fundo cônico do tubo foi rompido, possibilitando a passagem do extrato para o tubo de centrífuga de vidro (figura 10 c). É importante destacar que todas as etapas da extração foram realizadas no escuro a fim de evitar a degradação dos carotenoides. A quantificação de carotenoides totais das condições de extração estudadas foi realizada de acordo com o item 4.6.3.

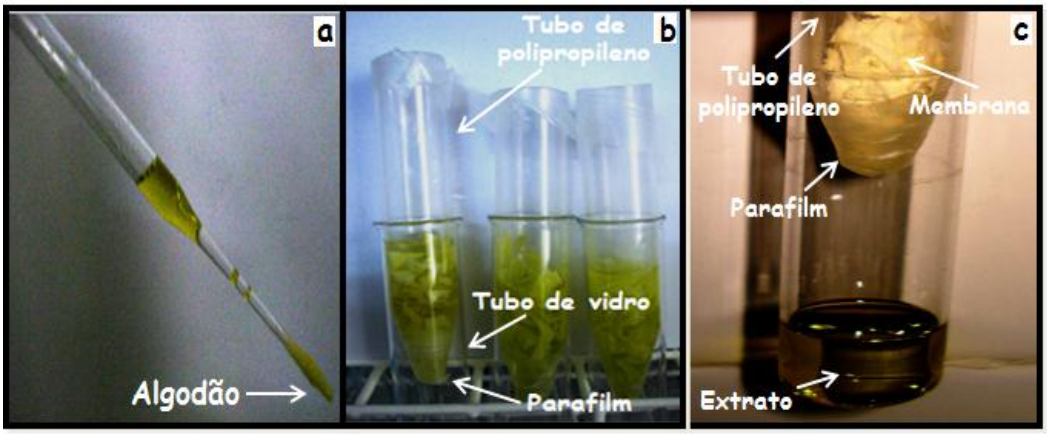

Figura 10: Detalhes experimentais da extração de carotenoides totais (a - filtração do extrato de carotenoides obtido por trituração da membrana; b – esquema de extração em tubos de polipropileno; c – ilustração da separação da membrana do extrato de carotenoides após centrifugação)

4.5.3. Padronização da metodologia de quantificação dos isômeros 9-cis-β-caroteno e todo-trans-β-caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência

Para quantificar os isômeros do β-caroteno produzidos nas diversas condições estudadas, foram testadas duas metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que se encontram no quadro 5.

Quadro 5: Metodologias para quantificação dos isômeros de β-caroteno produzidos por *Dunaliella bardawil*

Referência Bibliográfica	Coluna	Eluente
Hu *et al.*(2008) – Modificado[1]	PRONTOSIL 300-3 (C30, 3 µm e 250x4,6 mm)	Metanol/acetonitrila/água (84/14/2, v/v/v)/ diclorometano (75/25, v/v)
Hu *et al.* (2008) – Modificado[2]	PRONTOSIL 300-3 (C30, 3 µm e 250x4,6 mm)	Metanol/acetonitrila (85/15, v/v)/metil-terc-butil-éter (80/20, v/v)

Vazão do eluente: 1mL/min. Detecção: 450 nm.
[1]Coluna C30 de marca e tamanho de partícula diferentes do utilizado na metodologia de Hu *et al.*(2008)
[2]Modificação do eluente da metodologia de Hu *et al.*(2008)

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo (ACCELA, Thermo Scientific) com detector de arranjo de fotodiodo. Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram filtrados em membrana de PVDF com poro de 0,22 µm (Sartorius) e, posteriormente, foram submetidos a banho ultrassônico por 30 minutos para desgaseificação.

Uma curva de calibração de β-caroteno foi preparada com concentrações de 1,19 a 19,8 mg/L. A solução mãe foi preparada com o β-caroteno sintético (todo-trans), comercializado pela Sigma Aldrich, solubilizando-o em acetona 100%. A partir da solução mãe, diluições seriadas foram realizadas a fim de obter as diferentes concentrações desejadas para construir a curva a curva de calibração. A concentração da solução mãe foi determinada por espectrofotometria com leitura em comprimento de onda de 454 nm (WRIGHT & MANTOURA, 1997).

A partir da área gerada pelo pico do analito, a concentração do isômero todo-trans-β-caroteno presente nas amostras pôde ser calculada através da equação

obtida pela curva de calibração (figura 11). O isômero 9-cis-β-caroteno, também foi quantificado com base na curva de calibração correspondente à forma todo-trans (equação 1), porque seus coeficientes de extinção são similares (HU *et al.*, 2008). A concentração de β-caroteno produzido foi calculada somando-se as concentrações dos isômeros 9-cis e todo-trans.

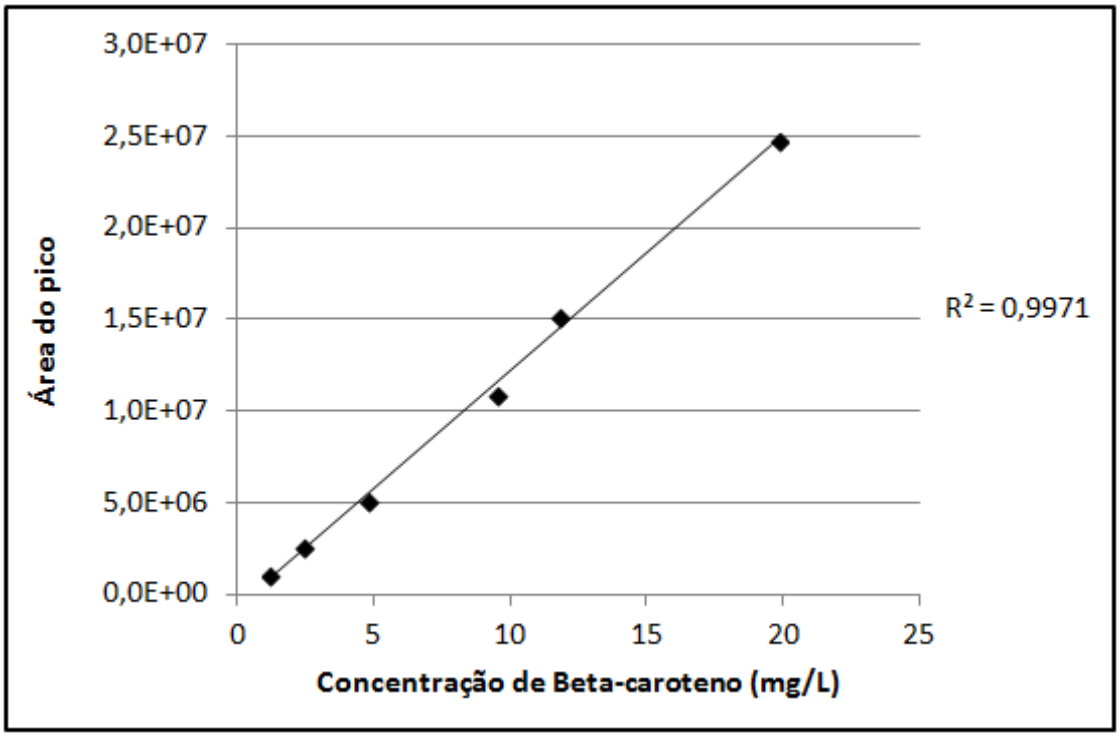

Figura 11: Curva de calibração do β-caroteno

Equação 1: $\beta - \text{caroteno (mg/L)} = (728865 + \text{Área do pico})/10^6$

4.5.4. Efeito da intensidade de luz e da salinidade no crescimento da microalga

Esta etapa teve como propósito definir as condições ideais de intensidade luminosa e salinidade para o crescimento da linhagem *D. bardawil* UTEX 2538, uma vez que em trabalhos da literatura são encontrados relatos sobre a importância dessas variáveis no crescimento da microalga.

Para avaliar a influência da intensidade luminosa e da concentração de NaCl na concentração celular obtida no início da fase estacionária, foi adotado um planejamento experimental fatorial completo de dois níveis e duas variáveis (2^2). As variáveis independentes estudadas foram a intensidade luminosa e a concentração de NaCl, sendo que a escolha dos níveis dessas variáveis foi feita com base em estudos da literatura realizados com microalgas carotenogênicas do gênero *Dunaliella* (GÓMEZ & GONZÁLEZ, 2005; GONZÁLEZ *et al*., 2005). Os menores e maiores níveis escolhidos para as variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz foram, respectivamente: 1 M e 50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$; e 2 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. Já a variável dependente estudada foi a concentração celular no início da fase estacionária. Além disso, estudou-se também a concentração de β-caroteno como variável dependente, a fim de observar a tendência de produção desse pigmento no início da fase estacionária. Como os experimentos do planejamento experimental não foram realizados em triplicata, foram feitos ensaios de pontos centrais, em triplicata, na concentração de NaCl e intensidade de luz de 1,5 M e 100 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, respectivamente, para calcular o erro experimental. O inóculo dos experimentos foi preparado de acordo com o item 4.4., em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL de meio de cultura. O quadro 6 apresenta a matriz do planejamento experimental com os valores decodificados do limite superior, inferior e dos pontos centrais.

Quadro 6: Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 completo para a maximização do crescimento celular

Experimento	NaCl (M)	Intensidade de luz ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)
1	1	50
2	2	50
3	1	150
4	2	150
Ponto central	1,5	100

Ponto central	1,5	100
Ponto central	1,5	100

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com o auxílio do *software Design expert* 6.0.8.

4.5.5. Efeito da concentração inicial de nitrato no crescimento celular e no acúmulo de β-caroteno

Uma vez que na melhor condição de crescimento selecionada na etapa anterior foi observada a presença de uma quantidade considerável de nitrato no final do cultivo, foram realizados novos experimentos para duas diferentes concentrações teóricas de nitrato, tendo como controle o cultivo com 310 mg/L de nitrato (concentração do meio descrito por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992)). Os valores de nitrato estabelecidos nos experimentos foram a metade da concentração original do meio descrito por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992) (155 mg/L) e a concentração de 54 mg/L encontrada no meio F/2 (GUILLARD, 1975) também utilizado em cultivos de *Dunaliella*.

4.5.6. Efeito da intensidade luminosa e salinidade na produção de β-caroteno em ausência de nitrogênio

A síntese de β-caroteno pela linhagem *D. bardawil* UTEX LB 2538 também foi avaliada após o crescimento celular, em uma segunda etapa de cultivo, com células do início da fase estacionária de crescimento. Para isso, foram realizados ensaios utilizando meio cultura (quadro 4) isento da fonte de nitrogênio (nitrato de sódio), seguindo um planejamento fatorial completo de dois níveis e duas variáveis (2^2), mais os pontos centrais em triplicata. As variáveis estudadas para induzir a produção de β-caroteno após o crescimento foram: concentração de NaCl e intensidade de luz, cujos níveis mínimos e máximos foram fundamentados nos resultados obtidos na etapa anterior e em dados da literatura. O quadro 7 apresenta o arranjo experimental utilizado.

Quadro 7: Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^2 para avaliação da produção de β-caroteno por células em ausência de nitrogênio

Experimento	NaCl (M)	Intensidade de luz ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)
1	1	400
2	3	400
3	1	1000
4	3	1000
5	2	700
6	2	700
7	2	700

Para a realização deste experimento, a microalga foi primeiramente cultivada no meio de cultivo descrito por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992), acrescido de 1 M de cloreto de sódio, sob iluminação constante, na intensidade de luz de 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, condições estabelecidas como ideais para atingir alta concentração celular, com base no estudo apresentado no item 4.5.4. No início da fase estacionária de crescimento, os 300 mL de cultura foram centrifugados (item 4.4.) e ressuspensos em 300 mL de meio (quadro 4), isento de nitrato, contendo 1 M, 2 M ou 3 M de NaCl.

A variável de resposta estudada nesta etapa foi a concentração de β-caroteno, a qual foi determinada a cada 24 horas, aproximadamente, por um período total de 93 horas. Com este fim, foram retiradas alíquotas de 10 mL dos frascos, que foram em seguida filtradas a vácuo e conservadas em nitrogênio líquido (item 4.5.1).

Para realizar o tratamento estatístico, foram analisados os dados obtidos para concentração de β-caroteno, determinada no tempo de máxima produção, 69 h., utilizando o *software Design expert* 6.0.8.

4.6. Determinações analíticas

4.6.1. Contagem de células

A determinação da concentração celular foi realizada por contagem de células em câmara Neubauer em microscópio óptico (Olympus) com aumento de 400x. Para tanto, alíquotas de 0,5 mL foram acrescidas de 0,02 mL de solução de lugol para imobilizar as células. A concentração celular foi calculada a partir da equação 2.

Equação 2: $$Número\ de\ células/mL = \frac{n^{\circ}\ de\ células\ contadas}{n^{\circ}\ de\ quadrantes\ contados} . 10^4$$

4.6.2. Quantificação de nitrato

Para quantificar a concentração de nitrato foram retiradas alíquotas de 2 mL dos cultivos que, após a remoção das células e de outros sólidos em suspensão por centrifugação (centrífuga Logen Scientific, LS) a 6.000 rpm por 5 minutos, foram analisadas espectrofotometricamente nos comprimentos de onda de 221,4 e 232,0 nm (YAMABERI, TAKAGI & YOSHIDA, 1998).

A concentração de nitrato foi encontrada a partir da equação da reta obtida (equação 3) por meio de uma curva de calibração (figura 12), previamente preparada a partir das leituras das absorvâncias em dois comprimentos de onda (221,4 e 232,0 nm) das soluções nitrato de sódio ($NaNO_3$) com concentrações que variaram de 1 a 40 mg/L de nitrato (faixa de linearidade).

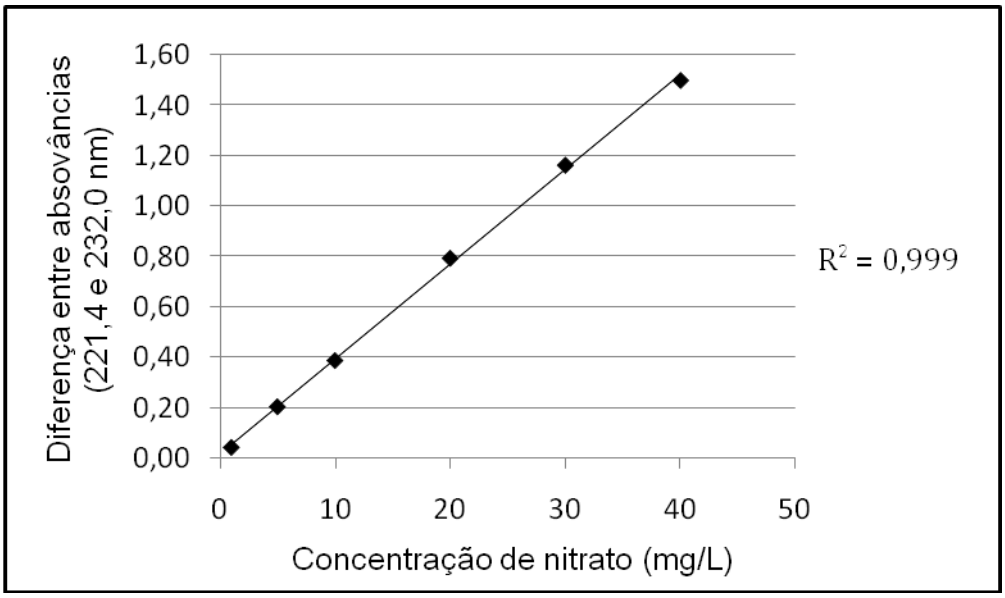

Figura 12: Curva de calibração de nitrato

Equação 3: $Nitrato\ (mg/L) = \frac{-0{,}0198+(Abs_{221{,}4\ nm}-Abs_{232{,}0})}{0{,}0375}$

4.6.3. Quantificação de carotenoides totais

A concentração de carotenoides totais foi determinada a partir da equação encontrada no trabalho de Strickland & Parsons (1972):

Equação 4:

$$Car.totais\ (mg/L) = [(7{,}6.Abs_{480} - 3{,}0.Abs_{750}) - (1{,}49.Abs_{510} - 2{,}0.Abs_{750})].\frac{v}{(V.c)}$$

Em que:

- ✓ v = volume de solução de acetona utilizado na extração (L);
- ✓ V = volume de suspensão celular filtrada (L);
- ✓ c = caminho óptico da cubeta que é 1 cm;
- ✓ Abs = absorvância num dado comprimento de onda.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização da metodologia de extração de carotenoides

A solução de acetona 90% foi o solvente utilizado para extração de carotenoides totais, porque segundo Strickland & Parsons (1972) o mesmo tem sido utilizado para amostras de água do mar, apresentando a acurácia adequada na maioria das investigações de estudos de ecologia marinha. Além disso, trata-se de uma metodologia simples, com o uso de um solvente de baixa toxicidade quando comparado a outros e que no presente trabalho também foi destinado à extração de amostras as quais continham sal.

Strickland & Parsons (1972) relatam a extração completa dos pigmentos em um período de 15 a 20 horas e que não observaram melhora na extração quando submeteram os filtros a ultrassom. Entretanto, em nosso trabalho, fez-se necessária a averiguação do tempo requerido para a máxima extração de carotenoides e a comparação entre triturar ou submeter a membrana ao tratamento por ultrassom, para verificar se com a espécie *Dunaliella bardawil* haveria uma melhor extração em uma das condições citadas.

Na figura 13, são encontrados os resultados das cinéticas de extração de carotenoides totais, onde pode-se notar que tanto para as membranas submetidas ao tratamento com ultrassom quanto para aquelas que foram somente trituradas, há uma pequena variação na concentração dos carotenoides obtidos nos diferentes tempos de extração.

A máxima concentração de carotenoides obtida no tratamento por trituração da membrana foi 8,12 mg/L em 12 horas de extração, enquanto a mínima alcançada foi 6,76 mg/L em 24 horas de extração. Já para o tratamento em ultrassom, o máximo e o mínimo extraído foram, respectivamente, 7,97 mg/L em 12 horas e 7,15 mg/L em 3 horas. Além disso, é possível perceber que não há uma tendência de aumento da concentração de carotenoides totais com o decorrer do tempo de extração para ambos os tratamentos (figura 13). A extração de carotenoides nos tempos estudados parece ser constante.

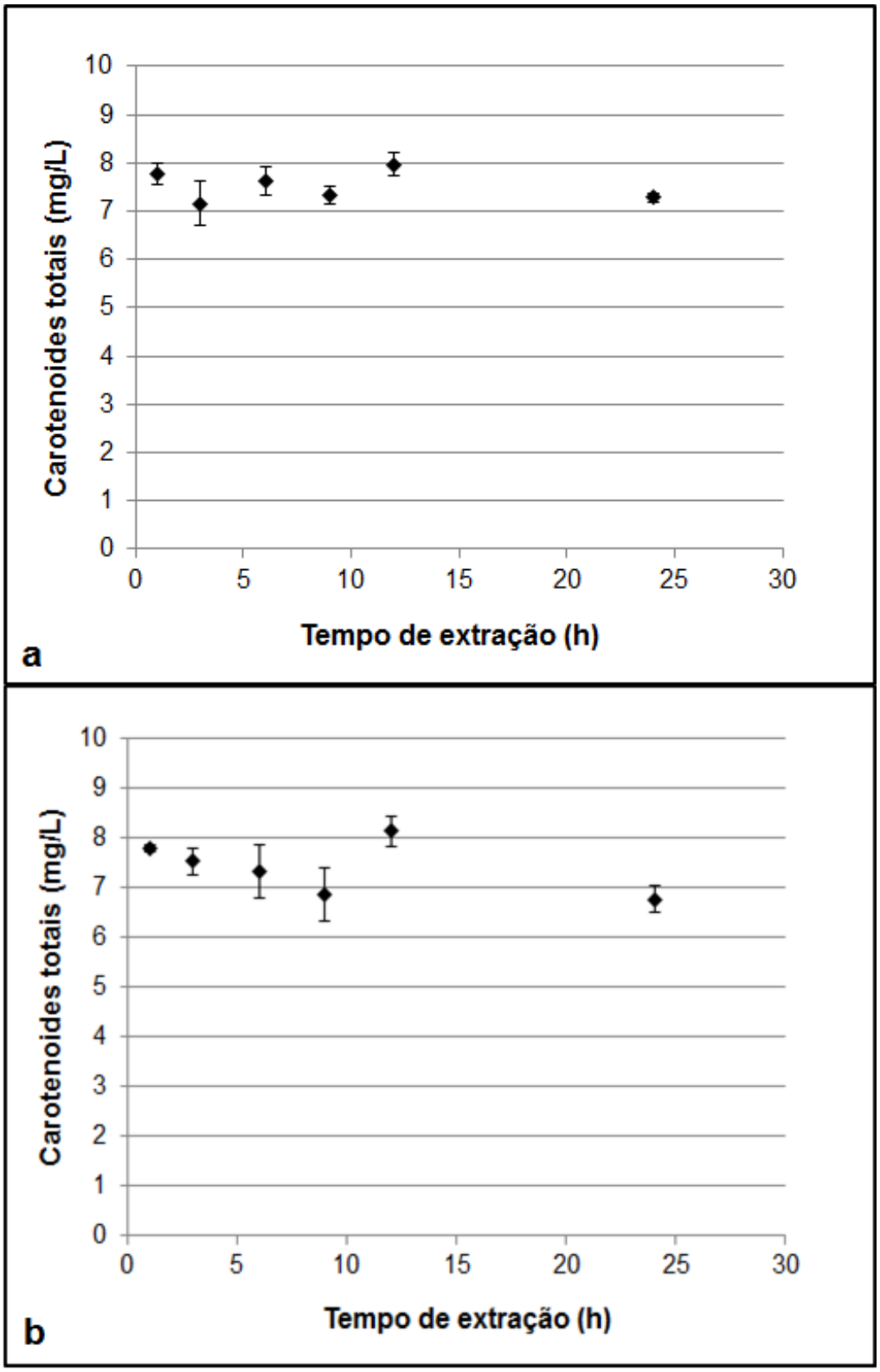

Figura 13: Cinéticas de extração de carotenoides totais (a) tratamento com ultrassom (b) tratamento com trituração da membrana.

Para comparar os dois tratamentos utilizados (ultrassom e trituração) e os diferentes tempos de extração, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores e repetições, com nível de confiança de 95% (tabela 1). A partir da análise dos dados abaixo, observa-se que, estatisticamente, não houve diferença entre as metodologias (trituração e ultrassonicação), uma vez que o p-valor foi maior que 5% e houve diferença entre os tempos de extração ($p<0,05$). É provável que essas diferenças entre os tempos estejam associadas aos erros experimentais.

Tabela 1: Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores e repetições

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	p-valor
Entre os tempos	4,698201	5	0,93964	$6,502x10^{-5}$
Entre as metodologias	0,147105	1	0,147105	0,2475048
Interações	0,972617	5	0,194523	0,1395436
Erro	2,512958	24	0,104707	
Total	8,33088	35		

Diante dos resultados apresentados e das pequenas variações de carotenoides totais extraídos, definiu-se 1 hora o tempo suficiente para extrair o máximo de carotenoides. Já a metodologia de extração escolhida foi a trituração da membrana em lugar do uso do ultrassom, a fim reduzir os gastos de energia, já que a sonda ultrassônica não seria utilizada.

5.2. Desenvolvimento de metodologia para quantificação dos isômeros de β-caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência

O uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido o método mais escolhido, para separar e quantificar carotenoides (SQUINA & MERCADANTE, 2003), sendo a coluna de fase reversa bastante utilizada na separação de carotenoides devido a sua alta eficiência de separação. Portanto, a escolha do uso

de coluna C30 foi devido a sua capacidade de promover uma melhor resolução na separação dos carotenoides e de seus isômeros, quando comparado à coluna C18 (INBARAJ *et al*., 2006), também utilizada na análise de carotenoides.

Primeiramente foi testada a metodologia descrita por Hu *et al.* (2008) com uma coluna C30, porém com tamanho de partícula de 3 µm (menor que o da metodologia original) com o objetivo de promover uma melhor interação entre o analito e a fase estacionária e, consequentemente, aumentar o poder de separação dos pigmentos (SNYDER & KIRKLAND, 1979).

Ao utilizar a mesma fase móvel do trabalho de Hu *et al.* (2008) para analisar uma amostra de carotenoides de *D. bardawil*, foi possível observar no cromatograma obtido (figura 14) que o método possibilitou uma boa separação e resolução dos isômeros.

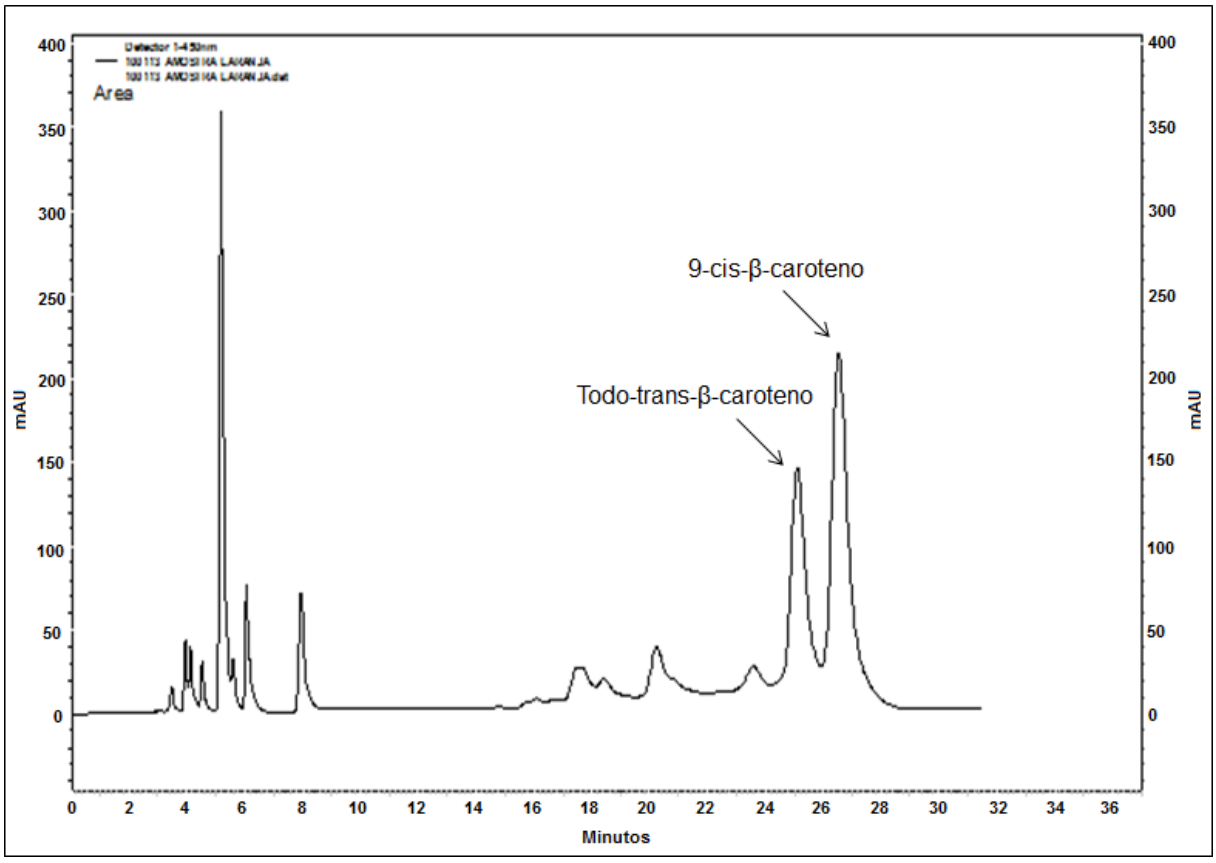

Figura 14: Espectro cromatográfico dos isômeros de β-caroteno obtidos por CLAE usando coluna C30 e metanol/acetonitrila/água (84:14:2) em diclorometano (75:25) como fase móvel.

Com o objetivo de melhorar a resolução dos picos dos isômeros todo-trans e 9-cis-β-caroteno, foram realizadas modificações na fase móvel. Segundo orientação da professora Dra. Silvana Vianna, realizou-se as seguintes modificações:

- ✓ Retirou-se a água da solução que era formada por metanol/acetonitrila/água;
- ✓ O diclorometano foi substituído pelo metil-terc-butil-éter;
- ✓ As proporções dos solventes utilizados na fase móvel foram alteradas, passando a ser metanol/acetonitrila (85:15, v/v)/metil-terc-butil-éter (80:20, v/v).

Com as modificações descritas anteriormente, foi preparada uma nova fase móvel e foi realizada a análise de uma amostra de extrato de carotenoides de *Dunaliella bardawil*. De acordo com a figura 15, pode-se notar que as modificações resultaram em uma melhor resolução nos picos dos isômeros de β-caroteno, o que permitiu uma quantificação mais exata dos mesmos.

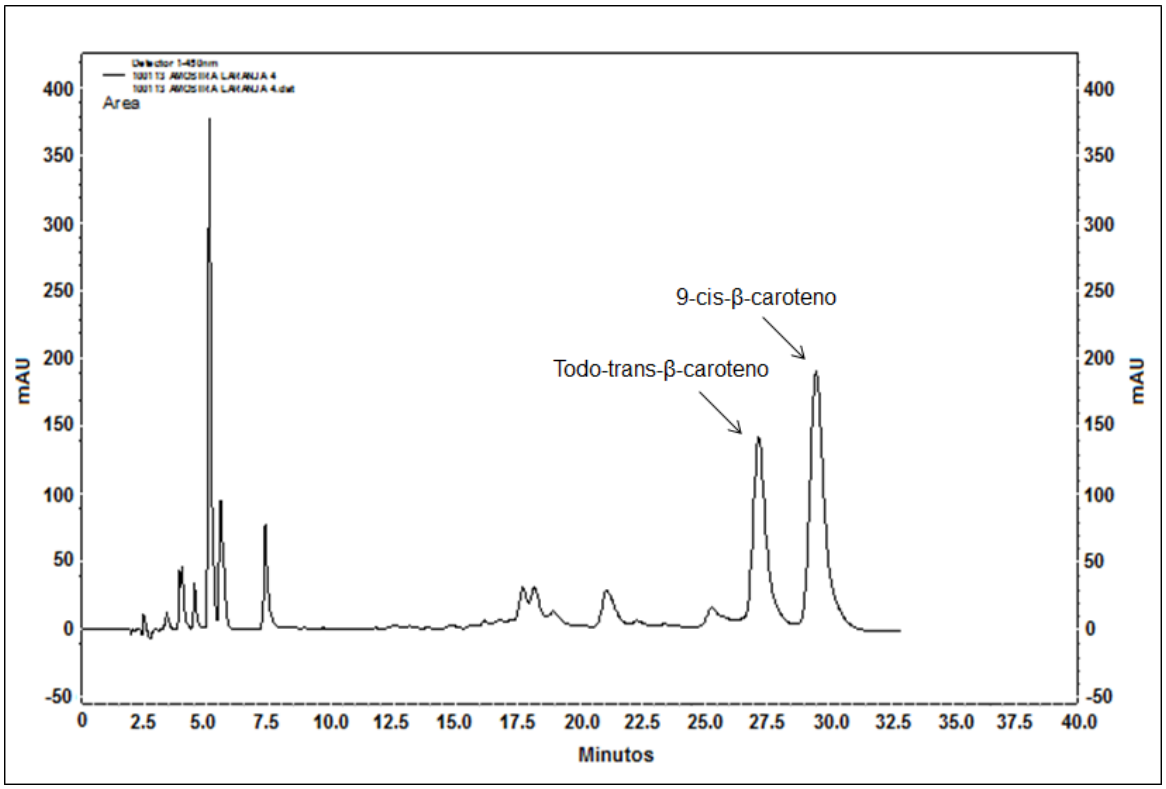

Figura 15: Espectro cromatográfico dos isômeros de β-caroteno obtidos por CLAE usando coluna C30 e fase móvel modificada [metanol/acetonitrila (85:15) / metil-terc-butil-éter (80:20)].

A seletividade da coluna utilizada em CLAE é dependente da fase móvel utilizada, como por exemplo, a seletividade dos isômeros do β-caroteno pode diferenciar com o uso de metanol ou acetonitrila na fase móvel. Além disso, a separação de carotenoides polares pode ser explicada pela influencia da presença de água na fase móvel, enquanto que os carotenoides não polares, como é o caso do β-caroteno, são insensíveis à presença de água. Sendo assim, separações completas podem ser obtidas com o uso de gradientes não-aquosos contendo metanol e metil-terc-butil-éter (SANDER, SHARPLESS & PURSH, 2000).

5.3. Avaliação do crescimento celular em diferentes salinidades e intensidade de luz

Inicialmente, foram estudadas as condições de cultivo para maximização da concentração celular na fase final do crescimento (fase estacionária), tendo em vista que os carotenoides se acumulam intracelularmente, em geral, em condições de estresse. Logo, quanto maior a concentração celular durante a etapa de estresse, maior a possibilidade de se obter elevadas concentrações de carotenoides.

O quadro 8 mostra os resultados de concentração celular na fase estacionária de crescimento em função das variações de salinidade e de intensidade luminosa. Analisando a tabela, pode-se constatar que, nas condições ensaiadas, não houve efeito marcante das variáveis na concentração celular, tendo sido atingidas concentrações celulares da ordem de 10^5 células/mL.

Ao observar o quadro 8, constata-se que a maior concentração celular final obtida foi no experimento 3, no qual foi utilizado o menor e maior nível, para a concentração de NaCl e intensidade de luz, respectivamente. Com isso, as melhores condições de cultivo escolhidas para o crescimento celular foram: NaCl 1M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

Quadro 8: Resultados de concentração celular e β-caroteno obtidos na fase estacionária das diferentes condições estudadas

Experimento	NaCl (M)	Intensidade de luz (μE)	Concentração celular (células/mL)	Concentração de β-caroteno (mg/L)
1	1	50	477500	1,13
2	2	50	261250	1,58
3	1	150	606250	4,14
4	2	150	393750	5,71
Ponto central	1,5	100	610000	3,13
Ponto central	1,5	100	541250	2,81
Ponto central	1,5	100	526250	2,65

O valor de densidade celular obtido no experimento 3, expressos em número de células/mL, está em concordância com o trabalho de Ben-Amotz (1995) com *D. bardawil*, em que se obteve $8x10^5$ células/mL em tanques abertos do tipo *raceway* com água do mar enriquecida. Porém, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura atingem a ordem de 10^6 células/mL, como no trabalho de Goméz & González (2005) que obtiveram o máximo de $1x10^6$ células/mL em 15 dias de cultivo em água do mar enriquecida. García-González, Moreno & Guerrero (2005) e Gómez *et al*. (2003) também obtiveram uma concentração celular na ordem de 10^6 células/mL em 10 dias e 28 dias de cultivo, respectivamente. Se por uma lado, nos trabalhos citados a concentração de células foi maior que a do presente estudo, por outro o tempo de cultivo foi mais longo que o obtido no presente trabalho. A condição escolhida como melhor para o crescimento celular (1 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) deste trabalho alcançou o número máximo de células em cerca de 6 dias de cultivo (figura 16).

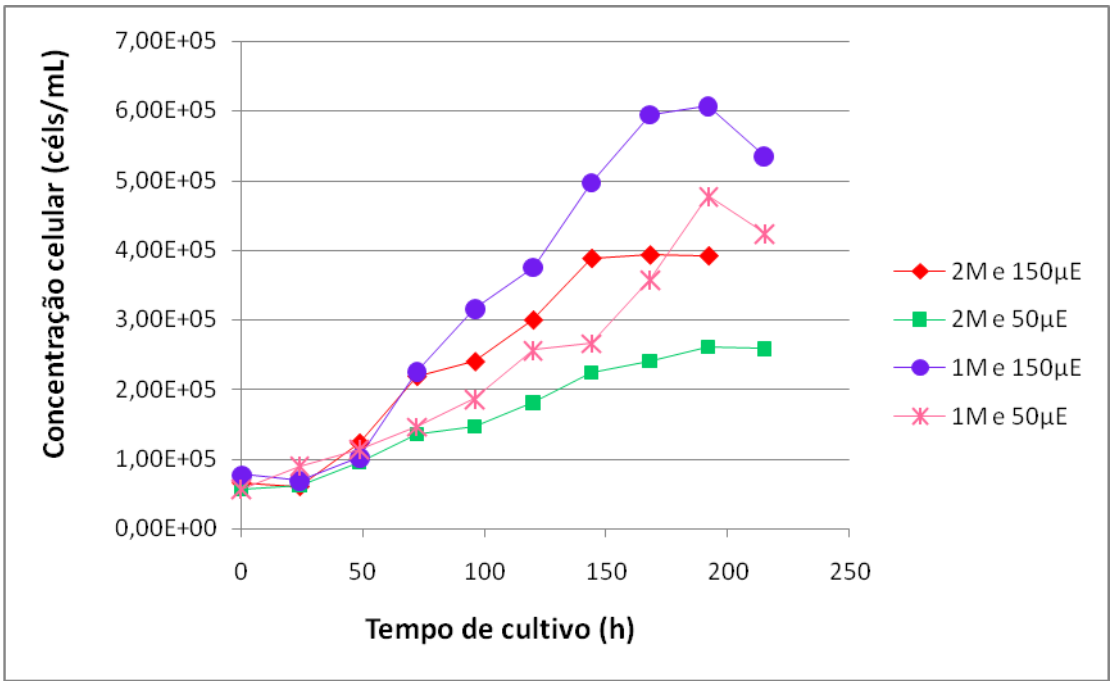

Figura 16: Curvas de crescimento de *D. bardawil* nas diferentes condições de intensidade de luz e salinidade estudadas

O efeito da salinidade e da intensidade luminosa sobre a concentração celular no final do cultivo pode ser mais bem analisada na figura 17. Neste tipo de gráfico, os dados são dispostos de forma a interligar os resultados obtidos nos níveis superiores e inferiores de cada variável. A tendência das duas retas formadas permite definir se há ou não interação entre as variáveis. No caso de as retas estarem dispostas em paralelo é indicativo de que não há interação entre as variáveis. Porém, se ocorrer intersecção entre as retas, ou pelo menos se houver tendência disto acontecer, é indicativo de existir interação entre as variáveis estudadas.

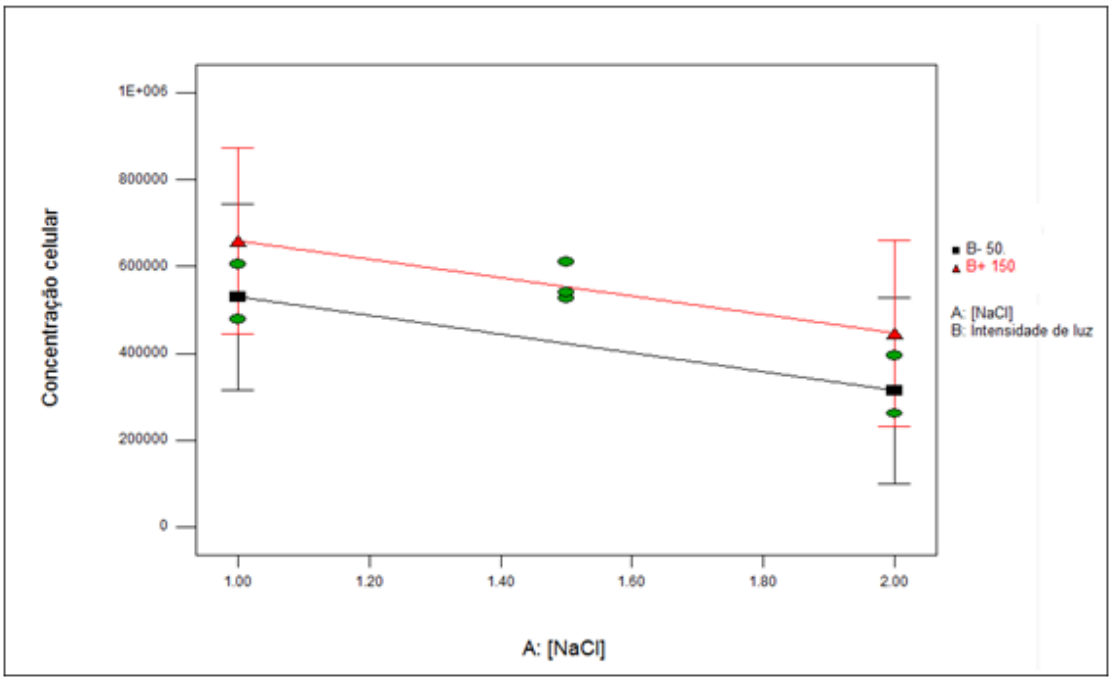

Figura 17: Gráfico de interação entre as variáveis (concetração de NaCl e intensidade luminosa) e sua influência na concentração celular na fase estacionária.

Conforme ilustrado na figura 17 as retas se apresentam paralelas e não tendem a se cruzar. Portanto, pode-se inferir que não existe interação entre a concentração de NaCl e a intensidade luminosa, de maneira a influenciar no crescimento da microalga.

Analisando a variável concentração de NaCl (figura 17) individualmente, é possível notar que o aumento da salinidade resulta em redução do crescimento celular. Por outro lado, o aumento da intensidade de luz favorece a produção da biomassa microalgal.

Para fins comparativos, também foram determinadas as concentrações de β-caroteno para cada uma das condições estudadas (quadro 8). A figura 18 reúne as concentrações de carotenoides totais e β-caroteno, distribuídos nos isômeros cis e trans, que foram determinadas na fase estacionária de crescimento para cada condição de salinidade e intensidade luminosa ensaiada. Distintamente do β-caroteno sintético, que é composto exclusivamente do isômero todo-trans, o β-caroteno de *Dunaliella* inclui também o isômero 9-cis (BEN-AMOTZ, KATZ &

AVRON, 1982). Segundo alguns autores, o isômero 9-*cis* produzido por *Dunaliella* tem maior ação antioxidante do que o isômero todo-*trans* (BEN-AMOTZ & LEVY, 1996; SHAISH *et al*., 2006).

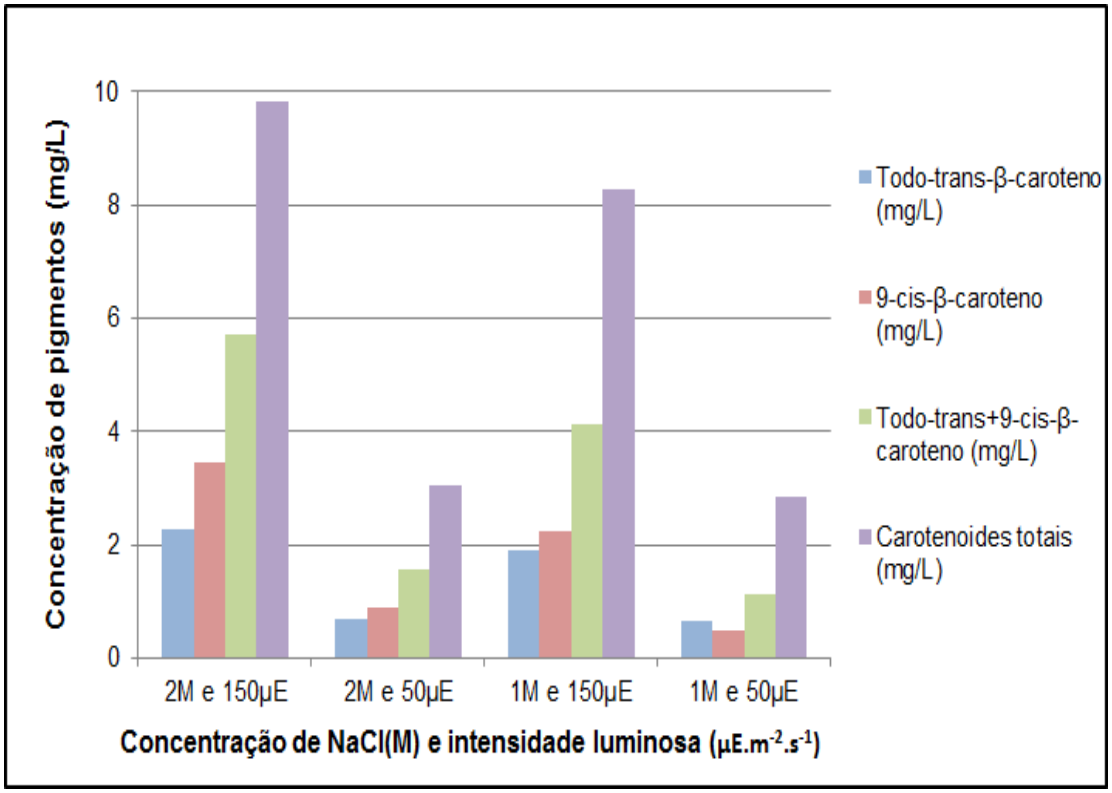

Figura 18: Efeito da salinidade e da intensidade de luz na biossíntese de catotenoides totais, de β-caroteno e seus isômeros 9-cis e todo-trans por *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538.

No presente estudo, os maiores valores de β-caroteno (5,7 mg/L) e de carotenoides totais (9,8 mg/L) foram alcançados quando a linhagem *D. bardawil* UTEX LB 2538 foi cultivada na salinidade de 2 M e sob iluminação de 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (figura 18). Nesta condição de cultivo, também foi obtido o valor máximo para a relação 9-cis/todo-trans de 1,7. Nas demais condições ensaiadas, a relação 9-cis/todo-trans variou de 0,8 a 1,3.

A análise da figura 18 permite ainda concluir que o acumulo de β-caroteno é dependente do aumento da intensidade de luz, na faixa de 50 a 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. Além disso, é possível perceber que para uma mesma intensidade de luz, o aumento da

concentração de NaCl 1M para 2M promove aumento nas concentrações de carotenoides totais e β-caroteno.

Já foi reportado que o acúmulo de β-caroteno em *Dunaliella* é desencadeado quando as células são submetidas a estresse ambiental, como por exemplo, alta intensidade de luz, alta salinidade, carência nutricional e temperaturas extremas (BEN-AMOTZ, KATZ & AVRON, 1982; BEN-AMOTZ & AVRON, 1983). Contudo, poucas informações existem sobre a influência desses parâmetros na proporção dos isômeros de β-caroteno. Estudos realizados por Ben-Amotz & Avron (1983) e Ben-Amotz, Lers & Avron (1988) demonstraram que a quantidade acumulada de β-caroteno, assim como a relação de isômeros 9-cis/todo-trans, dependem da intensidade de luz, a qual a microalga é exposta durante o ciclo de divisão celular. Portanto, não há mais dúvidas quanto a importância da fotoestimulação na biossíntese de β-caroteno de *D. salina* (BEN-AMOTZ, LERS & AVRON, 1988; ORSET & YOUNG, 2000; GÓMEZ & GONZÁLEZ, 2005).

A quantidade intracelular de pigmentos carotenoides também foi determinada (figura 19). O acúmulo de carotenoides totais nas células variou de 6,7 ng/célula (1 M e 50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) a 25 ng/célula (2 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$).

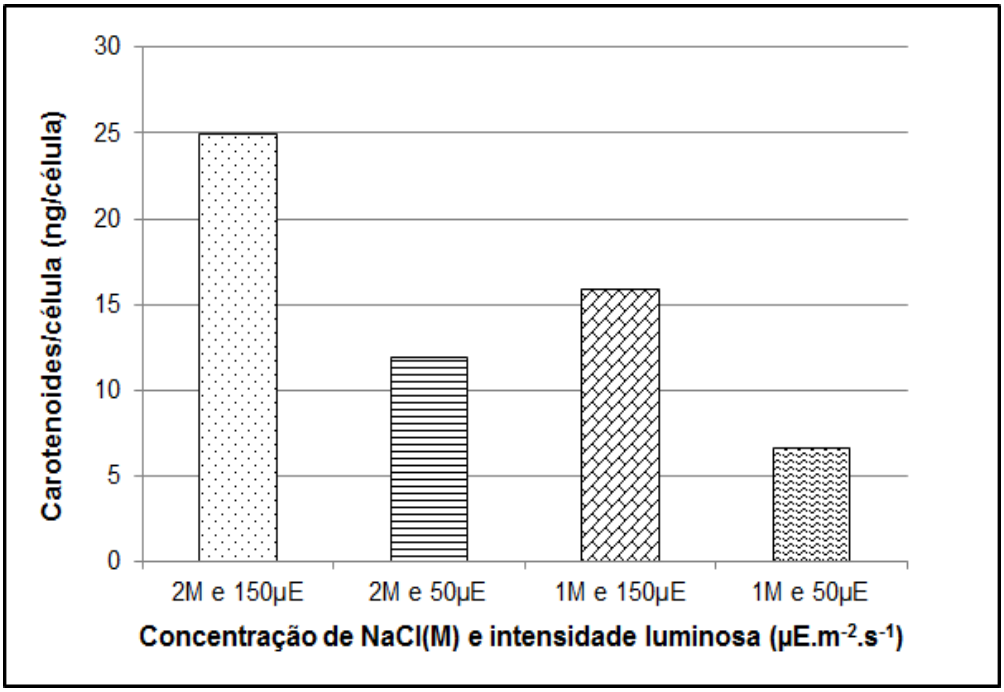

Figura 19: Variação da quantidade de pigmentos carotenoides acumulada intracelularmente em função da salinidade e da intensidade de luz.

Novamente ratifica-se a tendência de aumento no acúmulo de carotenoides quando a concentração de cloreto de sódio aumenta para uma mesma intensidade luminosa (figura 19), embora não tenha sido observada alteração significativa da concentração celular. E, da mesma forma, a produção de carotenoides totais por célula foi diretamente dependente da intensidade luminosa, para uma mesma salinidade.

A concentração de nitrato (NO_3^-) residual do meio de cultura também foi determinada com o objetivo de avaliar o consumo da fonte de nitrogênio pela microalga nas diferentes condições estudadas (quadro 9). Em todas as condições ensaiadas, o consumo de nitrato foi parcial, inferior a 50%. Logo, o baixo crescimento celular, correspondente ao aumento de apenas uma ordem de grandeza, não pode ser atribuído à limitação da fonte de nitrogênio, que se apresentava ainda em abundância no meio, decorridas 200 horas de cultivo.

Analisando o quadro 9, pode-se constatar que o maior e menor consumo de nitrato foi obtido nas condições de 1 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (experimento 3) e 2 M e 50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (experimento 2), respectivamente. Tal fato, pode ser explicado devido ao maior número de células presente no experimento 3 e o menor número de células no experimento 2.

Quadro 9: Consumo de nitrato por *D. bardawil* em função da salinidade e da intensidade luminosa

Experimento	Condição	Concentração final de nitrato (mg/L)	Consumo de nitrato (%)
1	1 M e 50 µE	200	33
2	2 M e 50 µE	216	28
3	1 M e 150 µE	157	48
4	2 M e 150 µE	166	45

Concentração inicial de nitrato: 302±25 mg/L.

A análise estatística do planejamento experimental para o crescimento da microalga foi realizada adotando-se um nível de confiança de 95%. Todos os valores de p obtidos para as variáveis utilizadas foram maiores que 5%, indicando que a concentração de NaCl, a intensidade de luz e a interação entre essas duas variáveis não são, estatisticamente, significativas para a obtenção de elevada concentração celular (tabela 2) na fase estacionária.

Tabela 2: Análise estatística da influência das variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz na concentração celular na fase estacionária de crescimento

Fatores	Média quadrática	Valores de F	p-valor
Concentração de NaCl (A)	$4,596 \times 10^{10}$	4,51	0,1237
Intensidade de luz (B)	$1,706 \times 10^{10}$	1,68	0,2862
AB	$3,516 \times 10^{6}$	0,9863	0,9863

Apesar de as variáveis utilizadas não terem se apresentado significativas estatisticamente, sabe-se que biologicamente há influência das mesmas no crescimento celular. Cifuentes *et al*. (2001), trabalhando com oito espécies diferentes de *Dunaliella*, verificaram que a concentração de NaCl influencia positivamente ou negativamente no número de divisões celulares por dia. Além disso, o cultivo em elevadas salinidades pode ser uma condição estressante para a célula, o que pode desencadear em mortandade celular. Ademais, segundo Adir *et al*. (2003), a luz é uma variável de extrema importância para a fotossíntese e, portanto, essencial para o crescimento fotoautotrófico das microalgas. Quando a quantidade de luz é insuficiente, o crescimento da microalga está sob uma condição de fotolimitação. Já quando há um aumento na intensidade de luz, ocorre uma melhora no crescimento da microalga até o ponto de saturação de luz. Após o limite

de saturação, o crescimento da microalga é inibido, causando a fotoinibição devido ao excesso de luz.

Também foi feita a análise estatística dos dados obtidos para β-caroteno (tabela 3). O nível de confiança adotado para a análise estatística desta etapa foi de 95%. De acordo com a tabela 3, as variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz, nas faixas estudadas, se mostraram estatisticamente significativas, uma vez que os valores de p foram inferiores a 5%. Já a interação entre essas dusas variáveis se mostrou não significativa no para a produção de β-caroteno.

Tabela 3: Análise estatística da influência das variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz na produção de β-caroteno

Fatores	Média quadrática	Valor de F	p-value
Concentração de NaCl (A)	1,02	12,21	0,0397
Intensidade de luz (B)	12,74	152,52	0,0011
AB	0,31	3,75	0,1481

Na figura 20, pode-se observar que não há interação entre a salinidade e a intensidade de luz, uma vez que as retas não se cruzam. Além disso, é possível perceber o efeito mais marcante da intensidade de luz em relação à salinidade no acumulo de β-caroteno. Nota-se também que a produção de β-caroteno praticamente não varia pelo aumento da concentração de NaCl, quando a intensidade de luz está em seu menor nível (50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). No entanto, quando as células são exposta a uma maior intensidade de luz (150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$), o aumento da concentração de NaCl 1 M para 2 M favorece um ligeiro aumento na produção de β-caroteno.

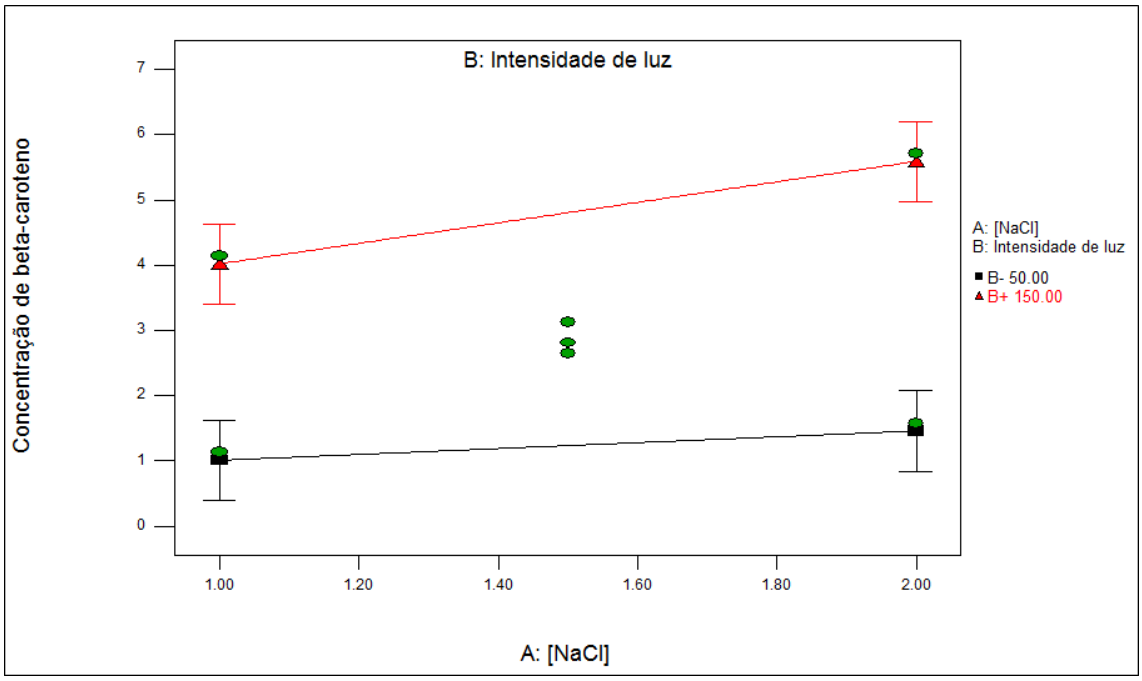

Figura 20: Gráfico de interação entre as variáveis intensidade de luz e concentração de NaCl e sua influência na produção de β-caroteno por *D. bardawil.*

Após a análise dos resultados de crescimento celular e síntese de β-caroteno frente as variadas relações de salinidade e intensidade luminosa, foi dada continuidade ao trabalho visando reduzir os custos do processo com a quantidade fonte de nitrogênio utilizada para o crescimento.

5.4. Crescimento e produção de β-caroteno por *D. bardawil* em diferentes concentrações de nitrato

Considerando que na etapa anterior havia uma elevada concentração de nitrato residual na cultura após o crescimento da microalga, em todas as condições ensaiadas, foi dada ênfase ao estudo da concentração inicial de nitrato a fim de estimular o crescimento celular e, ao mesmo tempo, reduzir os custos operacionais. As condições de intensidade de luz e concentração de NaCl utilizadas no cultivo da microalga foram 1 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, uma vez que foram essas condições que favoreceram a maior concentração celular na fase estacionária.

O quadro 10 apresenta as concentrações de nitrato teórica e prática utilizadas no cultivo de *D. bardawil*. No experimento 1, a concentração de nitrato correspondeu a original do meio de cultura desenvolvido por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992), enquanto no experimento 2 foi testada a metade da concentração uma vez que o consumo máximo no experimento 3 (NaCl 1 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) do item 5.3. foi próximo a 50%. Já no experimento 3, a concentração de nitrato escolhida foi correspondente à descrita no meio F/2 (GUILLARD, 1975), que em alguns trabalhos é utilizado para o cultivo de *Dunaliella* (PRIETO, CANAVATE & GARCÍA-GONZÁLEZ, 2011; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2005).

Quadro 10: Concentração teórica e prática de nitrato utilizada no cultivo de *D. bardawil.*

Experimento	**Concentração teórica de NO_3 (mg/L)**	**Concentração prática de NO_3 (mg/L)**
1 (Controle)	310	310
2	155	156
3	54	53

A figura 21 apresenta as curvas de crescimento da microalga e do consumo de nitrato. As maiores concentrações celulares alcançadas foram similares no experimento 1 ($5,8x10^5$ células/mL) e no experimento 2 ($5,4x10^5$ células/mL). A menor concentração celular obtida foi no experimento 3 ($2,9x10^5$ células/mL), onde havia menor concentração de nitrato. A menor concentração celular alcançada no experimento 3 pode ser explicada pela baixa concentração de nitrato disponibilizada que não foi suficiente para a multiplicação celular. Adicionalmente, os valores máximos de concentração celular foram alcançados ao redor de 100 h de cultivo.

O consumo de nitrato nos experimentos contendo 310 e 156 mg/L foi semelhante (figura 21 a e b). Para ambas as condições nutricionais, a quantidade de nitrato assimilada é semelhante, em torno de 100 mg/L, correspondendo a 37% e 76%, respectivamente.

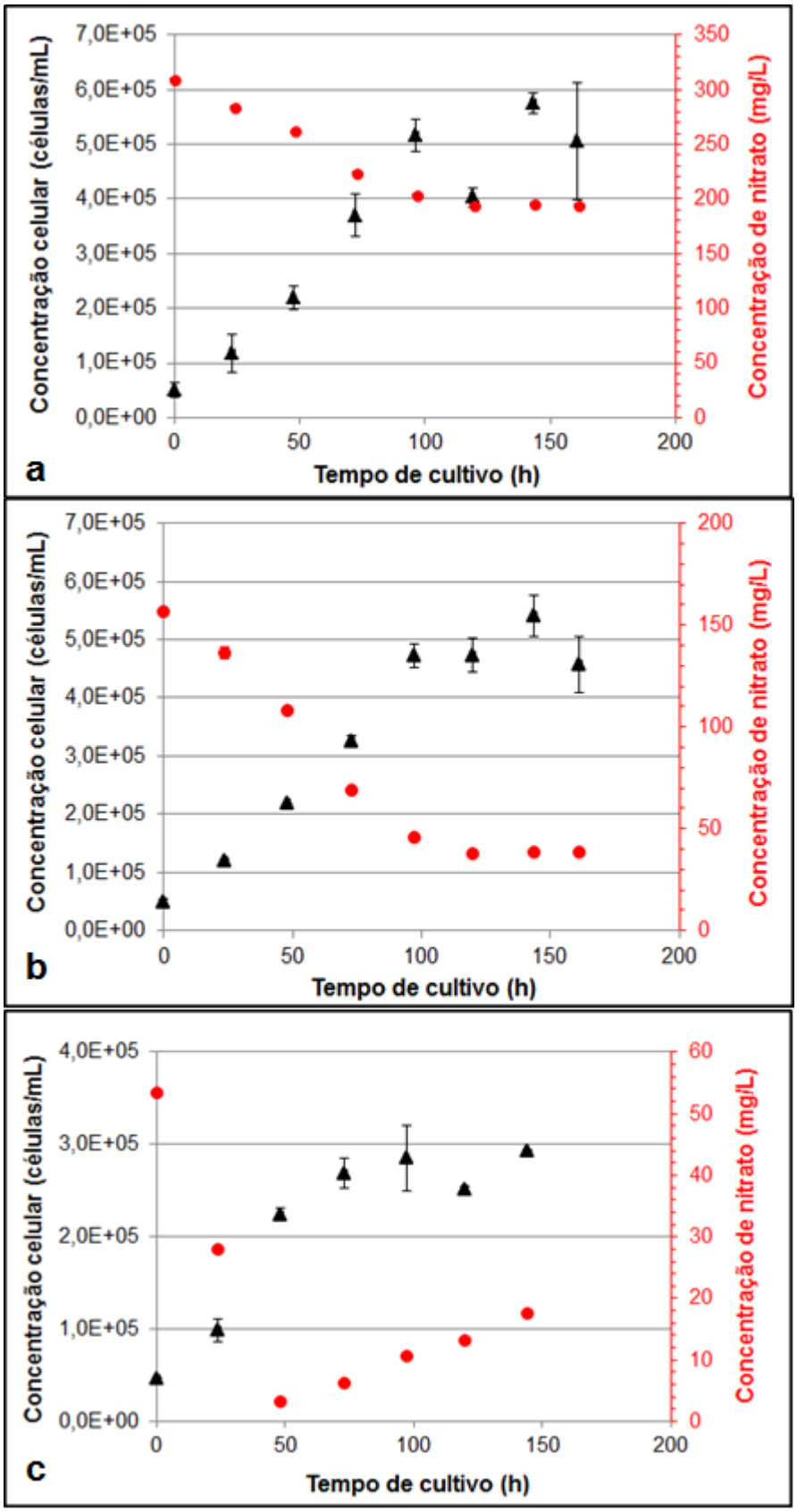

Figura 21: Curvas de crescimento de *D. bardawil* em meio de cultura contendo 310 (a); 156 (b); e 53 mg/L (c) de nitrato.

Comportamento distinto foi identificado para o cultivo da microalga na menor concentração inicial de nitrato (figura 21 c). Nesta condição, 94% do nitrato (cerca de 50 mg/L) disponível foi consumido em 97 h de cultivo, cessando o seu consumo quando as células se encontravam na fase de desacelaração do crescimento.

Ao atingir a fase estacionária, os cultivos com 310 e 156 mg/L continuavam a apresentar coloração verde, como no início do cultivo. Já para o cultivo da microalga realizado em condição de baixa disponibilidade de nitrogênio (53 mg/L) , foi notória a mudança da coloração de verde para laranja, logo no início da fase estacionária de crescimento. Tal fato pode ser explicado pela escassez de nitrato no final do cultivo que propiciou um estresse nutricional, o que favoreceu a carotenogênese. Isto porque, exceto pela concentração inicial de nitrato, todos os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições experimentais.

A síntese de β-caroteno e carotenoides totais foi maior no experimento que utilizou uma menor concentração de nitrato inicial (53 mg/L), alcançando concentrações de 9 mg/L e 13 mg/L, respectivamente. Já nos cultivos com concentrações iniciais de nitrato de 310 mg/L e 156 mg/L, foram obtidas concentrações de β-caroteno e carotenoides totais menores, mas similares entre si (figura 22).

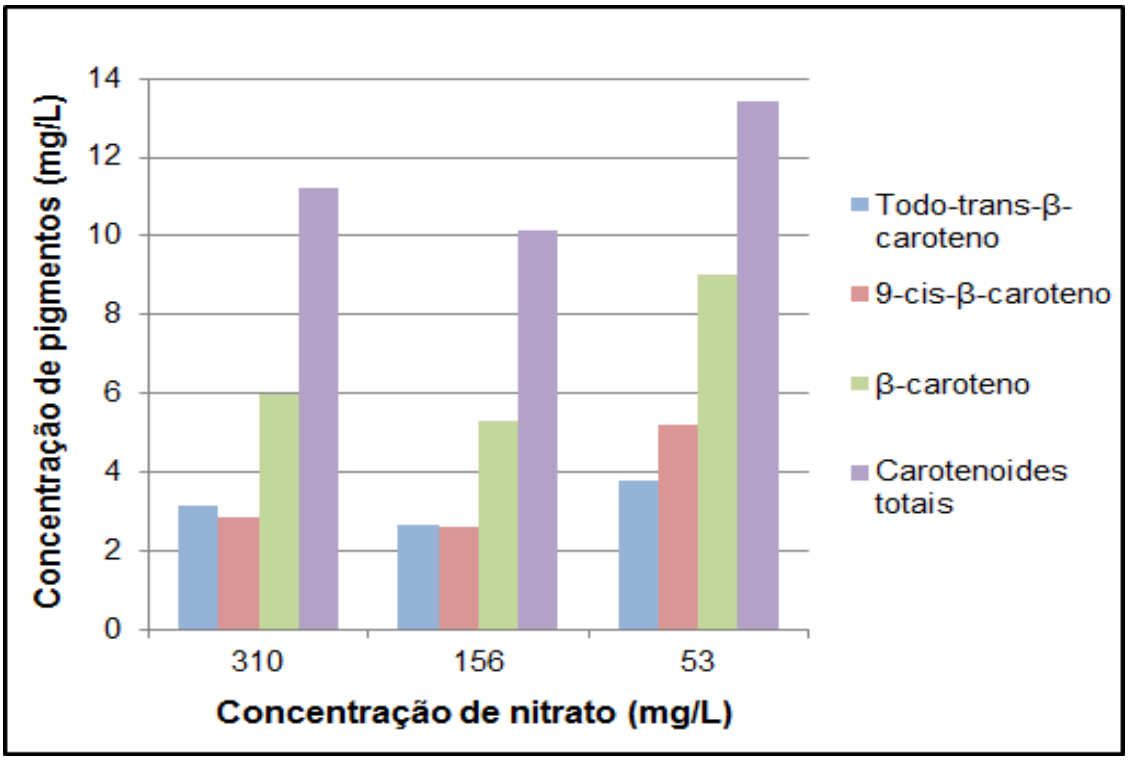

Figura 22: Efeito da salinidade e da intensidade de luz na biossíntese de catotenoides totais, β-caroteno e seus isômeros 9-cis e todo-trans.

Analisando a figura 22, constata-se a variação da qualidade do β-caroteno produzido, isto é, na proporção dos isômeros 9-cis e todo-trans, em função da concentração inicial de nitrato. O aumento da disponibilidade de nitrogênio resultou em decréscimo da relação 9-cis/todo-trans; sendo os valores 0,86; 0,99; e 1,37 determinados para as concentrações iniciais de nitrato de 310, 156 e 53 mg/L, respectivamente.

As produtividades de carotenoides totais e β-caroteno foram calculadas com base no dia de maior produção (tabela 4). Pode-se observar que as maiores produtividades em carotenoides totais (0,093 $mg.L^{-1}.h^{-1}$) e β-caroteno (0,063 $mg.L^{-1}.h^{-1}$).

Tabela 4: Produtividade ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) de β-caroteno e carotenoides totais nas diferentes concentrações iniciais de nitrato utilizadas no crescimento de *D.bardawil*

Nitrato (mg/L)	β-caroteno	Carotenoides totais
310	0,037±0,003	0,070±0,001
156	0,033±0,004	0,063±0,007
53	0,063±0,001	0,093±0,002

A figura 23 apresenta a variação do acúmulo de carotenoides pela microalga em função do cultivo em concentrações diferenciadas de nitrato. Novamente, pode-se observar que a limitação de nitrogênio estimulou o acúmulo de carotenoides pela microalga, alcançando 46 ng de carotenoides por célula com 53 mg/L de nitrato inicial. Comparativamente, nos outros dois experimentos, onde o nitrogênio não foi um fator limitante para o crescimento, a quantidade de carotenoides intracelular foi aproximadamente a metade.

Diante deste resultados, pode-se concluir que se por um lado a baixa concentração de nitrato de sódio (53 mg/L) não foi favorável ao crescimento da microalga, por outro lado a limitação de nitrato foi indutora da carotenogênese.

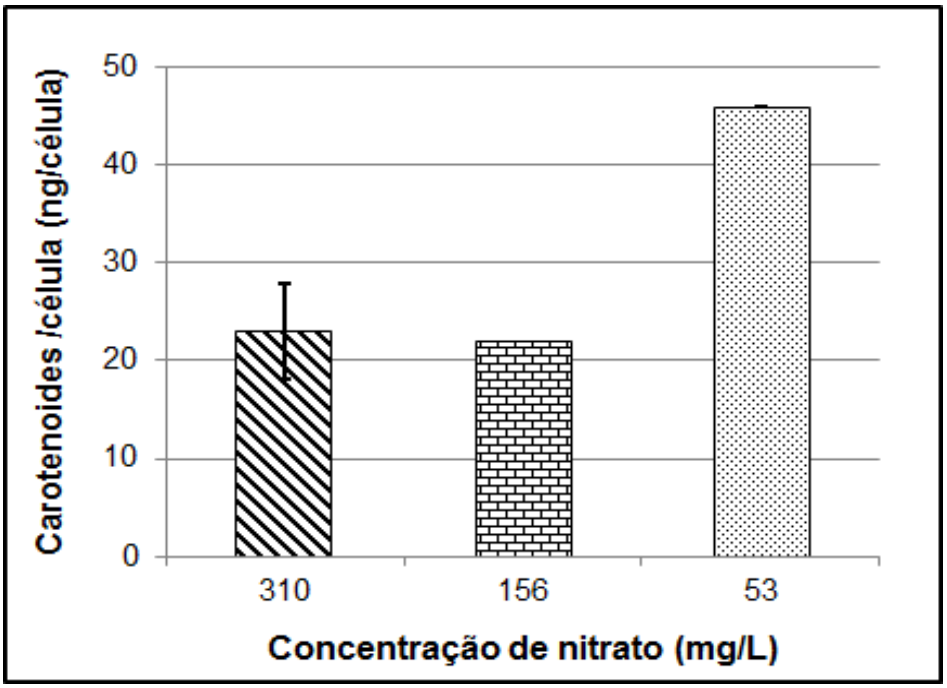

Figura 23: Quantidade de carotenoides (ng) acumulados por célula nas diferentes concentrações iniciais de nitrato utilizadas no crescimento de *D. bardawil*.

Os resultados obtidos nesta etapa nortearam para a continuidade dos experimentos visando incrementar a produção de β-caroteno. Com este propósito foi elaborado um novo planejamento experimental, fundamentado nos resultados de todos os experimentos já realizados.

5.5. Produção de β-caroteno pela microalga em condição de estresse nutricional e em diferentes intensidade de luz e concentrações de NaCl

Nesta etapa, foi estudada a produção de carotenoides totais e de β-caroteno por células em estado de estarvação, isto é, em meio de cultura isento da fonte de nitrogênio, em diferentes salinidades e intensidades de luz. Isto porque, sabe-se que a produção de caroteno é intensificada quando a microalga se encontra em limitada condição nutricional (LAMERS *et al.,* 2010).

Para este estudo, foi elaborado um novo planejamento experimental, com valores mínimos e máximos contemplando a tendência visualizada no item 5.3.

Ainda com base nos resultados anteriormente levantados, para preparo do inóculo, as células foram cultivadas em meio de cultura (quadro 4), em condições ideais para o crescimento (NaCl 1 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). Quando as células atingiram a fase estacionária de crescimento, as mesmas foram centrifugadas e ressuspendidas em meio sem nitrato de sódio e em diferentes concentrações de NaCl (1 M, 2 M e 3 M). Após isto, os experimentos foram conduzidos em diferentes intensidade de luz (400, 700 e 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). As condições estudadas neste planejamento experimental podem ser visualizadas no quadro 11.

Após as células serem submetidas à condição de estresse, a produção de β-caroteno foi acompanhada por 93 horas e constatou-se que em 69 horas a produção foi maior. Portanto, os resultados referentes à produção de β-caroteno encontrados no quadro 11 foram obtidos em 69 horas. A maior produção (12,64 mg/L) se deu na condição experimental com NaCl 1 M e sob 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, enquanto que, para a concentração de NaCl, o aumento da intensidade luminosa para 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ causou uma redução aproximada de 1,7 vezes.

Quadro 11: Resultados do planejamento experimental para a produção de β-caroteno por *D. bardawil* em ausência de nitrato, diferentes intensidades de luz e concentrações de NaCl

Experimento	NaCl (M)	Intensidade de luz ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)	β-caroteno (mg/L)
1	1	400	12,64
2	1	1000	7,24
3	3	1000	8,80
4	3	400	8,17
Ponto central	2	700	8,95
Ponto central	2	700	8,41
Ponto central	2	700	10,68

Conforme observado na figura 24, todos os cultivos apresentaram mudança da coloração verde para laranja, em virtude da produção de β-caroteno.

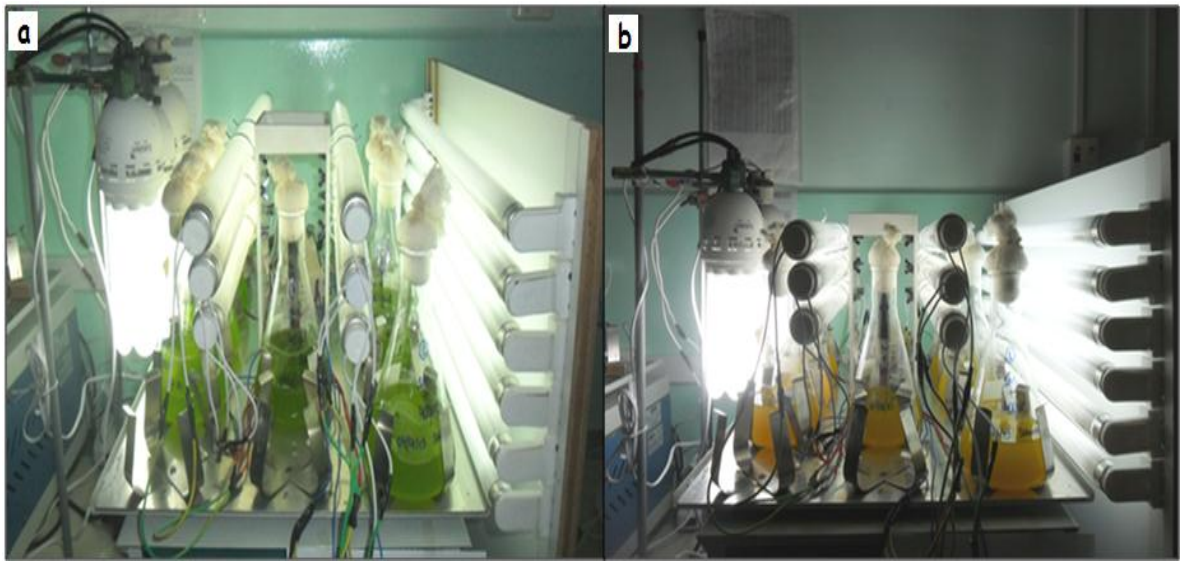

Figura 24: Coloração das culturas no início (a) e no final do estresse (b) (69 h).

Foram realizadas análises estatísticas para a variável de resposta concentração de β-caroteno adotando-se um nível de confiança de 90%, valor utilizado para processos mediados por micro-organismos devido à grande variabilidade encontrada nos resultados (RODRIGUES, 2012). Portanto, foram considerados estatisticamente significativos os parâmetros cujos p valores foram menores que 10%.

Analisando a tabela 5, observa-se que na faixa estudada, a variável concentração de NaCl não apresentou significância estatística para a produção de β-caroteno. No entanto, a concentração de NaCl em associação com a intensidade luminosa, apresentou-se significativa para a produção do pigmento. Já ao analisar a produção de β-caroteno em função apenas da intensidade de luz, nota-se que esta variável é significativa.

Tabela 5: Análise estatística da influência das variáveis concentração de NaCl e intensidade de luz na produção de β-caroteno

Fatores	Média quadrática	Valores de F	p-valor
Concentração de NaCl (A)	2,12	2,23	0,2319
Intensidade de luz (B)	5,69	6,00	0,0917
AB	9,09	9,59	0,0534

A influência da intensidade luminosa e de sua interação com a concentração de NaCl pode ser melhor analisada ao observar as figuras 25 e 26, respectivamente. Ao observar o efeito individual da intensidade luminosa na concentração de β-caroteno (figura 25), é possível notar que o aumento de 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ para 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ promoveu uma redução na concentração de β-caroteno. Já ao observar a interação entre a intensidade de luz e a concentração de NaCl (figura 26), pode-se notar um sensível aumento na concentração de β-caroteno quando a concentração de NaCl passa de 1 M para 3 M, na intensidade de luz de 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. Porém, para 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, o aumento da salinidade tem efeito negativo, causando um declínio na concentração de β-caroteno.

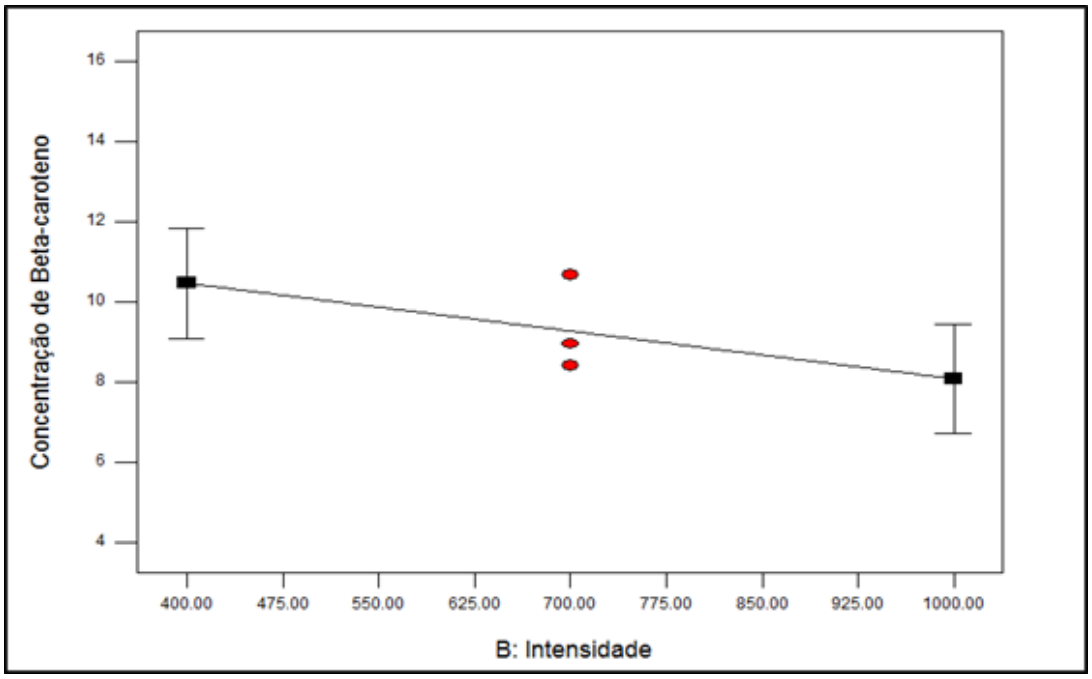

Figura 25: Gráfico de influência da intensidade luminosa na produção de β-caroteno por *D. bardawil.*

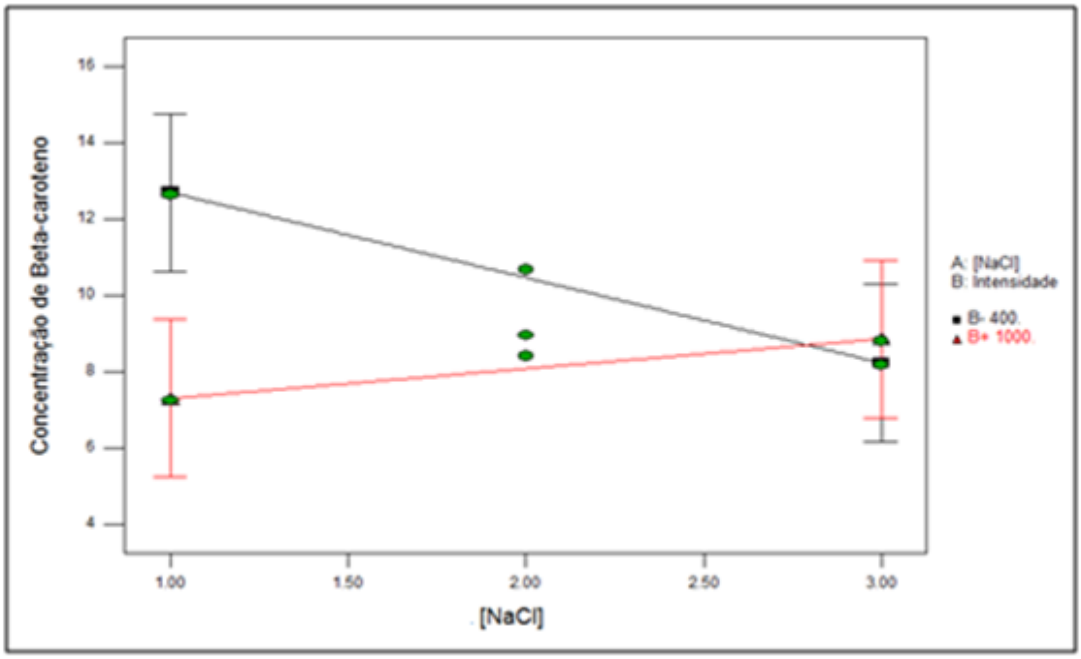

Figura 26: Gráfico de interação entre a intensidade luminosa e a concentração de NaCl na produção de β-caroteno por *D. bardawil.*

A figura 27 apresenta a produção de carotenoides totais, β-caroteno e seus isômeros ao longo de 93 horas na condição de estresse mais favorável à produção de β-caroteno (NaCl 1M e 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) pela linhagem *Dunaliella bardawil* UTEX LB 2538. A máxima concentração destes pigmentos foi alcançada em 69 h de cultivo, correspondendo a 19,4 mg/L de carotenoides totais, 12,6 mg/L de β-caroteno, e, por conseguinte, a uma produtividade de 0,107 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ em β-caroteno. Já com relação à composição isomérica do β-caroteno obteve-se 7,41 mg/L do isômero todo-trans e 5,22 mg/L do 9-cis-β-caroteno.

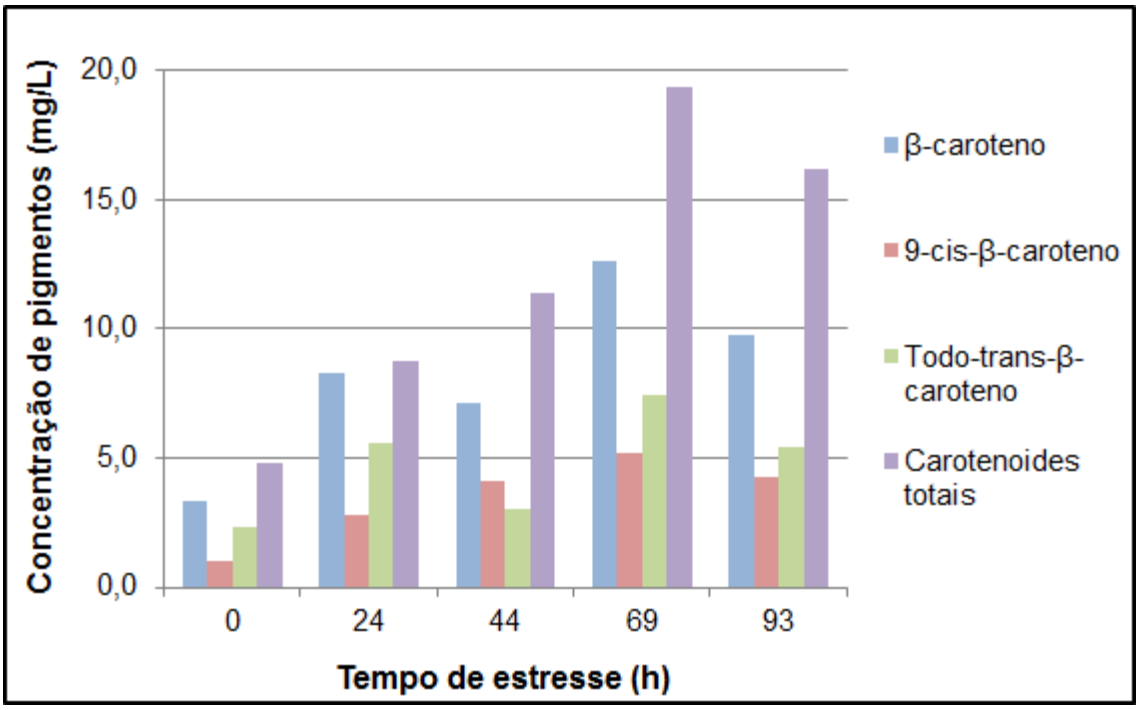

Figura 27: Produção de carotenoides totais, β-caroteno e seus isômeros pela microalga *Dunaliella bardawil* em meio descrito por Shaish, Ben-Amotz & Avron (1992) contendo NaCl 1M e sob intensidade luminosa de 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

A viabilidade celular e a quantidade de pigmentos carotenoides acumulados em cada célula também foram determinados ao longo do tempo de estresse (figura 28 a e b). A partir da análise da figura 28.a., pode-se perceber que houve um ligeiro decréscimo na concentração celular com o decorrer do tempo, ratificando que as condições de cultivo utlizadas não são favoráveis ao crescimento. De fato, a quantidade inicial de carotenoides totais por célula antes do estresse, cerca de

10 ng, aumentou para aproximadamente 65 ng em 69 h de cultivo, indicativo de estarem sendo favorecidas as condições para a carotenogênese. Este valor se manteve inalterado nas 24 h seguintes.

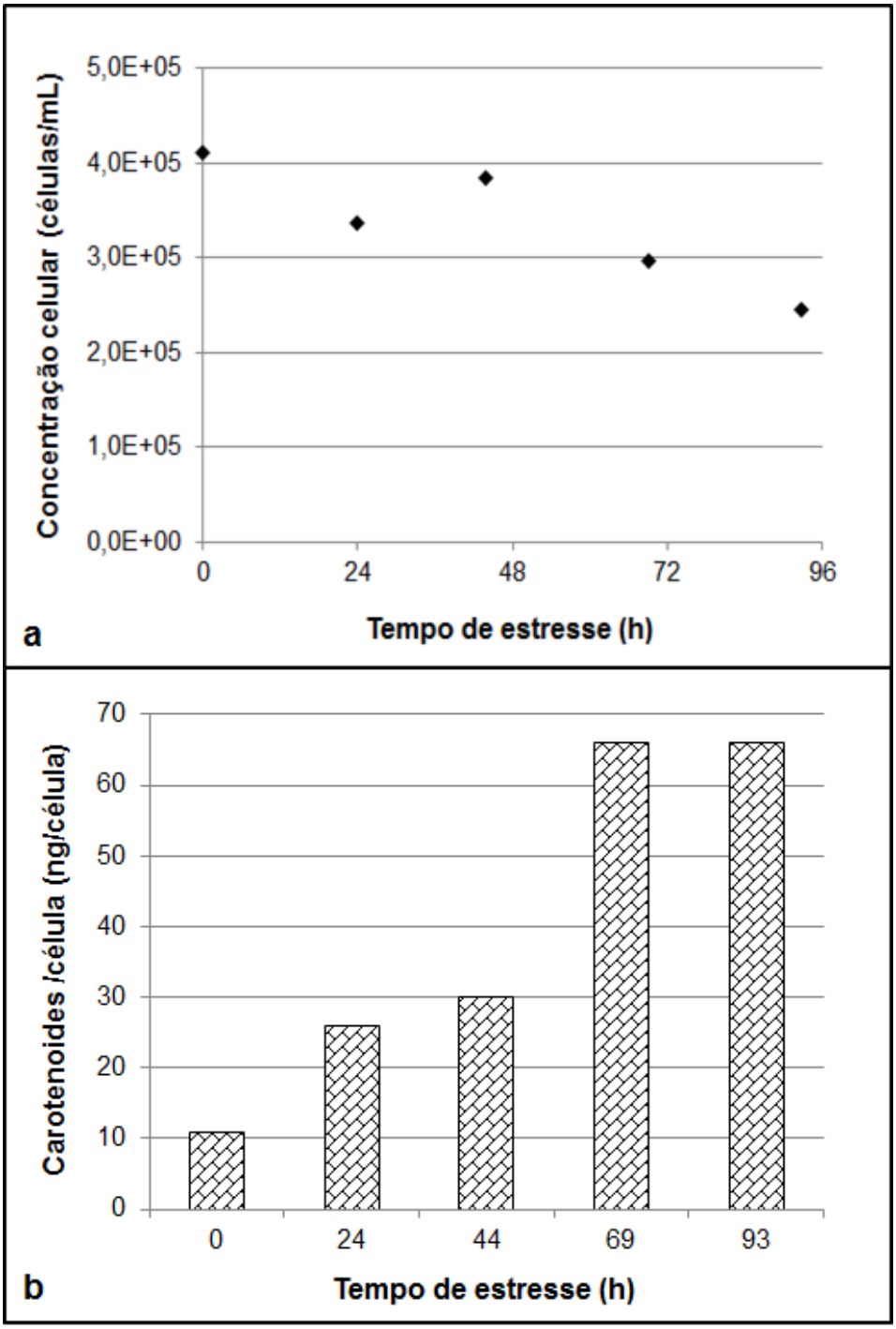

Figura 28: Monitoramento da viabilidade celular ao longo do tempo de estresse (a) e da quantidade intracelular de carotenoides totais/célula (b).

Os resultados obtidos neste experimento corroboram que o estresse ambiental é indutor da carotenogênese visto que a quantidade de β-caroteno duplicou quando as células de *D. bardawil* foram submetidas a condições de estresse, em comparação com o obtido em condições de crescimento apropriadas.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- As técnicas de trituração e ultrassonicação das células são igualmente indicadas para extração de carotenoides de *Dunaliella bardawil;*
- A técnica de trituração da membrana em acetona 90% combinado a 1 h de extração permite extrair o máximo de carotenoides das células;
- A metodologia para quantificação dos isômeros 9-cis e todo-trans-β-caroteno modificada se mostrou eficiente na separação e resolução dos compostos;
- O planejamento experimental realizado para avaliar a influência da intensidade luminosa e salinidade no crescimento de *D. bardawil* UTEX LB 2538 indicou ser NaCl 1M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, os mais favoráveis;
- A produção de β-caroteno pode se dar em condições ideais de luz e concentração de NaCl (1 M e 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) ideais ao crescimento e limitação de nitrato;
- As maiores concentrações de β-caroteno (12,64 mg/L) e carotenoides totais (19,40 mg/L) foram obtidas em condição de limitação de nitrogênio para NaCl 1M e 400 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ em 69 h de cultivo;
- A biomassa microalgal produzida na etapa de estresse é rica em pigmentos carotenoides, dos quais 69% de β-caroteno, na proporção de 41% de 9-cis-β-caroteno e 59% de todo-trans-β-caroteno.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar as etapas de crescimento e estresse nas condições ideais selecionadas neste trabalho, utilizando um meio de cultura de baixo custo, a fim de verificar o crescimento e produção de β-caroteno em condições economicamente mais vantajosas;

- Estudar condições de intensidade de luz, salinidade e concentração de nitrato que permitam a produção de β-caroteno em apenas uma etapa de cultivo (crescimento e produção ao mesmo tempo).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, S.; AMORIM, J. R.; OLIVEIRA, S. M.; BASTOS, P. A.; NERY, V. V. C, BAZILIO, F. S. Avaliação de corantes artificiais em bebidas não alcoólicas e não gaseificadas. **Revista analytica**, v. 27, p. 30-33, 2007.

ADIR, N.; ZER, H.; SHOCHAT, S.; OHAD, I. Photoinhibition – a historical perspective. **Photosynthesis research**, v. 76, p. 343-370, 2003.

AMIN, K. A.; HAMEID, A.; ELSTTAR, A. H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and chemical toxicology**, v. 48, p. 2994-2999, 2010.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.

BEN-AMOTZ, A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β-carotene production. **Journal of applied phycology**, v. 7, p. 65-68, 1995.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. On the factors which determine massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. **Plant physiology**, v. 72, p. 593-597, 1983.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 121-128, 1990.

BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J. E. W.; RAO, D. V. S. The Alga *Dunaliella.* Enfield: Science publishers, 2009, 555 p.

BEN-AMOTZ, A.; KATZ, A.; AVRON, M. Accumulation of β-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β-carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). **Journal of phycology**, v.18, p. 529-537, 1982.

BEN-AMOTZ, A.; LERS, A.; AVRON, M. Stereoisomers of β-carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. **Plant physiology**, v. 86, p. 1286-1291, 1988.

BEN-AMOTZ, A.; LEVY, Y. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans β-caroteno in human serum. The american journal of clinical nutrition, v. 63, p. 729-734, 1996.

BEN-AMOTZ, A.; SHAISH, A.; AVRON, A. Mode of action of the massively accumulated β-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. **Plant Physiology**, v. 91, p. 1040-1043, 1989.

BEN-AMOTZ, A.; SHAISH, A.; AVRON, M. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β-carotene rich algae. **Bioresource of technology**, v. 38, p. 233-235, 1991.

Biofuels. Disponível em:<www.hrc.unlv.edu/renewable/biofuels/rd_Photobioreactor.html>. Acesso em: dez. 2012.

BOROWITZKA, M. The Mass Culture of *Dunaliella salina*. In: REGIONAL SEAFARMING DEVELOPMENT AND DEMONTRATION PROJECT, 1990, Bangkok. **Anais eletrônicos…** Bangkok. 1996. Disponível em: <www.fao.org/docrep/field/003/AB728E/AB728E06.htm>. Acesso em: 20 out. 2012.

BOROWITZKA, A.; SIVA, C. J. The taxonomy of genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. **Journal of applied phycology**, v. 19, p. 567-590, 2007.

CHEN, H.; JIANG, J. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. **Journal of cellular physiology**, v. 219, p. 251-258, 2009.

CIFUENTES, A.; GONZÁLEZ, M. A.; INOSTROZA, I.; AGUILERA, A. Reapppaisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella*: growth and pigment content across a salinity gradient. **Journal of phycology**, v. 37, p. 334-344, 2001.

CONSTANT, P. B; STRINGHETA, P. C; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do CEPPA**, v. 20, p. 203-220, 2002.

COWAN, A. K.; ROSE, P. D. Abscisic acid metabolism in salt-stresses cells of *Dunaliella salina*. **Plant physiology**, v. 97, p. 798-803, 1991.

DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 74, p. 1163-1174, 2007.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Couloring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science and technology**, v. 35, p. 5-22, 2000.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. Carotenóides. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento,** v.13, n. 37, P. 40-45, 2000.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MORENO, J. C.; GUERRERO, M. G. Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis-Beta-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology, v.** 115, p. 81-90, 2005

GÓMEZ, P. I.; GONZÁLEZ, M. A. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of Dunaliella salina (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. **Biology resource**, v. 38, p. 151-162, 2005.

GÓMEZ, P. I.; BARRIGA, A.; CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta, v. 36, p. 185-192, 2003.

Global carotenoids market to reach US$1.3 billion by 2017. 2011. Disponível em:<http://www.prweb.com/releases/carotenoids/astaxanthin_beta_carotene/prweb8849957.htm>. Acesso em: out. 2012.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of marine invertebrate animals.** New York: Plenum Publishing Corporation, 1975, 60 p.

JIN, E.; POLLE, J. E. W.; LEE, H. K.; HYUN, S. M.; CHANG, M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 13, p. 165-174, 2003.

HEJAZI, M. A.; HOLWERDA, E.; WIJFFELS, R. H. **Milking Microalga Dunaliella salina for B-Carotene Production in Two-Phase Bioreactors,** p. 476-481, 2003.

HU, C. C.; LIN, J. T.; LU, F. J.; CHOUB, F. P.; YANG, D. J. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. **Food chemistry**, v. 109, p. 439-446, 2008.

INBARAJ, S. B.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of chromatography**, v. 1102, p. 193-199, 2006.

JIN, E.; MELIS, A. Microalgal biotechnology: carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. **Biotechnology an bioprocess engineering**, v. 8, p. 331-337, 2003.

KLEINEGRIS, D. M. M.; JANSSEN, M.; BRANDENBURG, W. A.; WIJFFELS, R. H. The selectivity of milking of *Dunaliella salina*. **Marine biotechnology**, v. 12, p. 14-23, 2010.

KLEINEGRIS, D. M. M.; JANSSEN, M.; BRANDENBURG, W. A.; WIJFFELS, R. H. Continous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 253-259, 2011.

KRITCHEVSKY, S. B. β-carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. **The journal of nutrition**, p. 5-8, 1998.

LAMERS, P.P.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. **Cell press**, p. 631-638, 2008.

LAMERS, P. P.; VAN DE LAAK, C. C. W.; KAASENBROOD, P. S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolismo in light-stressed *Dunaliella salina*. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, v. 106, p. 638-648, 2010.

Large scale algal culture systems. Disponível em: <www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-Appl4a.html>. Acesso em: out. 2012.

Legislação específica de alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos_bk.htm. Acesso em: dez. 2012.

LÉON, R.; MARTÍN, M.; VIGARA, J.; VILCHEZ, C.; VEGA, J. M. Microalgae mediated photoproduction of β-carotenein aqueous-organic two phase systems. **Biomolecular engineering**, v. 20, p. 177-182, 2003.

LERS, A.; BIENER, Y.; ZAMIR, A. Photoinduction of massive beta-carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*: kinetics and dependence on gene activation. **Plant Phisiology**, v.93, p. 389-395, 1990.

MAPARI, S.; MEYER, A.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 57, 2009.

Marine algae biofuel pilot project launched in the Eastern Cape. 2009. Disponível em:<www.engineeringnews.co.za/article/algae-biofuel-project-for-africa-kicks-off-in-eastern-cape-2009-03-20>. Acesso em: jan. 2013.

Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio. Disponível em: www.aliceweb.mdic.gov.br. Acesso em: jan. 2013.

MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; MOURELATOS, C. LAMBROPOLOU, V.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interection studies of the food colorantes amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2934-2944, 2010.

ORSET, S. C.; YOUNG, A. J. Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis-β,β-carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). **Plant physiology**, v. 122, p. 609-618, 2000.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de saúde pública**, v. 25, p. 1653-1666, 2009.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e nutrição**, v. 14, p. 237-250, 2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, p. 268-273, 2007.

PRIETO, J.; CAÑAVATE, P.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. Assesment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in diferente culture systems and operation regimes. **Journal of biotechnology**, v. 151, p. 180-185, 2011.

RABBANI, S. P.; BEYER, J. V.; LINTIG, P. HUGUENEY, P.; KLEINIG, H. Induced Induced β-caroteno Synthesis Driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicelular Alga *Dunaliella bardawil*. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1239-1248, 1998.

Resolução n° 44 de 1977. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/29906780474588e892cdd63fbc4c6735/ RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: dez. 2012.

RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Technological aspects of β-carotene production. **Food bioprocess technology**, v. 4, p. 693-701, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, 2008, 99 p.

RODRIGUES, T. A. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Obtenção de Carotenoides Visando a Utilização de Rejeitos da Indústria Cervejeira e da Produção de Biodiesel.** 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, E.; PURSH, M. Stationary phases for the analystis of food by liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 880, p. 189-202, 2000.

SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; CARVALHO, F. C.; NETO, A. N.; MARQUES, S. A. Tendências de mercado para corantes na indústria de alimentos. **Agricultura em São Paulo**, v. 39, p. 1-50, 1992.

SERRANO, M. C.; LOPES, A. C.; SERUYA, A. I. Dye Plants. **Revista de ciências agrárias**, v. 4, p. 16- 21, 2007.

SHAISH, A.; BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. Biosynthesis of β-carotene in *Dunaliella*. **Methods in enzymology**, v. 213, p. 439-444, 1992.

SHAISH, A.; HARARI, A.; HANANSHVILI, L.; COHENA, H.; BITZUR, R.; LUVISH, T.; ULMANA, E.; GOLAN, M.; BEM-AMOTZ, A.; GAVISH, D.; ROTSTEIN, Z.; HARATS, D. 9-cis-β-carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma

HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. **Atherosclerosis**, v. 189, p. 215-221, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. Introduction to modern liquid chromatography. New York: Wiley, 1979, 172 p.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

SQUINA, F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 39, 2003.

STAHL, W.; HEINRICH, U.; JUNGMANN, H.; SIES, H.; TRONNIER, H. Carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, p. 795-800, 2000.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis. **Pigment analisys.** Ottawa: Fisheries Research Bord of Canada, 1972, 310 p.

TELFER, A. What is β-carotene doing in the photosystem II reaction centre? **The royal society**, v. 357, p. 1431-1440, 2002.

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Molecular nutrition and food resource**, v. 56, p. 156-170, 2011.

UENOJO, M.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação em compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

WRIGHT, S. W; MANTOURA, R. F. C. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. 2. Ed. Califórnia: UNESCO Publishing, 1997, 439 p.

YAMABERI, K.; TAKAGI, M.; YOSHIDA, T. Nitrogen depletion for intracellular triglyceride accumulation to enhance liquefaction yield of marine microalgal cells into a fuel oil. **Journal of marine biotechnology**, v. 6, p. 44-48, 1998.

YE, Z. W.; JIANG, J. G.; WU, G. H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. **Biotechnology advances**, v. 26, p. 352-360, 2008.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 189-194, 1997.