Universidade Federal do Rio de Janeiro

Sabrina da Silva Mesquita

Seleção de cepa de microalga brasileira para a produção de carotenoides de interesse industrial

Rio de Janeiro

2018

Sabrina da Silva Mesquita

Seleção de cepa de microalga brasileira para a produção de carotenoides de interesse industrial

Tese de Doutorado 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 para obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientadora:
Eliana Fávia Camporese Sérvulo

Co-orientadoras:
Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira
Paula Fernandes de Aguiar

Rio de Janeiro
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

M578s

Mesquita, Sabrina da Silva
Seleção de cepa de microalga brasileira para a produção de carotenoides de interesse industrial / Sabrina da Silva Mesquita. -- Rio de Janeiro, 2018.
185 f.

Orientadora: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Coorientadora: Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Carotenoides. 2. Beta-caroteno. 3. Microalgas. 4. Dunaliella salina. 5. Ácido alfa linolênico. I. Sérvulo, Eliana Flávia Camporese, orient. II. Teixeira, Cláudia Maria Luz Lapa, coorient. III. Título.

Sabrina da Silva Mesquita

SELEÇÃO DE CEPA DE MICROALGA BRASILEIRA PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES DE INTERESSE INDUSTRIAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada por:

Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo (orientadora), Escola de Química, UFRJ

Dra. Paula Fernandes de Aguiar (orientadora), Instituto de Química, UFRJ.

Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira (orientadora), INT.

Dr. Carlos Alberto da Silva Riehl, Instituto de Química, UFRJ.

Dra. Danielle da Silveira dos Santos Martins, UFRJ.

Dra. Selma Gomes Ferreira Leite, Escola de Química, UFRJ.

Dra. Verônica Ferreira Melo, IFRJ.

Rio de Janeiro, 02 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos aqueles que se envolveram direta e indiretamente para que este trabalho acontecesse e deixo aqui minha imensa gratidão a todos, a começar por Deus que me deu forças para lutar diante das dificuldades que foram aparecendo e por ter me apresentado estas dificuldades. Afinal, diante delas eu ganhei sabedoria, tive grandes aprendizados, cresci e me tornei mais forte.

A meu querido e amado pai que não me deixou desistir. Ele sempre estava ali me ajudando a comprar materiais para os experimentos quando eu não podia sair do laboratório por ter muito trabalho, me levava ao laboratório nos finais de semana e feriados, me ajudou a elaborar as luminárias de LED usadas neste trabalho e tem muito mais.

A meu marido que sempre me incentivou no doutorado, dizendo que mulheres precisam ser independentes e que era necessário este ciclo para me realizar profissionalmente e abrir novos horizontes.

Às minhas amigas Márcia e Renata que sempre estiveram presentes para me aconselharem na vida pessoal, nos experimentos, me fazerem dar boas risadas e prestarem imensa ajuda nos experimentos. Para elas, não tinha hora para ajudar. Qualquer hora era A HORA.

À Helena que acompanhou meu trabalho como aluna de iniciação científica, sendo muito parceira e me ajudando sempre, não só com as tarefas laboratoriais, mas com seus questionamentos que me impulsionavam a pensar e pesquisar mais.

À Lígia e Monique, alunas de iniciação científica, que me ajudaram nos experimentos finais, quando eu já estava esgotada.

Ao José Roberto, técnico responsável pela montagem das luminárias de LED. Ele quem ajudou a aperfeiçoar a ideia bruta que eu tive sobre as luminárias.

À Professora Eliana Flávia que é minha orientadora de doutorado e de vida. Em muitos momentos deu conselhos de mãe. Ela é aquela pessoa humana, sabe elogiar e dar puxões de orelha bem dados, tudo na hora certa. Muito obrigada pelos puxões que ajudaram a me aprimorar cada vez mais.

À Professora Paula Fernandes que eu conheci para fazer uma disciplina a muito contragosto (e ela percebeu isso, estava estampado em meu rosto). Com o tempo eu fui tomando gosto e percebendo o quão importante ela estava sendo pra mim. Fiz até outra disciplina com ela. Gostei tanto que não saía da sala dela para tirar dúvidas e está aí o resultado: hoje ela é minha orientadora.

À Cláudia Teixeira, minha orientadora também. Foi com ela que aprendi a ser mais insistente naquilo que eu queria e foi por ser integrante do laboratório que ela gere no INT (LABIM) que aprendi sobre microalgas.

Ao Pedro, marido da minha orientadora Cláudia, que deu a ideia de coletar e isolar microalgas no projeto de doutorado.

À Thaís Garcia, um anjo de pessoa que conheci no CLABA (Congresso Latino Americano de Biotecnologia de Algas). Foi ela, com autorização do Professor Armando Vieira, quem me enviou cepas de microalgas para usar em minha tese, identificou a espécie de *Dunaliella* que coletei, me tirou dúvidas e foi muito parceira neste trabalho.

À Natália Figueiredo e Inaiã Cutrim por auxiliarem no desenvolvimento das metodologias e análises em CLAE usadas neste trabalho e à Simone Chiapetta por ceder tempo de uso do equipamento.

À Ingrid e ao Sarpal que me ensinaram sobre lipídios de microalgas.

Ao Diego pelas risadas e “soluções laboratoriais” que só ele sabia como improvisar.

À Professora Gleyci Moser que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, me ensinando a coletar e isolar microalgas.

Ao Professor Paulo Salomon que me ensinou a coletar e armazenar o material de coleta adequadamente.

Ao Professor Carlos Riehl que foi maravilhoso e fez de tudo para me ajudar a analisar os ésteres em CG. Além de ter me ensinado alguns “pulos do gato” para padronização do protocolo de metilação de ácidos graxos.

À Professora Daniella Vale que analisou minhas amostras de ésteres em CG, sendo a salvação para a conclusão deste trabalho, quando todos os equipamentos que eu tentava usar estavam ruins.

Aos colegas do LACOL, em especial ao técnico Ismael (o famoso “gato”), que não media esforços para me ajudar. Eles me viam quase todos os dias lá batendo na porta do laboratório, pedindo para usar a balança, a mufla... E tudo mais o que eu precisasse para executar o trabalho.

À professora Valéria Fernandes e Pâmela Miranda por terem feito a identificação das microalgas *H. pluvialis e G. radiata*.

À Natália Tinoco que às vésperas de seu casamento deu um jeito de me ajudar a analisar meus dados no *software* que só tinha no computador de seu laboratório.

À Juliana Cruz, pelas conversas no momento mais difícil do doutorado, quando me desliguei de tudo para cuidar da minha saúde mental e física. Ju, obrigada pelo incentivo. Eu consegui escrever!

Ao CNPq pelo apoio financeiro, concedendo a bolsa de doutorado e a taxa de bancada.

O passado é história, o futuro é mistério e hoje é uma dádiva. Por isso, é chamado de presente. (Provérbio Chinês)

RESUMO

MESQUITA, Sabrina da Silva. Seleção de cepa de microalga brasileira para a produção de carotenoides de interesse industrial. Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O uso de corantes artificiais em alimentos tem gerado questionamentos devido aos efeitos danosos que podem causar à saúde. Em virtude disto, houve aumento da demanda do uso de corantes naturais pelo mercado consumidor, tendo como destaque os pigmentos carotenoides. O objetivo deste trabalho foi selecionar uma microalga brasileira com potencial para produção de cantaxantina ou β-caroteno e estudar as condições de cultivo, a fim de otimizar a produção. Para tal, foi quantificada a produção de carotenoides totais e avaliada, qualitativamente, a presença de cantaxantina ou β-caroteno em extratos de culturas de *H. pluvialis*, *C.zofingiensis*, *G. radiata* e *D. salina.* A espécie *D. salina* foi escolhida como melhor produtora de carotenoides totais, acumulando 2,8 % de carotenoides, além de sintetizar β-caroteno. Sabendo-se da possibilidade de aumento da produção de ácidos graxos acompanhado da produção de β-caroteno, decidiu-se avaliar o comportamento de produção do ácido α-linolênico (ômega 3) em reposta à síntese β-caroteno. Para tanto, foi realizado o planejamento experimental do tipo *Plackett-Burmann* para avaliação da importância das variáveis irradiância, concentração de NaCl, nitrato e fosfato, na produtividade em β-caroteno (Q_p β-caroteno). As variáveis NaCl e irradiância se mostraram significativas, estatisticamente, tanto para Q_p β-caroteno, quanto para Q_p em ácido α-linolênico (Q_p α-linolênico). Após selecionar as variáveis, a produtividade foi otimizada usando planejamento fatorial completo 2^2. Obteve-se o máximo de Q_p β-caroteno (0,232 $mg.L^{-1}.h^{-1}$) sob 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1 M e máxima Q_p ácido α-linolênico (0,025 $mg.L^{-1}.h^{-}1$) sob 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1 M. A partir dos resultados conclui-se que não é possível maximizar a Q_p β-caroteno e α-linolênico ao mesmo tempo. Porém, podem ser alcançadas quantidades razoáveis dos dois produtos em condições comuns aos dois.

Palavras-chave: Carotenoides. β-caroteno. Cantaxantina. Microalgas. *Dunaliella salina.* Ácido α-linolênico.

ABSTRACT

MESQUITA, Sabrina da Silva. Selection of brazilian microalgae strain for carotenoids production of industrial interest. Rio de Janeiro, 2018. Thesis (Doctorate in Technology of Chemical and Biochemical Processes) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The usage of artificial colouring in food has generated arguments due to the harmful effects they can cause to human's health. As a result, there was a high demand of natural colouring usage by the consumer market, mainly the carotenoids pigments. The purpose of this study was to select a Brazilian microalga with potential to produce canthaxantin or β-carotene and to study the culture conditions, in order to optimize the production. In order to achieve this, the total carotenoids production was quantified and the presence of canthaxantin or β-carotene in culture extracts of *H. pluvialis*, *C.zofingiensis*, *G. radiata* and *D. salina* was evaluated qualitatively. The specie D. salina was chosen as the best total carotenoids producer, accumulating 2.8% of carotenoids; besides synthesizing β-carotene. Knowing of the possibility of an increase in the fatty acid production along with the β-carotene production, it was decided to evaluate the α-linolenic acid (Omega 3) production behaviour in response to β-carotene synthesis. For this purpose, a *Plackett-Burmann* experimental design was performed to assess the importance of the variables irradiance, NaCl, nitrate and phosphate concentration in the β-carotene (Q_p β-carotene) productivity. The variables NaCl and irradiance showed to be statistically significant for both Q_p β-carotene and α-Linolenic acid (Q_p α-Linolenic acid). After selecting the variables, the productivity was optimized by using a complete factorial design (2^2). A maximum of Q_p β-carotene (0,232 $mg.L^{-1}.h^{-1}$) was obtained under 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ and NaCl 1 M. The results concluded that it is not possible to maximise Q_p β-carotene and α-Linolenic acid at the same time. However, reasonable quantities can be reached under common conditions to both products.

Key words: Carotenoids. β-carotene. Canthaxantin. Microalgae. *Dunaliella salina.* α-linolenic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Unidade de isopreno. 32

Figura 4.2: Estrutura molecular dos carotenoides norbixina e bixina, presentes em sementes de Urucum. Estes carotenoides apresentam 24 átomos de carbono.....33

Figura 4.3: Exemplos de xantofilas (à esquerda) e carotenos (à direita). 35

Figura 4.4: Formação do retinol a partir de uma molécula de β-caroteno. Adaptado de: AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO (2006). 38

Figura 4.5: Distúrbios que podem ser causados por espécies reativas de oxigênio e que podem apresentar efeitos benéficos quando os carotenoides são usados. Adaptado de: Fiedor e Burda (2014). 40

Figura 4.6: Representação gráfica da quantidade (kg) de carotenoides e produtos contendo carotenoides ou algum tipo de carotenoide importada no período de 2010 a 2014 (NCM 32041911: carotenoides; NCM 32041912: preparações contendo β-caroteno, ésteres metílicos ou etílicos do ácido 8'-apo-β-carotênico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina próprias para colorir alimentos; NCM 32041919: outras preparações à base de carotenoides). 45

Figura 4.7: Exemplos de ambientes onde as microalgas podem ser encontradas: a) Rochas com *Haematoccocus pluvialis*; b) Líquen em tronco de árvores (simbiose entre fungo e microalga); c) *Bloom* de microalgas no mar em Copacabana – RJ; d) *Bloom* de microalgas no lago Erie – América do Norte; e) Área de produção de sal com *Dunaliella salina*; f) Neve com *Chlamydomonas nivalis*. Fonte: CHEKANOV et al., 2014; MEC, 2015; GLOBO, 2015; NASA, 2015; PLANT SYSTEMATICS, 2015. 49

Figura 4.8: Espectro da radiação eletromagnética com destaque para o espectro visível. As abreviações da figura significam: UV – ultravioleta; VIS – visível. Adaptado de: MAZOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK (2013). 50

Figura 4.9: Formação do estado excitado da molécula de clorofila a quando há excesso de energia luminosa. Fonte: BRUNET et al. (2012). 51

Figura 4.10: Neutralização da clorofila triplete por ação do carotenoide: (a) primeira reação do carotenoide na molécula de clorofila; (b) reação subsequente em que o carotenoide retorna ao estado fundamental. Fonte: Frank e Codgell (1993). 52

Figura 4.11: Ação de neutralização do oxigênio singlete por ação do carotenoide: (a) primeira reação do carotenoide na molécula de oxigênio; (b) reação subsequente, em que o carotenoide retorna ao estado fundamental. Fonte: Krinsky (1989). 52

Figura 4.12: Esquema simplificado da rota de biossíntese proposta para *Dunaliella*. Adaptado de: Eonseon e Polle (2009).....56

Figura 4.13: Exemplos de ômegas 3 de cadeias curtas e longas. 58

Figura 4.14: Tipos de sistemas abertos para o cultivo de microalgas: a) cultivo de *D. salina e*m grandes lagoas abertas; b) cultivo de *Nannochloropsis* sp. em tanques; c) cultivo em *Raceway pond*. Fonte: http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-Appl4a.html; http://rfeholland.com/downloads/wur/biofuels_from_microalgae.html. 61

Figura 4.15: Cultivo de *H. pluvialis* em fotobiorreator tubular. Fonte: http://www.lyxia.com/well-controlled-enclosed-cultivation-system-for-high-value-product/ 63

Figura 5.1: Pontos de medições das irradiâncias. A esfera verde ilustra a posição do frasco erlenmeyer e as letras ilustram os pontos onde foram feitas as medições de intensidade de luz. A intensidade de luz estabelecida no final das medições foi encontrada a partir da média das intensidades medidas. 65

Figura 5.2: Foto da câmara Neubauer usada na contagem de células. As setas indicam as duas regiões onde a amostra é inserida após a colocação da lâmínula. 66

Figura 5.3: Regiões de contagem de células. A) Indicação das regiões onde foram contadas as células das espécies isoladas (dulcícola e salina); B) Indicação das regiões onde foram contadas as células de *C. zofingiensis*. A ampliação mostra como é a configuração do quadrado que está dentro de cada círculo vermelho. 67

Figura 5.4: Etapas de preparo da amostra para posterior extração de carotenoides. 71

Figura 5.5: Etapas da extração de carotenoides totais: a) adição de acetona na membrana com biomassa microalgal; b) trituração da membrana com bastão de vidro; c) filtração da mistura reacional com filtro de algodão; d) obtenção do extrato filtrado; e) centrifugação do extrato filtrato; f) filtração do extrato centrifugado em membrana de celulose regenerada acoplada à seringa descartável. 72

Figura 5.6: Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado neste trabalho. 74

Figura 5.7: Extração de carotenoides de *D. salina* (A - coloração da membrana após a 1ª extração; B - coloração da membrana após total remoção de carotenoides). ...76

Figura 5.8: Etapas do processo de extração de carotenoides totais (A – fases formadas após adição de KCl (0,88%); B – lipídios redissolvidos em clorofórmio; C – filtração dos lipídios redissolvidos para remoção de sais; D – evaporação do clorofórmio em rotaevaporador; E – obtenção de lipídios totais secos após evaporação do clorofórmio. 79

Figura 5.9: Etapas da metilação de ácidos graxos (A – amostra em banho a 100ºC sob refluxo; B – extração de ésteres metílicos com formação de emulsão; C – formação de duas fases na extração de ésteres metílicos; remoção de água do extrato de ésteres metílicos com Na_2SO_4. 81

Figura 5.10: Etapas experimentais do presente trabalho. 82

Figura 5.11: Região de coleta em ambiente dulcícola. A) Mapa de localização do Parque Municipal da Quinta da Boa Vista – RJ; B) Local de coleta marcado em amarelo; coordenadas (aproximadas): latitude: S 22°54’16.18’’; longitude: W 43°13’28.37’’.....83

Figura 5.12: Região de coleta em ambiente salino. A) Mapa de localização do Município de São Pedro da Aldeia - RJ. B) Local de coleta marcado em amarelo; coordenadas (aproximadas): latitude: S 22°50’25.30’’; longitude: W 42°05’33.71’’…84

Figura 5.13: Representação das etapas da coleta de microalgas. 86

Figura 5.14: Exemplificação de uma placa com 96 poços e os fatores de diluição usados em cada fileira da horizontal. 87

Figura 5.15: Exemplificação dos volumes de amostra e de meio de cultura usados na diluição em série. 88

Figura 5.16: Exemplificação da montagem da pipeta Pasteur com a mangueira para a realização do isolamento por micropipetagem. 89

Figura 5.17: Ilustração da retirada do halo laranja que ficou aderido à parede do frasco com a alça de platina. 90

Figura 5.18: Ilustração das etapas de isolamento da microalga proveniente de ambiente salino. 91

Figura 5.19: Mesa agitadora usada no cultivo de microalgas.....92

Figura 5.20: Imagem ilustrativa dos componentes da luminária de LED (A – Desenho esquemático da luminária de LED; B – Luminária com todos seus componentes; C – Placa com circuito impresso; D – Placa de alumínio dissipadora de calor conectada à placa com LED; E – Placa com LED (6 W); F – Placa com LED (9 W); G – Terminais de compressão machos dentro de conector macho; H – Visão lateral do conector macho). 98

Figura 5.21: Imagem ilustrativa do sistema de iluminação completo. (A – Terminais metálicos fêmeas dentro de conector fêmea e visão geral da estrutura de suporte para as luminárias; B – A região pontilhada destaca a área em que os conectores foram instalados; C – Em destaque, conectores fêmea e macho unidos; D – Sistema completo com luminárias acesas; E – Cultivo de *D. salina* CCMA-UFSCar 711 com cada luminária direcionada a um frasco diferente). 99

Figura 6.1: Coloração da água em seus ambientes de coleta. A - Água rosada da salina (ambiente salino); B - Água esverdeada do lago da Quinta da Boa Vista (ambiente dulcícola). 109

Figura 6.2: Culturas recém-inoculadas e antigas da espécie dulcícola isolada: A) Cultura células verdes; B) microscopia óptica das células (400X); C) cultura de células laranjas; D) microscopia óptica das células (400x). 110

Figura 6.3: Microscopia óptica de *Golenkinia radiata* Chodat, 1894 em aumento de 1000x. Autor da foto: Pâmela Miranda (UFES). 111

Figura 6.4: Células do halo laranja crescidas em meio salino modificado (aumento 400x). 112

Figura 6.5: Culturas originadas do inóculo de cada poço em que, provavelmente, teria sido isolado uma única célula.....113

Figura 6.6: Perfis cinéticos de crescimento das espécies: A) *C. zofingiensis*; B) *G. radiata*; C) *H. pluvialis* e D) *Dunaliella salina.* n=3. 114

Figura 6.7: Extratos de pigmentos das espécies: A) *C. zofingiensis*; B) *H. pluvialis;* C) *G. radiata* e D) *D. salina.* 118

Figura 6.8: Cromatograma dos padrões de cantaxantina (pico 1) e todo-trans-β-caroteno (pico 2) e suas estruturas moleculares. 123

Figura 6.9: Espectros de absorção dos padrões de: cantaxantina e; 2) todo-trans-β-caroteno. 123

Figura 6.10: Cromatogramas dos extratos de pigmentos das microalgas estudadas. Os picos numerados por “1” representam a cantaxantina e os picos numerados por “2” representam o todo-trans-β-caroteno. Cromatograma: A) extrato de *C. zofingiensis*; B) extrato de *G. radiata*; C) extrato de *H. pluvialis* e D) extrato de *D. salina*. 125

Figura 6.11: Fotomicrografias de *D. salina* cepa CCMA-UFSCar 711: a - b) formatos celulares encontrados na população; c) célula com conteúdo intracelular verde, sob abundância de nitrato; d) célula com conteúdo intracelular em transição de verde para vermelho devido à restrição de NO_3^- no meio de cultura. Barra de escala: 10 µm. 128

Figura 6.12: Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir de sequências de ITS-2 de cepas mencionadas no quadro 5.3. Junto se encontram os valores *Bayesian Posterior Probability*, *Bootstrap ML* e *Neighbor-Joining* com os valores. As barras correspondem aos valores <50% para *Bootstrap* e *<0.60* para *Bayesian Posterior Probability.* A escala representa o número de substituições esperado por sítio.....130

Figura 6.13: Estrutura secundária de ITS-2 obtida a partir de múltiplos alinhamentos de sequência para as cepas de *Dunaliella salina* (CCMA-UFSCar 711, ATCC 30861, ITC5000, UTEX 2538, CCAP 19/12 and CCAP 19/30). As hélices estruturais estão numeradas de I a IV. 132

Figura 6.14: Cinética de crescimento de *D. salina* sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e LEDs brancos.....134

Figura 6.15: Cinéticas de crescimento e: A) consumo de NO_3^-; B) consumo de PO_4^{3-}. 135

Figura 6.16: Experimentos prévios do 1º bloco do *P&B* com 24 h e 42 h de cultivo. 137

Figura 6.17: Culturas de *D. salina* em diferentes condições estudadas no planejamento de experimentos *Plackett-Burman.* Na primeira fileira encontram-se as culturas dos experimentos antes de serem submetidas ao *P&B*. Na segunda fileira estão as mesmas culturas ao término dos experimentos do *P&B* (após 14 h).....138

Figura 6.18: Matrizes experimentais dos planejamentos usados. Explicação de como os resultados da matriz *P&B* foram usados na matriz 2^2. Variáveis: X1 – irradiância; X2 – [NaCl]; X3 – [PO_4^{3-}]; X4 – [NO_3]....144

Figura 6.19: Gráfico de superfície de resposta para Q_p em β-caroteno. A) Gráfico 3D; B) Gráfico 2D. 146

Figura 6.20: Gráfico de superfície de resposta para Q_p em ácido α-linolênico. A) Gráfico 3D; B) Gráfico 2D....151

Figura 6.21: Gráficos de superfície de resposta de Q_p em ácido α-linolênico e β-caroteno: A) Gráfico 3D de Q_p em ácido α-linolênico; B) Gráfico 3D de Q_p em β-caroteno; C) Gráfico 2D de Q_p em ácido α-linolênico com região central destacada; D) Gráfico 2D de Q_p em β-caroteno com região central destacada....153

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1: Corantes permitidos no Brasil com uso regulamentado pela ANVISA, segundo resolução nº 44 de 1977 (ANVISA, 2014) 29

Quadro 4.2: Exemplos de corantes artificiais e naturais e seus efeitos na saúde 30

Quadro 4.3: Exemplos de carotenoides encontrados na natureza, suas cores e exemplos de fontes produtoras 34

Quadro 4.4: Produtos comercializados que apresentam carotenoides em sua composição 37

Quadro 4.5: Empresas encontradas no Brasil que atuam no ramo da produção de corantes naturais 46

Quadro 4.6: Tipos de ômega 3 encontrados em *D. salina* e *D. bardawil* 59

Quadro 4.7: Espécies de microalgas produtoras de carotenoides secundários 60

Quadro 5.1: Composição do gradiente da fase móvel 75

Quadro 5.2: Gradiente usado na fase móvel 77

Quadro 5.3: Lista das cepas estudadas na análise filogenética, suas sequências de ITS-2 obtidas através do GenBank e informações de origem geográfica 96

Quadro 5.4: Variáveis escolhidas para o planejamento *P&B* e seus níveis. 102

Quadro 5.5: Matriz experimental usada no planejamento *Plackett-Burman* para 4 variáveis e 8 experimentos 102

Quadro 5.6: Matriz experimental usada no planejamento 2^2 106

Quadro 6.1 Informações sobre a produtividade de carotenoides totais ou β-caroteno encontradas em trabalhos da literatura 148

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Informações sobre a importação e exportação no mercado brasileiro de: carotenoides (NCM 32041911); preparações contendo β-caroteno, ésteres metílicos ou etílicos do ácido 8'-apo-β-carotênico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina próprias para colorir alimentos (NCM 32041912); outras preparações à base de carotenoides (NCM 32041919).....43

Tabela 6.1: Caracterização das amostras coletadas e dos locais de coleta.....108

Tabela 6.2: Resultados da produção de carotenoides pelas quatro espécies estudadas.....119

Tabela 6.3: Comparação dos resultados das cinéticas de crescimento das espécies estudadas.....126

Tabela 6.4: Resultados das extrações de lipídios totais das amostras contendo NaCl, cálculos das médias, variâncias e teste t-*Student*.....136

Tabela 6.5: Matriz do planejamento experimental *Plackett-Burman* com os valores dos limites das variáveis decodificados, a resposta em produtividade volumétrica de β-caroteno e o cálculo de desvio-padrão dos pontos centrais (PCs) 139

Tabela 6.6: Valores dos coeficientes e intervalos de confiança para os coeficientes do modelo.....139

Tabela 6.7: Matriz do planejamento experimental *Plackett-Burman* com os valores dos limites das variáveis decodificados, a resposta em produtividade volumétrica de ácido α-linolênico e o cálculo de desvio-padrão dos pontos centrais (PCs).....142

Tabela 6.8: Valores dos coeficientes e intervalos de confiança para os coeficientes do modelo.....143

Tabela 6.9: Resultados do planejamento experimental 2^2, valor dos coeficientes das variáveis e apresentação do modelo matemático 145

Tabela 6.10: Resultados do planejamento experimental 2^2, valor dos coeficientes das variáveis e apresentação do modelo matemático.....150

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....23

2. JUSTIFICATIVA.....25

3. OBJETIVOS.....26

3.1 Objetivo Geral 26

3.2 Objetivos Específicos 26

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

4.1 Aditivos: definição e legislação brasileira..... 27

4.2 Corantes 27
4.2.1 Corantes artificiais e corantes naturais 30

4.3 Carotenoides..... 32
4.3.1 Carotenoides: características químicas e fontes produtoras 32
4.3.2 Carotenoides: aplicações, propriedades e efeitos na saúde 36
4.3.3 Carotenoides: mercado mundial e brasileiro..... 41

4.4 Produção de carotenoides 47

4.5 Microalgas..... 48

4.6 Carotenoides em microalgas 50
4.6.1 Carotenoides primários: captação de energia luminosa e fotoproteção 51

4.7 O gênero *Dunaliella* e o acúmulo de carotenoides secundários 54
4.7.1 Produção de ácidos graxos e carotenogênese em *Dunaliella*..... 56
4.7.2 Ômega 3 e *D. salina*..... 57

4.8 Cultivo de microalgas 60

5. MATERIAIS E MÉTODOS 64

5.1 Micro-organismos 64

5.2 Meios de cultura 64

5.3 Manutenção das culturas 64

5.4 Determinações Analíticas..... 65
5.4.1 pH 65
5.4.2 Salinidade..... 65
5.4.3 Irradiância de luz 65
5.4.4 Quantificação celular 66

5.4.5 Quantificação de nitrato 69
5.4.6 Quantificação de fosfato 70
5.4.7 Extração e quantificação de carotenoides totais nas 4 espécies estudadas 70
5.4.8 Identificação da produção de β-caroteno e cantaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 74
5.4.9 Extração de carotenoides totais da espécie selecionada com maior potencial de produção . 75
5.4.10 Quantificação por CLAE do carotenoide majoritário (β-caroteno) da espécie selecionada .. 76
5.4.11 Extração e quantificação de lipídios totais 78
5.4.12 Derivatização de ácidos graxos 79
5.4.13 Quantificação de linolenato de metila por CG 81

5.5 Detalhamento experimental 82
5.5.1 Coleta de microalgas em diferentes ambientes 83
5.5.2 Isolamento de espécie(s) de microalga(s) de ambiente: 87
5.5.3 Avaliação da produção de carotenoides por diferentes microalgas 92
5.5.4 Identificação morfológica, molecular e análise filogenética da cepa selecionada 93
5.5.5 Elaboração de sistema de iluminação com LEDs brancos 97
5.5.6 Análise comparativa dos perfis cinéticos de crescimento da cepa isolada *D. salina* sob iluminação com lâmpadas fluorescentes e LED 100
5.5.7 Avaliação dos consumos de nitrato e fosfato sob iluminação com LED 100
5.5.8 Avaliação da influência da presença de sal em amostras de *D. salina* na extração de lipídios totais 100
5.5.9 Planejamento experimental *Plackett-Burman* 101
5.5.10 Planejamento Experimental Fatorial Completo 106

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 108

6.1 Caracterização dos locais de coleta 108

6.2 Isolamento de microalgas 109

6.3 Avaliação da produção de carotenoides por diferentes microalgas 113
6.3.1 Perfis cinéticos de crescimento celular 113
6.3.1.1 *Chlorella zofingiensis* 115
6.3.1.2 *Golenkinia radiata* 115
6.3.1.3 *Haematococcus pluvialis* 116
6.3.1.4 *Dunaliella salina* 116
6.3.2 Produção de carotenoides totais 118
6.3.2.1 Chlorella zofingiensis 119
6.3.2.2 Golenkinia radiata 120
6.3.2.3 Haematococcus pluvialis 120
6.3.2.4 Dunaliella salina 121
6.3.3 Análise qualitativa da produção de carotenoides 122
6.3.4 Análise comparativa dos cultivos das diferentes espécies de microalgas 126

6.4 Identificação morfológica, molecular e análise filogenética da cepa selecionada 128

6.5 Análise comparativa dos perfis cinéticos de crescimento da cepa isolada D. salina sob iluminação com lâmpadas fluorescentes e LED 132

6.6 Avaliação dos consumos de nitrato e fosfato sob iluminação com LED 134

6.7 Avaliação da influência da presença de sal em amostras de *D. salina* na extração de lipídios totais 136

6.8 Planejamento experimental *Plackett-Burman* 136
6.8.1 Produção de β-caroteno 136
6.8.2 Produção de ácido α-linolênico 141

6.9 Planejamento Experimental Fatorial Completo 143
6.9.1 Otimização da Q_p em β-caroteno 143
6.9.2 Otimização da Qp em ácido α-linolênico 149
6.9.3 Comparação entre os resultados de otimização da Qp em β-caroteno e ácido α-linolênico 152

7. CONCLUSÕES 154

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 155

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 156

10. APÊNDICES 170

11. APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PREPARO DE MEIO WC MODIFICADO PARA NÃO CONTER SÍLICA, SEGUNDO DESCRITO POR GUILLARD E LORENZEN (1972) 170

12. APÊNDICE B – PROTOCOLO DE PREPARO DE MEIO SALINO, SEGUNDO DESCRITO POR beN-AMOTZ, SHAISH E AVRON (1992) 174

13. APÊNDICE C – CURVA ANALÍTICA DE NITRATO (NO_3^-) 179

14. APÊNDICE D – REAGENTES E CURVA ANALÍTICA DE FOSFADO USADOS NA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE FOSFATO SEGUNDO GRASSHOFF, EHRHARDT E KREMILING (1983) 180

15. APÊNDICE E – CURVA ANALÍTICA DE TODO-TRANS-β-CAROTENO, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO 181

16. APÊNDICE F – CROMATOGRAMA DO EXTRATO DE CAROTENOIDES DE *D. salina* CCMA-UFSCar 711 (A) E ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS ISÔMEROS DE β-CAROTENO QUANTIFICADOS (B-C) 182

17. APÊNDICE G – CURVA ANALÍTICA DE LINOLENATO DE METILA, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO 183

18. APÊNDICE H – CROMATOGRAMA COM ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS DE *D. salina* CCMA-UFSCar 711 (A) E ESPECTRO DE MASSAS DO LINOLENATO DE METILA (B).....184

19. APÊNDICE I – PROTOCOLO DE PREPARO DE SOLUÇÕES-ESTOQUE DO MEIO F/2 MODIFICADO PARA NÃO CONTER SÍLICA, SEGUNDO GUILLARD (1975).....185

1. INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos e bebidas têm cada vez mais lançado mão de aditivos, em particular de corantes, com a intenção de tornar os alimentos mais atrativos, estimulando assim o seu consumo (PRADO; GODOY, 2003). Downham e Collins (2000) mostraram que, no contexto mundial, os corantes sintéticos são os principais corantes usados na indústria de alimentos. Porém, conforme revelado por alguns estudos, estes corantes podem causar hiperatividade, citotoxicidade, genotoxicidade, alterações neurocomportamentais (MCCANN et al., 2007; MPOUNTOUKAS et al. 2010; DOGUC et al., 2015), entre outros efeitos.

Em virtude dos possíveis efeitos danosos à saúde, houve um aumento na exigência do mercado consumidor, refletindo numa tendência mundial pelo consumo de corantes naturais em substituição aos corantes artificiais que além de colorir podem apresentam propriedades funcionais (SATO et al., 1992).

Dentre os corantes naturais mais usados estão os carotenoides que apresentam coloração amarela, laranja ou vermelha e são amplamente encontrados na natureza em plantas superiores, macroalgas, e micro-organismos, como fungos, bactérias e microalgas.

Os carotenoides usados comercialmente podem ser sintéticos ou naturais. Ernst (2002) relata que a produção de carotenoides sintéticos é mais vantajosa frente à produção por rota biotecnológica, devido ao seu custo que é mais baixo. Entretanto, a síntese química de carotenoides, como a astaxantina e a zeaxantina, por exemplo, requer o uso de derivados da indústria petroquímica. Nguyen (2013) mostrou em seu trabalho que os gastos com matéria-prima somados aos gastos com energia para a produção de 1 kg de astaxantina sintética, por exemplo, são de US$ 66, enquanto que para a produção biotecnológica pela levedura *Phaffia rhodozyma* e pela microalga *Haematococcus pluvialis* são, US$ 300 e 284, respectivamente.

O cenário econômico nacional do mercado de carotenoides é movimentado, principalmente, por importações que, no período de 2010 a 2014, representaram um total de US$ 9.968.158,00, o equivalente a 776.060 kg (ALICEWEB, 2015). A análise desses números denota que há demanda de carotenoides no Brasil, porém a produção nacional parece não atender.

Em um levantamento realizado sobre o consumo de carotenoides fora do domicílio no Brasil, constatou-se que os níveis de ingestão desses compostos revelaram-se inferiores aos limites recomendados (AMANCIO; SILVA, 2012). Diante disso, a adição de pigmentos carotenoides em alimentos pode se mostrar mais do que conferir ou intensificar a cor do produto, pode significar (se usado nas concentrações ideais) a prevenção de doenças devido à sua atividade antioxidante e o enriquecimento de alimentos para conter atividade pró-vitamínica A.

No Brasil, existem muitas fontes vegetais ricas em carotenoides que poderiam ser exploradas para fornecer os mais variados tipos de carotenoides. Entretanto, o cultivo de espécies vegetais, geralmente, depende do clima e do tempo para que possam se desenvolver. Portanto, fenômenos climáticos podem interferir na produção.

Deve-se ainda enfatizar que fontes vegetais de carotenoides, em geral, contêm baixa quantidade desses pigmentos, se comparados a outras fontes de carotenoides, como as microalgas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* (SEUNGHYE; YEW; EONSEON, 2013; IMAMOGLU, DALAY E SUKAN, 2009). Por exemplo, segundo Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), o conteúdo de β-caroteno presente no buriti, abóbora “baianinha”, cenoura e hortelã, corresponde a: 0,0364; 0,0235; 0,0034; e 0,0053%, respectivamente.

Neste cenário, uma alternativa para a produção de diferentes tipos de carotenoides pode ser a síntese por rota biotecnológica a partir de diferentes micro-organismos. Valduga et al. (2009) destaca como vantagens da produção microbiana, a obtenção destes pigmentos em curto prazo e em qualquer época do ano.

Na literatura são encontrados relatos de espécies de microalgas que podem acumular altas concentrações de carotenoides como, por exemplo, a espécie *Dunaliella bardawil* que, dependendo das condições de cultivo, pode acumular até 10% de β-caroteno em sua biomassa (BEN-AMOTZ; AVRON, 1990). Além disso, Rabanni et al. (1998) e Mendoza et al. (1999) relataram aumento na produção de ácidos graxos totais acompanhado da produção de β-caroteno em *D. bardawil* e *D. salina*, respectivamente. Dentre os ácidos graxos sintetizados por esta espécie, encontram-se os poli-insaturados do grupo ômega-3 que, se produzidos

concomitantemente com o β-caroteno, elevariam a qualidade nutricional e agregariam maior valor à biomassa microalgal.

Por fim, ressalta-se que para a obtenção de carotenoides produzidos por rota biotecnológica com preços de mercado mais competitivos, se fazem necessários investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil é encontrada grande riqueza de fauna e flora em seus diversos biomas. O país que abriga a maior biodiversidade do planeta, sendo o responsável por mais de 20% do número total de espécies da Terra, permitindo o Brasil ocupar a posição de principal nação entre os países 17 países megadiversos (MMA, 2015).

Estima-se que nosso país tenha de 170 a 210 mil espécies conhecidas, enquanto que o número calculado de espécies que o país abriga é cerca de 1,8 milhões de espécies, indicando que apenas 11% da biodiversidade brasileira é conhecida (SiBBr, 2015). Em relação à flora, nosso país detém a maior riqueza, contando com 45.835 espécies descritas, sendo 4.680 espécies de algas. No que tange as algas microscópicas brasileiras, Bicudo e Menezes (2010) reportam que pouco se conhece sobre o fitoplâncton marinho, por exemplo. Sendo assim, é notável que ainda há muito o que ser descoberto, incluindo as biomoléculas que podem ser encontradas em meio a essa biodiversidade.

A motivação para a realização do presente trabalho se deu diante da escassez de estudos prospectivos acerca da produção de carotenoides por espécies brasileiras de microalgas. Embora a produção do carotenoide, β-caroteno, por cepas da espécie de microalga *D. salina* venha sendo estudada há mais de 30 anos, não foram encontrados trabalhos que façam análise multivariada, a fim de selecionar variáveis relevantes à indução da carotenogênese para então otimizar a produção. Também são escassas as publicações com foco na avaliação da produção de ácido α-linolênico comparativamente à produção β-caroteno por *D. salina* (LAMERS et al. 2010; MENDOZA et al., 1999), sobretudo usando diferentes variáveis ao mesmo tempo.

Além disso, a produção de carotenoides por microalgas se mostra vantajosa frente a outras fontes vegetais por ser possível a obtenção da biomassa em curto tempo, maior a produtividade em carotenoides e pela independência das variações climáticas, para cultivos em fotobiorreatores. Nestes cultivos é possível obter vantagens ambientais como, por exemplo, somar créditos de carbono, visto que por serem micro-organismos fotoautotróficos, o CO_2 atmosférico utilizado é convertido em moléculas orgânicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral selecionar uma cepa de microalga brasileira com potencial para produção de cantaxantina ou β-caroteno, bem como estudar as condições de cultivo a fim de otimizar a produção do carotenoide mais abundante na espécie selecionada.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar microalgas de ambiente salino e dulcícola;
- Investigar a produção de carotenoides pelas espécies isoladas e selecionar aquela com maior potencial de produção de carotenoides totais;
- Selecionar variáveis importantes na produção de cantaxantina ou β-caroteno pela espécie escolhida, utilizando planejamento experimental do tipo *Plackett-Burman*;
- Otimizar a produção de cantaxantina ou β-caroteno pela espécie escolhida, usando as variáveis selecionadas no *Plackett-Burman*, no planejamento fatorial completo.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Aditivos: definição e legislação brasileira

No Brasil, a portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997 emitida pelo Ministério da Saúde (MS) e pela Secretaria de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014), diz respeito à aprovação do regulamento técnico de aditivos alimentares, incluindo definições, classificação e emprego. Segundo a definição da portaria, aditivo alimentar é:

> Qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

Os aditivos mencionados nesta mesma portaria podem ser: agente de massa; antiespumante; antiumectante; antioxidante; corante; conservadores; edulcorante; espessante; geleificante; estabilizante; aromatizante; umectante; regulador de acidez; acidulante; emulsificante; melhorador de farinha; realçador de sabor; fermento químico; glaceante; agente de firmeza; sequestrante; estabilizante de cor; e espumante (ANVISA, 2014).

Dentre os aditivos permitidos no Brasil, destacam-se aqueles que são usados como corantes, por serem amplamente utilizados nas indústrias de alimentos com o propósito de melhorar a aparência do produto, resultando na aceitabilidade do mesmo.

4.2 Corantes

Os corantes são usados desde a antiguidade, sendo que o mais antigo registro de uso de corantes naturais data de, aproximadamente, a.C. 2600 na China. Há também relatos do uso extratos naturais, como corantes, em preparações de doces e vinhos, em cidades egípcias (a.C. 1500). O primeiro corante sintético surgiu bem depois dos relatos de uso de corantes naturais, por volta de 1856, William Henry Perkin desenvolveu a chamada mauveína (CHAITANYA, 2014).

Nossos sentidos são responsáveis por captar cerca de 87% das percepções pela visão, 9% pela audição e 4% pelo somatório do olfato, paladar e tato. (ANGELUCCI, 1998 apud CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002). Sendo assim, as cores podem acabar exercendo influência em nossas decisões do dia-a-dia (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

A popular expressão “comer com os olhos” revela como a aparência dos alimentos, especialmente a cor, pode influenciar no desejo de consumí-los. Algumas pesquisas mostram que avaliação do consumidor é baseada, primeiramente, na cor do alimento que, por sua vez, é associada ao sabor. Com isso, a indústria de alimentos foca, prioritariamente, em despertar a atração dos consumidores a partir do uso da cor na formulação dos alimentos. (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

A adição de corantes aos alimentos visa, principalmente, restituir sua cor original que, geralmente, é alterada nas etapas de processamento, estocagem, embalagem e/ou distribuição. Sendo assim, os corantes são aplicados para conferir cor a alimentos desprovidos de cor, bem como para realçar a cor de alimentos, de modo a torná-los, visualmente, mais atraentes (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

No Brasil, a resolução nº 44 de 1977 emitida pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde define corante como “a substância ou mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida)” (ANVISA, 2014). No quadro 4.1, são encontradas a classificação, forma de obtenção dos corantes permitidos no Brasil.

Quadro 4.1: Corantes permitidos no Brasil com uso regulamentado pela ANVISA, segundo resolução nº 44 de 1977 (ANVISA, 2014)

Classificação	Origem	Representantes regulamentados para uso em alimentos e bebidas
Corante orgânico natural	Obtido a partir de vegetal ou animal cujo princípio do corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado	Curcumina; riboflavina; cochonilha; ácido carmínico; urzela; orceína; orceína sulfonada; clorofila; vermelho de beterraba; betanina; carvão medicinal; carotenoides: alfa, beta e gama-caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno, flavoxantina, luteína, criptoxantina, rubixantina, violaxantina, rodoxantina, cantaxantina; antocianinas: pelargonidina; cianidina; peonidina; delfinidina; petunidina; malvidina.
Corante orgânico sintético	Obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado	Amarelo crepúsculo; laranja GGN; amarelo ácido ou amarelo sólido; tartrazina; azul brilhante FCF; azul de idantreno RS ou Azul de alizarina; indigotina; bordeaux S ou amaranto; eritrosina; escarlate GN; vermelho sólido E; ponceau 4 R; vermelho 40.
Corante orgânico sintético idêntico ao natural	Obtido por síntese orgânica. Sua estrutura química semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural	Beta-caroteno; beta-apo-8´-carotenal; éster etílico do ácido beta-apo-8´-carotênico; cantaxanteno; complexo cúprico da clorofila e clorofilina.
Corante inorgânico	Substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.”	Carbonato de cálcio; dióxido de titânio; óxido e hidróxido de ferro; alumínio; prata; ouro.
Corante orgânico sintético artificial	Obtido por síntese orgânica. É artificial, não sendo encontrado em produtos naturais	Amarelo crepúsculo; laranja GGN; amarelo ácido ou amarelo sólido; tartrazina; azul brilhante FCF; azul de idantreno RS ou azul de alizarina; indigotina; bordeaux S ou amaranto; eritrosina; escarlate GN; vermelho sólido E; ponceau 4R; vermelho 40.
Caramelo	Corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão	Caramelo.
Caramelo* (processo amônia)	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, equivalentes a um produto cuja intensidade de cor seja de 20.000 unidades EGB (European Bewery Convention correspondente a 0,076 unidades de absorvância, determinada com solução a 0,1% peso por volume, em célula de 1 centímetro a 610 nm	Caramelo amônia.

*Definição de acordo com a resolução CNNPA nº 11, de 1978 que altera a definição do corante caramelo (processo amônio) presente na resolução CNNPA nº 44, de 1977.

Segundo Downham e Collins (2000), o mercado global de corantes em alimentos é representado pelo uso de: 42% de corantes sintéticos, seguido de 27% de corantes naturais, 20% de corantes idênticos ao natural e 11% de corante caramelo. Entretanto, este cenário encontra-se em transição, uma vez que a exigência do mercado consumidor pelo uso de produtos naturais tem aumentado.

4.2.1 Corantes artificiais e corantes naturais

Os corantes naturais e artificiais apresentam tanto pontos positivos, quanto negativos. Segundo Constant, Stringheta e Sandi (2002) os corantes sintéticos são apresentam menor custo de produção e são mais estáveis do que os naturais. Já os corantes naturais apresentam variação de estabilidade no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas, sendo muito sensíveis à oxidação, alterações de pH e variações de luz (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Sob variações de pH as antocianinas sofrem alteração de cor, os carotenoides e clorofilas são susceptíveis à perda de coloração por oxidação, quando expostos à luz, calor e oxigênio (MAPARI et al., 2005).

Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de comprovar os danos que os corantes sintéticos podem causar à saúde, o que têm gerado muita polêmica, principalmente, pelo uso desses corantes em alimentos destinados ao público infantil, como é o caso das guloseimas. No quadro 4.2, estão reunidos alguns exemplos de corantes artificias e seus efeitos à saúde.

Quadro 4.2: Exemplos de corantes artificiais e naturais e seus efeitos na saúde

Corante artificial	Efeito	Corante natural	Efeito
Amarelo crepúsculo, tartrazina e ponceau 4R	Hiperatividade[1]	Luteína	Antimutagênico [4]
Eritrosina, Ponceau 4R, vermelho allura, amarelo crepúsculo, tartrazina, azul brilhante FCF, azorrubina e indigotina	Aumento de ansiedade[2]	Fucoxantina	Prevenção de doenças ósseas[5]
Amaranto	Genotoxicidade[3]	Sifoxantina	Anticâncer[6]
Tartrazina	Genotoxicidade[3]	Malvidina-3-O-glucosídio	Agente hipoglicêmico[7]
Eritrosina	Citotoxicidade[3]	Betanina	Proteção contra danos ao DNA[8]

[1]MCCANN et al. (2007); [2]DOGUC et al. (2015); [3]MPOUNTOUKAS et al. (2010); [4]YASUJI et al. (1996); [5]SWADESH et al. (2010); [6]GANESAN et al. (2011); [7]GRACE et al. (2009); [8]ESATBEYOGLU et al. (2014).

McCann et al. (2007), por exemplo, estudaram a influência da ingestão da combinação de diferentes aditivos alimentícios no comportamento hiperativo de crianças de 3, 8 e 9 anos. Dentre os aditivos presentes na mistura, se encontravam corantes (amarelo crepúsculo, tartrazina, ponceau 4R). O estudo mostrou que o uso da mistura de diversos aditivos aumenta o nível de hiperatividade em crianças de 3, 8 e 9 anos.

Doguc et al. (2015) estudaram a influência de uma mistura de corantes artificiais (eritrosina, ponceau 4R, vermelho allura, amarelo crepúsculo, tartrazina, amaranto, azul brilhante FCF, azorrubina e indigotina) - em proles de mães de ratos submetidas à ingestão na fase da gestação. Os resultados desta pesquisa indicaram que a ingestão dessa mistura de corantes não influenciou no aprendizado espacial, mas reduziu a motivação de fêmeas e aumentou a ansiedade em machos e fêmeas.

Mpountoukas et al. (2010) investigou o efeito dos corantes amaranto, eritrosina e tartrazina em células sanguíneas humanas. Neste estudo foi possível constatar, para estas células, que o amaranto e a tartrazina apresentam um efeito genotóxico e que a eritrosina apresenta citotoxicidade.

Diante deste cenário, o número de aditivos sintéticos permitidos em países desenvolvidos tem diminuído com o passar do tempo, o que tem favorecido o uso dos corantes naturais. O destaque que tem sido dado ao uso de corantes naturais na indústria de alimentos, advém não somente da tendência mundial pelo consumo de produtos naturais, como também pelas propriedades funcionais já conhecidas em alguns desses pigmentos (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002) (quadro 4.2), como é o caso dos carotenoides.

Dentre os corantes naturais mais empregados nas indústrias de alimentos estão: extratos de urucum, curcumina, carmim de cochonilha, antocianinas e betalaínas (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002). O uso do urucum é bem recorrente, sendo a bixina o principal carotenoide que o compõe, segundo Tocchini e Mercadante (2001).

4.3 Carotenoides

4.3.1 Carotenoides: características químicas e fontes produtoras

Os carotenoides são tetraterpenoides, ou seja, são moléculas formadas por oito unidades isoprenoides (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004) (figura 4.1).

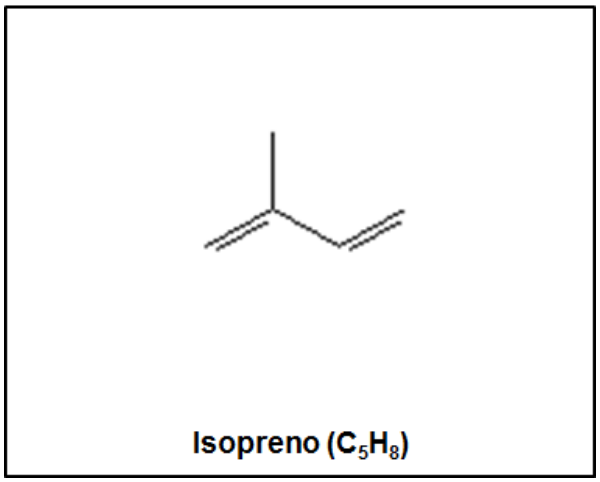


Figura 4.1: Unidade de isopreno.

Estas moléculas, em geral, são constituídas por 40 átomos de carbono, contudo segundo Weedon e Moss (1995), também é possível encontrar carotenoides com cadeias carbônicas maiores e menores. Por exemplo, alguns carotenoides podem apresentar 45 ou 50 átomos de carbono devido a adição de uma ou duas moléculas de isopreno à cadeia com 40 átomos de carbono, como é o caso do carotenoide decaprenoxantina. Os carotenoides com número de carbonos menor que 40 são chamados de apocarotenoides e norcarotenoides. Os apocarotenoides são resultado de alterações em um ou dois terminais da cadeia com 40 carbonos e os norcarotenoides resultam de alterações internas na molécula com 40 carbonos, podendo apresentar 39 e 38 átomos de carbono. A bixina e a norbixina, por exemplo, são carotenoides com 24 átomos de carbono em sua estrutura molecular (figura 4.2).

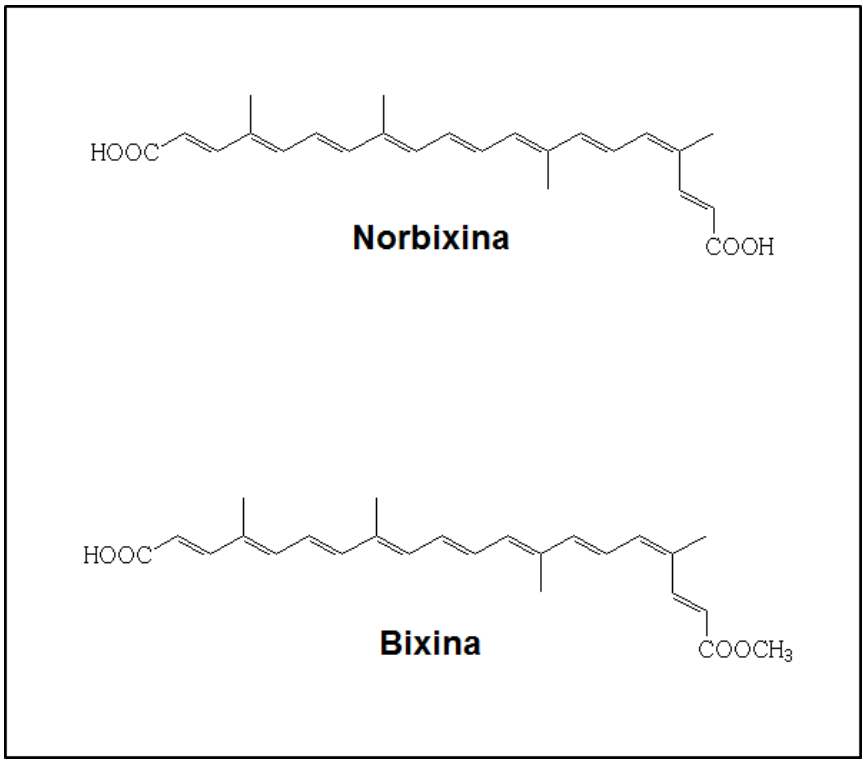


Figura 4.2: Estrutura molecular dos carotenoides norbixina e bixina, presentes em sementes de Urucum. Estes carotenoides apresentam 24 átomos de carbono.

Os carotenoides fazem parte de uma família de compostos naturais que apresentam coloração amarela, laranja e vermelha (FONTANA et al., 2000) e apresentam cerca de 700 representantes (ERNST, 2002) que podem ser produzidos por bactérias, algas, fungos, plantas superiores (FONTANA et al., 2000). A presença de carotenoides também é vista em animais, como em crustáceos (camarão, lagosta, siri), em penas de aves (ex.: flamingo), em tecidos de peixes (ex.: truta e salmão), entre outros (GORDON, BAUERNFEIND E FURIA, 1982; VALDUGA et al., 2009). Porém, animais não são capazes de sintetizar estes pigmentos, os mesmos acumulados por via da alimentação (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995). No quadro 4.3, podemos observar alguns exemplos de fontes produtoras de carotenoides, bem como os principais carotenoides produzidos por elas e suas cores.

Quadro 4.3: Exemplos de carotenoides encontrados na natureza, suas cores e exemplos de fontes produtoras

Carotenoide	Cor	Exemplos de fontes de carotenoides
Luteína	**Amarelo**	*Chlorella sorokiniana, Cucurbita moschata* (abóbora goianinha)
Zeaxantina	**Amarelo alaranjado**	*Dunaliella salina*, milho-verde
β-caroteno	**Laranja**	*Dunaliella salina*, *Malpighia glabra* (acerola), *Daucus carota* (cenoura), *Rhodotorula rubra* (levedura)
Bixina	**Laranja**	*Bixa orellana* (Urucum)
Norbixina	**Laranja**	*Bixa orellana*
Licopeno	**Vermelho alaranjado**	*Psidium guajava* (goiaba), *Lycopersicum esculentum* (tomate Carmen), *Blakeslea trispora* (fungo filamentoso)
Cantaxantina	**Vermelho alaranjado**	*Haematococcus pluvialis* (microalga), *Chlorella zofingiensis (*microalga), *Rhodococcus maris* (bactéria)
Astaxantina	**Vermelho**	*Haematococcus pluvialis Chlorella zofingiensis, Xanthophyllomyces dendrorhous*

Fonte: DOWNHAM; COLLINS (2000); MULDERS et al. (2014); RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN (2008); VALDUGA et al. (2009); TAGHI et al. (2013).

Na natureza existem duas classes de carotenoides: carotenos e xantofilas (figura 4.3). A primeira classe é caracterizada por apresentar uma cadeia hidrocarbônica que pode ser linear ou ciclizada em um ou nos dois terminais da molécula. Já a segunda classe, se trata de derivados oxigenados dos carotenos (EONSEON et al., 2003). Os grupos oxigenados substituintes, comumente, encontrados nas xantofilas são: hidroxila (encontrado na β-criptoxantina), ceto (encontrado na cantaxantina), epóxido (encontrado na violaxantina) e aldeído (encontrado na β-citraurina) (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

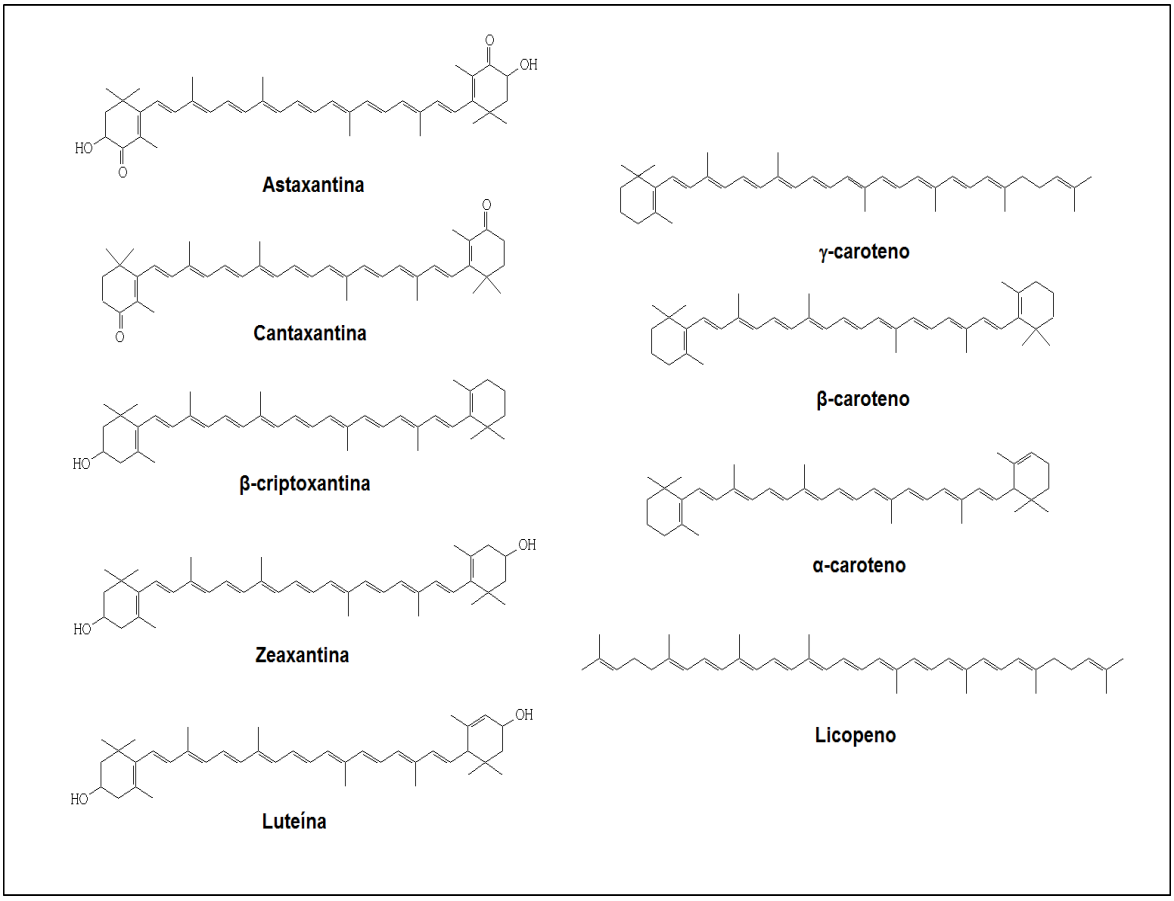


Figura 4.3: Exemplos de xantofilas (à esquerda) e carotenos (à direita).

As diferentes estruturas de carotenoides são derivadas de um mesmo esqueleto básico, geralmente, composto por 40 carbonos e são formadas a partir de modificações, tais como: ciclizações, substituições, eliminações, adições e rearranjos (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995). As modificações na molécula podem gerar carotenoides acíclicos (como a molécula do licopeno), monocíclicos (como a molécula do γ-caroteno) ou bicíclicos (como as moléculas de α- e β-caroteno) (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008), conforme figura 4.3.

Ademais, os carotenoides são substâncias lipofílicas e, geralmente, são insolúveis em água. A absorção de luz característica destes pigmentos é explicada pela presença de longo cromóforo de duplas ligações conjugadas, a chamada cadeia poliênica. Portanto, um grupo cromóforo com sete ou mais ligações duplas é responsável pela absorção de luz na região visível que compreende o amarelo, laranja e vermelho. Além disso, a estrutura poliênica confere vulnerabilidade a

degradações oxidativas e isomerizações geométricas por meio da incidência de luz, calor ou acidez (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995).

4.3.2 Carotenoides: aplicações, propriedades e efeitos na saúde

Na indústria de alimentos, os carotenoides podem apresentar duas funções, são elas: conferir cor aos alimentos sem cor ou uniformizar a coloração para torná-los mais atraentes; e enriquecer os alimentos, fornecendo valor nutricional. Carotenoides como astaxantina, cantaxantina, β-caroteno, bixina, norbixina e licopeno, já são usados com estes propósitos (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013). Além de sua aplicação na indústria de alimentos, os carotenoides, também podem ser usados nas indústrias de cosméticos, suplementos alimentares e fármacos. No quadro 4.4, é possível observar alguns exemplos das aplicações de carotenoides em produtos que já são comercializados.

Quadro 4.4: Produtos comercializados que apresentam carotenoides em sua composição

Carotenoide	Produto	Marca/ Fabricante	Aplicação e/ou função
Astaxantina	Carophyll® Stay Pink	DSM	Aditivo para rações de aves, peixes e camarões
β-caroteno	Beta Caroteno	Sundown Naturals	Suplemento alimentar (cápsulas)
β-caroteno	CaroCare ®	DSM	Suplemento alimentar (cápsulas)
β-caroteno	Rovimix ®	DSM	Suplemento para ruminantes
β-caroteno	Doce Marrom Glacê	Predilecta ®	Corante
β-caroteno	Suco de maracujá com soja	Shefa	Corante
β-caroteno	Rondelli de presunto com mussarela, quatro queijos, calabresa com catupiri e frango com catupiri	Massas Milena	Não especificada
β-caroteno	Suco de Tangerina	Maguary	Corante
β-caroteno e Urucum	Colágeno hidrolisado versão verão	Sanavita	Urucum: corante. β-caroteno: não especificada
β-caroteno e licopeno	Inneov Solar	Nestlé e L'oréal	Suplemento alimentar (cápsulas)
β-caroteno, luteína e Zeaxantina	Vitalux™ Plus	Novartis	Prevenção da degeneração macular relacionada à idade
β-caroteno e Urucum	Suco de morango e kiwi com soja	Shefa	Corante
Cantaxantina	Carophyll® Red	DSM	Aditivo em rações de aves, peixes e camarões
Licopeno	Lycopene	Sundown Naturals	Suplemento alimentar (cápsulas)
Luteína	Teína	Eurofarma	Suplemento alimentar (cápsulas)
Luteína	Linha Profuse Ensolei	Aché	Antioxidante para a pele em dermoscosmético
Luteína	Ionzyme® C Quence creme	Skinlumina	Dermocosmético. Função não especificada
Urucum	Picolé de maracujá e sorvete de maracujá	Sorvete Itália	Corante
Urucum	Shake Banana com Aveia	Itambé	Corante
Urucum	Petit Suisse Itambezinho Vitamina	Itambé	Corante
Urucum	Minha gelatina sabor abacaxi	Dr. Oetcker	Corante
Urucum	Freegells Naturals sabor Cítrus	Riclan	Corante
Urucum	Colágeno hidrolisado sabor tangerina	Sanavita	Corante
Urucum	Cremogema sabor tradicional	Maisena	Corante
Caroteno* e urucum *Não especificado	Iogurte Vigor grego com creme adoçado, calda e pedaços de frutas. Sabor frutas amarelas	Vigor	Corante

Fonte: Informações retiradas dos rótulos dos produtos ou das *homepages* dos fabricantes.

Os carotenoides apresentam diversos benefícios já comprovados à saúde humana. A função mais conhecida dos carotenoides é a atividade pró-vitamínica A, a qual depende que a molécula contenha, ao menos, um anel β não substituído com uma cadeia poliênica de, no mínimo, 11 carbonos. O β-caroteno, o γ-caroteno, o α-caroteno, a β-criptoxantina e a α-criptoxantina apresentam esta atividade, sendo o β-caroteno a única molécula capaz de gerar duas moléculas de retinol (vitamina A) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Na figura 4.4 é possível observar a formação de duas moléculas de retinol a partir de uma molécula de β-caroteno.

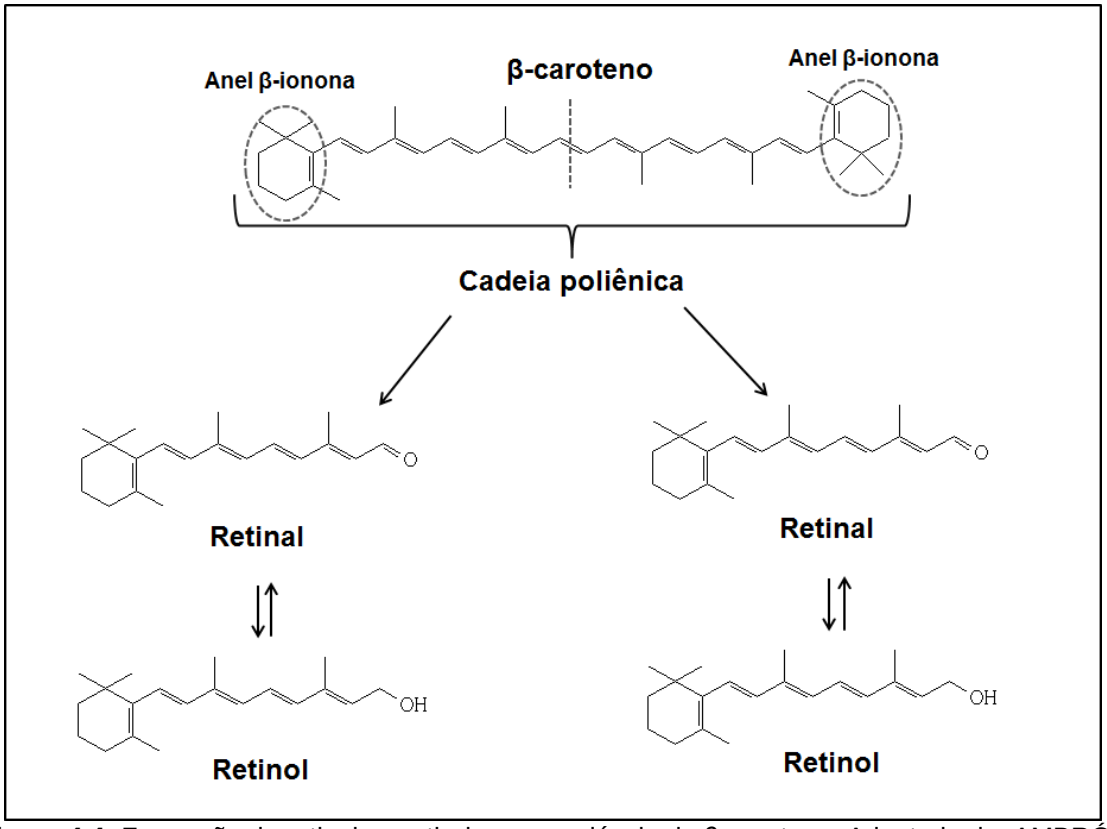


Figura 4.4: Formação do retinol a partir de uma molécula de β-caroteno. Adaptado de: AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO (2006).

Em sistemas biológicos, o estresse oxidativo produzido por um agente pró-oxidante causa o aumento dos danos oxidativos como, por exemplo, a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (PALOZZA, 1998). Os carotenoides podem apresentar ação antioxidante, atuando na neutralização da oxidação das moléculas alvo de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são altamente oxidantes. Em estudo comparativo das atividades antioxidantes de alguns carotenoides, Naguib (2000)

constatou que a astaxantina apresenta maior atividade quando comparada ao α-caroteno, β-caroteno, luteína e licopeno.

Os carotenoides também podem ser pró-oxidantes. Neste caso, estes pigmentos ao invés de mitigarem o efeito oxidativo de ERO em biomoléculas, eles acabam por induzir ao estresse oxidativo. Testes realizados por Beutner et al. (2001) mostraram que a astaxantina, a cantaxantina e a zeaxantina atuam como antioxidantes, enquanto que o β-caroteno e o licopeno apresentam tanto atividade antioxidante quanto pró-oxidante. Porém, quando o β-caroteno e o licopeno se encontravam em concentrações maiores que 7,7 $x10^{-4}$ M, nenhum produto de oxidação foi encontrado. Esses resultados sugerem que a função cetona associada à cadeia poliênica, como ocorre nas moléculas de cantaxantina e astaxantina, por exemplo, é capaz de estabilizar os radicais de carbono na região central de forma mais eficiente do que somente a cadeia poliênica (JACKSON; BRAUN; ERNST, 2008). Ademais, Palozza (1998) relata que a atividade pró-oxidante do β-caroteno pode depender também da pressão parcial de oxigênio que quando é baixa favorece a atuação do β-caroteno como antioxidante e quando aumenta faz com que este carotenoide exiba comportamento pró-oxidante.

Devido à capacidade de prevenir a produção excessiva de ERO, os carotenoides também se mostram benéficos na prevenção de doenças que podem ser mediadas pela ação de ERO (FIEDOR; BURDA, 2014) (figura 4.5).

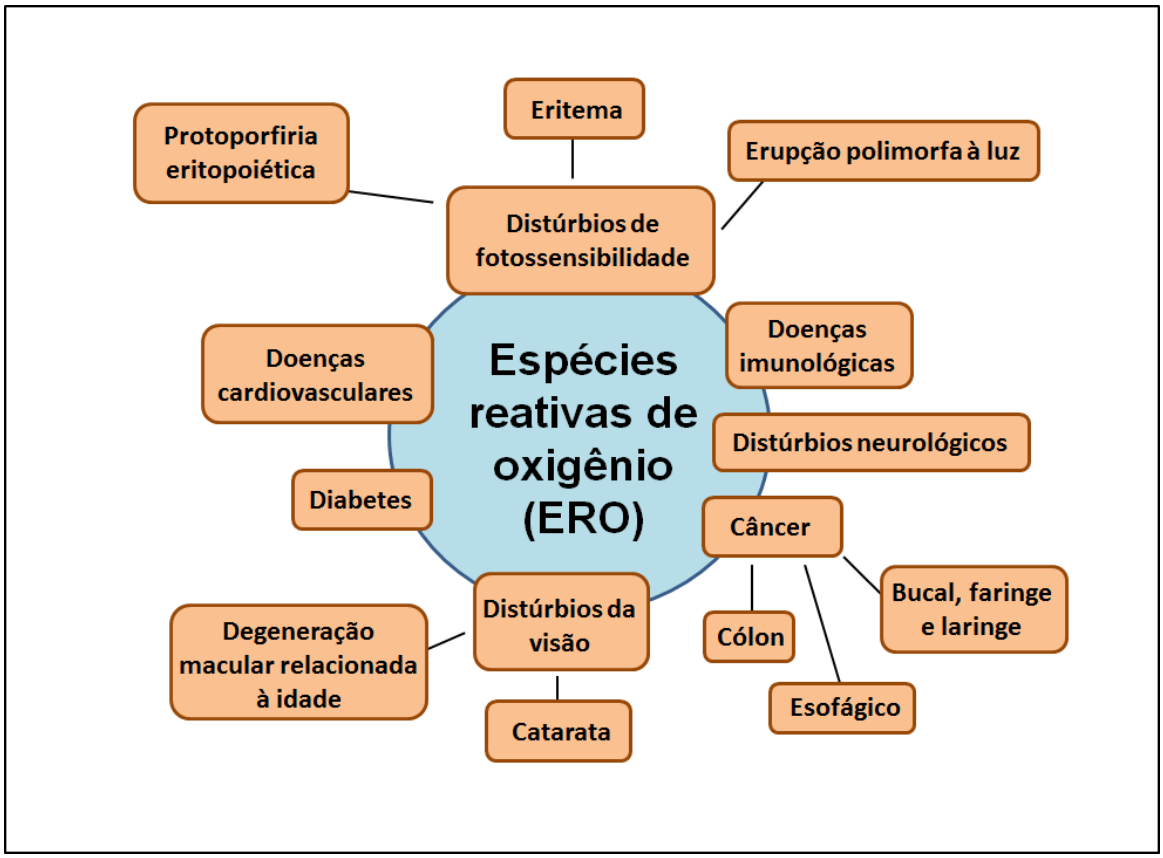


Figura 4.5: Distúrbios que podem ser causados por espécies reativas de oxigênio e que podem apresentar efeitos benéficos quando os carotenoides são usados. Adaptado de: Fiedor e Burda (2014).

Sluijs et al. (2015) investigaram a associação de uma dieta rica em carotenoides com a incidência de diabetes do tipo 2. Os carotenoides incluídos na dieta de homens e mulheres foram: o β-caroteno, o α-caroteno, β-criptoxantina, licopeno, luteína com zeaxantina e a soma de todos esses carotenoides. Neste trabalho, a ingestão de β-caroteno e α-caroteno se mostrou favorável à redução da diabetes do tipo 2 tanto em homens quanto em mulheres.

Pesquisas com camundongos mostraram que uma dieta à base de biomassa de *Dunaliella* (microalga) em pó contendo 0,6% de β-caroteno é capaz de reduzir os níveis de colesterol no plasma sanguíneo, além de inibir a progressão da arteroesclerose em dietas ricas em gordura (HARARI et al. 2013).

Camundongos submetidos à ingestão de uma solução gerada a partir da biomassa de microalga *Haematococcus* pluvialis, rica em astaxantina foram avaliados quanto à exaustão quando submetidos à atividade física. A

suplementação de astaxantina na alimentação desses camundongos atrasou, siginificativamente, a exaustão desses animais quando forçados a nadar. Com isso, sugeriu-se que uma alimentação contendo astaxantina pode ajudar a melhorar o desempenho em exercícios aeróbicos (POLOTOW et al., 2014).

4.3.3 Carotenoides: mercado mundial e brasileiro

Os carotenoides disponíveis no mercado são produzidos por síntese química, microbiana, ou ainda podem ser obtidos pela extração a partir de fontes vegetais (VALDUGA et al., 2009).

Em 1954, a produção comercial de β-caroteno por síntese química foi iniciada pela Roche, seguida da produção de β-apo-8'-carotenol em 1960 e, em 1965, a cantaxantina começou a ser produzida pela mesma indústria (GORDON; BAUERNFEIND; FURIA, 1982).

Na literatura consultada, não foi encontrado levantamento atual referente à produção comercial de carotenoides por síntese química. De acordo com Ernst (2002), os carotenoides sintéticos produzidos em escala industrial são: licopeno, β,β-caroteno, (3R,3'R)-zeaxantina, cantaxantina e astaxantina. Segundo este mesmo autor, as empresas BASF e Hoffmann-La Roche são responsáveis pela produção de β-caroteno, astaxantina e cantaxantina. Sendo que a Hoffmann-La Roche também é produtora de zeaxantina.

Mercados desenvolvidos como os Estados Unidos e a Europa são os maiores responsáveis pelas vendas de carotenoides no mercado global. Porém, estima-se que países como a China, Índia, Japão e Malásia sejam responsáveis por significativas vendas nos próximos anos (FOOD PRODUCT DESIGN, 2011).

De acordo com a divulgação do relatório da *Global Industry Analysts*, a crescente demanda por alimentos naturais e saudáveis tem estimulado o mercado mundial de carotenoides que poderá chegar a US$ 1,4 bilhões em 2018 (BCC RESEARCH, 2018). Ademais, é previsto que nos próximos anos, os carotenoides naturais sejam vistos com maior aceitação pelo mercado consumidor, reduzindo a participação de carotenoides sintéticos, já que é crescente a demanda por alimentos fortificados e naturais. De acordo com o relatório, o β-caroteno que apresenta amplo uso na indústria de alimentos e suplementos, representa a maior parcela do mercado global

de carotenoides, embora não haja menção de valores. Além disso, o conhecimento sobre os efeitos benéficos dos carotenoides na saúde contribuiu positivamente sobre o mercado global dos carotenoides nos Estados Unidos (FOOD PRODUCT DESIGN, 2011).

Com relação ao mercado brasileiro de carotenoides, pode-se observar uma escassez literária. Portanto, informações sobre o importações e exportações do comércio brasileiro foram buscadas no Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior, denominado AliceWeb, a partir da inserção da Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM). Os produtos pesquisados da tabela NCM foram:

- Carotenoides (NCM 32041911);
- Outras preparações à base de carotenoides (NCM 32041919);
- Preparações contendo β-caroteno, ésteres metílicos ou etílicos do ácido 8’-apo-β-carotênico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina próprias para colorir alimentos (NCM 32041912).

A partir do levantamento dos dados, foi possível gerar a tabela 4.1, onde se encontram as informações de importação e exportação desses três produtos pesquisados. No período de 2010 a 2014, o Brasil importou um total de 776.060 kg de carotenoides, movimentando US$ 9.968.158. Já para o mesmo período, exportou apenas 7.607 kg, o que correspondeu a US$ 505.186.

Tabela 4.1: Informações sobre a importação e exportação no mercado brasileiro de: carotenoides (NCM 32041911); preparações contendo β-caroteno, ésteres metílicos ou etílicos do ácido 8'-apo-β-carotênico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina próprias para colorir alimentos (NCM 32041912); outras preparações à base de carotenoides (NCM 32041919)

	NCM 32041911		**NCM 32041912**		**NCM 32041919**	
Ano	**Importação (US$)**	**Exportação (US$)**	**Importação (US$)**	**Exportação (US$)**	**Importação (US$)**	**Exportação (US$)**
2010	2.440.475	30.379	2.419.355	41.528	2.462.839	392
2011	2.399.371	312.956	2.650.674	99.646	1.541.834	25.263
2012	1.368.307	41.757	2.833.573	57.096	1.926.245	5.015
2013	1.804.478	36.129	2.958.395	59.662	2.174.491	12.917
2014	1.955.527	83.965	2.844.693	40.720	2.386.717	1.850

Ano	**Importação (kg)**	**Exportação (kg)**	**Importação (kg)**	**Exportação (kg)**	**Importação (kg)**	**Exportação (kg)**
2010	429.707	25	47.397	300	961.436	5
2011	101.168	5.544	59.126	1.850	629.934	1.212
2012	53.601	531	67.741	943	820.464	410
2013	62.069	471	75.178	1.190	892.453	855
2014	129.515	1.036	74.640	1.145	1.060.076	146

Fonte: AliceWeb (2015).

De acordo com a tabela apresentada, pode-se notar que os gastos com a importação das preparações representadas pelas NCMs 32041919 e 32041912 no período de 2010 a 2014 foram, respectivamente, US$ 10.492.126 (4.364.363 kg) e US$ 13.706.690 (324.082 kg). Com relação à exportação, nota-se uma pequena participação, correspondendo a US$ 45.437 (2.628 kg) para os produtos incluídos na NCM 32041919 e US$ 298.652 (5.428 kg) para as preparações cuja NCM é 32041912.

As informações encontradas na base de dados AliceWeb não especificam se os carotenoides representados pela NCM 32041911 e os contidos nas preparações representadas pelas NCM 32041919 e NCM 32041912 são sintéticos ou naturais. Além disso, a especificação de quais são os carotenoides incluídos nos produtos de NCM 32041911 e NCM 32041919 também não é dada.

Diante dos dados apresentados na tabela 4.1, é possível perceber que o cenário econômico dos carotenoides no Brasil é marcado, sobretudo pela importação destes pigmentos, das preparações à base de carotenoides e preparações contendo β-caroteno, ésteres metílicos ou etílicos do ácido 8’-apo-β-carotênico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina próprias para colorir alimentos. Tal fato, sinaliza que os carotenoides produzidos no Brasil não são suficientes para suprir as demandas internas.

Considerando a quantidade (kg) importada dos três produtos pesquisados nos últimos quatro anos (de 2010 a 2014) como 100%, pode-se perceber que 80% do que foi importado é referente à produtos cuja NCM é 3204191919, seguida de 14% de produtos representado pela NCM 32041911 e 6% de produtos com NCM 32041912 (figura 4.6).

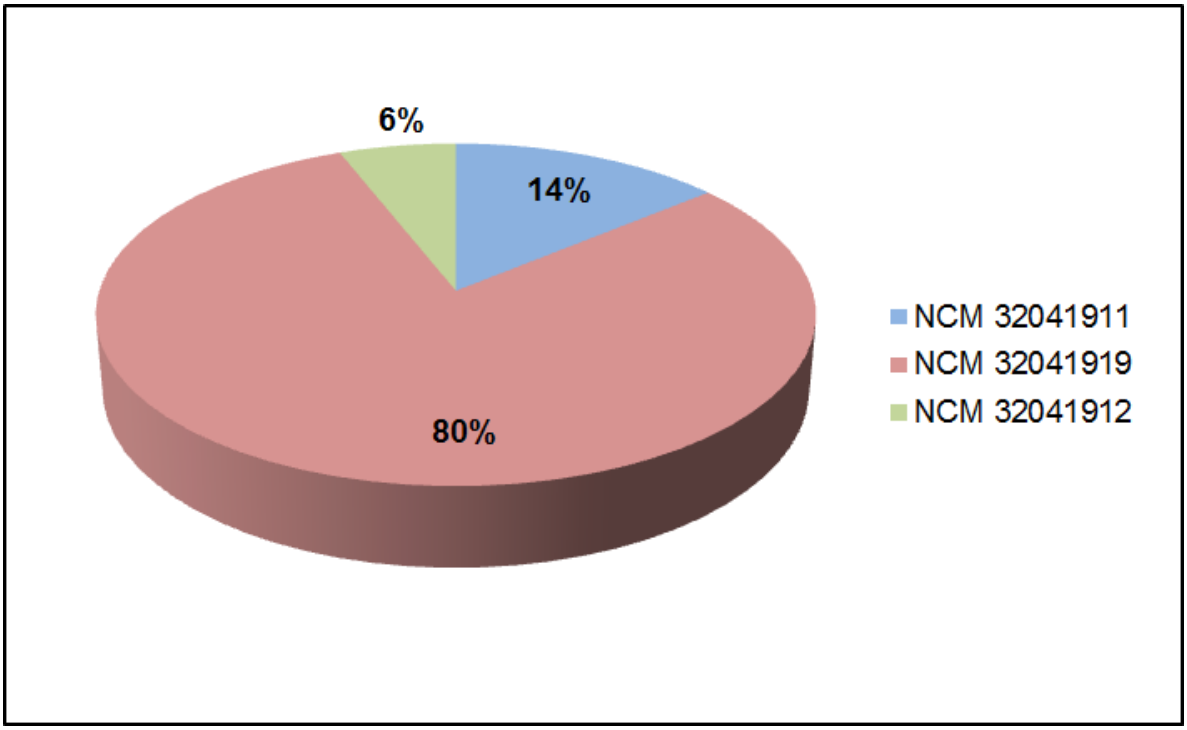


Figura 4.6: Representação gráfica da quantidade (kg) de carotenoides e produtos contendo carotenoides ou algum tipo de carotenoide importada no período de 2010 a 2014 (NCM 32041911: carotenoides; NCM 32041912: preparações contendo β-caroteno, ésteres metílicos ou etílicos do ácido 8'-apo-β-carotênico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina próprias para colorir alimentos; NCM 32041919: outras preparações à base de carotenoides).

No quadro 4.5, estão reunidas as empresas que produzem carotenoides no Brasil encontradas em buscas pela internet, já que não foram encontrados dados na literatura científica consultada. Note-se que todas as empresas compiladas são produtoras de corantes à base de urucum, ou seja, a partir de extração vegetal. A empresa Tebracc é a única que comercializa β-caroteno (sintético), mas não informa se o mesmo é produzido por eles ou se é, simplesmente, revendido.

Quadro 4.5: Empresas encontradas no Brasil que atuam no ramo da produção de corantes naturais

Empresa	***Homepage* das empresas**	**Produto Comercial**
Corantec ®	www.corantec.com.br/index.html	PA LIPO; PA HIDRO; PA3 HS; PA3 Colorífico
Duas Rodas Industrial	www.duasrodas.com/produtos/condimentos-e-aditivos/corantes-naturais	Corante Urucum Hidrossolúvel Líquido e Corante Urucum Hidrossolúvel em Pó
Sanrisil	www.sanrisil.com.br/corantes.htm	Corante Natural Urucum
Tecnocor Corantes Naturais	www.tecnocor.ind.br/produtos/hidrossoluvel/hidrossoluvel.htm	Hidrovita – Urucum
Baculerê Corantes Naturais	www.baculere.com.br/ex_urucum.htm	Extrato Lipossolúvel de Urucum; Extrato Hidrossolúvel de Urucum; Susupensão Concentrada de Urucum; Bixina em pó e Norbixina em pó.
Aditivos e condimentos IBRAC	www.ibrac.com.br	Solução de Corante Vegetal de Urucum para Revestimento de Carne; Solução de Corante Vegetal de Urucum e Curcuma para Revestimento de Carne.
Kratos corantes naturais	www.kratoscorantesnaturais.com.br/index.php?pagina=produto#titulo	Corante natural de urucum hidrossolúvel; Suspensão oleosa de urucum lipossolúvel; Bixina em pó.
Temperart temperos sob medida	www.temperart.com.br/#!/temperos-e-realcadores-de-sabor	Corante Natural Urucum em Pó; Corante Natural Urucum em Líquido.
Tebracc – Técnica brasileira de corantes e condimentos	www.tebracc.com.br/produtos.htm	Bixon; Mix-Cor; Hidromix; Urucum em Pó; Colorífico; Mix Cor C; Vitamassa-U; Vitamassa-U Hidro; Vitamassa e Vitamassa Hidrossolúvel.
Proregi Aditivos para Alimentos	www.proregi.com.br/outros-aditivos.html	Corante de urucum
Hot Flavour Alimentos Ltda.	www.hotflavour.com.br/produtos-alimentos.htm	Colorífico
New Max	www.newmaxindustrial.com.br/ver-produto/corantes	Corante Natural de Urucum Hidrossolúvel C166; Corante Natural de Urucum Hidrossolúvel C206; Corante Natural de Urucum Hidrossolúvel C266; Corante Natural de Urucum Hidrossolúvel Conc. 1,5.
Firace	www.firace.com.br/produtos.php	Xantêne Original; Xantêne Super; Xantêne Churros; Xantêne Pó; Xantêne Pão de Queijo; Cortêne Red; Cortêne Hidro; Colorífico; Protenê.
Vivare Insumos	www.vivare.com.br	Corante Natural de Urucum

4.4 Produção de carotenoides

Conforme visto no tópico anterior, todas as empresas produtoras de carotenoides no Brasil - encontradas no levantamento - usam uma fonte vegetal, o urucum, para a obtenção de carotenoides. Apesar do Brasil já apresentar essa produção de carotenoides, ainda gastam-se grandes quantias com a importação de carotenoides (tópico 4.3.3.), o que pode indicar a existência de uma demanda interna por esses corantes.

Além do urucum que produz, principalmente, bixina e norbixina, existem outras fontes produtoras de carotenoides que poderiam aumentar a variedade desses corantes no mercado nacional. Isto porque diferentes fontes podem produzir diversos tipos de carotenoides com outras cores e distintas propriedades benéficas à saúde.

No Brasil existem diversas fontes vegetais produtoras de carotenoides. Porém, segundo Valduga et al. (2009) a produção biotecnológica de carotenoides tem ganhado destaque pelas seguintes razões:

- ★ Possibilidade do uso de meios de cultura de baixo custo para a produção;
- ★ Controle das condições de cultivo;
- ★ Necessidade de pequenas áreas para produção;
- ★ Independência das variações climáticas, estações do ano e composição do solo.

Muitos micro-organismos são produtores de carotenoides, dentre eles são encontradas bactérias, microalgas (procarióticas e eucarióticas), leveduras e fungos filamentosos (ZHANHUA et al., 2011). Alguns exemplos podem ser dados, como: as bactérias *Corynebacterium michiganense* e *Micrococcus roseus*, o fungo filamentoso *Blakeslea trispora*, as leveduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Rhodotorula glutinis* e as microalgas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* (MATA-GÓMEZ et al., 2014). Frente a outros micro-organismos, as microalgas se destacam pela

atuação no resgate de carbono atmosférico através da fotossíntese, bem como na emissão de oxigênio para a atmosfera.

4.5 Microalgas

As algas são organismos fotossintéticos que podem ser uni ou pluricelulares. Dentro da diversidade deste grupo, estão incluídos os organismos procarióticos, assim como os eucarióticos que abrange os protistas autotróficos e heterotróficos e organismos multicelulares (BICUDO; MENEZES, 2010). As microalgas, cujo termo não tem valor taxonômico (RAVEN et al., 2001 apud DERNER et al., 2006), são organismos fossintetizantes, microscópicos, unicelulares, procariotos e eucariotos, autótrofos e heterótrofos (OLAIZOLA, 2003) que se encontram dentro do grupo das algas.

As microalgas procarióticas são representadas por micro-organismos da divisão Cyanophyta que são bactérias, popularmente conhecidas como algas azuis, cianobactérias ou cianofíceas (PREISIG; ANDERSEN, 2013; JEFFREY; WRIGHT; ZAPATA, 2012). Já algumas algas eucarióticas são divididas de acordo com a composição de pigmentos das antenas de captação de luz em: Rhodophyta (algas vermelhas), Chrysophyta (algas douradas), Phaeophyta (algas marrons) e Chlorophyta (algas verdes) (MAZOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK, 2013).

Esses micro-organismos apresentam diferenças morfológicas, sendo as mais recorrentes: ameboide (ex.: *Chrysamoeba*), palmeloide (ex.: *Pavlova*), cocóide *(*ex.: *Chlorella*), filamentosa (ex.: *Spirulina)*, flagelada (ex.: *Tetraselmis)* e sarcinoide (ex.: *Chlorosarcina*) (PREISIG; ANDERSEN, 2013). Além disso, as microalgas podem ser encontradas nos mais diversos habitats, como cavernas, neve, águas termais e hipersalinas, em relações de simbiose e parasitismo (TEBBANI et al., 2014) (figura 4.6). Com relação à cadeia trófica, ocupam a base da cadeia alimentar em ecossistemas aquáticos (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011).

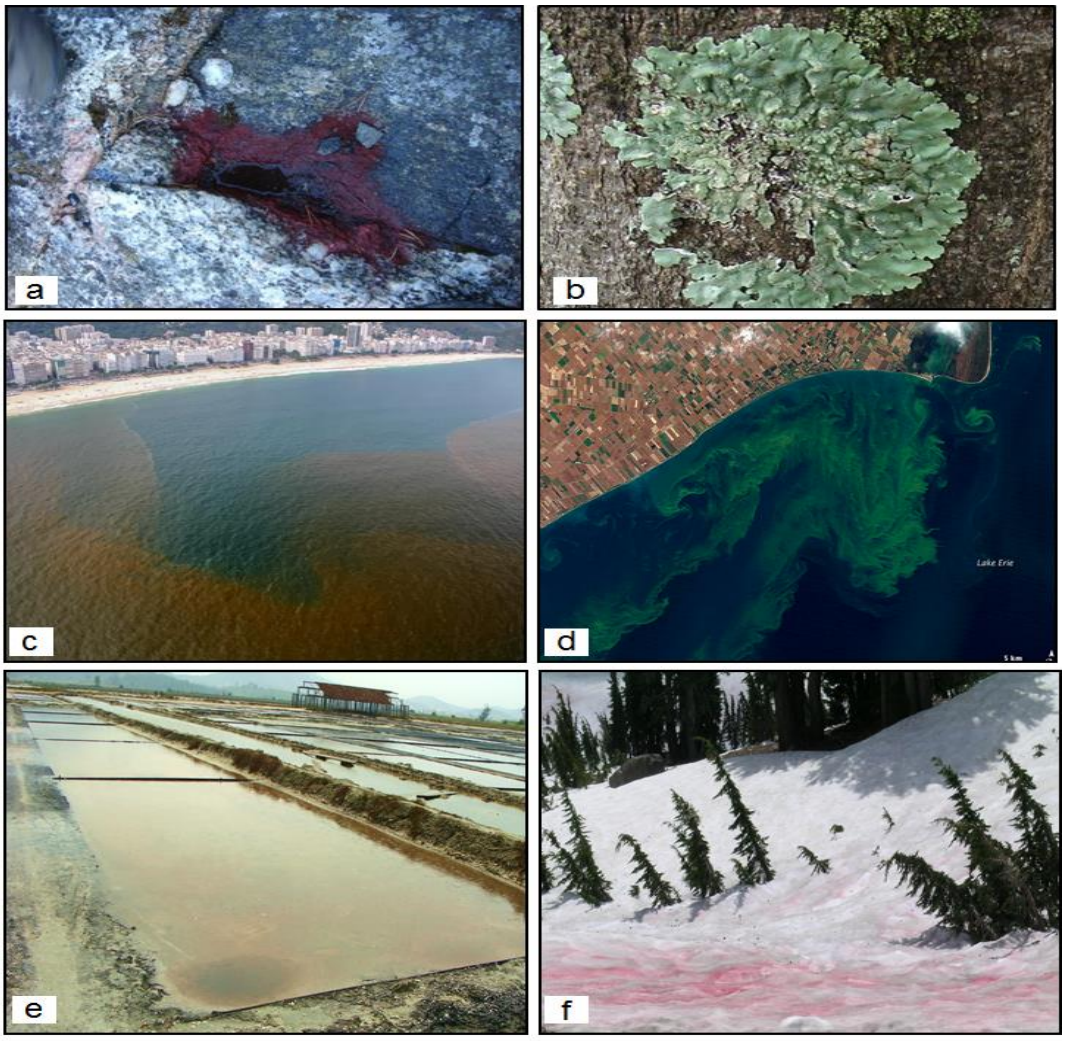


Figura 4.7: Exemplos de ambientes onde as microalgas podem ser encontradas: a) Rochas com *Haematoccocus pluvialis*; b) Líquen em tronco de árvores (simbiose entre fungo e microalga); c) *Bloom* de microalgas no mar em Copacabana – RJ; d) *Bloom* de microalgas no lago Erie – América do Norte; e) Área de produção de sal com *Dunaliella salina*; f) Neve com *Chlamydomonas nivalis*. Fonte: CHEKANOV et al., 2014; MEC, 2015; GLOBO, 2015; NASA, 2015; PLANT SYSTEMATICS, 2015.

Assim como outros organismos fotossintéticos, as microalgas usam a energia solar para sintetizar moléculas orgânicas, a partir do dióxido de carbono (CO_2) e da água (H_2O), liberando oxigênio (O_2):

$$6CO_2 + 6H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

Fonte: Taiz e Zeiger (2002).

A radiação fotossinteticamente ativa (diversos comprimentos de onda da região visível), presente no espectro luminoso da luz solar, é captada por diferentes grupos de pigmentos acessórios à fotossíntese (MAZOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK, 2013) (figura 4.7). Sendo as clorofilas, os carotenoides e as ficibiliproteínas os grupos de pigmentos que são encontrados em microalgas (MULDERS et al., 2014). Todavia, a composição de pigmentos acessórios do complexo-antena é distinta nas diversas classes de organismos fotossintetizantes (TAIZ; ZEIGER, 2002).

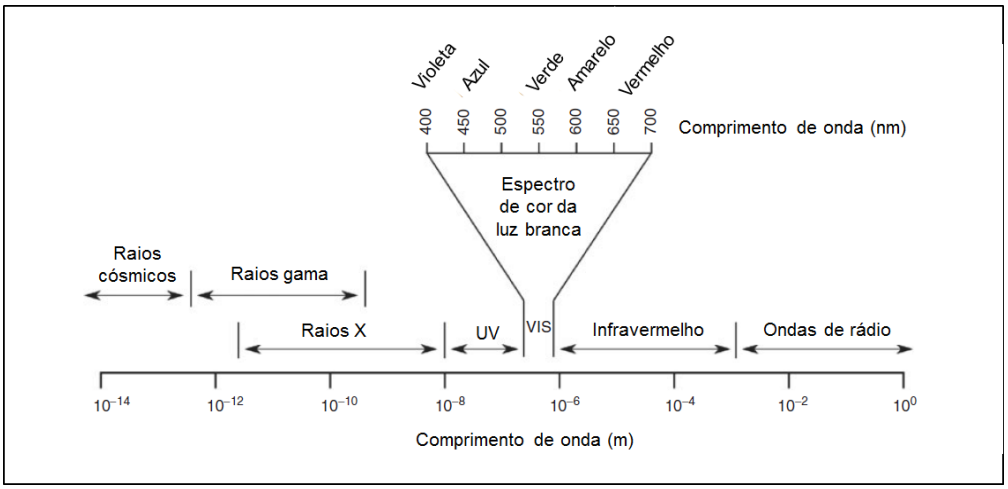


Figura 4.8: Espectro da radiação eletromagnética com destaque para o espectro visível. As abreviações da figura significam: UV – ultravioleta; VIS – visível. Adaptado de: MAZOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK (2013).

O pigmento fotossintético e os pigmentos acessórios apresentam um comprimento de onda de absorção de energia. Sendo assim, após a captação de energia pelos pigmentos acessórios, há a transferência da mesma entre os pigmentos até que ela chegue ao pigmento fotossintético (geralmente clorofila a) localizado no centro de reação do fotossistema.

4.6 Carotenoides em microalgas

Os carotenoides são pigmentos podem ter função primária e secundária nos organismos fotossintetizantes. Os carotenoides primários atuam como pigmentos acessórios à fotossíntese e também são considerados com função primária, quando protegem o aparato fotossintético contra o estresse causado pelo excesso de luz

(YOUNG, 1991). No que tange aos carotenoides secundários, estes também têm efeito fotoprotetor e são produzidos em grande quantidade em resposta a diferentes estresses ambientais.

4.6.1 Carotenoides primários: captação de energia luminosa e fotoproteção

Os carotenoides primários localizam-se no complexo-antena das microalgas onde atuam como pigmentos acessórios à fotossíntese. Estes pigmentos são responsáveis pela captura da energia luminosa na faixa de 400 a 550 nm que corresponde à região azul-verde do espectro visível (figura 4.8) (MAZOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK, 2013).

De acordo com Bidigare et al. (1993), os carotenoides primários também têm ação fotoprotetora por neutralizarem o estado triplete da clorofila e moléculas de oxigênio singlete. O efeito fotoprotetor é induzido quando há excesso de energia luminosa e o estado excitado da clorofila não consegue ser rapidamente mitigado pela transferência de excitação. Neste estado, a clorofila pode reagir com moléculas de oxigênio que passam para o estado excitado da molécula, como o oxigênio singlete – $^{1}O_{2}^{*}$) (TAIZ; ZEIGER, 2002). A formação do estado excitado da molécula de clorofila pode ser visualizada na figura 4.9.

$$\text{Clorofila a} + \text{Luz} \longrightarrow {}^{1}\text{Clorofila a}^{*} \longrightarrow {}^{3}\text{Clorofila a}^{*}$$

Figura 4.9: Formação do estado excitado da molécula de clorofila a quando há excesso de energia luminosa. Fonte: BRUNET et al. (2012).

O oxigênio singlete é altamente oxidante e quando presente causa danos celulares como, por exemplo, em proteínas, pigmentos e lipídios, implicando na redução da taxa fotossintética (BRUNET et al., 2012).

É na presença do excesso de energia luminosa que os carotenoides atuam como fotoprotetores, neutralizando o estado excitado da clorofila (figura 4.10a) e até mesmo das espécies reativas de oxigênio. De acordo com Taiz e Zeiger (2002), o

estado excitado do carotenoide não possui energia suficiente para gerar oxigênio singlete, decaindo assim ao estado fundamental e perdendo energia na forma de calor (figura 4.10b).

$$^{3}\text{Clorofila}^{*} + \text{Carotenoide} \longrightarrow \text{Clorofila} + {}^{3}\text{Carotenoide}^{*} \quad \text{(a)}$$

$$^{3}\text{Carotenoide}^{*} \longrightarrow \text{Carotenoides} + \text{Calor} \quad \text{(b)}$$

Figura 4.10: Neutralização da clorofila triplete por ação do carotenoide: (a) primeira reação do carotenoide na molécula de clorofila; (b) reação subsequente em que o carotenoide retorna ao estado fundamental. Fonte: Frank e Codgell (1993).

Os carotenoides podem neutralizar diretamente a ação do oxigênio singlete ($^{1}O_2$). O mecanismo de ação física de neutralização do $^{1}O_2$ abrange a transferência de energia de excitação do $^{1}O_2$ para a molécula de carotenoide, o que resulta na formação de uma molécula de carotenoide triplete (figura 4.11a). A reação seguinte (figura 4.11b) envolve a dissipação da energia de excitação por meio de interações rotacionais e vibracionais que regeneram a molécula original de carotenoide (KRINSKY, 1989).

$$^{1}O_2 + \text{Carotenoide} \longrightarrow {}^{3}O_2 + {}^{3}\text{Carotenoide} \quad \text{(a)}$$

$$^{3}\text{Carotenoide}^{*} \longrightarrow \text{Carotenoide} + \text{Calor} \quad \text{(b)}$$

Figura 4.11: Ação de neutralização do oxigênio singlete por ação do carotenoide: (a) primeira reação do carotenoide na molécula de oxigênio; (b) reação subsequente, em que o carotenoide retorna ao estado fundamental. Fonte: Krinsky (1989).

4.6.2. Carotenoides secundários

Os carotenoides secundários são assim chamados por não serem essenciais à fotossíntese. Por isso, ao contrário dos carotenoides primários não estão localizados nas membranas tilacóides dos cloroplastos. Esses carotenoides são produzidos em grande quantidade, em resposta a diferentes fatores de estresse

(KATSUYA; HIROAK; MORIO, 2007) e, geralmente, são acumulados em gotículas de óleo dentro de plastídios ou no citoplasma (LEMOINE; SCHOEFS, 2010).

Bidigare et al. (1993) explica que os carotenoides secundários proporcionam uma fotoproteção através da absorção passiva de fótons, antes que os mesmos atinjam os pigmentos fotossintéticos. Portanto, o acúmulo de carotenoides secundários significa um favorecimento à sobrevivência das espécies em nichos ecológicos com condições mais severas (SOLOVCHENKO, 2013).

As espécies reativas de oxigênio que são geradas em meio à condição de estresse, sobretudo a elevada irradiância de luz, são fatores universais para a síntese e regulação dos carotenoides secundários (SOLOVCHENKO, 2013). Entretanto, esta função dos carotenoides secundários ainda não é totalmente compreendida (SOLOVCHENKO, 2013).

Algumas espécies de algas verdes, como por exemplo, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, tem a habilidade de produzir elevadas quantidades de carotenoides sob condições de estresse ambiental, o que resulta na alteração da coloração das células de verde para vermelha. Por exemplo, em *D. salina*, o teor de carotenoides de 0,3% pode chegar até cerca de 10% da massa seca (JEFFREY; EGELAND, 2009).

As condições ambientais que podem levar ao estresse e, consequentemente, ao acúmulo aumentado de carotenoides, são: escassez de nutrientes (nitrato, fosfato e/ou sulfato), alta irradiância de luz, salinidade elevada, temperaturas extremamente altas ou baixas e uma combinação de todas essas variáveis (JEFFREY; EGELAND, 2009).

O acúmulo de carotenoides secundários por *D. bardawil*, no caso o β-caroteno, atua na proteção contra a fotoinibição induzida pela luz azul, absorvendo o excesso de irradiação azul (BEN-AMOTZ; SHAISH; AVRON, 1989). Além disso, para *D. salina e D. bardawil*, o acúmulo de β-caroteno também protege a célula contra a radiação UV-A que também é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (WHITE; JAHNKE, 2002).

Segundo Bing et al. (2003), em *H. pluvialis*, a astaxantina (carotenoide secundário) produzida possibilita à célula uma aclimatação à alta irradiância de luz, uma vez que este pigmento dissipa a energia excessiva, permitindo assim, que o aparato fotossintético seja protegido. Além disso, estes mesmos autores explicam que a astaxantina atua como uma barreira físico-química, a fim de proteger o DNA em replicação das espécies reativas de oxigênio.

4.7 O gênero *Dunaliella* e o acúmulo de carotenoides secundários

Os representantes do gênero *Dunaliella* são eucariotos pertencentes à divisão Chlorophyta. As microalgas do gênero *Dunaliella* são biflageladas e uninucleadas, desprovidas de parede celular, mas contendo uma espécie de glicocálix mucilaginoso envolvendo a célula (ALGAE BASE, 2015; BOROWITZKA; SIVA, 2007). O tamanho das células pode ter uma leve alteração de acordo com as condições de crescimento, como é o caso do aumento de salinidade que favorece o aumento do comprimento, largura e volume celular devido ao acúmulo de glicerol (soluto compatível). Por exemplo, a espécie *D. salina* pode ter, em média, de 10,9 a 16,9 µm de comprimento e 7,9 a 13,2 µm de largura (BOROWITZKA; SIVA, 2007). Essas variações do tamanho celular são possíveis devido à elasticidade que a membrana citoplasmática das espécies deste gênero apresenta (BEM-AMOTZ; AVRON, 1990).

Espécies do gênero *Dunaliella* são encontradas em água doce, marinha, hipersalina e ácida (POLLE; TRAN; BEM-AMOTZ, 2009). Algumas espécies podem ser encontradas em uma ampla faixa de concentração salina, de 5% à saturação (cerca de 35%) (BEN-AMOTZ; SHAISH; AVRON, 1991). De acordo com Tafreshi e Shariati (2009) algumas espécies podem sobreviver em temperaturas abaixo de zero e até, aproximadamente, 45 ºC.

Para que espécies possam sobreviver em condições de ampla variação ambiental, como é o caso de *D. salina*, mecanismos de sobrevivência são necessários. Esta espécie, por exemplo, é capaz de superproduzir β-caroteno do metabolismo secundário quando submetida a elevadas intensidades de luz, salinidade, temperatura e escassez de nitrogênio (BOROWITZKA; BOROWITIZKA, 1989). Com a produção aumentada de β-caroteno é possível neutralizar as espécies

reativas de oxigênio que são geradas nestas condições, bem como filtrar o excesso de luz azul.

A biossíntese de carotenoides pode se dar por duas vias: a via do ácido mevalônico (MEV) e a via do metileritritol fosfato (MEP). A via MEV usa, primeiramente, Acetil CoA para gerar isopentenil pirofosfato (IPP) - molécula de isopreno considerada como bloco de construção dos carotenoides – por meio de uma série de reações. Já a via MEP, via de biossíntese de carotenoides em *Dunaliella*, utiliza piruvato e gliceraldeído-3-fosfato em sucessivas reações para a obtenção de dimetilalil pirofosfato (DMAPP), molécula de isopreno também usada como bloco de construção de moléculas de carotenoides (EONSEON; POLLE, 2009). A figura 4.12 mostra um resumo da rota de biossíntese proposta para *Dunaliella*.

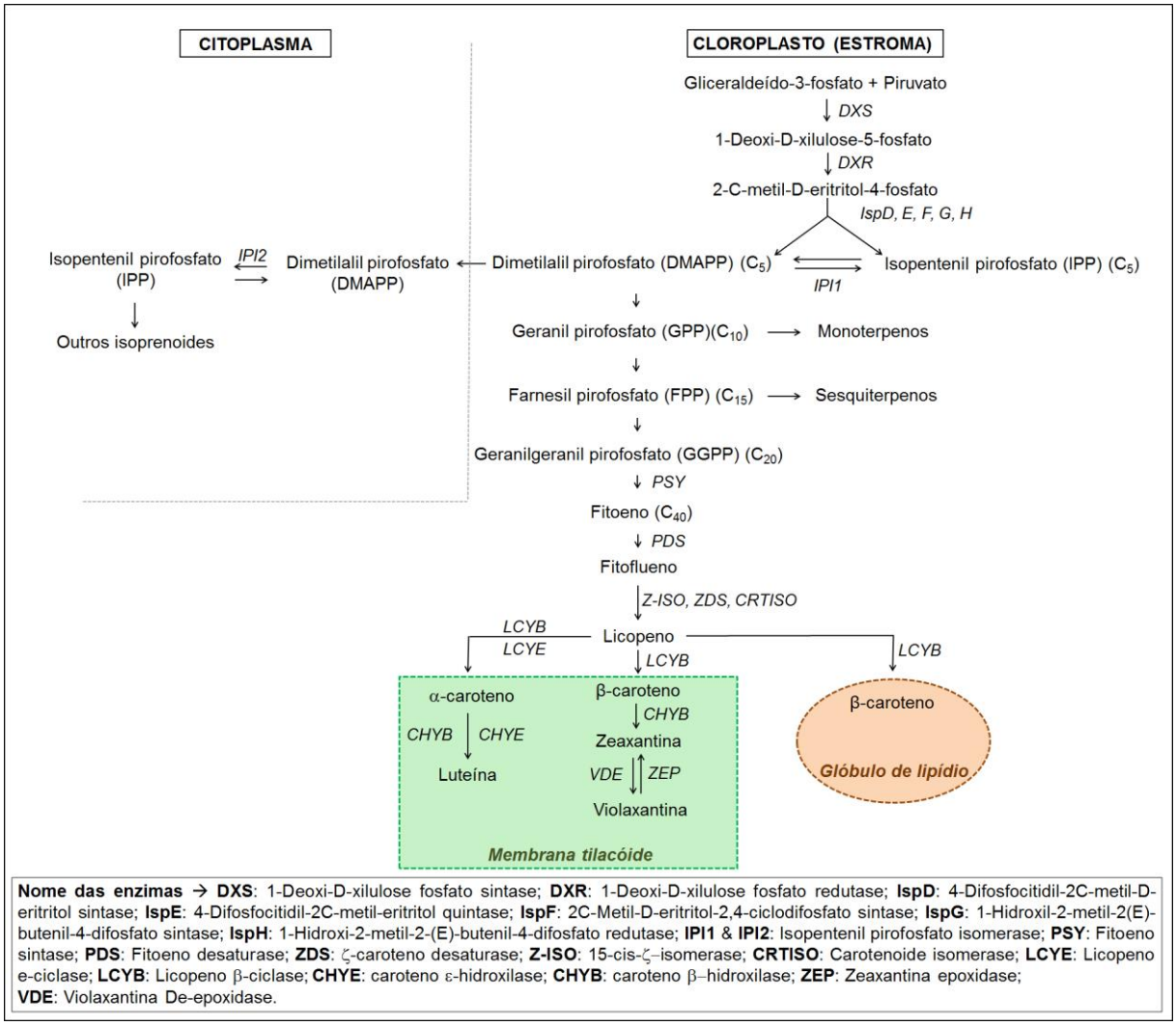


Figura 4.12: Esquema simplificado da rota de biossíntese proposta para *Dunaliella*. Adaptado de: Eonseon e Polle (2009).

Conforme observado na figura 4.12, há produção de β-caroteno para compor as antenas de captação de luz (ou complexo-antena) que se encontram na membrana tilacóide do cloroplasto. Também é possível notar que existe a produção de β-caroteno proveniente do metabolismo secundário (carotenoide secundário) que, segundo Zhi-Wey, Jian-Guo e Guang-Hong (2008), é armazenado em glóbulos lipídicos localizados nos espaços intertilacóide.

4.7.1 Produção de ácidos graxos e carotenogênese em *Dunaliella*

Alguns estudos com *D. salina* (microalga produtora de carotenoides secundários) foram realizados na tentativa de entender se há relação entre o acúmulo de carotenoides secundários e a síntese de ácidos graxos. Isto porque, conforme já

mencionado, os carotenoides secundários de *Dunaliella* ficam solubilizados em glóbulos de lipídios.

Rabanni et al. (1998) buscaram compreender a relação entre a síntese de β-caroteno e lipídios em *D. bardawil*, ao submeterem as células à elevada irradiância de luz (690 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) e perceberam aumento no acúmulo de gotículas lipídicas, sendo os triacilglicerídeos os principais constituintes. Os autores relatam também a queda de β-caroteno acompanhando a redução de ácidos graxos, quando usados inibidores da rota biossintética de ácidos graxos. Sugerindo assim, que o acúmulo de β-caroteno seria uma consequência da produção de triacilglicerídeos.

Resultados similares foram encontrados por Mendoza et al. (1999) que propõem a existência de uma relação entre a produção de ácidos graxos totais e a carotenogênese em *D. salina*, quando a mesma é submetida ao jejum de nitrogênio combinado à alta irradiância luminosa. Ademais, estes autores preconizam que o ácido oleico pode ser o principal constituinte dos glóbulos de lipídios onde se encontra o β-caroteno produzido pelo metabolismo secundário.

Todavia, Lamers et al. (2010) não encontraram evidências de que há correlação entre a produção de β-caroteno e ácidos graxos totais. A alta intensidade de luz usada em seus experimentos, resultou num declínio da quantidade intracelular de ácidos graxos totais, coincidindo com o aumento intracelular de β-caroteno em células de *D. salina*.

Diante dos resultados encontrados na literatura, são perceptíveis as controvérsias em relação à possível correlação entre a biossíntese de β-caroteno e ácidos graxos em *D. salina*, o que sinaliza a necessidade de mais estudos investigativos.

4.7.2 Ômega 3 e *D. salina*

Ômega 3 é um grupo de ácidos graxos poli-insaturados constituídos por cadeias carbônicas de 18 a 24 carbonos, onde a primeira ligação dupla se encontra entre o terceiro e quarto átomo de carbono (n-3), contado a partir do terminal metil (KIM et al., 2014; RYCKEBOSCH et al., 2014). As cadeias carbônicas tanto podem ser curtas, como no caso do ácido α-linolênico (C18:3 n-3) e estearidônico (C18:4 n-4),

quanto longas conforme visto no ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3), docosapentaenoico (C22:5 n-3) e docosahexaenoico (C22:6 n-3) (LEMAHIEU et al., 2013) (figura 4.13).

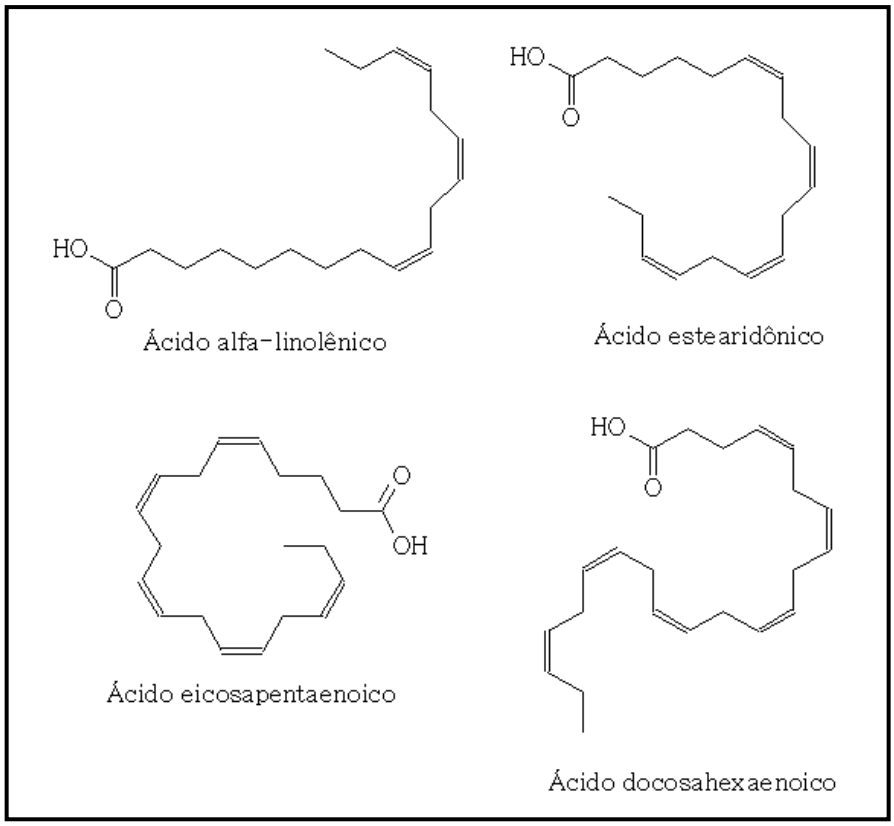


Figura 4.13: Exemplos de ômegas 3 de cadeias curtas e longas.

Na natureza, seres como bactérias, fungos, plantas e algas (macro e microalgas) são capazes de produzir ômega 3. Entretanto, a principal fonte de obtenção destes ácidos graxos, especialmente, DHA e EPA, é o pescado. Peixes, como salmão, arenque, cavalinha e atum, incorporam esses nutrientes por meio da cadeia alimentar que tem como produtores as algas (OLIVEIRA; LUZIA; RONDO, 2012; ADARME-VEGA et al., 2012). Devido ao crescente risco de escassez de peixes marinhos em decorrência da pesca intensiva e ao perigo da presença de contaminantes, como o mercúrio, houve o aumento da demanda por fontes alternativas de ômega 3 (RYCKEBOSCH et al., 2014). As microalgas se enquadram como uma opção para a produção destes ácidos graxos poli-insaturados, sendo encontrados em *D. salina*.

Em trabalhos de avaliação do perfil de ácidos graxos em *D. salina* é possível perceber a produção de diferentes moléculas de ômega 3, sendo o ácido α-linolênico o mais recorrente em variadas cepas (quadro 4.6).

Quadro 4.6: Tipos de ômega 3 encontrados em *D. salina* e *D. bardawil*

Cepa/origem	Tipo de ômega 3	Referência
D. salina (UTEX)	ALA e DHA	El-Baky et al. (2004)
D. salina	ALA e DHA	Vanitha et al. (2007)
D. bardawil	ALA, DHA e EPA	Vanitha et al. (2007)
D. salina (Índia)	EPA	Bhosale; Rajabhoj; Chaugule (2010)
D. salina	ALA	Devi et al. (2012)
D. salina (Espanha)	ALA	Mendoza et al. (1999)

ALA: Ácido α-linolênico; DHA: Ácido decosahexaenoico; EPA: Ácido eicosapentaenoico.

Os ômegas 3 são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e alimentícia. Estima-se que, no mundo, o consumo de ômega 3 em 2013 tenha sido de 123,8 toneladas, equivalente a US$ 2,3 bilhões. A previsão é que o consumo aumente até 2020, atingindo 241 toneladas, movimentando assim US$ 4,96 bilhões (INDUSTRY EXPERTS, 2018). Toda esta demanda sinaliza sua importância por serem considerados essenciais aos seres humanos, visto que não são sintetizadas por mamíferos; e devido suas propriedades funcionais, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antibiótica, antiaterosclerótica, antitrombótica e antiarrítmica (MARTINS et al., 2013).

Além disso, os ômegas 3 apresentam importantes funções na saúde humana. Organizações de saúde do mundo recomendam a ingestão de DHA e EPA para prevenção de doença coronariana, redução dos níveis de triglicerídeos e para gestantes, sabendo-se da importância do DHA no desenvolvimento neurológico e visual do feto (KUS-YAMASHITA; MACINI-FILHO, 2017).

Embora seja dado muito enfoque aos benefícios proporcionados pelo DHA e EPA, o ALA, mais comumente encontrado em *D.* salina, também apresenta efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, osteoporose, entre outros. Ademais, o ALA é precursor do EPA e DHA no organismo, ocorrendo a conversão dos dois últimos quando o primeiro é ingerido (KIM et al., 2014).

4.8 Cultivo de microalgas

Para a produção de carotenoides secundários por microalgas, é muito recorrente encontrar duas maneiras de condução de cultivo, são elas: cultivo em um estágio e em dois estágios (quadro 4.7). No cultivo em apenas um estágio (batelada), a microalga é cultivada em condições favoráveis à produção de carotenoides secundários, como a escassez de nutrientes, mas que não são tão favoráveis ao crescimento celular. Sendo assim, de uma maneira geral, o crescimento celular é limitado para que a produção de carotenoides ocorra. Já o cultivo em dois estágios é conduzido, primeiramente, em condições ideais ao crescimento celular e, em seguida, as células são submetidas às condições de estresse para induzir à produção de carotenoides secundários.

Quadro 4.7: Espécies de microalgas produtoras de carotenoides secundários

Microalga	Carotenoide secundário	% Carotenoides secundários na biomassa (m/m)	Modo de condução	Referência
Coelastrella striolata var. *multistriata*	Cantaxantina	4,75	Um estágio	Katsuya, Hiroaki e Morio (2007)
Chlorella zofingiensis	Astaxantina Cantaxantina	0,24 0,13	Dois estágios	Mulders et al. (2014)
Chlorella zofingiensis	Astaxantina Cantaxantina	0,60 0,85	Um estágio	Pelah, Sintov e Cohen (2004)
Dactylococcus sp.	Cantaxantina	~0,4	Dois estágios	Grama et al. (2014)
Haematococcus pluvialis	Astaxantina	3	Dois estágios	Imamoglu, Dalay e Sukan (2009)
Haematococcus pluvialis	Astaxantina	Não informado	Um estágio	Fábregas et al. (1998)
Dunaliella salina	β-caroteno	~3	Um estágio	Seunghye, Yew e EonSeon (2013)
Dunaliella bardawil	β-caroteno	~1,2	Um estágio	Seunghye, Yew e EonSeon (2013)

Adicionalmente, pode-se contar com diferentes modelos de sistemas de cultivo cujas características variam de acordo com a espécie a ser cultivada e com o destino final da biomassa microalgal. A seguir, encontra-se o detalhamento dos sistemas de cultivo utilizados:

★ **Sistemas abertos**

De acordo com Ling et al. (2009) os sistemas abertos representam os clássicos sistemas de produção de biomassa algal. Os mais comuns são as grandes lagoas rasas (figura 4.14a), tanques (figura 4.14b), lagoas circulares e lagoas do tipo pista de corrida (figura 4.14c) (BOROWITZKA, 1999).

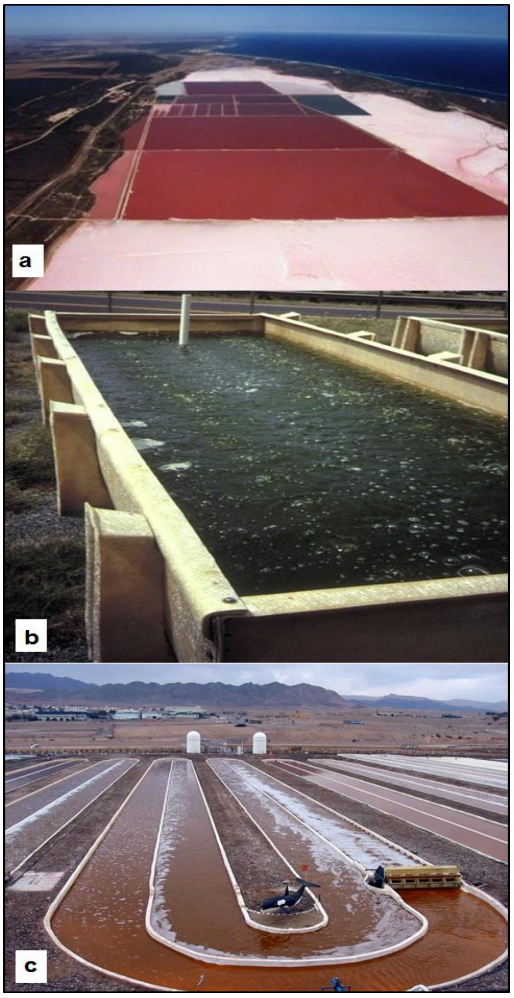


Figura 4.14: Tipos de sistemas abertos para o cultivo de microalgas: a) cultivo de *D. salina* em grandes lagoas abertas; b) cultivo de *Nannochloropsis* sp. em tanques; c) cultivo em *Raceway pond*. Fonte: http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-Appl4a.html; http://rfeholland.com/downloads/wur/biofuels_from_microalgae.html.

A construção e implantação desses sistemas irão depender das condições climáticas, custos com água e área (BOROWITZKA, 1999) e das características das células. Segundo Ugwu, Aoyagi e Uchiyama (2008), uma das principais vantagens do cultivo em sistemas abertos é a facilidade de construção e operação quando comparada a um sistema fechado.

Existem muitas limitações em cultivos realizados em tanques abertos, como por exemplo, o mau aproveitamento da luz pelas células, as perdas por evaporação do meio de cultura, a exigência por áreas maiores de área para a instalação do sistema, a contaminação por predadores e outros organismos de rápido crescimento e a difusão de CO_2 para a atmosfera (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

Devido aos sistemas abertos serem vulneráveis à contaminações, geralmente, espécies que se adaptam a condições extremas são cultivadas nestes sistemas, sob condições ambientais seletivas, como elevado pH e alta salinidade (LING et al., 2009). Espécies dos gêneros *Spirulina* (cultivo em elevado pH) e *Dunaliella* (cultivo em alta salinidade) têm sido cultivadas com sucesso em sistemas abertos e, até mesmo comercializadas (YUAN-KUN, 2001). Além disso, os sistemas abertos acabam por resultar em baixa produtividade em biomassa, devido aos mecanismos de agitação que não são tão eficientes, o que possibilita uma baixa transferência de massa (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

★ **Sistemas fechados**

Os cultivos de microalgas em sistemas fechados são conduzidos em fotobiorreatores. Na literatura, são encontrados fotobiorreatores planares, tubulares, em coluna, entre outras variedades que podem ser operadas de diferentes formas (DEL-CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007) .

Frente às lagoas abertas, os fotobiorreatores apresentam elevados custos de construção e operação (DEL-CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). Entretanto, se destacam pelas diversas vantagens que podem ser obtidas nos cultivos, são elas:

- A redução das contaminações da cultura cultivada (WIJFFELS; BARBOSA; JANSSEN, 2009). Por exemplo, culturas de *Haematoccocus* que são sensíveis a contaminações, bem como às condições ambientais extremas, podem ter sucesso no cultivo em fotobiorreatores (figura 4.15) (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007);

- Melhor controle das condições de cultivo como, por exemplo, pH, pCO_2, pO_2, temperatura (WIJFFELS; BARBOSA; JANSSEN, 2009);

- Redução da evaporação de meio de cultura (WIJFFELS; BARBOSA; JANSSEN, 2009);
- Elevadas produtividades em biomassa (WIJFFELS; BARBOSA; JANSSEN, 2009).

Figura 4.15: Cultivo de *H. pluvialis* em fotobiorreator tubular. Fonte: http://www.lyxia.com/well-controlled-enclosed-cultivation-system-for-high-value-product/

Pesquisas em torno do desenvolvimento de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas têm sido amplamente investigadas (HARUN et al., 2010), tendo em vista a existência de algumas peculiaridades para se cultivar determinadas espécies, a qualidade da biomassa e o valor agregado do produto final.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Micro-organismos

Para avaliar o potencial de produção de carotenoides foram estudadas quatro espécies de microalgas nativas, três dulcícolas e uma salina. As espécies estudadas se encontram a seguir:

- ★ *Haematococcus pluvialis*, gentilmente, doada por MSc. Alexsandro Claudino dos Santos (UFSCar);
- ★ *Chlorella zofingiensis*, gentilmente, cedida pelo Prof. Armando Augusto Henriques Vieira (UFSCar);
- ★ Uma espécie dulcícola isolada no presente trabalho;
- ★ Uma espécie salina isolada no presente trabalho.

5.2 Meios de cultura

As espécies de microalgas dulcícolas foram cultivadas em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) sem sílica, ou seja, modificado. O pH do meio foi ajustado para 8,00 com solução estéril de NaOH 1M.

Já a espécie de microalga salina foi cultivada em meio salino descrito por Shaish, Ben-Amotz e Avron (1992), contendo NaCl 1M e pH 8,00 ajustado com HCl 3,7%. Em alguns momentos a espécie salina foi cultivada neste meio, mas com uma modificação na concentração de $NaNO_3$, na tentativa de induzir à carotenogênese, sendo então chamado de meio salino modificado. A concentração de $NaNO_3$ usada na modificação foi 0,0479 g/L.

Os protocolos dos meios utilizados nos cultivos se encontram nos apêndices A e B.

5.3 Manutenção das culturas

A manutenção das culturas-estoque das espécies estudadas foi feita as espécies em tubos de ensaio com 5 mL de meio de cultura próprio para cada espécie (item 5.2.). As culturas foram mantidas em câmara de germinação, a 21ºC e iluminação

constante. Essas culturas foram transferidas para um novo meio de 15 em 15 dias, a fim de mantê-las sempre novas.

5.4 Determinações Analíticas

5.4.1 pH

As medidas de pH foram feitas com o medidor de pH (Hanna, HI 8424), cujo eletrodo foi calibrado com soluções tampão 4,00 e 7,00.

5.4.2 Salinidade

A salinidade das águas dos ambientes de coleta foi aferida com o refratômetro (Instrutherm, RTS-101ATC).

5.4.3 Irradiância de luz

As medições de intensidade de luz foram feitas com o medidor QSL 2100 (Biospherical Instrument,) que expressa os valores em µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. As intensidades utilizadas nos cultivos foram estabelecidas a partir do cálculo da média das intensidades medidas nos pontos A, B, C, D e E (figura 5.1).

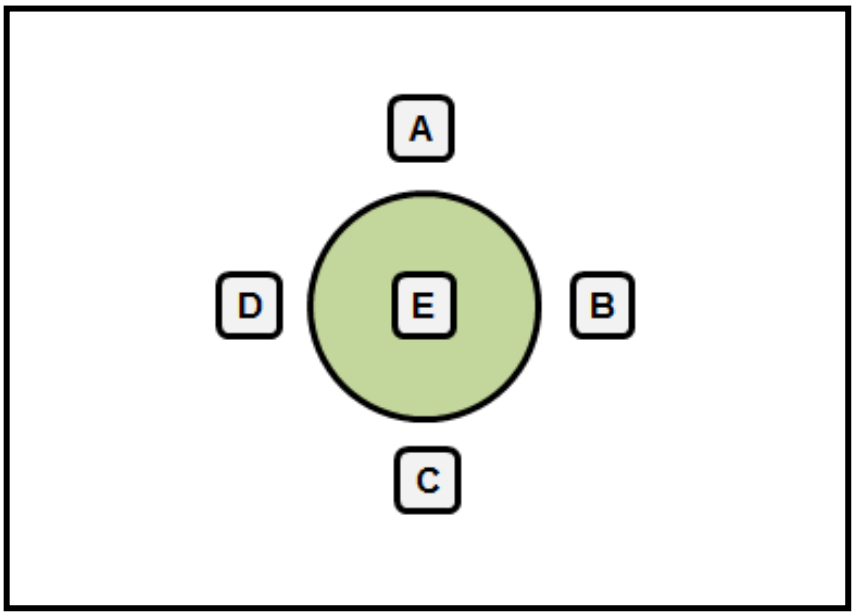


Figura 5.1: Pontos de medições das irradiâncias. A esfera verde ilustra a posição do frasco erlenmeyer e as letras ilustram os pontos onde foram feitas as medições de intensidade de luz. A intensidade de luz estabelecida no final das medições foi encontrada a partir da média das intensidades medidas.

5.4.4 Quantificação celular

★ **Contagem de células**

Com o objetivo de acompanhar a multiplicação celular, diariamente, retiravam-se alíquotas de 500 µL. Para fixar as células, acrescentavam-se 20 µL de lugol neutro às alíquotas, com exceção daquelas referentes à espécie dulcícola isolada em que foram adicionados 40 µL de solução de formol 25%, haja vista que as células desta espécie eram danificadas na presença de lugol.

O acompanhamento do crescimento celular foi feito por meio de contagem de células em câmara Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico (Olympus) em aumento de 400x. Para isto, preparou-se a câmara Neubauer, inserindo 10 µL de alíquota homogênea nas duas regiões de entrada indicadas na figura 5.2.

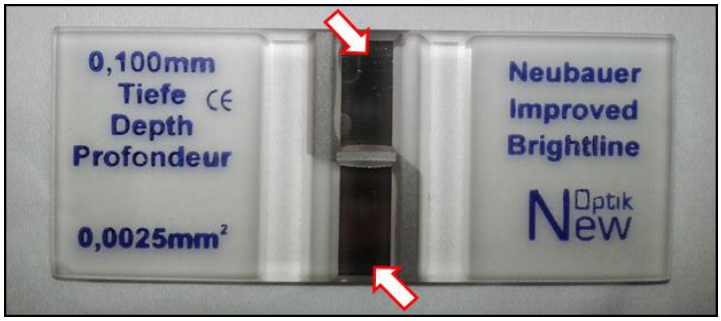


Figura 5.2: Foto da câmara Neubauer usada na contagem de células. As setas indicam as duas regiões onde a amostra é inserida após a colocação da lâmínula.

A contagem de células grandes, como as das espécies salina e dulcícola isoladas e de *H. pluvialis,* foi feita nas regiões indicadas pelos números de 1 a 5 (figura 5.3). Já a contagem de células pequenas, como no caso de *C. zofingiensis*, foi realizada nos quadrados destacados pelos círculos vermelhos que estão na região representada pelo número 5.

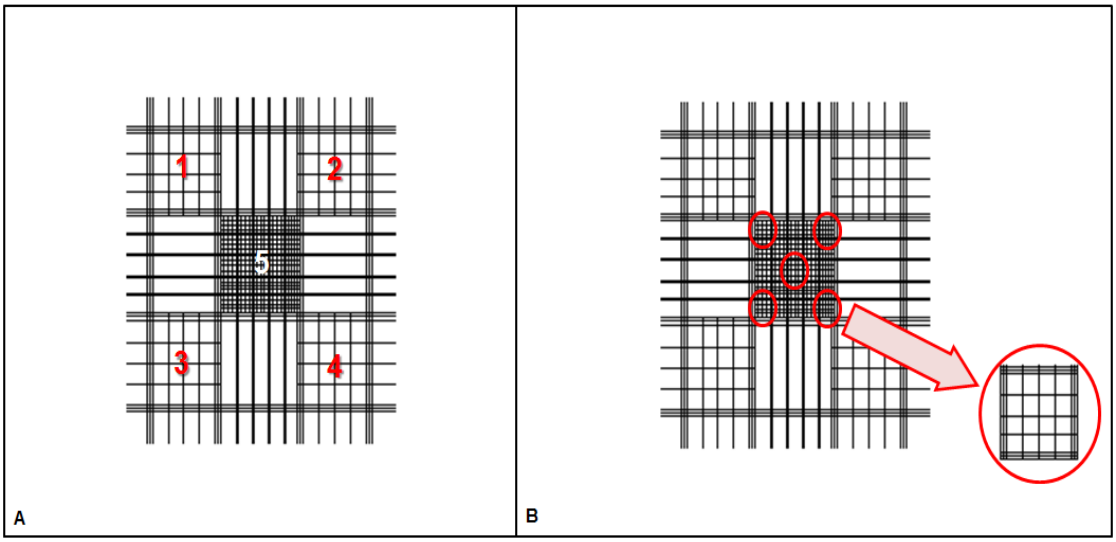


Figura 5.3: Regiões de contagem de células. A) Indicação das regiões onde foram contadas as células das espécies isoladas (dulcícola e salina); B) Indicação das regiões onde foram contadas as células de *C. zofingiensis*. A ampliação mostra como é a configuração do quadrado que está dentro de cada círculo vermelho.

A partir da equação 1 foi possível calcular a estimativa do número de células por volume de cultura quando as células foram contadas nas regiões de 1 a 5; com a equação 2, pôde-se calcular a concentração celular da contagem realizada nos cinco quadrados destacados pelos círculos vermelhos da (figura 5.3b).

Equação 1:

$$N^{\circ}\ células/mL = \frac{Número\ total\ de\ células\ contadas}{Número\ de\ regiões\ contadas} \,.\, 10^{4}$$

Equação 2:

$$N^{\circ}\ células/mL = \frac{Número\ total\ de\ células\ contadas}{Número\ de\ regiões\ contadas} \,.\, 25 \,.\, 10^{4}$$

★ **Massa seca**

Para determinar a concentração de massa seca no final do cultivo – quando as células alcançaram a fase estacionária de crescimento – realizou-se a filtração a vácuo (com baixa pressão de vácuo) de 30 a 50 mL da suspensão celular, utilizando-se membrana de fibra de vidro (poro 0,7 – 1,4 µm, GF/P, Sartourius ®).

As membranas com as células filtradas foram secas em uma balança determinadora de umidade (MB 45, OHAUS) a 105ºC, para que a secagem fosse mais rápida do que em uma estufa. Em seguida, as membranas foram pesadas em balança analítica de precisão, uma vez que a balança determinadora de umidade apresentava somente 3 casas decimais.

A massa seca foi obtida a partir da subtração entre a massa da membrana com o filtrado seco (células secas) e a massa da membrana sem o filtrado. Desta forma, foi possível calcular a concentração celular do cultivo em massa seca.

★ **Massa seca livre de cinzas**

A determinação da massa seca livre de cinzas fez-se necessária para eliminar a interferência da massa dos sais do meio de cultura da espécie de microalga salina. Este procedimento foi realizado, uma vez que não foi possível lavar as células para remoção de sal do meio de cultura devido à observação de rompimento celular durante a lavagem. A metodologia adotada para a determinação da massa seca livre de cinzas baseou-se no trabalho de Zhu e Lee (1997) com algumas modificações.

Para realizar o procedimento de obtenção de massa seca livre de cinzas, primeiramente, fez-se a pré-combustão das membranas de fibra de vidro (poro 0,7 – 1,4 µm, GF/P, Sartourius ®) que seriam utilizadas na filtração da suspensão celular. Sendo assim, cada membrana a ser utilizada foi colocada em um cadinho de porcelana e os mesmos foram submetidos a 540ºC por 2 horas na mufla. A pré-combustão fez-se necessária para possíveis compostos orgânicos da membrana volatilizarem antes das mesmas serem utilizadas com as amostras. Decorrido o tempo necessário, os cadinhos foram retirados da mufla e armazenados em um dessecador até o seu completo resfriamento.

As suspensões celulares da espécie salina foram filtradas com as membranas que passaram pela pré-combustão e foram secas em balança determinadora de umidade, segundo descrito anteriormente (tópico “massa seca”). Essas membranas com a biomassa seca foram colocadas em seus respectivos cadinhos e os mesmos foram pesados em balança analítica de precisão.

Os cadinhos com as membranas secas foram encaminhados para a mufla, onde permaneceram por 4 horas a 540 ºC. Nesta etapa, a matéria orgânica da biomassa microalgal foi volatilizada, enquanto a inorgânica transformou-se em cinzas. Após 4 horas, os cadinhos foram retirados da mufla e armazenados em um dessecador até o seu completo resfriamento. Em seguida, os cadinhos foram pesados.

A massa seca livre de cinzas foi calculada a partir da subtração da massa seca pela massa das cinzas, obtendo-se assim somente a massa da matéria orgânica. Com isso, foi possível calcular a concentração de biomassa seca produzida no final do cultivo (fase estacionária de crescimento).

5.4.5 Quantificação de nitrato

O consumo de nitrato foi acompanhado, diariamente, por meio de método espectrofotométrico descrito por Collos et al. (1999). Para isto, foram retiradas alíquotas diárias com volume de 2 mL, as mesmas foram centrifugadas a 6000 rpm (LS, Logen Scientific) para se obter o sobrenadante livre de células. Os sobrenadantes permaneceram congelados até o dia das análises.

Para calcular a concentração de nitrato no sobrenadante, fez-se necessário o preparo de curva analítica de NO_3^- usando $NaNO_3$ (apêndice C). Cada absorvância registrada no espectrofotômetro correspondeu a uma concentração de NO_3^- conhecida. Com isso, foi possível gerar um gráfico com uma equação da reta (equação 3), onde a variável x é a concentração de NO_3^- (mg/L) e a variável y é a absorvância do sobrenadante em 220 nm.

<u>Equação 3:</u>

$$[NO_3^-] = \frac{Absorvância_{220\,nm} - 0{,}042}{0{,}0743}$$

5.4.6 Quantificação de fosfato

Foi usada a metodologia de análise descrita por Grasshoff, Ehrhardt e Kremling (1983) (apêndice D). Para tanto, 1 mL do cultivo previamente centrifugado (item 5.4.5) para remoção das células, foi transferido para tubo de ensaio, e acrescido de 0,02 mL de solução de ácido ascórbico acidificado. Após homogeneização em *vortex*, a mistura foi adicionada de 0,02 mL de reagente mistura para fosfato e, em seguida, novamente homogeneizada. Logo a seguir, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 880 nm.

A concentração de fosfato foi calculada a partir de curva de analítica absorvância *versus* $[PO_4^{3-}]$ construída com diferentes diluições de solução padrão de KH_2PO_4 em água (apêndice D), cuja equação da reta calculada foi:

<u>Equação 4:</u>

$$[PO_4^{3-}] = \frac{Absorvância_{880\,nm} + 0{,}0032}{0{,}2268}$$

5.4.7 Extração e quantificação de carotenoides totais nas 4 espécies estudadas

Primeiramente, foi preciso obter a alíquota da amostra que se desejava realizar a extração. Para isto, foram filtrados (a vácuo) volumes de 10 a 30 mL de suspensão celular com membrana de fibra de vidro (poro 0,7 – 1,4 µm, GF/P, Sartourius ®). Após a filtração, a membrana foi dobrada e o excesso de água foi retirado com o auxílio de papel toalha. Esta membrana foi colocada dentro de um tubo criogênico e para evitar a degradação de carotenoides, o mesmo foi armazenado em nitrogênio líquido até o momento da extração. A figura 5.4 ilustra os passos do preparo da amostra para posterior extração de carotenoides.

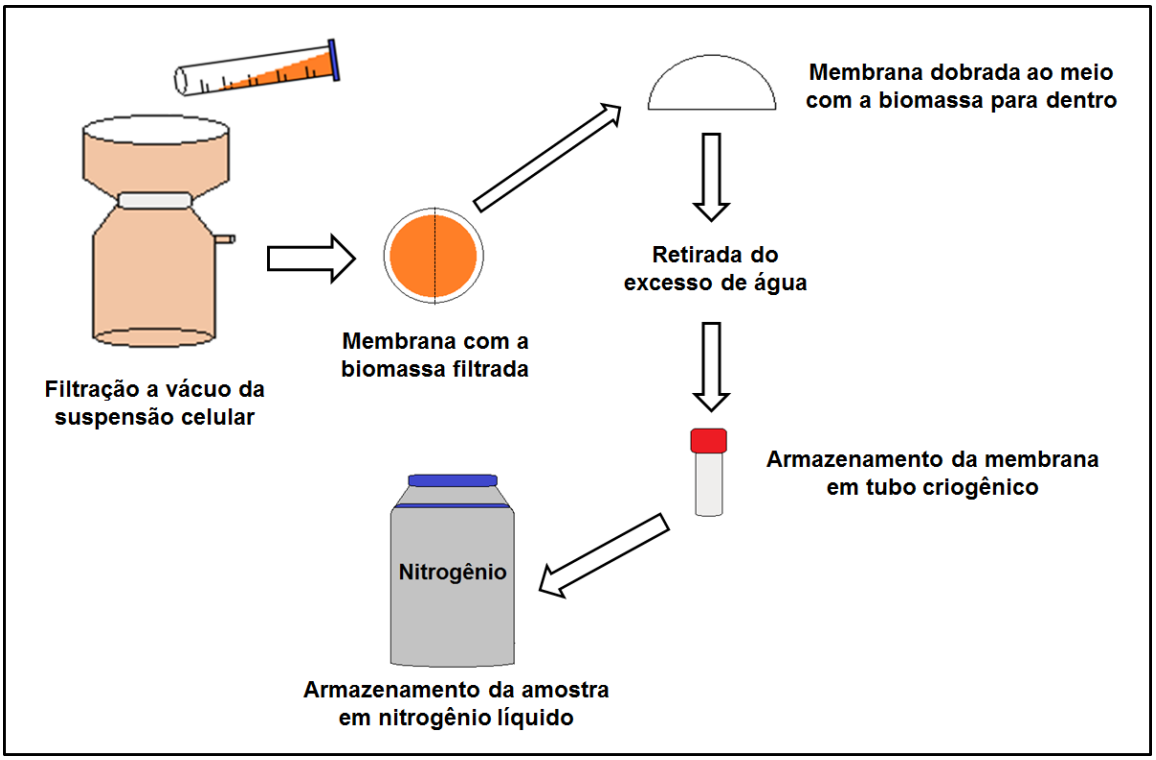


Figura 5.4: Etapas de preparo da amostra para posterior extração de carotenoides.

Para realizar a extração de carotenoides, a membrana congelada foi colocada dentro de um tubo de ensaio de vidro com tampa e, com o auxílio de uma pipeta graduada, foram adicionados 5 mL de acetona (grau HPLC, TEDIA) (figura 5.5a). Na ausência de luz, triturou-se a membrana com um bastão de vidro (figura 5.5b) e tampou-se o tubo. O tubo, envolvido em papel alumínio, foi levado ao congelador onde permaneceu por 1 hora.

Decorrida 1 hora, o extrato foi filtrado (figura 5.5c) com um filtro de algodão em pipeta Pasteur, em seguida, o filtrado foi transferido para um tubo de ensaio limpo (figura 5.5d) e centrifugado em microtubos de 2 mL, por 10 minutos a 6000 rpm (Logen Scientific, LS) (figura 5.5e). Após esta etapa, os extratos foram filtrados em membrana de celulose regenerada (0,2 μm; Macherey-Nagel) (figura 5.5f) para removeção de materiais particulados da amostra, como *debris* celulares. Todas estas etapas foram feitas no escuro, a fim de evitar a isomerização e/ou degradação dos carotenoides. Uma parte dos extratos filtrados foi usada na quantificação de

carotenoides totais e a outra parte foi transferida para *vials* âmbar e encaminhada para análise qualitativa, em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

É importante mencionar que a metodologia de extração usada nesta etapa não foi otimizada para cada espécie de microalga estudada.

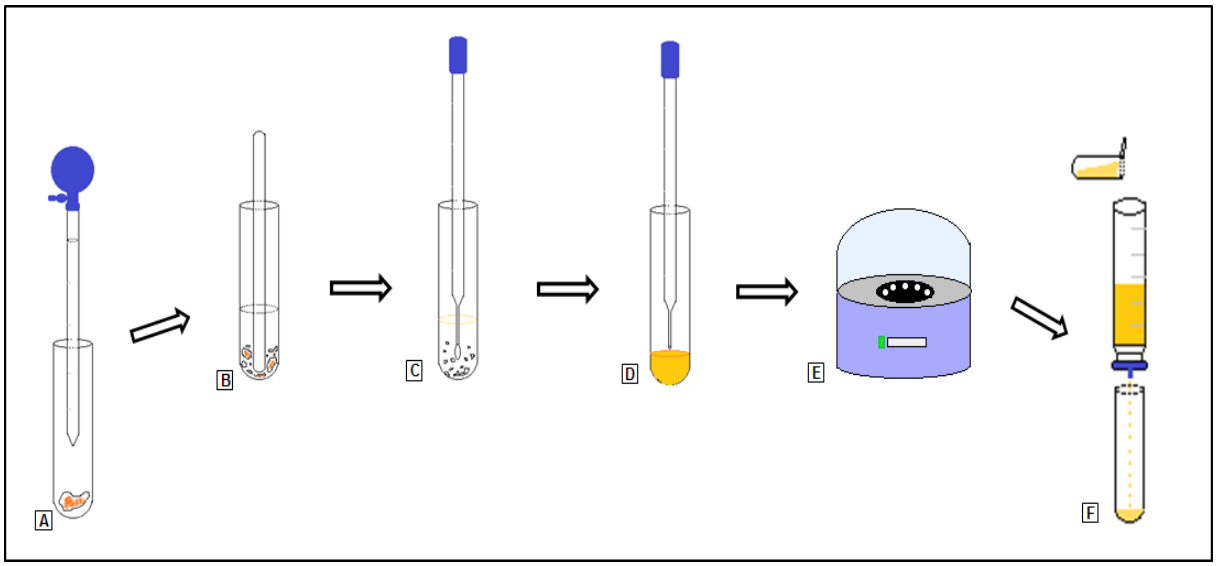


Figura 5.5: Etapas da extração de carotenoides totais: a) adição de acetona na membrana com biomassa microalgal; b) trituração da membrana com bastão de vidro; c) filtração da mistura reacional com filtro de algodão; d) obtenção do extrato filtrado; e) centrifugação do extrato filtrato; f) filtração do extrato centrifugado em membrana de celulose regenerada acoplada à seringa descartável.

O extrato obtido foi analisado em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda (nm): 470; 644,8 e 661,6. Com o resultado das absorvâncias nestes comprimentos de onda, foi possível determinar a concentração de carotenoides totais, a partir das equações desenvolvidas por Lichtenthaler (1987) que se encontram a seguir.

As equação de 5 a 7, se referem à concentração de pigmentos no extrato em acetona, enquanto a equação 8 diz respeito à concentração de carotenoides totais na cultura.

<u>Equação 5:</u>

$$[Clorofila\ a](\mu g/mL) = 11{,}24\ .\ A_{661{,}6} - 2{,}04\ .\ A_{644{,}8}\ .\ c$$

Equação 6:

$$[Clorofila\ b](\mu g/mL) = 20{,}13\ .\ A_{644{,}8} - 4{,}19\ .\ A_{661{,}6}\ .\ c$$

Equação 7:

$$[Carotenoides\ totais](\mu g/mL) = \frac{1000\ .\ A_{470} - 1{,}90\ .\ [Clorofila\ a] - 63{,}12\ .\ [Clorofila\ b]}{214}\ .\ c$$

Equação 8:

$$[Carotenoides\ totais]\ (\mu g/mL) = \frac{1000\ .\ A_{470} - 1{,}90\ .\ [Clorofila\ a] - 63{,}12\ .\ [Clorofila\ b]}{214}\ .\ c\ .\ \frac{v\ (mL)}{V\ (mL)}$$

Onde:

- ⇨ c é o caminho óptico da cubeta (1 cm);
- ⇨ [Clorofila a] é a concentração de clorofila a no extrato;
- ⇨ [Clorofila b] é a concentração de clorofila b no extrato;
- ⇨ [Carotenoides totais] é a concentração de carotenoides totais no extrato;
- ⇨ Na equação 8, [Carotenoides totais] representa a concentração de carotenoides totais na cultura de células;
- ⇨ v é o volume de acetona usado na extração (mL);
- ⇨ V é o volume filtrado de cultura (mL).

5.4.8 Identificação da produção de β-caroteno e cantaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Tendo em vista que a cantaxantina e o β-caroteno são carotenoides de interesse industrial, análises qualitativas dos extratos de carotenoides totais (item 5.4.7) foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para detectar a presença desses dois pigmentos, utilizou-se o cromatógrafo Agillent 1100/1200 com injetor automático e detector do tipo DAD para a realização das análises (figura 5.6).

Figura 5.6: Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado neste trabalho.

A metodologia de análise utilizada baseou-se no método de Guarantini et al. (2009), injetando-se 20 µL de amostra e com algumas adaptações, foram elas: a utilização de uma coluna C30 de outra marca e com outro tamanho de partícula (Prontosil 300-3, 250 x 4,6 mm, 3 µm, Bischoff); o uso de 25 ºC como temperatura do forno de coluna. Neste método, foram utilizadas duas fases (A e B) para compor o gradiente de fase móvel (quadro 5.1) cuja vazão de trabalho foi 1 mL/min.

Quadro 5.1: Composição do gradiente da fase móvel

	Gradiente (%)	
Tempo (min)	[1]Fase A	[2]Fase B
0	95	5
15,00	90	10
25,00	90	10
35,00	85	15
40,00	60	40
42,00	55	45
62,00	55	45
63,00	0	100
68,00	0	100
70,00	95	5
80,00	95	5

[1]MeOH:H_2O:Acetato de amônio (1 mol L^{-1})(pH 4.6)(90:8:2)
[2] MeOH:MTBE: Acetato de amônio (pH 4.6) (30:68:2)

A confirmação da presença dos carotenoides, todo-trans-β-caroteno e cantaxantina foi feita pela comparação entre os tempos de retenção dos padrões dos mesmos (Sigma Aldrich ®) e pelos seus espectros de absorção.

5.4.9 Extração de carotenoides totais da espécie selecionada com maior potencial de produção

A extração de carotenoides totais da espécie com maior potencial de produção (*D. salina*), foi realizada com biomassas obtidas por filtração a vácuo (item 5.4.7.) que foram armazenadas conforme descrito no tópico 5.4.7. Para tal, foram adicionados 5 mL de acetona (HPLC, Tedia) à membrana com a biomassa, sendo esta triturada e filtrada com filtro de algodão (item 5.4.7), sendo o filtrado recolhido em tubo de ensaio limpo. O procedimento de extração foi novamente realizado até o branqueamento do leito filtrante (figura 5.7) com o filtrado recolhido no mesmo tubo de ensaio. Em seguida, o extrato foi centrifugado e filtrado em membrana de celulose regenerada (item 5.4.7). A amostra foi armazenada em *vials* âmbar e o

carotenoide majoritariamente produzido (β-caroteno) foi quantificado por CLAE (seção 5.4.10).

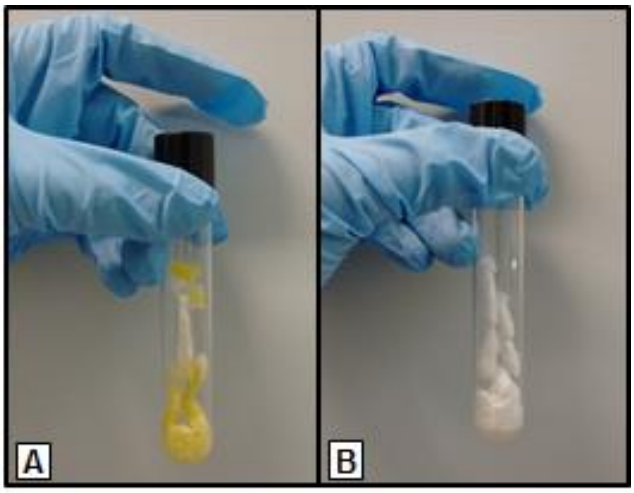


Figura 5.7: Extração de carotenoides de *D. salina* (A - coloração da membrana após a 1ª extração; B - coloração da membrana após total remoção de carotenoides).

5.4.10 Quantificação por CLAE do carotenoide majoritário (β-caroteno) da espécie selecionada

A produção de β-caroteno nos experimentos do planejamento *Plackett-Burmann*, com a espécie escolhida, foi avaliada por CLAE, a partir de adaptações da metodologia descrita por Pacheco (2009), que são delineadas a seguir. Esta metodologia possibilitou a redução do tempo de análise e, consequentemente, o custo se compararmos à metodologia usada nos experimentos anteriormente contemplados neste estudo (item 5.4.8).

Para a realização das análises foi usado o cromatógrafo Agilent 1100/1200, com injeção automática e detector *Diode Array* (DAD). As adaptações consistiram no uso de uma coluna C30 (Prontosil 300-3; Bischoff; 250 x 4,6 mm; tamanho de partícula: 3 µm) e alteração no tempo de variação do gradiente da fase móvel (quadro 5.2). Foram injetados 10 µL de amostra, com vazão de 0,8 mL/min da fase móvel, temperatura de 33ºC no forno da coluna e DAD programado para detecções em 452,4 nm.

Quadro 5.2: Gradiente usado na fase móvel

	GRADIENTE	
Tempo(min)	**Metanol (%)**	**MTBE (%)**
0,01	80	20
5	80	20
20	15	85
25	15	85
27	80	20
30	80	20

Para construção de curva analítica de β-caroteno, foi preparada uma solução de todo-trans-β-caroteno (Sigma Aldrich®; HPLC) em acetona (grau HPLC; TEDIA®), que para total solubilização foi submetida a banho ultrassônico (USC-2500; Unique; 40Hz) por 30 minutos, no escuro para prevenir sua degradação. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de celulose regenerada (0,2 µm; Macherey-Nagel), a fim de remover possíveis materiais particulados que pudessem prejudicar o funcionamento do sistema de cromatografia. A concentração de β-caroteno na solução preparada foi confirmada por análise espectrofotométrica (CRAFT, 1992), uma vez que o β-caroteno utilizado não se tratava de padrão analítico.

Os parâmetros de validação “limite de detecção (LD)”, “limite de quantificação (LQ)” e “linearidade” para a análise de todo-trans-β-caroteno por CLAE foram calculados a partir da análise de alíquotas da amostra padrão obtidas por diluições sucessivas. As concentrações analisadas foram 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mg/L (apêndice E). Definiu-se como LD a concentração mais baixa capaz de ser detectada pelo DAD. Considerou-se como LQ a concentração equivalente a 3 vezes o resultado de LD (apêndice E). A faixa de linearidade estabelecida foi de 0,83 a 12,1 mg/L de todo-trans-β-caroteno (apêndice E). Definidos os parâmetros de validação, seguiu-se a identificação e quantificação do analito todo-trans-β-caroteno.

A identificação de todo-trans-β-caroteno na amostra foi feita a partir da comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção entre a amostra e uma solução de todo-trans-β-caroteno. Já a identificação do isômero 9-cis-β-caroteno se deu a partir da comparação do espectro de absorção da amostra com o

obtido por Pacheco (2009) (apêndice F), uma vez que não são comercializados padrões deste isômero.

5.4.11 Extração e quantificação de lipídios totais

A extração de lipídios totais foi realizada a partir do método Folch, Less e Stanley (1957) modificado por Santos (2013) com algumas adaptações realizadas neste trabalho, conforme descrição a seguir:

Amostras de 200 mL de cultura da espécie selecionada como melhor produtora de carotenoides (*D. salina*) foram centrifugadas a 2158 x *g,* por 10 min, a 15ºC. O *pellet* celular foi obtido após a separação do sobrenadante e, em seguida, ressuspenso em 10 mL do sobrenadante e congelado em béqueres de vidro de 100 mL por 24 h em ultrafreezer a -80ºC (UFR 30, Liotop). Após congelamento, a biomassa foi seca por liofilização (Enterprise II, Terroni), durante 48 h.

Para a extração de lipídios, a biomassa liofilizada foi ressuspensa em 36 mL de solução de clorofórmio:metanol (2:1), e levada a banho ultrassônico (USC 2500, Unique) por 20 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 2158 x *g* à 4ºC (NT 825, Nova Técnica) por 8 min. O sobrenadante (fração líquida) foi transferido para um tubo de ensaio, e foram adicionados, vigorosamente, 9 mL de solução de KCl (0,88%). Então, manteve-se essa mistura em repouso até a formação de duas fases distintas (figura 5.8a). A fase superior foi descartada e à outra fase foram adicionados 4,5 mL de solução de clorofórmio:metanol:água (3:48:47). O sistema foi novamente deixado em repouso até separação de duas fases, sendo feito o descarte da fase superior. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e a fase orgânica final foi transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL e submetida à evaporação em rotaevaporador (Fisatom) a 50ºC e 85 rpm. O resíduo presente no fundo do balão foi redissolvido em 20 mL de clorofórmio (figura 5.8b) e filtrado em papel de filtro com dobradura pregueada (figura 5.8c), a fim de remover resquícios de sais inorgânicos que poderiam subestimar a quantificação dos lipídios totais. Por fim, o solvente contido no filtrado foi evaporado em rotaevaporador a 50ºC (figura 5.8d-e) e, em seguida, mantido em estufa com circulação de ar a 50ºC por 12 h. Após o resfriamento em dessecador, a massa de lipídeos totais foi determinada por

pesagem em balança analítica, ao décimo de miligrama. As amostras de lipídios totais foram usadas na quantificação de ácido α-linolênico.

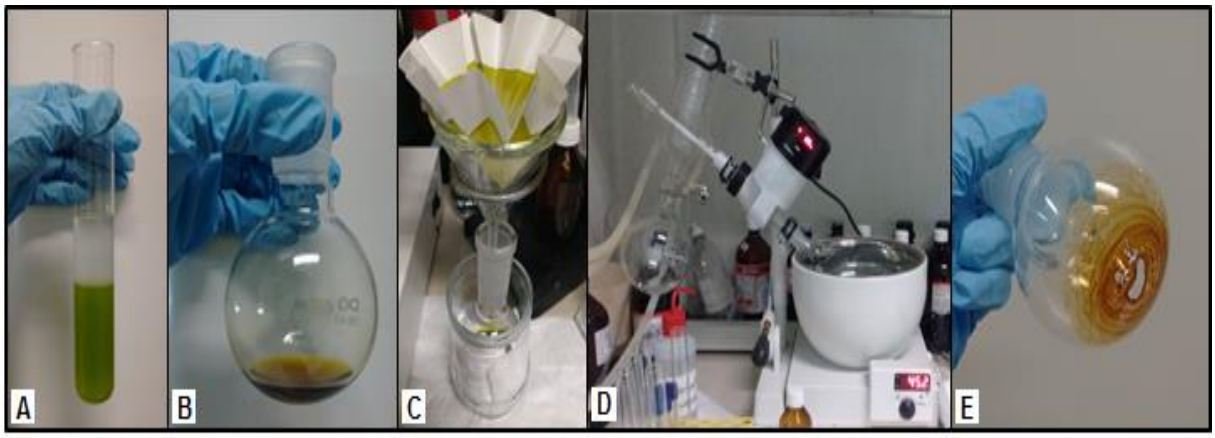


Figura 5.8: Etapas do processo de extração de carotenoides totais (A – fases formadas após adição de KCl (0,88%); B – lipídios redissolvidos em clorofórmio; C – filtração dos lipídios redissolvidos para remoção de sais; D – evaporação do clorofórmio em rotaevaporador; E – obtenção de lipídios totais secos após evaporação do clorofórmio.

5.4.12 Derivatização de ácidos graxos

Para identificação do perfil de ácidos graxos, a cromatografia gasosa tem sido a metodologia mais usada. No entanto, para o uso desta técnica analítica, os ácidos graxos devem ser previamente convertidos em formas mais voláteis, como os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês, *fatty acid methyl ester*), o que pode ser obtido por meio de reações de metilação. Este tipo de reação se mostra eficiente em produzir FAMEs e outros compostos metilados de cadeia longa, a partir de lipídios celulares como ácidos graxos, aqueles com ligações éster, éter e amina (FERNANDES; CHAER, 2010).

A metilação de ácidos graxos foi executada conforme descrito por Igarashi et al. (2004). Para tal, os lipídios totais extraídos da biomassa, cuja descrição é apresentada no item 5.4.11, foram redissolvidos em clorofórmio. A seguir, uma alíquota equivalente a 2 mg de lipídios totais foi transferida para um balão de fundo redondo e o solvente evaporado em rotaevaporador (seção 5.4.11). Em sequência, foram adicionados 4 mL de solução metanólica de NaOH (0,5 N) aos 2 mg de lipídios secos contidos no balão. Esta mistura foi então aquecida à 100ºC em banho com refluxo (figura 5.9a) durante 5 min. A mistura reacional foi deixada por 3 minutos no ambiente (sala aclimatada a 25ºC) para resfriamento, e então adicionada

de 4 mL de solução metanólica de fluoreto bórico (BF_3) (14%, Sigma Aldrich), sendo novamente aquecida em banho-maria a 100ºC sob refluxo. Decorrido tempo de reação de 5 min., a mistura reacional foi retirada do banho e adicionada de 6 mL de solução de $KHCO_3$ (2% m/v) para neutralizar a reação. A mistura obtida foi transferida para um funil de decantação de 60 mL de capacidade, onde se deu a extração dos ésteres metílicos. Para isto, foram adicionados 25 mL de hexano e, após suave homogeneização, a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente até o aparecimento de duas fases distintas. Nos casos em que houve formação de emulsão (figura 5.9b), foram adicionados 3 mL de solução de NaCl (300 g/L) para induzir a formação das duas fases (figura 5.9c). Uma vez escoada a fase inferior, foi realizada a extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos, presentes na fase superior, com hexano por mais duas vezes consecutivas.

Os extratos de ésteres metílicos em hexano foram recolhidos em um único béquer e tratados com Na_2SO_4 anidro para remoção de resquícios de água porventura neles presentes (figura 5.9d). Logo a seguir, o extrato total, livre de água, foi transferido para um balão de fundo redondo para evaporação do solvente em rotaevaporador (item 5.4.11). A mistura de ésteres metílicos foi então redissolvida em 1,2 mL de diclorometano, CH_2Cl_2, (grau HPLC, TEDIA), transferida para *vial* âmbar, que foi deixado *overnight* em capela de exaustão a 25ºC, para evaporação total do solvente. Por fim, a mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos foi redissolvida em 300 µL de heptano (grau HPLC, TEDIA) para análise por cromatografia a gás (CG) (item 5.4.14).

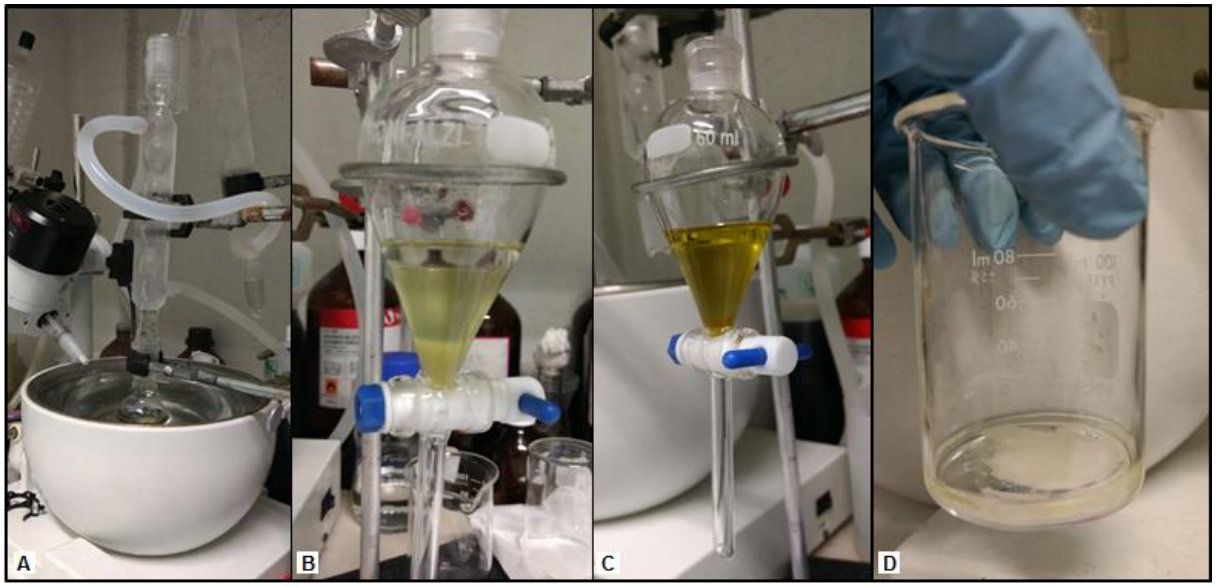


Figura 5.9: Etapas da metilação de ácidos graxos (A – amostra em banho a 100ºC sob refluxo; B – extração de ésteres metílicos com formação de emulsão; C – formação de duas fases na extração de ésteres metílicos; remoção de água do extrato de ésteres metílicos com Na_2SO_4.

5.4.13 Quantificação de linolenato de metila por CG

A identificação e quantificação de linolenato de metila (éster metílico do ácido α-linolênico) foi feita no cromatógrafo a gás Agilent Technology 6890 N, equipado com coluna CARBOWAX (J&W; dimensões: 25m x 0,25 mm; espessura do filme: 0,25 µm) e acoplado a espectrômetro de massas (Agilent Technology 5973). Alíquotas de 1µL de amostra foram injetadas, automaticamente, em modo s*plit* (1:15), em injetor com temperatura de 250ºC. A temperatura do forno da coluna foi programada para ocorrer em rampa de temperatura, iniciando a 150ºC e com aumentos de 2ºC/min até 210ºC, mantendo-se em isoterma até o final da análise, o que incidiu em período de 36 min.

Antes de executar a análise, os parâmetros de validação “limite de detecção (LD)”, “limite de quantificação (LQ)” e “linearidade” foram calculados. O limite de detecção foi encontrado segundo descrito no item 5.4.10. As concentrações analisadas para obtenção do LD foram de 0,001; 0,003; 0,005; 0,007 e 0,009 mg/mL (apêndice G). O LD foi estabelecido como a concentração mais baixa capaz de ser

detectada pelo espectrômetro de massas. O LQ foi calculado de acordo com o item 5.4.10. A faixa usada compreendeu as concentrações de 0,1 a 1 mg/mL (apêndice G). Tendo estas etapas concluídas, foi possível identificar e quantificar o analito.

A identificação do analito foi realizada a partir de comparação do tempo de retenção do padrão (F.A.M.E. Mix GLC-10; CRM1891; Sigma-Aldrich®) e espectro de massas (apêndice H) presente na base de dados SDBS.

5.5 Detalhamento experimental

Para atender aos objetivos propostos neste trabalho, serão contempladas diferentes etapas experimentais. A figura 5.10 reúne as principais etapas experimentais do trabalho para melhor entendimento do que será descrito neste tópico.

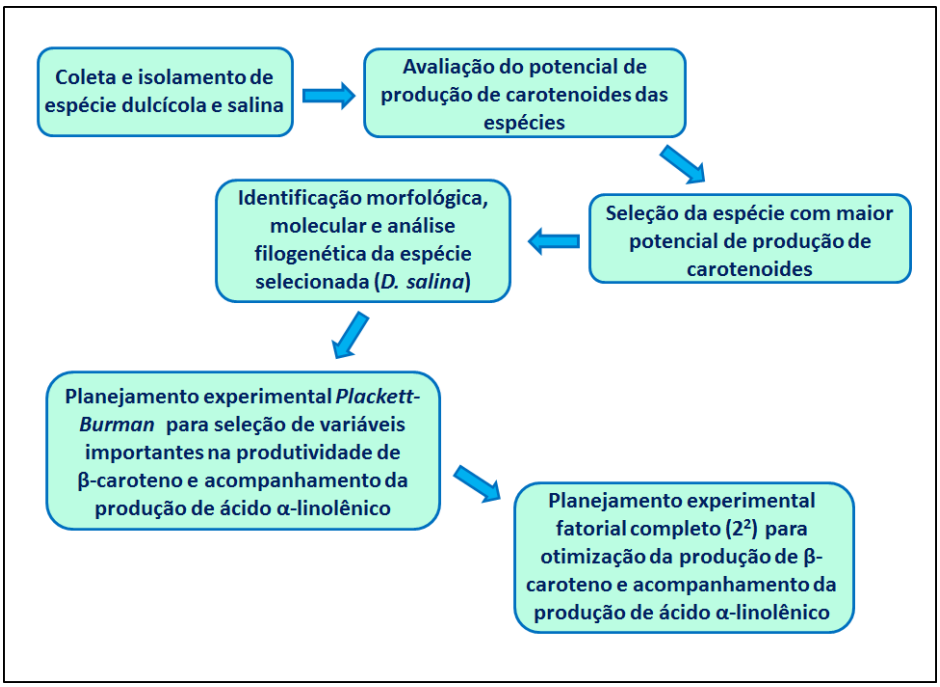


Figura 5.10: Etapas experimentais do presente trabalho.

5.5.1 Coleta de microalgas em diferentes ambientes

Com o objetivo de obter espécie(s) de microalga(s) de diferentes ambientes, dulcícola e salino, foram realizadas duas coletas. A coleta em ambiente dulcícola foi realizada à margem de um dos dois lagos do Parque Municipal da Quinta da Boa Vista, o qual pode ser visualizado na figura 5.11.

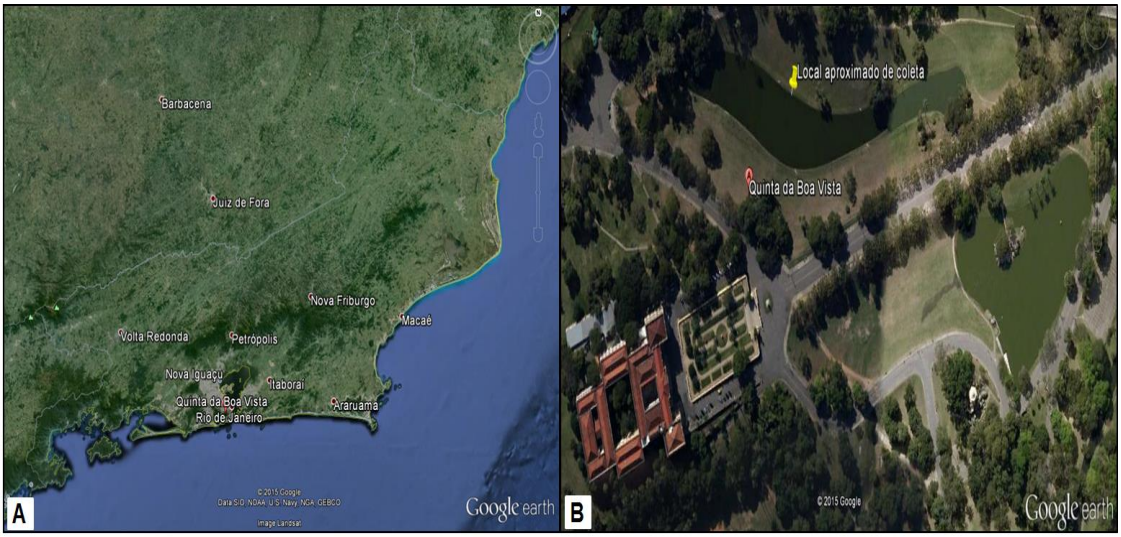


Figura 5.11: Região de coleta em ambiente dulcícola. A) Mapa de localização do Parque Municipal da Quinta da Boa Vista – RJ; B) Local de coleta marcado em amarelo; coordenadas (aproximadas): latitude: S 22°54’16.18’’; longitude: W 43°13’28.37’’.

A coleta em ambiente salino foi realizada em uma salina, localizada no município de São Pedro da Aldeia (Região dos Lagos), no Estado do Rio de Janeiro. A água foi coletada em regiões rosadas da área de produção de sal. Na figura 5.12, pode ser observada a região da coleta.

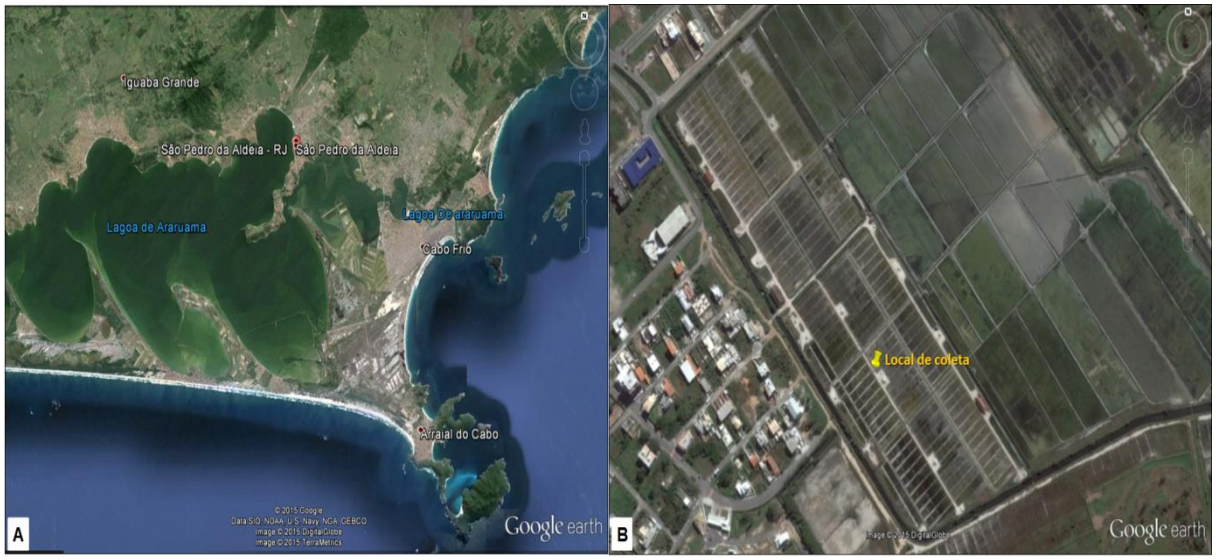


Figura 5.12: Região de coleta em ambiente salino. A) Mapa de localização do Município de São Pedro da Aldeia - RJ. B) Local de coleta marcado em amarelo; coordenadas (aproximadas): latitude: S 22°50’25.30’’; longitude: W 42°05’33.71’’.

Para realizar a amostragem, utilizou-se um aparato confeccionado com cabo longo de bambu – para promover flexibilidade e alcance a grandes distâncias – preso a um recipiente plástico, com capacidade aproximada de 500 mL, em uma de suas extremidades (figura 5.13a). Com este aparato foi possível coletar, cerca de 5 L de água que, em seguida, foram filtrados em um filtro confeccionado com tubo de pvc e malha de nylon de 200 µm em uma de suas aberturas (figura 5.13b). À medida que a água era filtrada, o filtrado era recolhido em um balde de plástico com 7 L de capacidade. Esta filtração fez-se necessária para remover organismos do zooplâncton, os quais poderiam se alimentar das microalgas presentes na água coletada (ANDERSEN; KAWASHI, 2005).

Em seguida, o filtrado obtido passou por um processo de concentração numa rede de plâncton, para aumentar a chance de coletar células viáveis em maior número e para selecionar uma faixa de tamanho de microalgas. Esse procedimento de concentração consiste em reduzir o volume de água da amostra, mantendo o número de microalgas (do tamanho desejado) que antes se encontravam num volume maior. Para isto, verteu-se todo o filtrado para dentro da rede de plâncton (20 µm de poro) (figura 5.13c). Nesta etapa, organismos menores que 20 µm saíram junto com a água pelos poros e os que permaneceram dentro da rede apresentavam

tamanho maior ou igual a 20 µm e menor que 200 µm. Sendo assim, o volume aproximado de 5 L foi reduzido a, aproximadamente, 300 mL.

Após a etapa de concentração, cerca de 60 mL da amostra foram transferidos para frascos de polipropileno (figura 5.13d) com capacidade de 250 mL. Imediatamente, o frasco com a amostra foi acondicionado dentro de um isopor até a chegada ao laboratório, onde foram processadas para isolamento, determinação de pH e salinidade. A temperatura da água foi medida no momento da coleta com um termômetro.

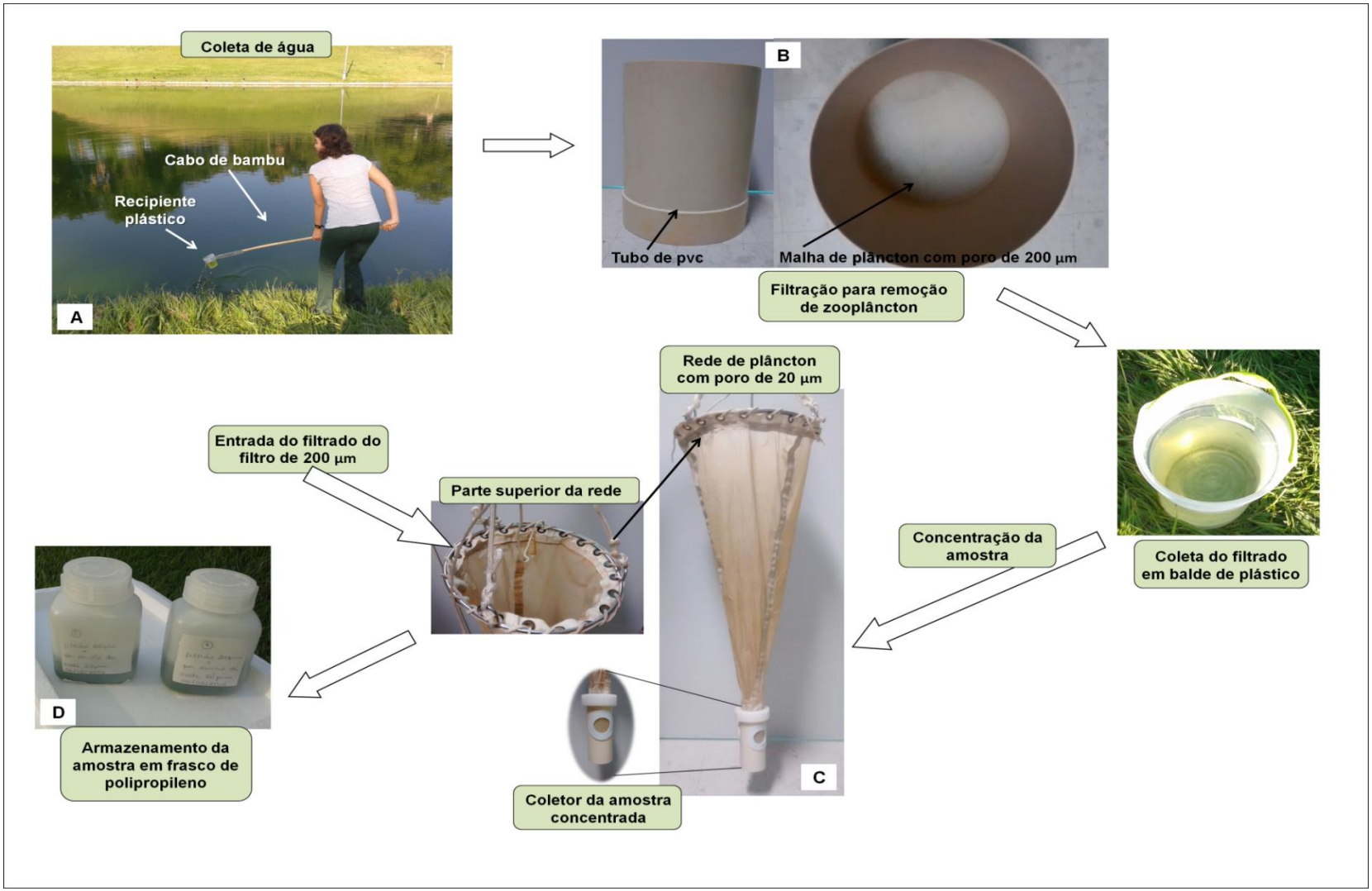


Figura 5.13: Representação das etapas da coleta de microalgas.

5.5.2 Isolamento de espécie(s) de microalga(s) de ambiente:

★ **Dulcícola**

No mesmo dia da coleta foi realizado o procedimento de isolamento por diluição em série que favorece o isolamento do organismo mais abundante na amostra (ANDERSEN; KAWASHI, 2005). Essa técnica de isolamento consistiu na realização de sucessivas diluições em placa com 96 poços, a fim de obter-se uma suspensão celular com apenas uma espécie de microalga. Conforme o fator de diluição foi aumentado, a probabilidade de se encontrar apenas uma célula de microalga em um poço também foi aumentada. A figura 5.14 ilustra as sucessivas diluições feitas na placa com 96 poços.

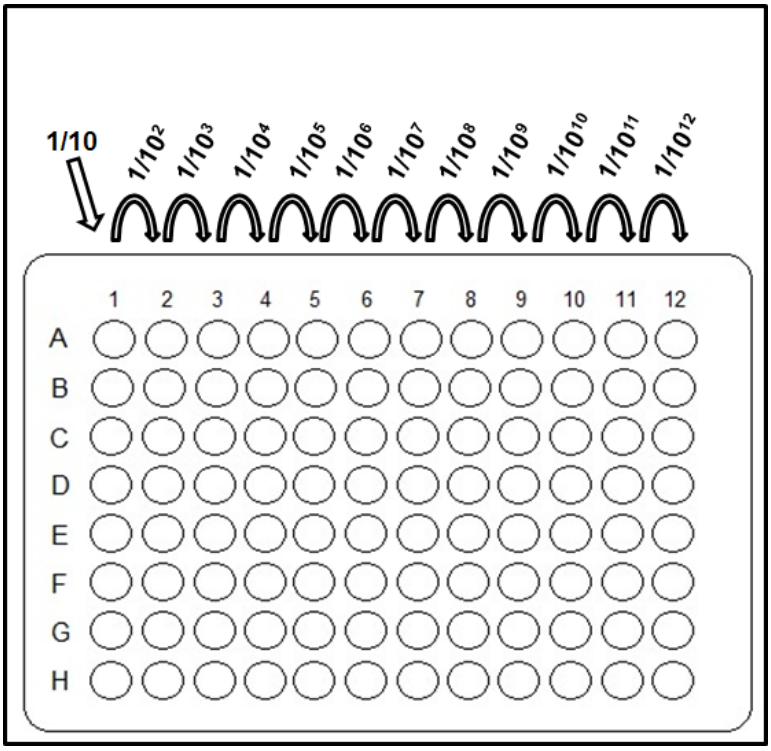


Figura 5.14: Exemplificação de uma placa com 96 poços e os fatores de diluição usados em cada fileira da horizontal.

Antes de iniciar o isolamento, foi feita a contagem de células da amostra que seria submetida ao isolamento. Desta forma, foi possível estimar após o isolamento,

em qual fator de diluição seria mais provável encontrar uma cultura originada a partir de uma célula.

As diluições da amostra coletada foram feitas em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) modificado (apêndice A) e na própria água do ambiente de coleta (previamente filtrada em membrana 0,7 µm). No primeiro poço da primeira fileira da horizontal (poço A1) a amostra foi diluída 10 vezes, acrescentando-se 10 µL de amostra e 90 µL de meio. Já nos demais poços da mesma fileira foram acrescentados 90 µL de meio de cultura ou água do ambiente de coleta. Com isso, 10 µL da suspensão do poço A1 foram adicionados ao poço A2, em seguida 10 µL do poço A2 foram transferidos para o poço A3, e assim sucessivamente. A figura 5.15 exemplifica as diluições sucessivas feitas em uma das fileiras da placa.

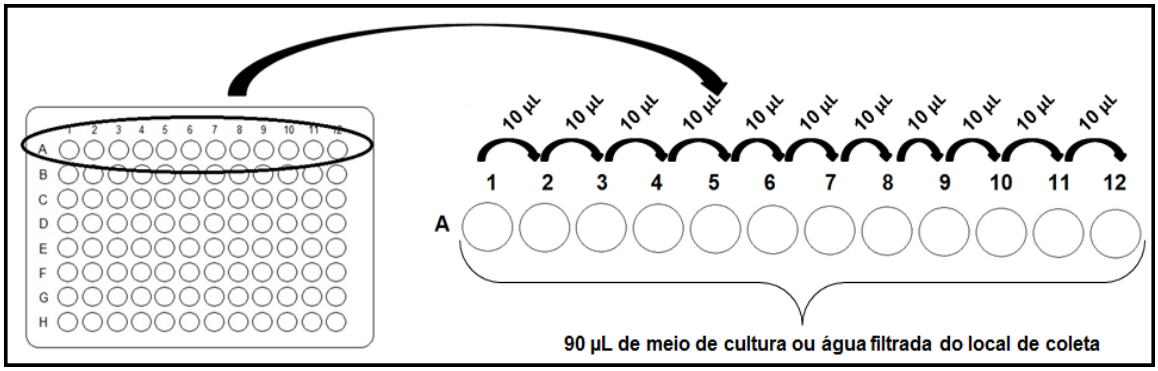


Figura 5.15: Exemplificação dos volumes de amostra e de meio de cultura usados na diluição em série.

Terminado o procedimento de diluição em série, a placa foi incubada em uma câmara de germinação a 21ºC e sob iluminação constante. Passado o tempo de crescimento celular, escolheram-se os poços em que, provavelmente, a cultura teria sido originada a partir de uma célula. Para saber o número de células de cada poço, fez-se necessária a contagem de células (seção 5.4.4.) da cultura usada no isolamento. O conteúdo de cada poço escolhido foi inoculado em diferentes *erlenmeyers* de 150 mL de capacidade, com 50 mL de meio WC modificado (apêndice A) e foram mantidos em cultivo estático, sob iluminação constante a 25ºC. A cultura que teve sucesso no crescimento celular foi submetida a um novo isolamento por diluição em série, de modo a garantir a obtenção de uma cultura clonal.

A microalga isolada foi, gentilmente, identificada com base na morfologia celular pela bióloga Pâmela Miranda sob supervisão da Profª. Valéria de Oliveira Fernandes da UFES.

★ **Salino**

O procedimento de isolamento foi realizado no mesmo dia da coleta, sendo a micropipetagem (ANDERSEN; KAWASHI, 2005) o método adotado para isolar a microalga. A técnica de micropipetagem baseou-se na escolha visual de uma única célula, observada ao microscópio, utilizando uma pipeta Pasteur de ponta fina conectada a uma mangueira em sua extremidade de maior diâmetro (figura 5.16). Com esta conexão foi possível levar a mangueira à boca para succionar a célula escolhida.

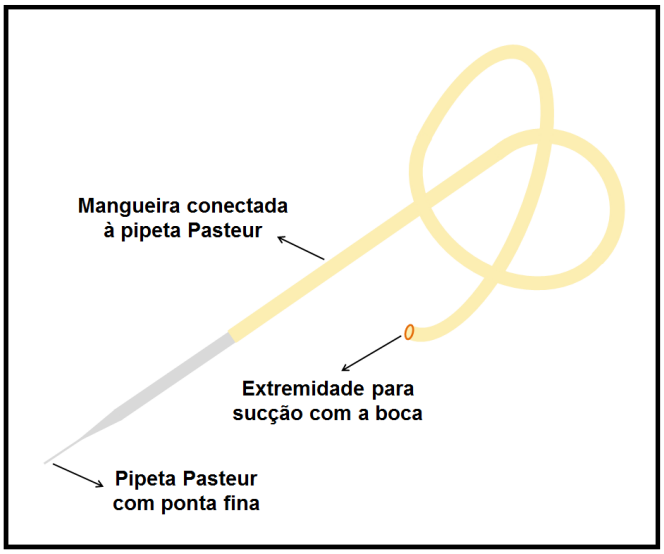


Figura 5.16: Exemplificação da montagem da pipeta Pasteur com a mangueira para a realização do isolamento por micropipetagem.

Para realizar o procedimento de isolamento, preparou-se uma lâmina com uma gota de amostra proveniente da coleta. A partir da observação da alíquota da amostra em microscópio óptico invertido, localizou-se a célula alvo e, em seguida, a mesma foi succionada. Esta célula foi transferida para a água do ambiente de coleta enriquecida com componentes do meio F/2 modificado (GUILLARD, 1975) (apêndice I), previamente filtrada em membrana 0,7 µm, que se encontrava nos poços de uma placa de polipropileno com 12 poços. Este procedimento foi realizado até que todos os poços tivessem sido inoculados com uma célula. Após a transferência das células

para os poços, a placa foi incubada em câmara de germinação a 21ºC e sob iluminação constante.

Depois de 1 mês de incubação, o conteúdo dos poços foi inoculado em *erlenmeyer* de 150 mL com 50 mL de meio salino (apêndice B), a fim de favorecer o crescimento celular. Após, cerca de 2 meses, esta cultura que inicialmente era verde, passou a ter a coloração laranja e, a partir disto, a mesma passou a ser cultivada em meio salino modificado (com $NaNO_3$ 0,0479 g/L). Passados alguns dias de cultivo em meio com restrição de $NaNO_3$ foi possível perceber a formação de um fino halo laranja na parte superior suspensão celular, enquanto que o restante da suspensão de células se apresentava verde. Tal fato indicava a presença de, pelo menos, duas espécies de microalgas.

A partir da observação da formação do halo laranja, procedeu-se a retirada das células aderidas às paredes internas do *erlenmeyer* com auxílio de alça de platina, em condições assépticas (figura 5.17). Em seguida, o conteúdo recolhido foi inoculado em meio salino modificado.

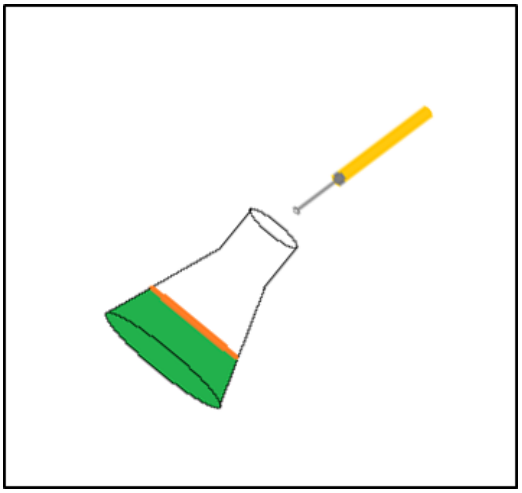


Figura 5.17: Ilustração da retirada do halo laranja que ficou aderido à parede do frasco com a alça de platina.

Quando o cultivo se tornou laranja, em cerca de 15 dias, foi feito um isolamento por diluição em série, assim como descrito anteriormente para a espécie dulcícola. Entretanto, as diluições para a espécie salina foram feitas em meio salino modificado. Assim como para a espécie dulcícola, também foram feitos dois isolamentos por diluição seriada. Para melhor entendimento, a figura 5.18 ilustra a sequência de isolamentos realizados para a espécie salina.

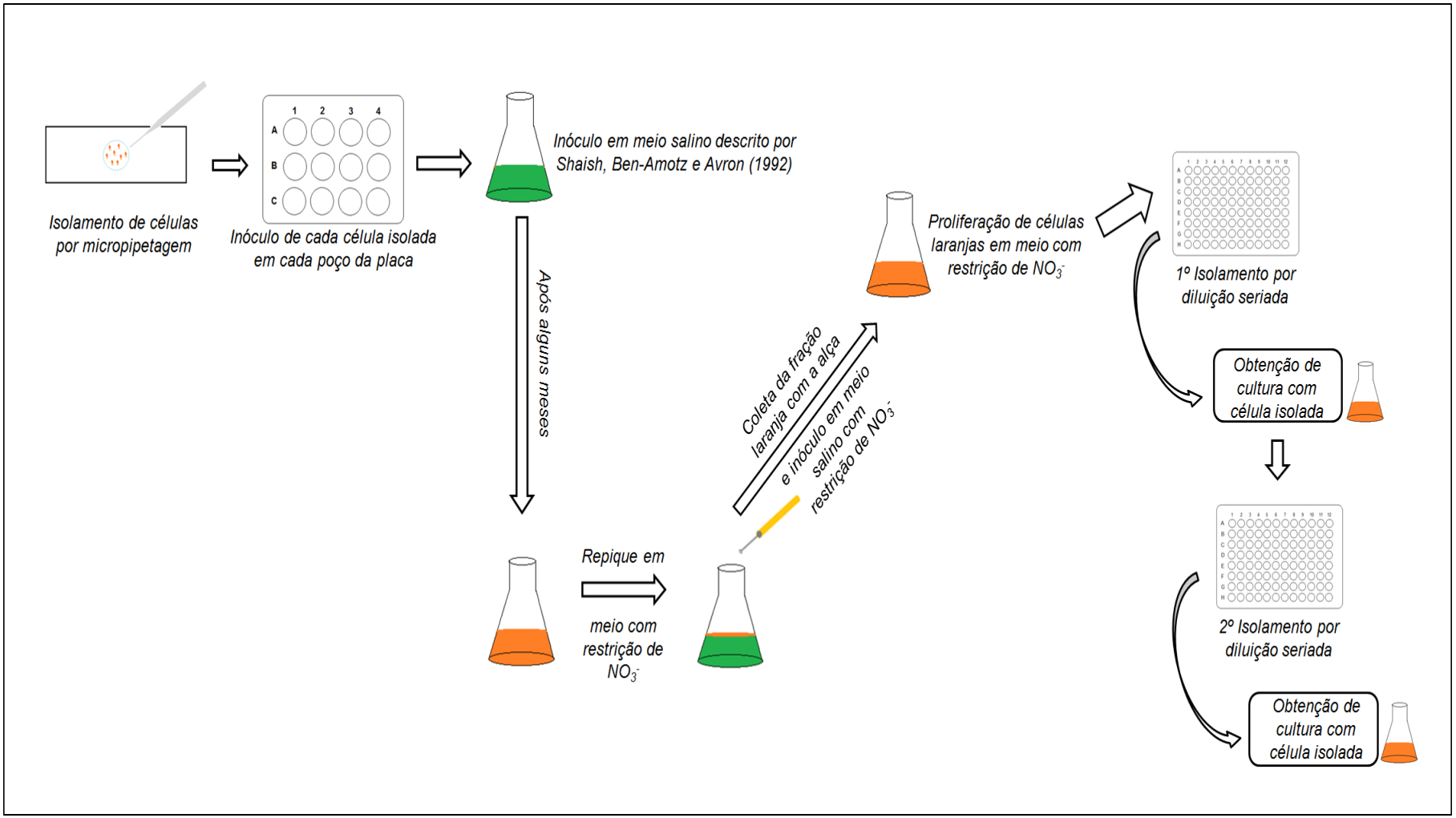


Figura 5.18: Ilustração das etapas de isolamento da microalga proveniente de ambiente salino.

5.5.3 Avaliação da produção de carotenoides por diferentes microalgas

Esta etapa consistiu em comparar a produção de carotenoides por quatro espécies de microalgas: duas isoladas no presente trabalho e duas obtidas de coleção de cultura (*C. zofingiensis* e *H. pluvialis*).

★ **Pré-inóculo**

Inicialmente, foi feito o preparo do pré-inóculo a partir do cultivo das microalgas em frascos *erlenmeyers* de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura, em sala climatizada (23 – 27 ºC). Os cultivos foram submetidos à agitação orbital de 180 rpm (Marconi, MA 140 CFT) (figura 5.19) e iluminação de lâmpadas fluorescentes (20 W) com irradiância de 200 ± 10 µmols de fótons. $m^{-2}.s^{-1}$. A espécie salina foi cultivada em meio salino modificado (apêndice B). Já as espécies dulcícolas foram cultivadas em meio WC modificado (apêndice A).

Figura 5.19: Mesa agitadora usada no cultivo de microalgas.

★ **Inóculo**

Quando as células do pré-inóculo alcançaram a fase exponencial de crescimento, um volume do pré-inóculo foi centrifugado a 3000 rpm a 15ºC por 10 minutos (centrífuga Rotixa 50 S, Hettich). Em condições assépticas, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* celular foi ressuspenso e inoculado em outro *erlenmeyer* com capacidade de 500 mL, contendo 300 mL de meio salino ou dulcícola.

A concentração celular inicial estabelecida foi de $3x10^4$ células/mL. No caso da espécie *C. zofingiensis* a concentração inicial foi $3x10^5$ células/mL, com base em resultados de trabalhos do laboratório com *C. vulgaris*. Essas novas culturas foram cultivada em condições de irradiância, agitação e temperatura ambiente iguais as do pré-inóculo.

Diariamente, foram retiradas alíquotas para determinação do crescimento celular e consumo de NO_3^-. Quando as células alcançaram a fase estacionária de crescimento, foram feitas determinações analíticas de: massa seca ou massa seca livre de cinzas, carotenoides totais, identificação da produção de cantaxantina e β-caroteno.

Os experimentos foram encerrados na fase estacionária, porque é nesta fase em que, geralmente, ocorre a limitação de nutrientes. O objetivo foi manter as células sob escassez de nitrato na fase estacionária, já que este nutriente é um dos fatores indutores do acúmulo de carotenoides do metabolismo secundário. Esta indução da produção de carotenoides pela escassez de nitrogênio é encontrada na literatura para as espécies *D. salina*, *H. pluvialis* e *C. zofingiensis* (PRIETO; CAÑAVATE; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2011; IMAMOGLU; DALAY; SUKAN, 2009; MULDERS et al., 2015).

5.5.4 Identificação morfológica, molecular e análise filogenética da cepa selecionada

A execução e análise de dados das etapas de identificação e análise filogenética foram realizadas pela Dra. Thaís Garcia da Silva, pesquisadora do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), parceira neste estudo.

A identificação morfológica da espécie selecionada como melhor produtora de carotenoides foi realizada observando-se o ciclo de vida em microscópio (Axioplan 2 Imaging; Zeiss), seguindo as chaves de identificação descritas por Teodoresco (1905) e Borowitzka & Siva (2007). Para a identificação molecular da cepa, extraiu-se o DNA da cultura microalgal conforme descrito por Garcia et al. (2017), com o kit Invisorb® Spin Plant Mini (STRATEC Biomedical AG; Alemanha).

As moléculas de DNA foram amplificadas segundo Bock et al. (2011), usando os *primers* NS7m e LR1850 (AN et al. 1999) e ITS055R (MARIN et al. 1998). O sucesso da amplificação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed® (Biotium, CA, EUA). Para a remoção dos resíduos da reação de amplificação, o produto de extração foi purificado com polietileno glicol (PEG), segundo Rosenthal et al. (1993). Após a execução das etapas descritas, o material foi enviado para a empresa Macrogen Inc. (ABI 3130-Genetic-Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Alemanha) para sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados na amplificação.

Para a análise filogenética, foi obtida uma nova sequência de ITS-2 que foi incluída no GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI]). O conjunto de dados utilizado na análise filogenética encontra-se no quadro 5.3, bem como as 27 sequências referências obtidas no GenBank.

A inferência baseada no ITS-2 foi realizada com 28 sequências (272 posições de bases), manualmente alinhadas com auxílio do Align - Manual Sequence Alignment Editor (HEPPERLE, 2004). O alinhamento foi analisado segundo máxima verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) no Treefinder (JOBB, 2008) e distância (Neighbor Joining; NJ) no PAUP* (portable version 4.0b10) (SWOFFORD, 2002). O modelo evolutivo aplicado foi o GTR+G para ML e GTR+GI para a análise Bayesiana, como sugerido pelo MrModeltest (NYLANDER, 2004), com amostragem a cada 100 gerações. A fidelidade da topologia da árvore foi testada após o cálculo de 1000 valores de *bootstrap* para os critérios de NJ e ML. Para a análise Bayesiana, utilizou-se o programa MrBayes versão 3.1. (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), aplicando-se duas corridas com quatro cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), com um milhão de gerações. A distribuição estacionária foi assumida quando a média dos desvios-padrão entre as sequências das duas

corridas foi menor que 0,01, utilizando-se o programa Tracer V1.4 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007) para checar a fase estacionária e os valores de *burn-in* apropriados. Foram descartadas 25% do total das árvores iniciais para o cálculo de consenso da regra da maioria em 50% (50% *majority–rule consensus*) para as probabilidades posteriores (PP). A edição das árvores foi feita no programa TreeGraph 2 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

A estrutura secundária do ITS-2 da cepa isolada de *Dunaliella salina*, sob o número de acesso no GenBank AF313431, foi obtida na base de dados The ITS-2 Database (ANKENBRAND et al., 2015) e utilizada como modelo para a nossa sequência, sendo adaptada à mão. A estrutura secundária foi gerada com o auxílio do programa 4 SALE v1.5 (SEIBEL et al. 2006) com o mínimo de energia livre (*minimum free energy* - MFE) da estrutura secundária de sequências simples, sendo o equilíbrio da probabilidade de emparelhamento das bases predito. A estrutura secundária do RNA foi visualizada no Pseudoviewer 3 (BYUN; HAN 2009).

Quadro 5.3: Lista das cepas estudadas na análise filogenética, suas sequências de ITS-2 obtidas através do GenBank e informações de origem geográfica

Coleção de cultura	Assunção et al. (2012) (aceito neste trabalho)	Identificação da cepa	Número de acesso no Genbank	Origem Geográfica
Dunaliella bardawil Ben-Amotz & Avron	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	ATCC 30861	AF313431	Israel
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	-	CCMA-UFSCar 711	KX290495*	Brasil
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	ITC5000	HM035351	Israel
Dunaliella bardawil Ben-Amotz & Avron	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	UTEX 2538	DQ377085	Israel
Dunaliella sp. Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	CCAP 19/12	HM035342	Israel
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	CCAP 19/30	EU932917	Israel
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	ITC 5119	HM035349	França
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	ITC 5105	HM035346	Espanha
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	UTEX 1644	AF313429	EUA
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco	AC144	AY549441	Tunísia
Dunaliella tertiolecta Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	SAG 13.86	EF473738	Noruega
Dunaliella bioculata Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	CCAP 19/27	EF473748	Canadá
Dunaliella bioculata Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	CCAP 19/27	HM035344	Canadá
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	SAG 42.88	EF473741	Israel
Dunaliella parva W.Lerche	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	CCAP 19/9	AF313439	Inglaterra
Dunaliella tertiolecta Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	CCAP 19/6B	AY572957	Noruega
Dunaliella bioculata Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	UTEX199	DQ157433	União Soviética
Dunaliella quartolecta Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	CCAP 19/8	DQ157054	Inglaterra
Dunaliella primolecta Butcher	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	UTEX 1000	AY582942	Inglaterra
Dunaliella maritima Massjuk	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	SAG 42.89	AY582086	União Soviética
Dunaliella sp. Teodoresco	*Dunaliella tertiolecta* Butcher	CCAP19/2	HM035343	EUA
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella viridis* Butcher	CCAP 19/3	EF473744	União Soviética
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella viridis* Butcher	UTEX 200	AF313423	União Soviética
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	*Dunaliella viridis* Butcher	SAG 184.80	AY577766	-
Dunaliella parva W.Lerche	Dunaliella salina Butcher	SAG 19.1	DQ377091	Romênia
Outgroups				
Chlamydomonas reinhardtii P.A.Dangeard	-	SAG 11.31	AJ749628	Reino Unido
Pandorina morum (O.F.Müller) Bory	-	EP3	AF378359	EUA
Eudorina elegans Ehrenberg	-	UTEX 1192	AF098173	-

[1]Cepa isolada no presente trabalho, doravante denominada CCMA-UFSCar 711**;**
[2] Sequência obtida a partir da cepa isolada

5.5.5 Elaboração de sistema de iluminação com LEDs brancos

Foram elaboradas luminárias, cada uma contendo um placa com lâmpadas LEDs (Light Emitting Diode) com potência de 6 ou 9 W (5000 K; Osram). Para a baixa irradiância (200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$), foi utilizada placa com LEDs de 6 W (figura 5.20e), enquanto as de 9 W (figura 5.20f) foram usadas nos cultivos de irradiância de 600 e 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

Como pode ser visualizado na figura 5.20, foi utilizada placa retangular de madeira (64 x 5 cm), como base das luminárias (figura 5.20b), onde em uma das extremidades foi aparafusada uma placa de alumínio (7,5 x 5 cm). O uso da placa de alumínio foi necessário para que houvesse a dissipação do calor gerado pelos LEDs, prevenindo danos aos mesmos. As placas de LEDs, retiradas do bulbo das lâmpadas, foram aparafusadas à placa de alumínio, e os terminais de entrada de corrente (figura 5.20d) da placa de LEDs foram soldados a um fio (0,5 mm) que teve sua outra extremidade conectada à saída do terminal da placa com circuito impresso (figura 5.20c). Fios de 1,5 mm foram conectados a terminais de compressão metálicos machos (figura 5.20g-h). Por fim, fez-se o uso de espaguete termo retrátil para isolar a placa de circuito (figura 5.20b), de maneira a preservar seus componentes e prevenir choque elétrico.

Cada luminária ficou presa a um suporte o qual sobrepunha à mesa agitadora onde foi feito o cultivo. Este suporte (figura 5.21a-b) também foi confeccionado em madeira e nele foram dispostos 13 conectores com terminais de compressão fêmea (figura 5.21a), ligados em circuito paralelo ao longo de um fio paralelo de 1,5 mm. Desta forma, para que cada luminária fosse acesa, foi preciso unir o conector macho da luminária ao conector fêmea do suporte (figura 5.21c-e) e ligar o circuito à corrente elétrica com uma tomada.

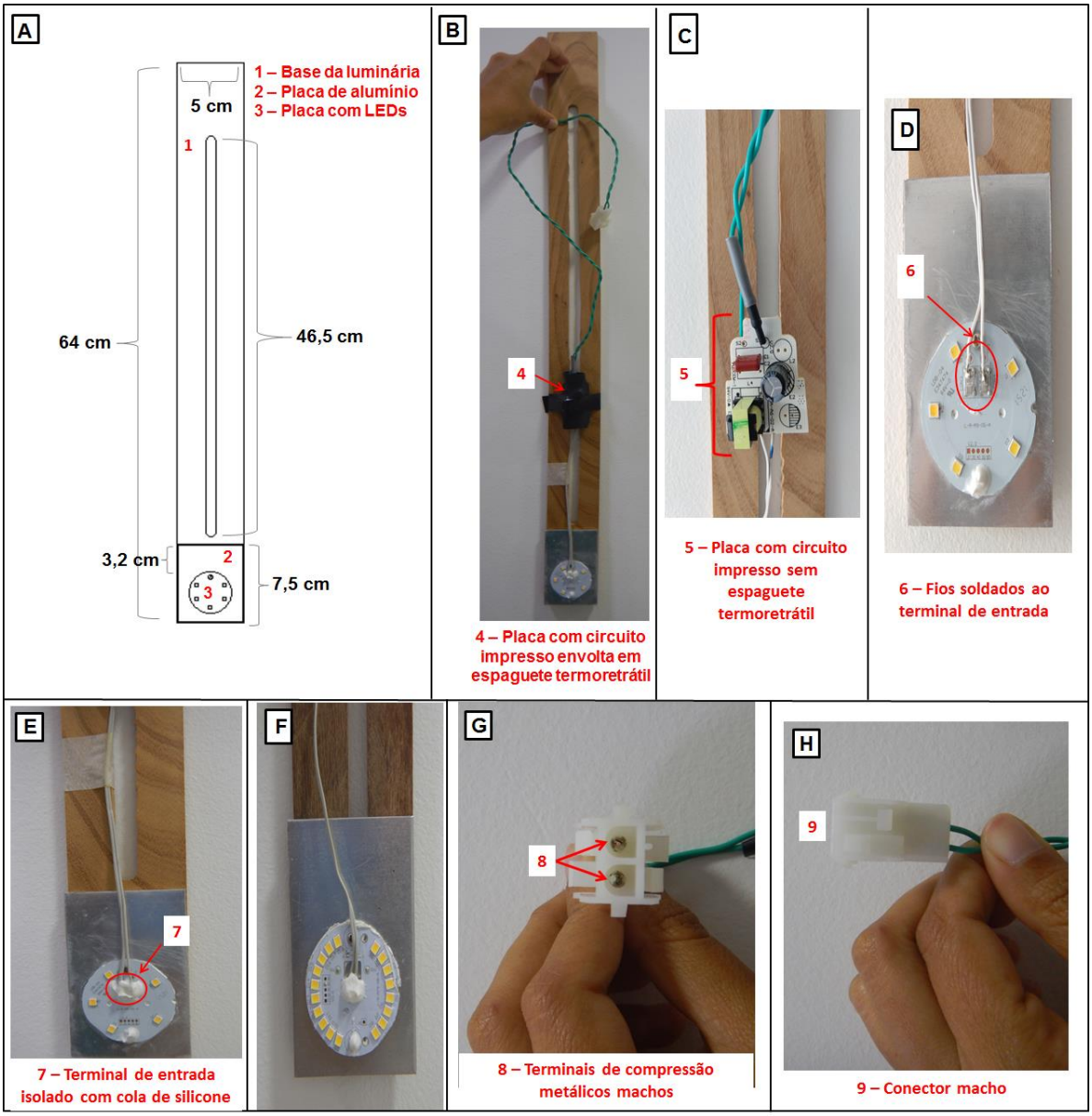


Figura 5.20: Imagem ilustrativa dos componentes da luminária de LED (A – Desenho esquemático da luminária de LED; B – Luminária com todos seus componentes; C – Placa com circuito impresso; D – Placa de alumínio dissipadora de calor conectada à placa com LED; E – Placa com LED (6 W); F – Placa com LED (9 W); G – Terminais de compressão machos dentro de conector macho; H – Visão lateral do conector macho).

Figura 5.21: Imagem ilustrativa do sistema de iluminação completo. (A – Terminais metálicos fêmeas dentro de conector fêmea e visão geral da estrutura de suporte para as luminárias; B – A região pontilhada destaca a área em que os conectores foram instalados; C – Em destaque, conectores fêmea e macho unidos; D – Sistema completo com luminárias acesas; E – Cultivo de *D. salina* CCMA-UFSCar 711 com cada luminária direcionada a um frasco diferente).

5.5.6 Análise comparativa dos perfis cinéticos de crescimento da cepa isolada *D. salina* sob iluminação com lâmpadas fluorescentes e LED

Foram realizados testes iniciais para comparar o desempenho do crescimento celular de *D. salina* sob iluminação de lâmpadas fluorescentes (20 W) e de LED branca neutra (6 W). Para isso, foram conduzidos dois cultivos, cada um em triplicata, em frascos *erlenmeyers* com 300 mL de meio salino (apêndice B) modificado de maneira a conter baixa concentração de $NaNO_3$ (0,0479 g/L), a fim de visualizar a mudança da coloração verde para laranja da cultura. Os cultivos foram iniciados com concentração celular inicial de aproximadamente $3x10^4$ células/mL. As condições de operação foram: irradiância de 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, agitação orbital de 180 rpm; e controle de temperatura à 25±2ºC. Diariamente, acompanhou-se o crescimento celular por contagem direta de células, sendo determinada a massa seca livre de cinzas ao término da fase estacionária.

5.5.7 Avaliação dos consumos de nitrato e fosfato sob iluminação com LED

Análises de fosfato e de nitrato também se fizeram necessárias para definir os limites de concentração destes elementos no planejamento experimental *Plackett-Burman*. Desta forma, os íons fosfato e nitrato foram quantificados (item 5.4.6 e 5.4.5), diariamente, em cultivos com concentração original de nitrato (apêndice B) e com iluminação de lâmpadas de LED.

5.5.8 Avaliação da influência da presença de sal em amostras de *D. salina* na extração de lipídios totais

O método de extração de lipídios totais usado neste trabalho (item 5.4.11) não foi, originalmente, desenvolvido para amostras com alto teor de sal. Desta forma, seria necessária a lavagem da biomassa de *D. salina* para que os sais fossem removidos, uma vez que a presença deles é devido ao uso de sobrenadante para liofilização das células (item 5.4.11). Porém, segundo experiências prévias, essa lavagem não é possível, porque ocorre lise celular, levando à perda de conteúdo intracelular. Sabendo-se disso, avaliou-se a extração de lipídios totais em biomassas de *D. salina* contendo 1 e 3M de NaCl, com o objetivo de verificar a existência de interferências no processo extrativo. Estas concentrações salinas foram estudadas,

porque seriam encontradas em amostras dos experimentos dos planejamentos experimentais, em que se faria necessária a extração de lipídios totais.

Para realização desta avaliação, a espécie foi cultivada em meio de cultura salino (apêndice B), sob 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ de lâmpadas LED, 25ºC, 180 rpm de agitação orbital (Marconi, MA 140 CFT). Após o término do cultivo as culturas foram centrifugadas, ressuspensas em 10 mL de meio 1 M e 3 M de NaClpara serem liofilizadas. Após a liofilização a biomassa teve seus lipídios extraídos, em triplicata, para cada concentração salina estudada, conforme o item 5.4.11. Os resultados das médias de lipídios totais de amostras com 1 e 3 M de NaCl foram comparados por meio de teste t-*Student*.

5.5.9 Planejamento experimental *Plackett-Burman*

As publicações em que se estuda a produção de β-caroteno por *D. salina* sinalizam a escassez de nutrientes como nitrato e fosfato, a elevada concentração de NaCl e a irradiância de luminosa como indutores da carotenogênese (LERS; BIENER; ZAMIR, 1990; LAMERS et al., 2010; LAMERS et al., 2012; GÓMEZ; GONZÁLEZ, 2005; GÓMEZ et al., 2003; BOROWITZKA; BOROWITZKA; KESSLY, 1990).

Considerando que existem diferenças intraespecíficas, fez-se necessária a realização de uma varredura, a fim de selecionar variáveis que, realmente, fossem significativas estatisticamente, na produtividade volumétrica de β-caroteno (Q_p), para posterior otimização do processo. Com isso, adotou-se a estratégia de cultivo em duas etapas, sendo a primeira destinada ao crescimento celular (pré-inóculo) e a segunda direcionada ao *screening* com as variáveis concentração de NO_3^-, concentração de PO_4^{3-}, concentração de NaCl e irradiância, por meio de planejamento experimental do tipo *Plackett-Burmann* (*P&B*).

Para a realização dos experimentos do planejamento experimental, foram definidos os valores dos níveis “-1” e “+1”, de acordo com informações encontradas na literatura e com resultados de experimentos preliminares. Para as variáveis com nível “-1”, foram adotadas condições extremas que provavelmente causariam estresse celular. Já para o nível “+1’’, foram definidos valores para condições de

cultivo para crescimento da microalga em laboratório. Os pontos centrais referem-se a condição intermediária entre os níveis máximo e mínimo, não fazendo parte da matriz de experimentos. No quadro 5.4 estão expostos os valores escolhidos para os níveis de cada variável independente estudada.

Quadro 5.4: Variáveis escolhidas para o planejamento *P&B* e seus níveis.

Variáveis	**Níveis**		**Ponto Central**
	-1	+1	0
Irradiância ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)	1000	200	600
[NaCl] (M)	3	1	2
[PO_4^{3-}] (mg/L)	0	18,9	9,45
[NO_3^-] (mg/L)	0	310	155

Neste tipo de planejamento, utilizou-se a matriz *Plackett-Burman* para sete variáveis, totalizando oito experimentos (quadro 5.5) tendo as três últimas colunas X5, X6 e X7 não preenchidas por não estarem associadas a variáveis.

Quadro 5.5: Matriz experimental usada no planejamento *Plackett-Burman* para 4 variáveis e 8 experimentos

	Variáveis						
Experimento	**X1**	**X2**	**X3**	**X4**	**X5**	**X6**	**X7**
1	+	+	+	-			
2	+	+	-	+			
3	+	-	+	-			
4	-	+	-	-			
5	+	-	-	+			
6	-	-	+	+			
7	-	+	+	+			
8	-	-	-	-			
Ponto Central 1	0	0	0	0			
Ponto Central 2	0	0	0	0			

X1: Irradiância; X2: [NaCl]; X3: [PO_4^{3-}]; X4: [NO_3^-].

Antes dos experimentos do planejamento serem executados, primeiramente, foram feitos cultivos para obtenção de pré-inóculo. Para isto, a espécie *D. salina* foi cultivada em *erlenmeyers* com 300 mL de meio salino (apêndice B), contendo NaCl 1M, sob 180 rpm de agitação orbital, iluminação de LEDs brancos com irradiância de 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e 25±2ºC de temperatura. Para dar início aos experimentos do planejamento, aguardou-se as culturas de pré-inóculo alcançarem a fase exponencial de crescimento. Atingida esta fase, as culturas foram centrifugadas (tópico 5.5.3) e o *pellet* celular ressuspenso em 300 mL de meio, de forma a conter, aproximadamente, $3x10^5$ células/mL após o inóculo. Os meios utilizados na ressuspensão foram o salino (apêndice B), havendo alterações nas concentrações de NO_3^-, PO_4^{3-}, NaCl e irradiância, conforme observado no quadro 5.4. As condições de agitação orbital e temperatura usada no planejamento experimental foram as mesmas do pré-inóculo.

Devido a limitações operacionais, os oito experimentos do planejamento experimental não foram realizados de uma só vez, sendo divididos em dois blocos e feitos de forma aleatória juntamente com um ponto central por bloco para cálculo do desvio-padrão experimental. Os experimentos foram finalizados após 14 h, de acordo com observações feitas em experimentos preliminares.

Ao término do período experimental, foram determinadas as concentrações β-caroteno (9-cis-β-caroteno + todo-trans-β-caroteno) e ácido α-linolênico nas biomassas obtidas para cada uma das oito condições experimentais testadas. Os valores obtidos foram ainda utilizados para cálculo das produtividades volumétricas em β-caroteno e ácido α-linolênico (equação 9), sendo estas as variáveis de resposta adotadas para análise de significância das variáveis independentes usadas do planejamento.

<u>Equação 9</u>:

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{t_f}$$

Onde:

- ⇨ Q_p é a produtividade volumétrica de produto (β-caroteno ou ácido α-linolênico) em $mg/L^{-1}.h^{-1}$;
- ⇨ P_f é a concentração final de produto (β-caroteno ou ácido α-linolênico) em mg/L;
- ⇨ P_0 é a concentração inicial de produto (β-caroteno ou ácido α-linolênico) em mg/L;
- ⇨ t_f é o tempo de cultivo, em horas, dos experimentos durante planejamento.

Este tipo de planejamento experimental pressupõe que as interações de segunda ordem são desprezíveis, sendo o comportamento da resposta avaliada frente as variáveis estudadas, expresso por uma equação polinomial de primeiro grau (equação 10).

<u>Equação 10:</u>

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6 + b_7x_7$$

Onde:

- ⇨ y é a resposta medida (Q_p em β-caroteno ou ácido α-linolênico)
- ⇨ b_1, b_2, b_3 e b_4 são os coeficientes associados às variáveis x_1, x_2, x_3 e x_4;
- ⇨ b_5, b_6 e b_7 são os coeficientes associados às variáveis x_5, x_6 e x_7 que, neste caso, não foram usadas;
- ⇨ b_0 é a interseção da reta com o eixo y.

Os coeficientes do modelo foram calculados a partir da equação 11 (Q_p em β-caroteno ou ácido α-linolênico). A cada resposta foi incorporado o sinal positivo ou negativo correspondente ao experimento e à coluna da variável associada ao coeficiente em questão. Os sinais podem ser mais bem visualizados na tabela matriz representada pelo quadro 5.5. Deve-se destacar que para cálculo da variável b_0, consideraram-se todas as respostas com sinal positivo, não estando associada a

nenhuma variável e, consequentemente, a um nível “–”ou “+” para ter seu sinal alterado.

Equação 11:

$$Efeito = \frac{(\Sigma\ respostas\ (+) - \ \Sigma\ respostas\ \ (-))}{N^{\underline{o}}\ respostas\ (+)}$$

Onde:

- ⇨ Efeito é o coeficiente que se deseja encontrar o valor;
- ⇨ Σ respostas (+) é o somatório das respostas com sinal positivo;
- ⇨ Σ respostas (-) é o somatório das respostas com sinal negativo;
- ⇨ Nº respostas (+) é o número de respostas com sinal positivo na coluna correspondente ao coeficiente que se deseja calcular.

A significância estatística dos coeficientes foi determinada a partir da análise do intervalo de confiança. Foi calculada a variância experimental do ponto central (equação 12), o desvio-padrão (equação 13) dos resultados experimentais do ponto central e, por último, o intervalo de confiança (equação 14).

Equação 12:

$$s^2 = {}^{\Sigma\ (y_i - y_m)}/_{n-1}$$

Equação 13:

$$s = \sqrt{s^2}$$

Equação 14:

$$IC = efeito \pm t_{\alpha,n}.s_{pc}$$

Onde:

- ⇨ s^2 é a variância experimental do ponto central;
- ⇨ y_i é o valor de cada resposta medida (Q_p em β-caroteno ou ácido α-linolênico);
- ⇨ y_m é a média de todas as respostas medidas;
- ⇨ n é o número de pontos centrais.
- ⇨ s é o desvio-padrão experimental do ponto central;
- ⇨ IC é o intervalo de confiança;
- ⇨ efeito é o valor calculado para cada coeficiente do modelo;
- ⇨ $t_{\alpha,n}$ é o valor de t-student tabelado para o número de experimentos do planejamento, em tabela bilateral com 95% de confiança;
- ⇨ s_{pc} é o desvio-padrão dos pontos centrais.

5.5.10 Planejamento Experimental Fatorial Completo

Após a seleção de variáveis relevantes (irradiância e NaCl) na produtividade de β-caroteno e ácido α-linolênico, foram utilizados os resultados do *Plackett-Burman* para cálculo do planejamento experimental fatorial 2^2, visando a otimização das produtividades, nos mesmos níveis do planejamento anterior. Os pontos centrais, não compõem os experimentos da matriz, foram usados para cálculo de desvio-padrão experimental e verificação da presença de curvatura no modelo matemático. No quadro 5.6, encontra-se a matriz experimental de planejamento fatorial completo 2^2.

Quadro 5.6: Matriz experimental usada no planejamento 2^2

Experimento	X1	X2
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
Ponto Central 1	0	0
Ponto Central 2	0	0

X1: irradiância; X2: [NaCl].

Os cálculos para encontrar os valores dos coeficientes do modelo foram feitos da mesma forma conforme descrito para o *P&B*. A equação que representa o comportamento da resposta (Qp em β-caroteno ou ácido α-linolênico) do planejamento fatorial 2^2 é linear (equação 15),.

Equação 15:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

Onde:

- ⇨ y é a resposta medida (Qp em β-caroteno ou ácido α-linolênico);
- ⇨ b_1 e b_2 são os coeficientes associados às variáveis x_1 e x_2;
- ⇨ b_{12} é o coeficiente associado à interação das variáveis x_1x_2;
- ⇨ b_0 é a interseção da reta com o eixo y.

Os resultados obtidos nestes experimentos foram lançados em gráficos no *software* Excel 2010.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos locais de coleta

Na tabela 6.1, estão compilados os dados referentes às características dos locais de coleta e das amostras coletadas.

Tabela 6.1: Caracterização das amostras coletadas e dos locais de coleta

	Resultados	
Parâmetros	**Ambiente salino**	**Ambiente dulcícola**
Coloração da água	Rosada	Esverdeada
Temperatura da água (°C)	30	26
pH	7,50	10,06
Salinidade	330	0
Características das células (aumento 400x)	Presença de células laranjas, ovais e em movimento	Abundância de células redondas com espinhos, verdes e estáticas

Em relação à coloração (figura 6.1a), nota-se que o ambiente salino apresentava característica de presença de organismos, predominantemente, produtores de carotenoides. Esta ocorrência era preponderante em locais onde a salinidade era maior, segundo relato de um profissional da salina. Tal fato aumentou a suspeita de que poderia se tratar da espécie carotenogênica *D. salina*, uma vez que a alta salinidade é reportada como um dos fatores de estresse que induzem à carotenogênese (LAMERS et al., 2008). Após observação da amostra ao microscópio foi possível verificar a presença de células laranjas, aparentando conter apenas um tipo de célula. Além disso, a salinidade encontrada neste ambiente foi próxima à saturação (cerca de 35%), o que restringe o número de espécies que podem sobreviver nesta condição.

Já no caso do ambiente dulcícola, a coloração indicava a presença de algas verdes (figura 6.1b). Fato evidenciado pela observação de abundância de células verdes em microscópio óptico. Também foi possível observar outros micro-organismos, incluindo outras microalgas, bactérias e até mesmo um protozoário.

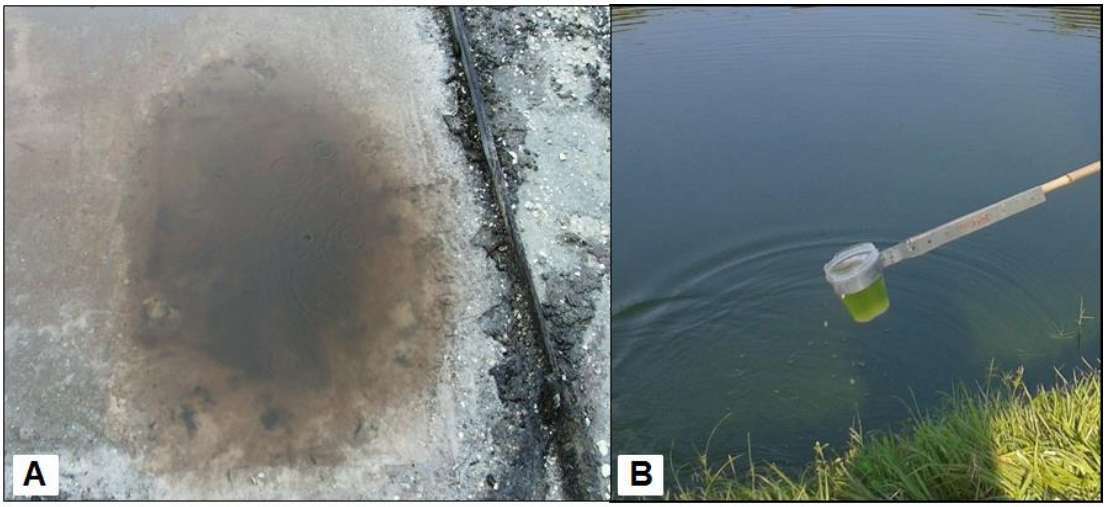


Figura 6.1: Coloração da água em seus ambientes de coleta. A - Água rosada da salina (ambiente salino); B - Água esverdeada do lago da Quinta da Boa Vista (ambiente dulcícola).

A respeito da temperatura, observa-se que as temperaturas registradas foram 30ºC e 26ºC nos ambientes salino e dulcícola, respectivamente. De uma maneira geral, pode-se dizer que a faixa de tolerância das microalgas é de 15 a 26ºC, mas a temperatura ótima para o crescimento pode variar de acordo com a espécie (TEBANNI et al., 2014).

Podemos notar que o pH da água da salina era próximo da neutralidade. Já o pH da água do lago era alcalino. Geralmente, faixas de pH em torno de valores neutros são as ideais para o crescimento de microalgas. Entretanto, algumas espécies podem tolerar valores extremos de pH (TEBANNI et al., 2014).

6.2 Isolamento de microalgas

★ Ambiente dulcícola

Após algumas semanas de incubação foi possível perceber, a olho nú, que houve o crescimento das culturas apenas em meio WC modificado (GUILLARD; LORENZEN, 1972). Portanto, foram escolhidas as culturas que estavam neste meio para propagação em maior volume de meio.

Em um dos poços escolhidos observou-se que a coloração do mesmo era alaranjada, o que poderia indicar a produção de carotenoides pela espécie isolada. A observação desta cultura ao microscópio permitiu constatar a presença de células

alaranjadas, o que não foi observado no dia da coleta. Na figura 6.2, é possível observar duas culturas da espécie isolada, uma cultura recém-inoculada e outra cultura mais antiga (com 60 dias de cultivo).

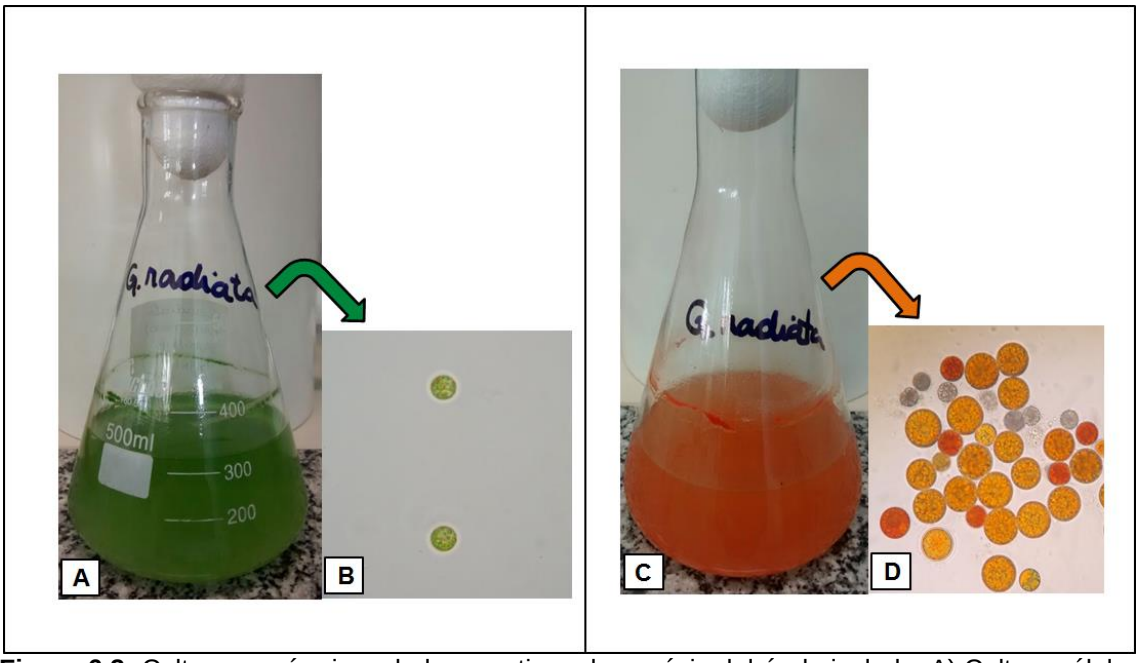


Figura 6.2: Culturas recém-inoculadas e antigas da espécie dulcícola isolada: A) Cultura células verdes; B) microscopia óptica das células (400X); C) cultura de células laranjas; D) microscopia óptica das células (400x).

Considerando a possibilidade deste procedimento não ter isolado apenas uma espécie, tanto uma cultura com células verdes (cultura jovem), quanto uma cultura com células laranjas (cultura velha) foram encaminhadas para a identificação morfológica, pressupondo que se tratava de duas espécies.

Após a identificação morfológica das células das duas culturas foi possível concluir que ambas as culturas eram compostas pela mesma espécie, denominada *Golenkinia radiata* Chodat, 1894 (figura 6.3).

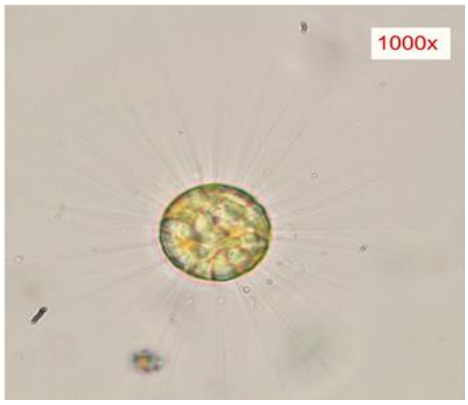


Figura 6.3: Microscopia óptica de *Golenkinia radiata* Chodat, 1894 em aumento de 1000x. Autor da foto: Pâmela Miranda (UFES).

Tucci et al. (2014) descreveram as células desta espécie como esféricas e isoladas, podendo apresentar diâmetro de 10 a 15 µm e um grande número de espinhos, com tamanho de 20 a 40 µm, na parede celular. Além disso, esta espécie ocorre em diferentes regiões brasileiras (BICUDO; MENEZES, 2010).

★ Ambiente salino

Depois do tempo de incubação foi possível perceber, a olho nú, que na água da salina não houve crescimento celular. Provavelmente, isto se deveu à alta salinidade da água que poderia estar causando estresse celular, uma vez que a água havia sido enriquecida com os componentes do meio F/2 modificado (GUILLARD, 1975). Tal suspeita, pode ser sustentada a partir da análise do trabalho de Cifuentes *et al.* (2001), onde estudou-se o efeito do aumento da concentração de NaCl em seis espécies, sendo elas: *D. parva*, *D. tertiolecta*, *D. salina*, *D. pseudosalina*, *D. viridis* e *D. peircei*. Para algumas espécies, a porcentagem de NaCl em uma determinada faixa favoreceu o número de divisões por dia, enquanto para outras o aumento gradual deste sal reduziu o crescimento. Já quando a porcentagem de NaCl alcançou 30% (m/v), percebeu-se que para a maioria das espécies o crescimento foi limitado ou não houve crescimento.

Assim, a cultura isolada foi cultivada em meio salino, na tentativa de favorecer o crescimento celular. Com o passar dos dias, a cultura foi adquirindo uma coloração verde, mostrando que o meio favoreceu o crescimento. Após 3 meses, em cultivo estático, a cultura adquiriu uma cor alaranjada.

Na tentativa de induzir à carotenogênese foi feito o cultivo dessa cultura em meio salino modificado (item 5.2), uma vez que a restrição de nitrato é reportada como parâmetro indutor do acúmulo de carotenoides. Nessa condição, foi possível observar que a cultura continuava apresentando coloração verde. Todavia, quando o cultivo não era agitado, havia formação de um fino halo laranja na superfície que se aderia à parede do frasco. A partir desta observação, pode-se constatar que foram coletadas, pelo menos, duas espécies de microalgas da amostra coletada. As explicações para o ocorrido podem ser:

- ★ A amostra continha gametas de outra espécie que acabaram não sendo observados ao microscópio;
- ★ A amostra apresentava células vegetativas de outra espécie que não foram observadas ao microscópio.

Sendo assim, foi realizado um novo isolamento desta cultura, a partir do halo de coloração laranja que estava aderido à parede do frasco. As células, coletadas com auxílio de alça de platina, foram inoculadas em meio salino modificado, a fim de favorecer a observação de células de coloração laranja.

Em alguns dias, obteve-se uma cultura de células cuja maioria das células observadas, ao microscópio, apresentava coloração laranja (figura 6.4). Esta cultura foi submetida a outro isolamento, por diluição em série, de maneira a garantir que a espécie carotenogênica fosse isolada.

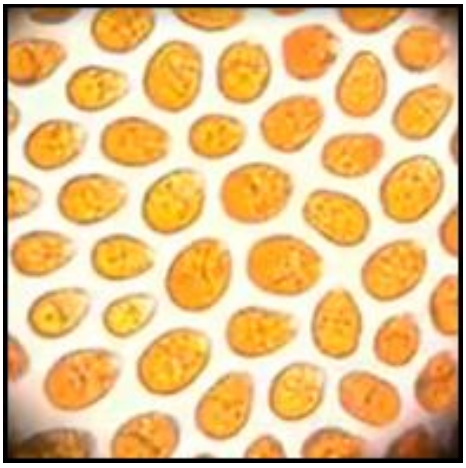


Figura 6.4: Células do halo laranja crescidas em meio salino modificado (aumento 400x).

Passadas algumas semanas, as culturas dos poços com maior probabilidade de terem sido originadas de uma única célula foram inoculadas em meio salino modificado. Na figura 6.5, encontra-se o aspecto dessas diferentes culturas.

Figura 6.5: Culturas originadas do inóculo de cada poço em que, provavelmente, teria sido isolado uma única célula.

Após 15 dias em cultivo estático, notou-se que apenas uma das culturas ficou laranja (figura 6.5). A mesma foi utilizada para um novo isolamento por diluição seriada.

A microalga isolada foi identificada por técnicas de biologia molecular, em que foi possível concluir que se trata da espécie *D. salina*, como será visto no tópico 6.4.

6.3 Avaliação da produção de carotenoides por diferentes microalgas

As quatro espécies, dulcícolas (*C. zofingiensis*, *G. radiata* e *H. pluvialis*) e salina (*D. salina*) foram cultivadas em meio WC modificado e meio salino modificado (item 5.2.), a fim de avaliar: o crescimento celular, produção de carotenoides totais e detectar a presença de β-caroteno e cantaxantina. Os dados serão apresentados em subtópicos para cada espécie, de modo a permitir o melhor entendimento da análise dos resultados.

6.3.1 Perfis cinéticos de crescimento celular

Na figura 6.6, podem ser observados os perfis cinéticos de crescimento e consumo de nitrato para as espécies: *C. zofingiensis* (figura 6.6a), *G. radiata* (figura 6.6b) *e H. pluvialis* (figura 6.6c) *e D. salina* (figura 6.6d).

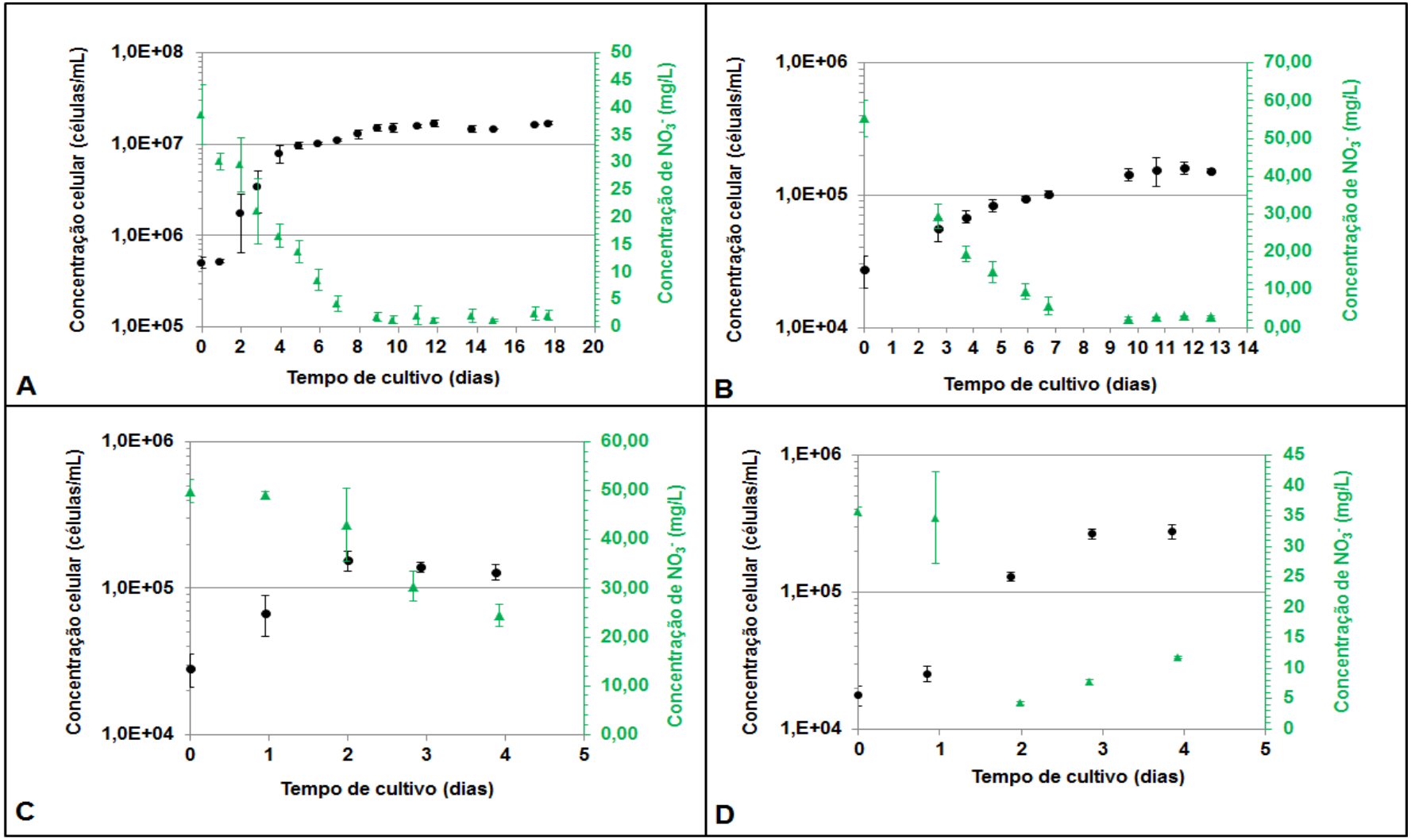


Figura 6.6: Perfis cinéticos de crescimento das espécies: A) *C. zofingiensis*; B) *G. radiata*; C) *H. pluvialis* e D) *Dunaliella salina.* n=3.

6.3.1.1 *Chlorella zofingiensis*

Nota-se que o cultivo iniciado com concentração celular aproximada de $5,1x10^5$células/mL, apresentou fase de adaptação de um dia. Em 8 dias, teve início a fase estacionária de crescimento que manteve a concentração celular em torno de $1,7x10^7$ células/mL, até o final do ensaio (18 dias), o que correspondeu a 0,41 g/L de massa seca.

Na figura 6.6a, também é possível observar que o consumo de NO_3^- foi gradualmente consumido pela espécie *C. zofingiensis*. No 9º dia de cultivo, o consumo deste nutriente representou 97%, ou seja, o consumo máximo ocorreu na fase estacionária.

Pelah, Sintov e Cohen (2004) cultivaram *C. zofingiensis* em meio de diferente composição (Bristol's), contendo $NaNO_3$ a 0,1 g/L e sob 300 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, obtiveram $2,5x10^7$ células/mL em 9 dias de cultivo. Esta concentração equivaleu a 0,61 g/L de massa seca e foi similar à encontrada no presente trabalho, em relação ao número de células. Melhores resultados foram alcançados por Fung (2010), em outro meio de cultura. Em 6 dias de cultivo, foram obtidos 3g/L de massa seca (sob 100 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e $NaNO_3$ a 0,125 g/L). Já sob 300 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e na mesma condição de $NaNO_3$, a concentração em massa seca foi 4 g/L. Esses resultados demonstram que ensaios em fotobiorreator estabelecem condições mais favoráveis ao cultivo de microalgas, permitindo intensificar o crescimento celular.

6.3.1.2 *Golenkinia radiata*

Na figura 6.6b, se encontra a curva de crescimento e de consumo de NO_3 da microalga *G. radiata*. Aparentemente, esta cultura não apresenta fase lag nas condições ensaiadas. A concentração celular inicial de $2,7x10^4$ células/mL atingiu seu valor máximo de células ($1,6x10^5$ células/mL) em, aproximadamente, 10 dias de cultivo quando as células entraram na fase estacionária de crescimento. A concentração celular se manteve constante até o 13º dia de cultivo quando o experimento foi encerrado, obtendo-se 0,34 g/L em massa seca de células por volume de cultura. Na fase estacionária, 95% de nitrato já havia sido consumido.

Em relação a esta espécie, não foram encontradas informações até o momento. Apenas foi encontrado um trabalho para outra espécie deste gênero (RAHIMIAN; RAYBURN, 1979). Estes autores obtiveram concentração celular na faixa de 6,7 – 9,6x10^7 células/mL, em 7 dias de cultivo fototrófico, dependendo da concentração de cálcio usada no meio de cultura. No entanto, não há dados concernentes ao consumo de nutrientes.

6.3.1.3 *Haematococcus pluvialis*

O crescimento da espécie *H. pluvialis* está representado na figura 6.6c, onde pode-se observar que o cultivo iniciado com 2,8x10^4 células/mL não apresentou fase lag. No 2º dia de cultivo, as células entraram na fase estacionária de crescimento, atingindo concentração celular máxima, em torno de, 1,6x10^5 células/mL. No 4º dia de cultivo, a concentração celular em massa seca foi correspondente a 0,30 g/L.

Em relação ao consumo de nitrato, pode-se notar que seu consumo máximo (25%) se deu no 4º dia de cultivo, quando as células já estavam na fase estacionária. Com isso, pode-se inferir que o crescimento da microalga não foi limitado pelo esgotamento deste nutriente no meio.

No trabalho de Domínguez-Bocanegra et al. (2004) com *H. pluvialis* foi obtida concentração celular máxima similar, atingindo-se em 7 dias 1,8x10^5 células/mL em meio Basal Bold com $NaNO_3$ a 1 g/L e sob intensidade luminosa de 177 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Goksan e Ak (2006) em cultivos sob 170 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} em meio BG-11, também encontraram 1,8x10^5 células/mL, aproximadamente, 0,50 g/L de biomassa seca, em 10 dias de cultivo. Diante destes resultados, pode-se notar que o presente trabalho alcançou concentração celular similar aos encontrados na literatura, em menor tempo de cultivo.

6.3.1.4 *Dunaliella salina*

A curva de crescimento da microalga *Dunaliella* sp. é encontrada na figura 6.6d, onde pode-se perceber que o cultivo iniciado com 1,7x10^4 células/mL, apresentou fase de adaptação com duração aproximada de um dia. É possível observar ainda que no 3º dia de cultivo as células entraram na fase estacionária de

crescimento. A concentração celular se manteve constante até o 4º dia, alcançando-se $2,7x10^5$ células/mL, o equivalente a 0,27 g/L de massa seca livre de cinzas.

Um comparativo dos resultados apresentados no parágrafo anterior pode ser feito com o trabalho de Gómez e González (2005) em que o cultivo da cepa CONC-007 de *D.* salina em condições laboratoriais (sob 110 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, a 26 ºC e NaCl 2 M) resultou numa concentração celular máxima de $2,9x10^5$ células/mL, resultado bem próximo ao obtido na presente tese. Além disso, o autor também relatou que em, aproximadamente, 15 dias de cultivo a microalga entrou na fase estacionária de crescimento, enquanto que a espécie do gênero *Dunaliella* utilizada no presente trabalho atingiu a fase estacionária em um tempo menor, ou seja, no 4º dia de cultivo (figura 6.6d).

Ressalta-se ainda que em 2 dias de cultivo a microalga *Dunaliella* consumiu 88% de nitrato. O consumo foi máximo nos dois primeiros dias de cultivo, havendo ligeiro aumento na concentração de nitrato a partir do 2º dia de cultivo. É provável que este aumento seja devido à interferência de nitrito, excretado pela microalga, já que este apresenta pequena absorção em 220 nm (PERKAMPUS, 1992 apud in COLLOS et al., 1999).

6.3.2 Produção de carotenoides totais

Na figura 6.7, se encontram os extratos obtidos a partir da extração de carotenoides das biomassas com acetona. Note que os extratos “A” (*C. zofingiensis*) e “C” (*G. radiata*) apresentam coloração esverdeada, característica da predominância de clorofilas. Já os extratos “B” (*H. pluvialis*) e D (*D. salina*) apresentam colorações avermelhada e amarelada, características de pigmentos carotenoides. No caso de *H. pluvialis*, os principais carotenoides produzidos capazes de prover esta coloração são: a astaxantina e a cantaxantina. No extrato de *D. salina*, pode-se atribuir esta coloração ao β-caroteno que é produzido em abundância.

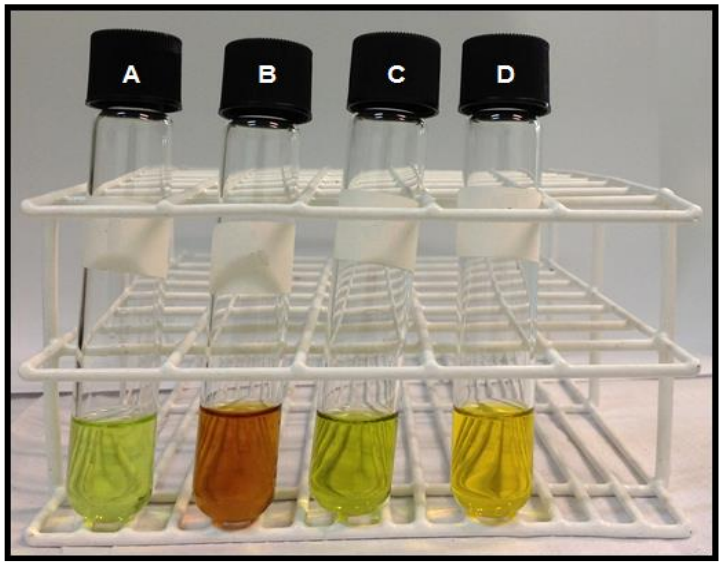


Figura 6.7: Extratos de pigmentos das espécies: A) *C. zofingiensis*; B) *H. pluvialis;* C) *G. radiata* e D) *D. salina.*

Na Tabela 6.2, encontram-se os resultados de produção de carotenoides de cada espécie. Para melhor entendimento dos resultados apresentados na tabela, a análise dos mesmos se dará em subtópicos para as diferentes espécies estudadas.

Tabela 6.2: Resultados da produção de carotenoides pelas quatro espécies estudadas

	Carotenoides				
Espécie	**mg/L**	**mg/g m.s**	**% m.s**	**pg/célula**	**Tempo de cultivo**
C. zofingiensis	0,40 ± 0,04	0,98 ± 0,07	0,1	0,03 ± 0,005	18
G. radiata	0,71 ± 0,09	2,06 ± 0,11	0,21	4,71 ± 0,75	13
H. pluvialis	3,44 ± 0,19	11,51 ± 0,46	1,1	26,90 ± 3,33	4
Dunaliella sp.	7,31 ± 0,91	28,81 ± 2,57	2,8	26,52 ± 2,69	4

m.s: massa seca. *n* = 3.

6.3.2.1 *Chlorella zofingiensis*

Conforme pode ser observado na tabela 6.2, a produção de carotenoides totais por *C. zofingiensis* foi de 0,40 mg/L. Pelah, Sintov e Cohen (2004) obtiveram concentração de carotenoides totais de 5,3 mg/L, valor calculado a partir dos dados apresentados. Neste caso, os cultivos foram conduzidos em frascos cônicos, contendo meio de diferente composição com $NaNO_3$ a 0,1 g/L e 300 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Fung (2010) encontrou valores maiores quando cultivou *C. zofingiensis* em fotobiorreator. O autor obteve, aproximadamente, 7 mg/L e 9 mg/L de carotenoides, usando $NaNO_3$ a 0,125 g/L, sob 100 e 300 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, respectivamente..

Com relação ao rendimento de carotenoides totais em biomassa ($Y_{P/X}$), nota-se que o alcançado foi 0,98 mg/g (tabela 6.2). Pelah, Sintov e Cohen (2004) obtiveram 8,7 mg/g de carotenoides totais por massa seca. Portanto, as condições operacionais permitiram que a cepa cultivada pelos autores acumulasse, praticamente, 10 vezes mais pigmentos carotenoides. Mulders et al. (2014) encontraram cerca de 2,4 mg/g de astaxantina e 1,3 mg/g de cantaxantina por massa seca.

Já o acúmulo de carotenoides totais por célula (tabela 6.2), resultou em 0,03 pg, enquanto no cultivo realizado por Pelah, Sintov e Cohen (2004) foram obtidos cerca de 0,21 pg/célula.

Diante destes comparativos, é possível notar que a produção de carotenoides da cepa usada no presente trabalho pode ser otimizada, uma vez que as variáveis

de indução à carotenogênese sejam melhor exploradas. Além disso, pode-se perceber também que o acúmulo de carotenoides pode ser influenciado não só pelas condições de cultivo, como também pela cepa utilizada.

6.3.2.2 *Golenkinia radiata*

Na tabela 6.2, encontram-se os resultados da produção de carotenoides pela espécie *G. radiata*. A produção de carotenoides totais na cultura (0,71 mg/L), o rendimento de produto em biomassa (2,06 mg/g), e a quantidade de carotenoides intracelular (4,71 pg/célula).

A escassez de trabalhos bioprospectivos com a espécie *G. radiata* não permite que comparações possam ser feitas com os resultados encontrados na presente tese. Portanto, não há como sugerir se a otimização das condições de cultivo poderiam resultar numa produção de carotenoides interessante comercialmente.

6.3.2.3 *Haematococcus pluvialis*

De acordo com o apresentado na tabela 3, a microalga *H. pluvialis* produziu 3,44 mg/L de carotenoides totais, resultado superior a 1,7 mg/L que foi obtido por Goksan e Ak (2006) ao cultivar a espécie em frascos tubulares de 5 L de capacidade e 170 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$.

Alcançou-se 11,51mg/g (tabela 6.2) em rendimento de carotenoides em biomassa. Goksan e Ak (2006) encontraram um rendimento de 3,5 mg de carotenoides/g de massa seca, quantidade inferior a encontrada no presente trabalho. Ressalta-se que em outras condições de cultivo, a produção possa ser melhorada.

Boussiba et al. (1999) relataram rendimento de 40 mg/g somente em astaxantina na biomassa de *H. pluvialis* cultivada em duas fases, uma fase de crescimento sob intensidade de 100 µmols de fótons. $m^{-2}.s^{-1}$ e uma fase de indução à carotenogênese em ausência de nitrogênio sob 200 µmols de fótons. $m^{-2}.s^{-1}$.

Já o acúmulo intracelular de carotenoides totais resultou em 26,90 pg/célula (tabela 6.2), enquanto Goksan e Ak (2006) encontrou, aproximadamente, 8

pg/célula. Este tipo de avaliação se mostra importante para explicar, por exemplo, como a cultura de células da presente tese alcançou valores maiores de carotenoides totais por volume de cultura, mesmo tendo concentrações celulares similares, sendo obtido $1,5x10^5$ células/mL por Goksan e Ak (2006) e $1,3x10^5$ no presente trabalho.

6.3.2.4 *Dunaliella salina*

No cultivo de *D. salina* obteve-se 7,31 mg/L de carotenoides totais (tabela 6.2), resultado ligeiramente maior que o alcançado pela cepa de *D. salina* CONC-006 que foi 5,42 mg/L (GÓMEZ; GONZÁLEZ, 2005). A produção dos autores se deu em, aproximadamente, 37 dias de cultivo, em condições laboratoriais, sob 110 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, NaCl 2M e 26°C. Já para a cepa de *D. salina* CONC-007 do trabalho citado, o valor encontrado para carotenoides totais foi maior, atingindo 16 mg/L nas mesmas condições de cultivo e apresentando concentração celular similar ($2,9x10^5$ células/mL) a do presente trabalho ($2,7x10^5$ células/mL). Esta maior concentração de carotenoides totais na cultura de *D. salina* CONC-007 pode ser explicada, devido ao fato da mesma ter acumulado uma quantidade maior de carotenoides (72,1 pg/célula) que a cepa de *D. salina* usada na presente tese que acumulou 26,52 pg/célula (tabela 6.2).

A biomassa microalgal de *D. salina* estudada no presente trabalho, apresentou rendimento de 28,81mg de carotenoide totais/g de massa seca (tabela 6.2). Entretanto, sabe-se que algumas espécies carotenogênicas do gênero *Dunaliella* podem acumular muito mais que o resultado obtido. A espécie *D. bardawil*, por exemplo, pode acumular até 100 mg de β-caroteno/g de massa seca (BEN-AMOTZ; AVRON, 1990). Prieto, Cañavate e García-González (2011), por exemplo, encontraram rendimento de 45 mg/g de carotenoides na biomassa em cultivos em fotobiorreator *outdoor* sob regime de batelada. Os autores também reportaram para este mesmo cultivo, 90 mg/L de carotenoides em 8 dias de cultivo.

6.3.3 Análise qualitativa da produção de carotenoides

Carotenoides provenientes do metabolismo secundário como a cantaxantina, astaxantina e β-caroteno podem ser produzidos em grande quantidade em algumas espécies de microalga como resposta ao estresse celular, como: elevada irradiância luminosa, deficiência de nutrientes no meio e elevada salinidade.

Neste trabalho, além da análise quantitativa de carotenoides totais, foi realizada a análise da produção de β-caroteno e cantaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no Laboratório de Tabaco e Derivados (Instituto Nacional de Tecnologia), baseando-se no método desenvolvido por Guaratini et al. (2009).

Para avaliar se houve a produção de β-caroteno e cantaxantina pelas microalgas estudadas, foram realizadas análises por CLAE comparando os tempos de retenção dos padrões desses carotenoides e seus espectros de absorção com os picos eluídos dos extratos em acetona.

Na figura a seguir 6.8, encontra-se o cromatograma dos padrões de cantaxantina e β-caroteno. Nesta figura são observados dois picos, sendo o de número “1” referente à cantaxantina que eluiu em 45,9 minutos e o de número “2” referente ao todo-trans-β-caroteno cuja eluição foi em 67,2 minutos. A figura 6.9 apresenta os espectros de absorção dos padrões analíticos desses dois carotenoides.

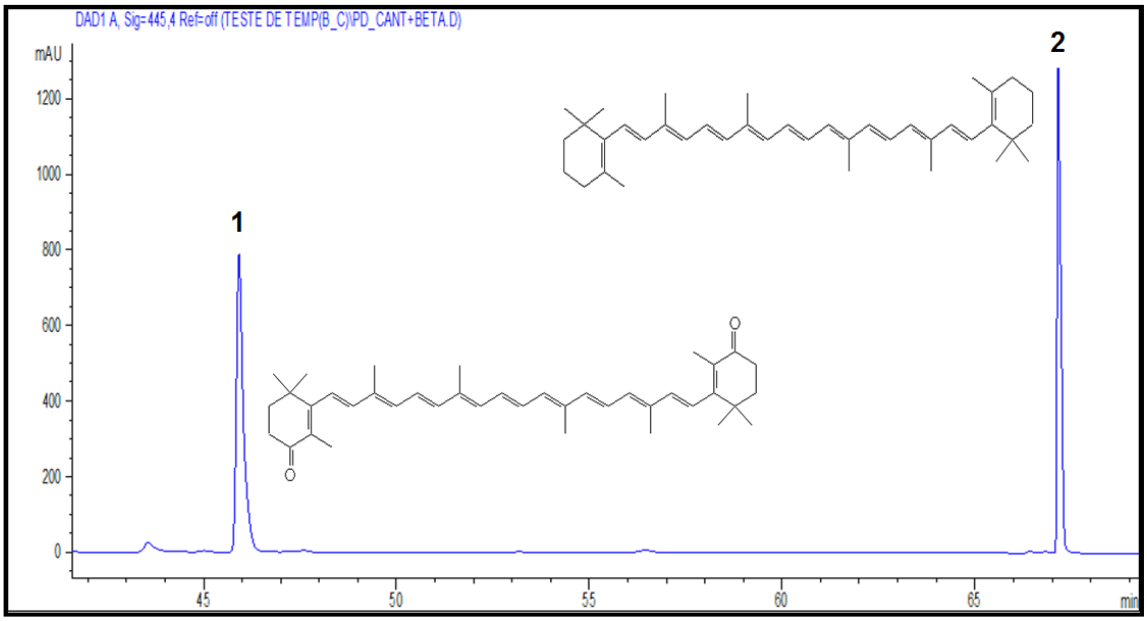


Figura 6.8: Cromatograma dos padrões de cantaxantina (pico 1) e todo-trans-β-caroteno (pico 2) e suas estruturas moleculares.

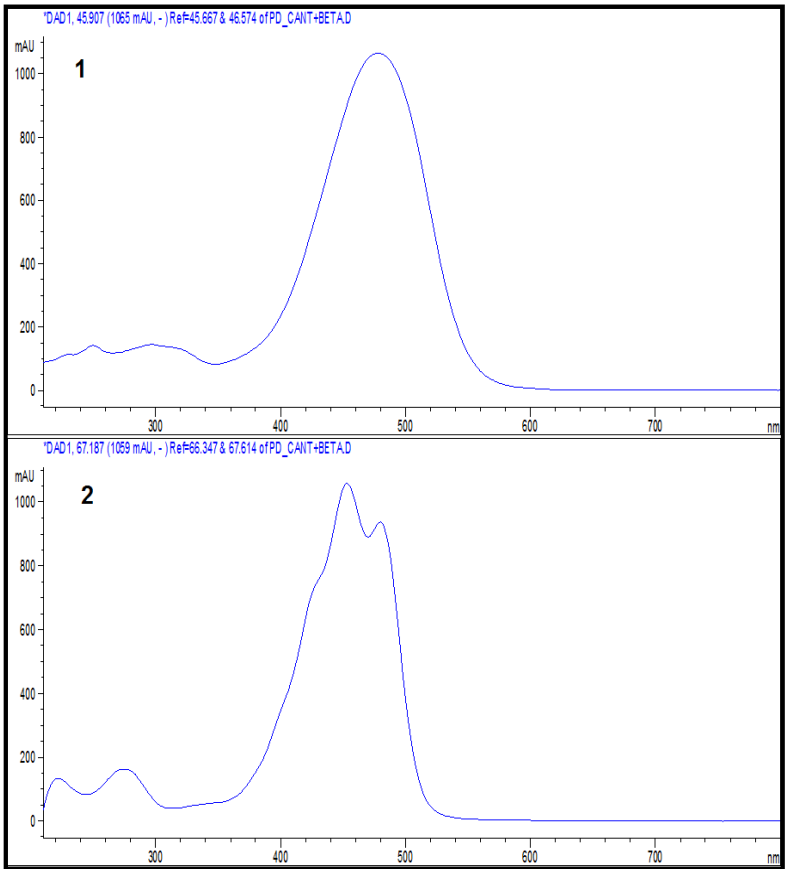


Figura 6.9: Espectros de absorção dos padrões de: cantaxantina e; 2) todo-trans-β-caroteno.

De acordo com a análise dos cromatogramas (figura 6.10) de cada espécie é possível notar que nas condições de cultivo estudadas, a presença de cantaxantina

somente pode ser observada no extrato de *G. radiata.* Entretanto, na literatura consultada foi encontrada a presença cantaxantina para *C. zofingiensis* (MULDERS et al., 2014) e *H. pluvialis* (FENGPING et al., 2006) .

Já o todo-trans-β-caroteno foi detectado em todas as espécies estudadas, o que não significa que as mesmas o produzam em grande quantidade. Telfer (2002) explica que este pigmento pode ser encontrado nas antenas de captação de luz, onde auxiliam na absorção de energia luminosa (função primária) que será direcionada à fotossíntese.

Além disso, a literatura reporta que os principais carotenoides acumulados em resposta ao estresse celular nas espécies *H. pluvialis* e *C. zofingiensis* são: astaxantina e cantaxantina (MULDERS et al., 2014; FENGPING et al., 2006). No caso de *D. salina*, informações da literatura mostram que esta espécie é capaz de acumular grandes quantidades de β-caroteno quando submetida a algum tipo de estresse celular. Desta forma, o β-caroteno produzido não auxilia na captação de energia luminosa para a fotossíntese. Em relação à espécie *G. radiata*, não foram encontradas informações até o momento. Mas, pode-se dizer que microalgas da classe Chlorophyceae, geralmente, apresentam β-caroteno com função primária (JEFFREY; WRIGHT; ZAPATA, 2012).

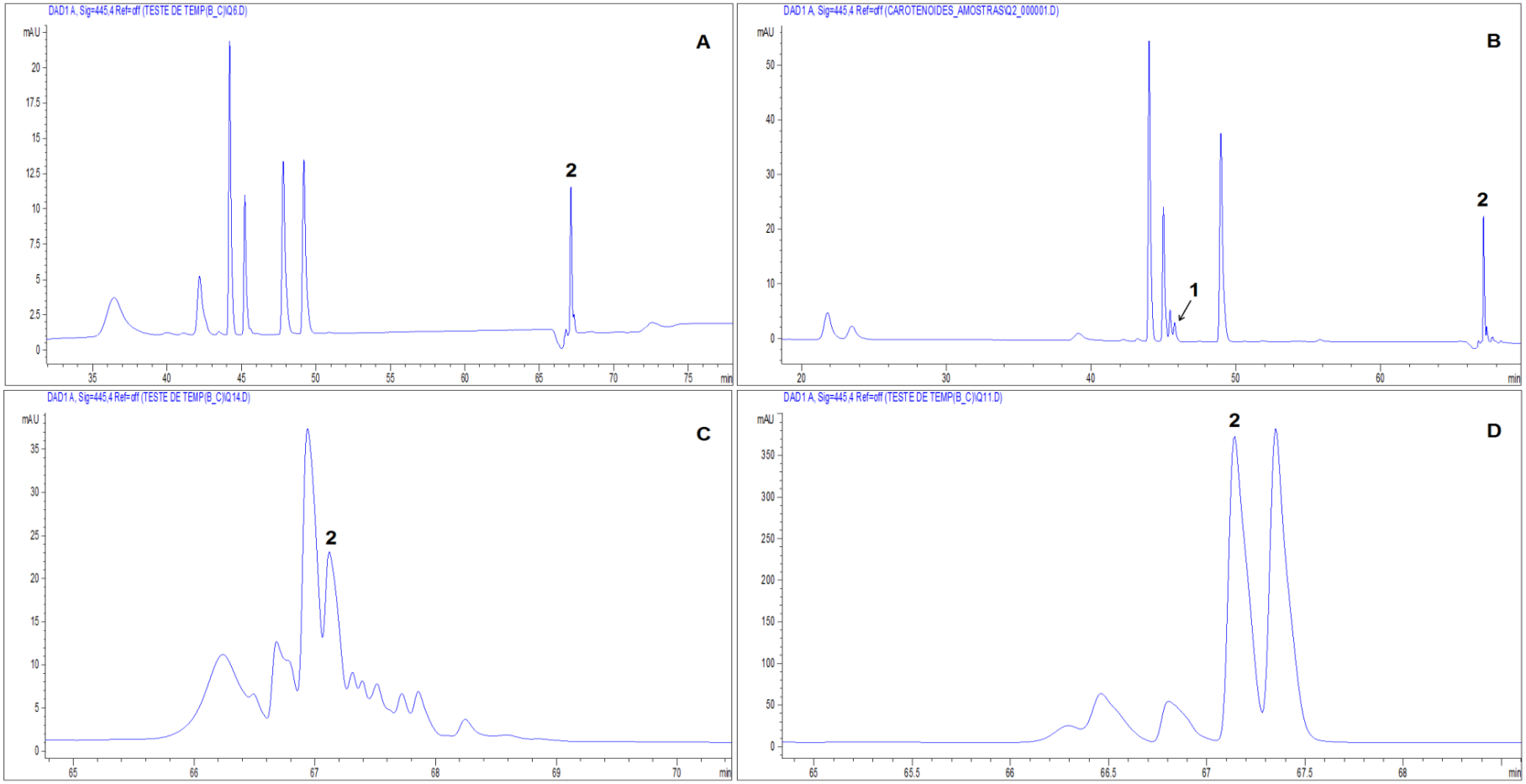


Figura 6.10: Cromatogramas dos extratos de pigmentos das microalgas estudadas. Os picos numerados por “1” representam a cantaxantina e os picos numerados por “2” representam o todo-trans-β-caroteno. Cromatograma: A) extrato de *C. zofingiensis*; B) extrato de *G. radiata*; C) extrato de *H. pluvialis* e D) extrato de *D. salina*.

6.3.4 Análise comparativa dos cultivos das diferentes espécies de microalgas

Na Tabela 6.3, estão reunidos os resultados de crescimento encontrados para as espécies estudadas.

Tabela 6.3: Comparação dos resultados das cinéticas de crescimento das espécies estudadas

Espécie	Concentração celular no final do experimento (células/mL)	Massa seca (g/L)	Consumo de nitrato (%)
C. zofingiensis	$1,7x10^7 \pm 5,3x10^5$	0,41 ± 0,01	97
G. radiata	$1,5x10^5 \pm 6x10^3$	0,34 ± 0,02	95
H. pluvialis	$1,3x10^5 \pm 1,6x10^4$	0,30 ± 0,01	25
D. salina	$2,7x10^5 \pm 3,3x10^4$	0,27 ± 0,01	88

Pode-se observar que houve maior produção de biomassa para *C. zofingiensis*, principalmente em relação ao número de células. As demais espécies apresentaram número de células e massa seca semelhante. Mesmo com concentração celular na ordem de 10^7 células/mL, a produção de biomassa por *C. zofingiensis* não foi muito maior do que para as demais espécies que alcançaram uma ordem de 10^5 células/mL. Provavelmente, isto se deve ao fato de as células da cepa de *C. zofingiensis* serem menores e menos densas que as demais espécies usadas neste trabalho.

Em relação ao tempo reduzido de cultivo, destacam-se duas espécies neste trabalho: *H. pluvialis* e *D. salina*. Estas duas espécies produziram massa seca similar à espécie *G. radiata* que demorou 10 dias para alcançar a fase estacionária. Portanto, poder-se-ia obter o dobro de biomassa de *H. pluvialis* e *D. salina*, no mesmo intervalo de tempo do cultivo de *G. radiata*.

Dentre as duas espécies, *H. pluvialis* e *D. salina*, a primeira atingiu a fase estacionária mais rapidamente (2 dias) que a segunda (3 dias). Todavia, há de se considerar que cultivos com microalgas dulcícolas são mais susceptíveis à contaminações do que cultivos com microalgas salinas, sobretudo aquelas do gênero *Dunaliella* que podem ser cultivadas em concentração salina elevada (>35/L de NaCl). Borowitzka (1990) revela que cultivo de *D. salina* com alta concentração

de sal auxilia na redução da proliferação de outras espécies de *Dunaliella* e de protozoários predadores como, por exemplo, *Fabrea salina*.

No que tange a produção de carotenoides, obteve-se o maior resultado no cultivo de *D. salina* (7,31 mg/L), seguido por *H. pluvialis* (3,44 mg/L), *G. radiata* (0,71 mg/L) e *C. zofingiensis* (0,40 mg/L) (tabela 6.2). Os resultados apontam o maior rendimento de carotenoides em massa seca para a microalga *D. salina* que atingiu 28,81 mg/g. Já o menor resultado foi encontrado para a espécie *C. zofingiensis* (0,98 mg/g) (tabela 6.2).

A relação entre a escassez de nitrato no meio e indução da produção de carotenoides pode ser observada no cultivo de *D. salina*, enquanto que para as espécies *C. zofingiensis* e *G. radiata* parece não ter havido influência na produção (tabela 6.3). Já para a microalga *H. pluvialis*, pode-se perceber que houve baixo consumo de nitrato (tabela 6.3) e produção de carotenoides. Sendo assim, suspeita-se que a escassez de outro nutriente possa ter causado o acúmulo de carotenoides nesta espécie, uma vez que a escassez de fosfato exerce influência no acúmulo de carotenoides por *H. pluvialis* (IMAMOGLU; DALAY; SUKAN, 2009); ou que a irradiância de luz usada foi suficiente para induzir a produção.

Nas condições de cultivo estudadas, as espécies *H. pluvialis* e *D. salina* se destacaram na produção de carotenoides como também no tempo de cultivo, o que é muito importante quando se pensa em cultivos comerciais. Porém, a maior produção de carotenoides foi vista no cultivo de *D. salina*, sendo muito provável que o carotenoide majoritário do extrato seja o β-caroteno .

Apesar do β-caroteno ter sido encontrado em todas as espécies, a espécie *D. salina* é a única, das microalgas estudadas, que é reconhecidamente reportada na literatura por produzir grandes quantidades deste carotenoide. Embora, alguns estudos apontem maior atividade antioxidante para cantaxantina, o β-caroteno apresenta a vantagem de possuir atividade pró-vitamínica A, devido à presença do anel β-ionona em sua estrutura (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Já a cantaxantina, não possui esta atividade.

Frente aos resultados apresentados, a espécie de microalga *D. salina* foi escolhida para dar continuidade às próximas etapas do presente trabalho.

6.4 Identificação morfológica, molecular e análise filogenética da cepa selecionada

A morfologia das células isoladas encontra-se de acordo com as chaves de identificação de Teodoresco (1905) e Borowitzka e Siva (2007) que descrevem a espécie como *Dunaliella salina*.

Ao realizar a observação em microscópio, foi possível perceber a presença de células ovais e esféricas (figura 6.11a,d) (principalmente as células vermelhas), biflageladas (figura 6.11b), piriformes, elipsoides e cilíndricas, tanto a parte posterior quanto a anterior se mostraram arredondadas. O comprimento celular variou de 5 a 30 µm e a largura celular de 3 a 22 µm. O aparato flagelar se apresentava, aproximadamente, igual à largura celular. Cloroplastos com formato poculiforme, apresentando um pirenóide amilóide e um estigma. Quando em condição de limitação de nitrato, o conteúdo celular mudava de verde para vermelho (figura 6.11c-d), estando de acordo com a descrição da espécie.

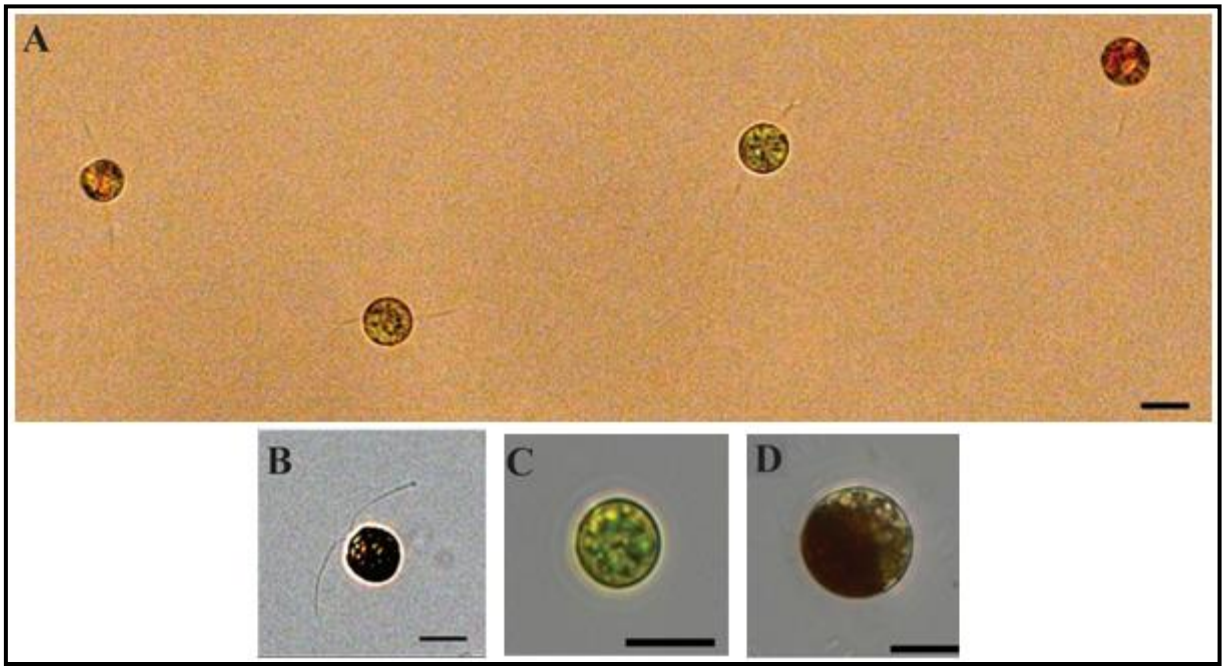


Figura 6.11: Fotomicrografias de *D. salina* cepa CCMA-UFSCar 711: a - b) formatos celulares encontrados na população; c) célula com conteúdo intracelular verde, sob abundância de nitrato; d) célula com conteúdo intracelular em transição de verde para vermelho devido à restrição de NO_3^- no meio de cultura. Barra de escala: 10 µm.

Buscas por artigos científicos foram realizadas, a fim de investigar se havia registros desta espécie no Brasil e nenhuma informação foi encontrada. Também foi feita uma busca na base de dados *online* “Flora do Brasil” e nenhum registro de *D. salina* foi encontrado. Com isso, a cepa isolada no presente trabalho se trata do 1º registro de ocorrência de *D. salina* no Brasil.

A filogenia do gênero *Dunaliella* foi acessada anteriormente com vários marcadores moleculares, como 18S rDNA, rbcL, ITS, e psaB (OLMOS; PANIAGUA; CONTRERAS et al., 2000; KANNAN et al., 2010, AZÚA-BUSTOS et al., 2010; ZAMANI et al., 2011; ASSUNÇÃO et al., 2012; POLLE et al., 2008; ASSUNÇÃO et al., 2013).

Neste estudo, o ITS-2 foi adotado para a nossa análise filogenética por causa de sua utilidade em identificar cepas em nível de espécie e pelo grande número de sequências disponíveis no NCBI que já foram previamente identificadas em um trabalho taxonômico (ASSUNÇÃO et al., 2012).

Representantes de *Dunaliella* foram incluídas na árvore de ITS-2 (figura 6.12). Os valores de bootstrap mais altos foram obtidos dentro do mesmo grupo de cepas, como o clado-salina I e clado-salina III, clado-tertiolecta e clado-viridis (figura 6.12).

Os clados melhores resolvidos na árvore correspondem às espécies tradicionalmente atribuídas ao gênero *Dunaliella*: *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, *Dunaliella tertiolecta* Butcher and *Dunaliella viridis* Teodoresco.

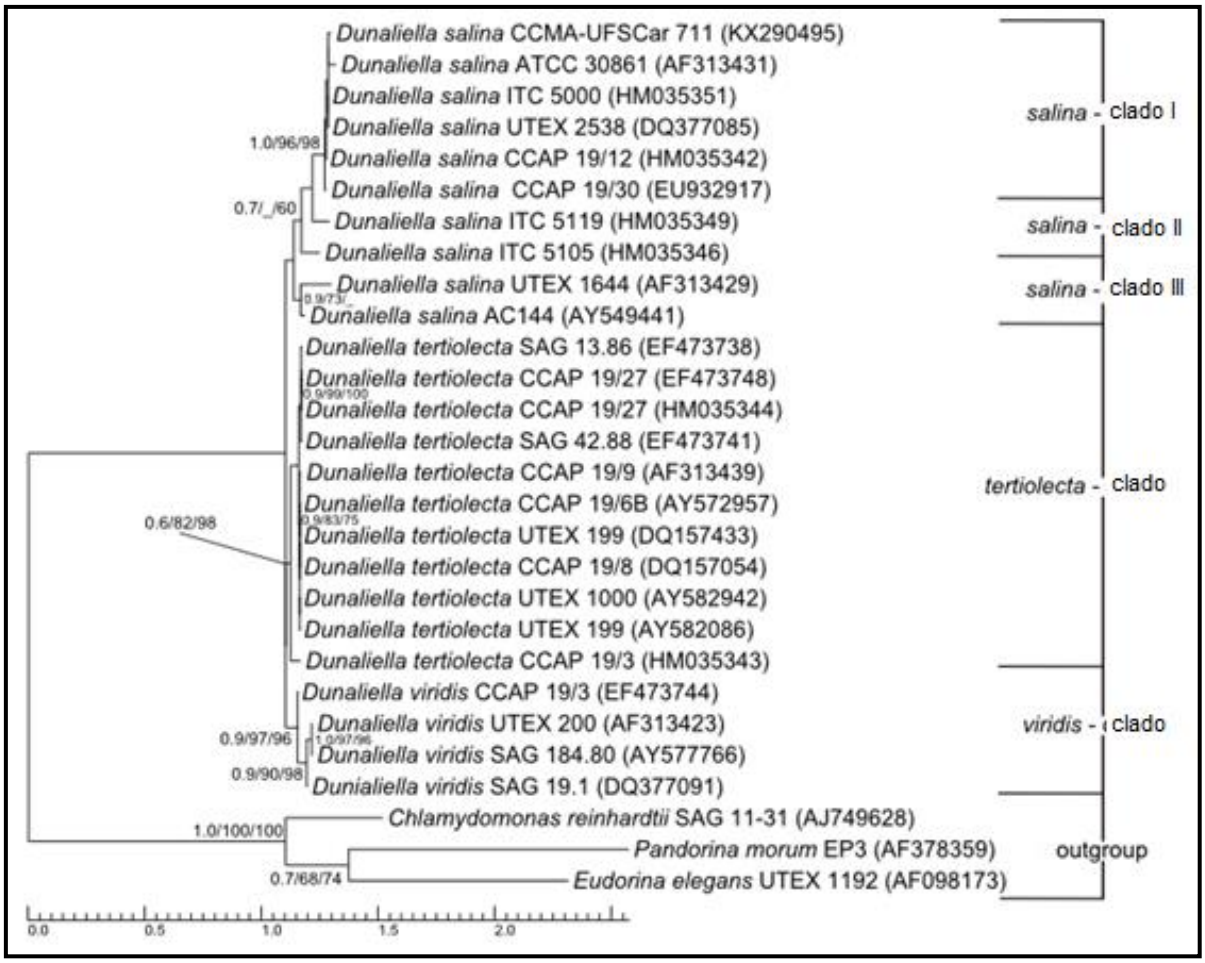


Figura 6.12: Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir de sequências de ITS-2 de cepas mencionadas no quadro 5.3. Junto se encontram os valores *Bayesian Posterior Probability*, *Bootstrap ML* e *Neighbor-Joining* com os valores. As barras correspondem aos valores <50% para *Bootstrap* e <*0.60* para *Bayesian Posterior Probability.* A escala representa o número de substituições esperado por sítio.

Algumas espécies de *Dunaliella* já foram reportadas como polifiléticas. Algumas cepas designadas como *D. viridis*, formaram dois clados distintos em um estudo filogenético associado a este táxon (ASSUNÇÃO et al. 2013). Achados similares também foram encontrados para *D. salina* (GONZÁLEZ et al., 2001; POLLE et al. 2008; ASSUNÇÃO et al. 2012, ASSUNÇÃO et al. 2013).

A espécie *D. salina* está representada em três clados distintos: clado I é composto por isolados do Brasil (CCMA-UFSCar 711), Israel (ATCC 30861, ITC 5000, UTEX 2538, CCAP 19/12, CCAP 19/30) e França (ITC 5119); clado II é representado por um isolado espanhol (ITC 5105) e o clado III compreende isolados dos EUA (UTEX 1644) e Tunísia (AC 144).

A filogenia por ITS-2 apresentada na árvore de máxima verossimilhança (figura 6.12) demonstrou que o nosso novo isolado pode ser reconhecido como *D. salina*, sendo a filogenia reconstruída em um clado (suporte Bayesiana/ML/NJ = 1.0/96%/98%) junto com outras cepas homônimas.

De forma a acessar a identificação correta da cepa isolada (CCMA-UFSCar 711), foi examinada a estrutura secundária das sequências que compõe o clado-salina I na nossa árvore filogenética. A análise da estrutura secundaria do ITS-2 não apresentou mudança de bases compensatória (do inglês, Compensatory Base Change - CBC) entre as cepas que compuseram o clado-salina I (figura 6.12), demonstrando que todas as sequências deste clado podem ser reconhecidas como a mesma espécie. A estrutura secundária para as cepas de *Dunaliella salina* (clado-salina I) é mostrada na figura 6.13.

Ao comparar a estrutura secundária do ITS-2 de dois organismos, a presença de CBC pode estar relacionada com a incompatibilidade sexual entre ambos. Ademais assume-se que este marcador pode ser aplicado para discriminar cepas a nível de espécie (MÜLLER et al. 2007; COLEMAN 2000).

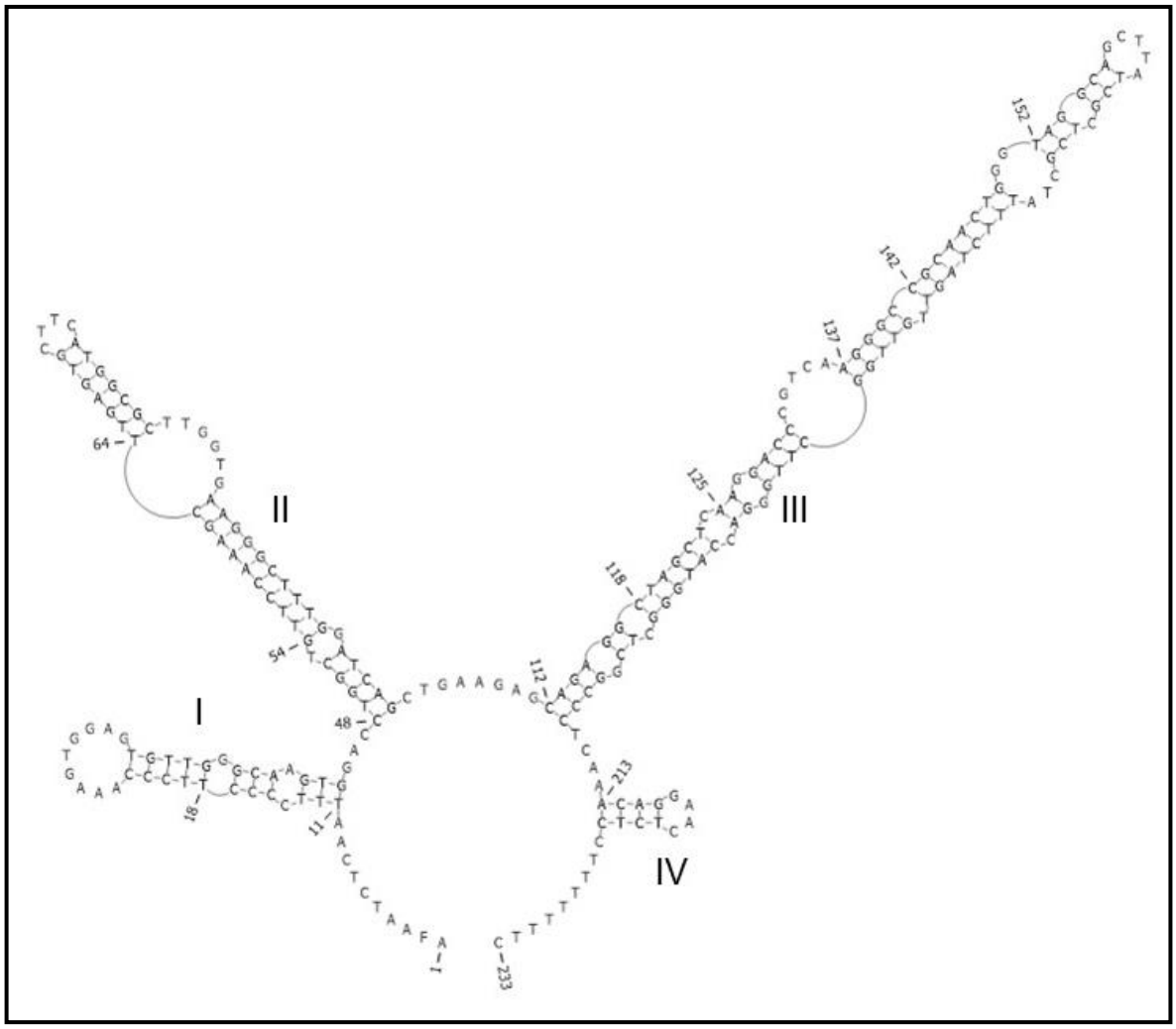


Figura 6.13: Estrutura secundária de ITS-2 obtida a partir de múltiplos alinhamentos de sequência para as cepas de *Dunaliella salina* (CCMA-UFSCar 711, ATCC 30861, ITC5000, UTEX 2538, CCAP 19/12 and CCAP 19/30). As hélices estruturais estão numeradas de I a IV.

6.5 Análise comparativa dos perfis cinéticos de crescimento da cepa isolada D. salina sob iluminação com lâmpadas fluorescentes e LED

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se as culturas cultivadas com LEDs teriam o mesmo perfil de crescimento celular que àquelas cultivadas com lâmpadas fluorescentes. Na figura 6.14, observa-se que as culturas tiveram curvas de crescimento semelhantes. Ambas as culturas iniciaram com, aproximadamente, $3x10^4$ células/mL, tiveram um dia de fase *lag* (adaptação), em três dias houve a desaceleração do crescimento e no quarto dia de cultivo alcançaram a fase estacionária de crescimento com cerca de $3x10^5$ células/mL. No

que concerne à biomassa produzida sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e LEDs, obteve-se 0,29 g/L nas duas condições estudadas.

Se considerarmos que para iluminar três frascos de cultivo sob 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ com lâmpadas fluorescentes tubulares foram usadas três lâmpadas de 20 W cada e que para obter a mesma irradiância para o mesmo número de frascos usaram-se três placas de LEDs de 6 W cada, pode-se calcular que houve redução de 70% dos gastos energéticos com o uso de LEDs. Outra vantagem é a menor emissão de calor para o cultivo, devido a menor conversão de energia elétrica em energia radiante, se comparada às lâmpadas fluorescentes que apresentam elevado conteúdo energético na emissão de luz, tendo como consequência o aumento da transferência de calor para o cultivo. Desta forma, é possível manter menores variações de temperatura ao decorrer do cultivo (GLEMSER et al., 2015). Além disso, os LEDs apresentam tempo de vida estimado superior (25.000 h), se comparado às lâmpadas fluorescentes (8.000 h).

A partir dos resultados obtidos, é possível notar que as lâmpadas fluorescentes podem ser substituídas pelos LEDs usados neste experimento, sem haver influência negativa sobre o crescimento celular. A partir da análise dos resultados deste experimento, as luminárias de LED começaram a ser utilizadas em experimentos posteriores a este.

.

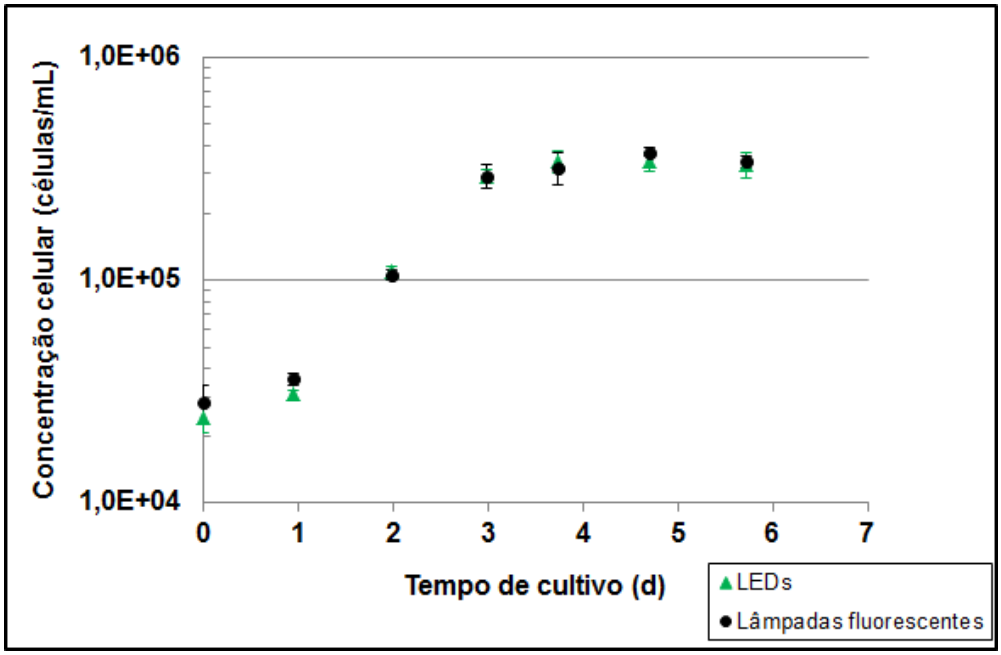


Figura 6.14: Cinética de crescimento de *D. salina* sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e LEDs brancos.

6.6 Avaliação dos consumos de nitrato e fosfato sob iluminação com LED

A avaliação do consumo de PO_4^{3-} e NO_3^- do meio de cultura foi dada com o intuito de conhecer a cinética de consumo destes nutrientes, descobrindo assim se a concentração encontrada no meio salino (apêndice B) seria suficiente para não causar estresse celular na etapa que antecede (pré-inóculo) o planejamento experimental. Ademais, este experimento também norteou a escolha dos limites (inferior e superior) a serem usados no planejamento experimental *Plackett-Burman*.

Conforme pode ser observado na figura 6.15, o consumo de NO_3^- e PO_4^{3-} foi correspondente ao crescimento celular visto na fase exponencial, tendo a desaceleração do consumo e estabilização coincidindo com a fase de desaceleração e estacionária de crescimento, respectivamente. A espécie *D.* salina consumiu 32% de NO_3^- e 46% de PO_4^{3-}, disponíveis no meio de cultura. Tendo em vista este padrão, pôde-se concluir que as células do pré-inóculo cultivadas nesta condição, não sofreriam privação desses nutrientes, garantindo então que estas células sofressem ou não estresse somente em experimentos do planejamento *Plackett-*

Burman. Esta observação foi necessária para melhor compreensão dos resultados de produção de β-caroteno e ácido alfa-linolênico sob condições definidas do planejamento experimental.

Com os resultados obtidos, foi possível escolher como condição de não estresse (nível +1 do planejamento), as concentrações 18,9 mg/L de PO_4^{3-} e 310 mg/L de NO_3^-, tendo em vista que estas concentrações encontrar-se-iam em abundância. Já para as situações de possível estresse (nível -1 do planejamento), foi determinada a ausência destes nutrientes no meio.

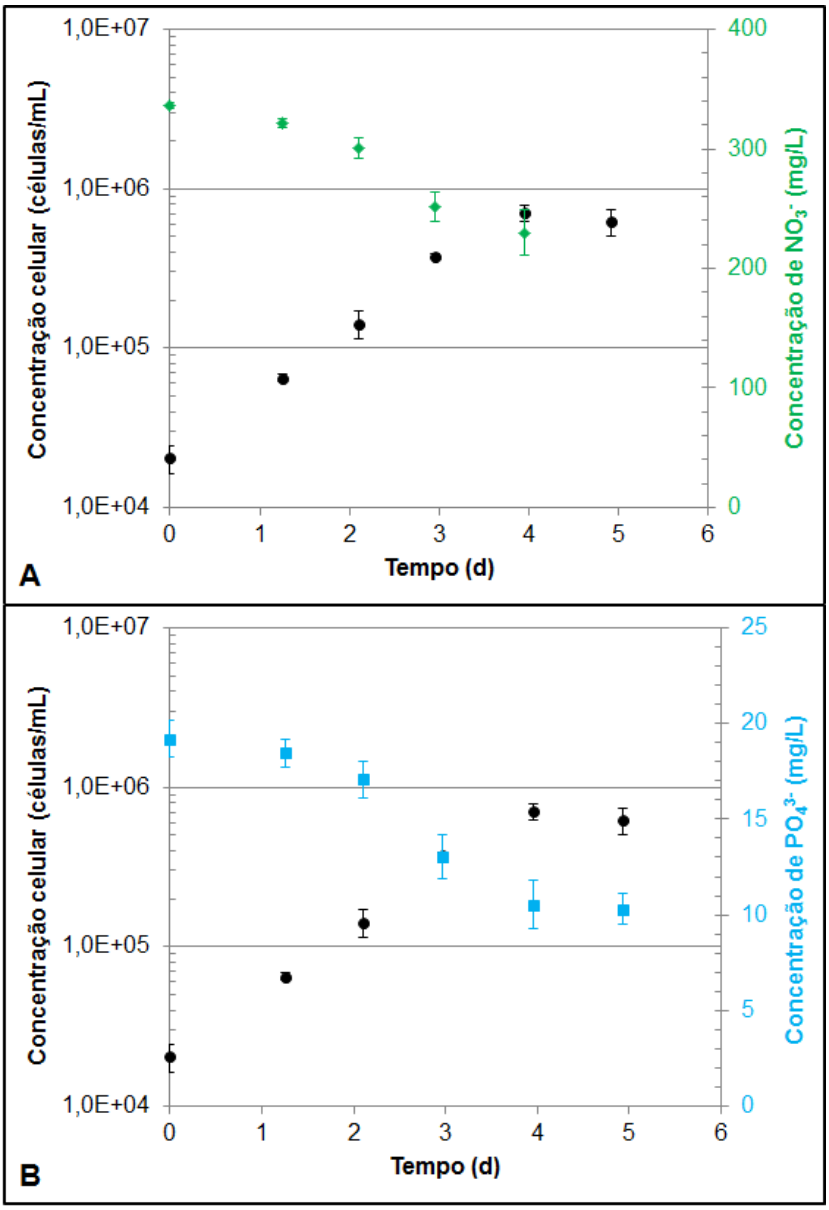


Figura 6.15: Cinéticas de crescimento e: A) consumo de NO_3^-; B) consumo de PO_4^{3-}.

6.7 Avaliação da influência da presença de sal em amostras de *D. salina* na extração de lipídios totais

A tabela 6.4 apresenta os resultados das médias de lipídios totais para cada concentração de NaCl estudada. Ao comparar as médias pelo teste t-*Student* (tabela 6.4), pode-se notar que o valor de t calculado é menor que o valor de t tabelado. Conclui-se então que as médias não são significativamente diferentes entre si, ou seja, são iguais. Com isso, pode-se dizer que a metodologia de extração empregada se comportou de maneira igual em amostras com NaCl 1 M e 3 M.

Tabela 6.4: Resultados das extrações de lipídios totais das amostras contendo NaCl, cálculos das médias, variâncias e teste t-*Student*

Amostra	Amostras com 1 M de NaCl Lipídios totais (g)	Amostras com 3 M de NaCl Lipídios totais (g)
1	0,0059	0,0062
2	0,0051	0,0050
3	0,0072	0,0063
$\bar{x}$	0,0061	0,0058
s^2	$1,12 \times 10^{-6}$	$5,23 \times 10^{-7}$
N	3	3
t_{calc}	0,32	
t_{tab}	4,303	

$\bar{x}$: média; s^2: variância; *n:* número de amostras; t_{calc}: valor de t calculado; t_{tab}: valor de t tabelado; usada a tabela bilateral para nível de confiança de 95%.

A partir destes resultados, pôde-se dar continuidade aos experimentos usando a metodologia de extração de lipídios totais (item 5.4.11) em amostras provenientes dos planejamentos experimentais, as quais continham NaCl dentro da faixa de variação estudada. Garantindo-se, assim, que o processo extrativo tenha o mesmo comportamento em todas as amostras, independente da concentração salina.

6.8 Planejamento experimental *Plackett-Burman*

6.8.1 Produção de β-caroteno

O estabelecimento do prazo de 14 h de experimento se deu a partir de observações prévias (figura 6.16) de uma primeira tentativa de realização do 1º bloco do *P&B* (com os experimentos 1, 4, 5 e 7). Percebeu-se que após,

aproximadamente, 15 h as culturas dos experimentos 4 e 7 encontravam-se com cor alaranjada, notando-se início de morte celular no experimento 4. Decorridas 24 h, a coloração do experimento 4 estava esbranquiçando, indicando maior morte celular. Com 42 h de experimento, a cultura do experimento 4 encontrava-se esbranquiçada, apontando morte celular. Já a cultura do experimento 7, encontrava-se bem alaranjada, enquanto as demais permaneciam esverdeadas. Sendo assim, foi definido que a produtividade volumétrica de β-caroteno seria avaliada com 14 h de submissão às condições experimentais do *P&B* e para este mesmo tempo também foi avaliada a produtividade de ácido α-linolênico, a fim de verificar a possibilidade da produção concomitante deste componente com o β-caroteno.

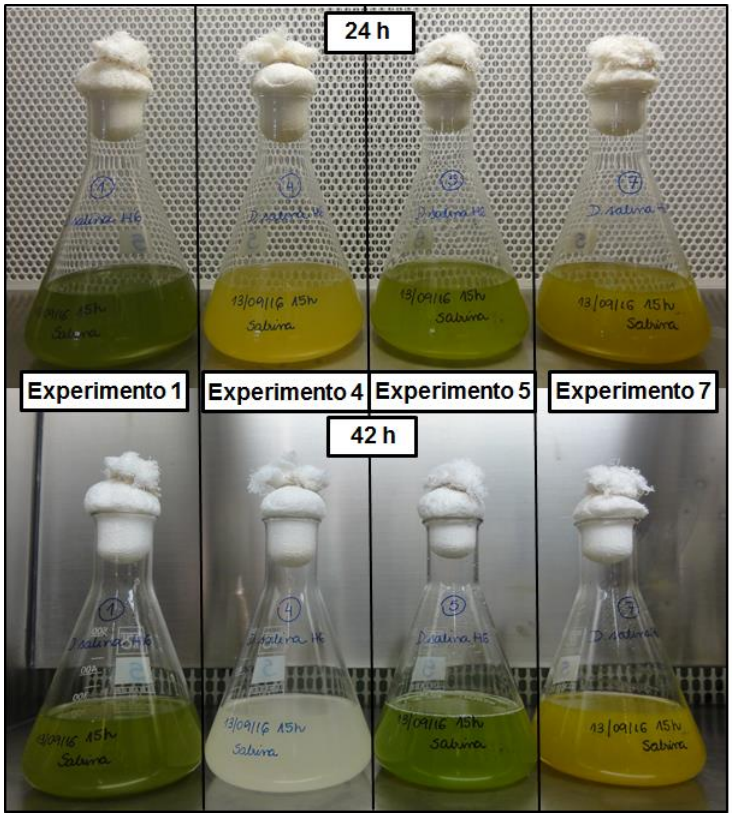


Figura 6.16: Experimentos prévios do 1º bloco do *P&B* com 24 h e 42 h de cultivo.

A figura 6.17 mostra a coloração das culturas dos experimentos imediatamente antes de iniciar o *P&B* e após 14 h de experimento. Como se pode notar, as culturas iniciaram com coloração esverdeada, indicando a prevalência do pigmento clorofila nas células. Passadas 14 h de experimento, pode-se perceber que as culturas dos experimentos 4 e 7 apresentam coloração tendendo à

alaranjada, indicando maior presença de carotenoides nas células, frente aos demais experimentos.

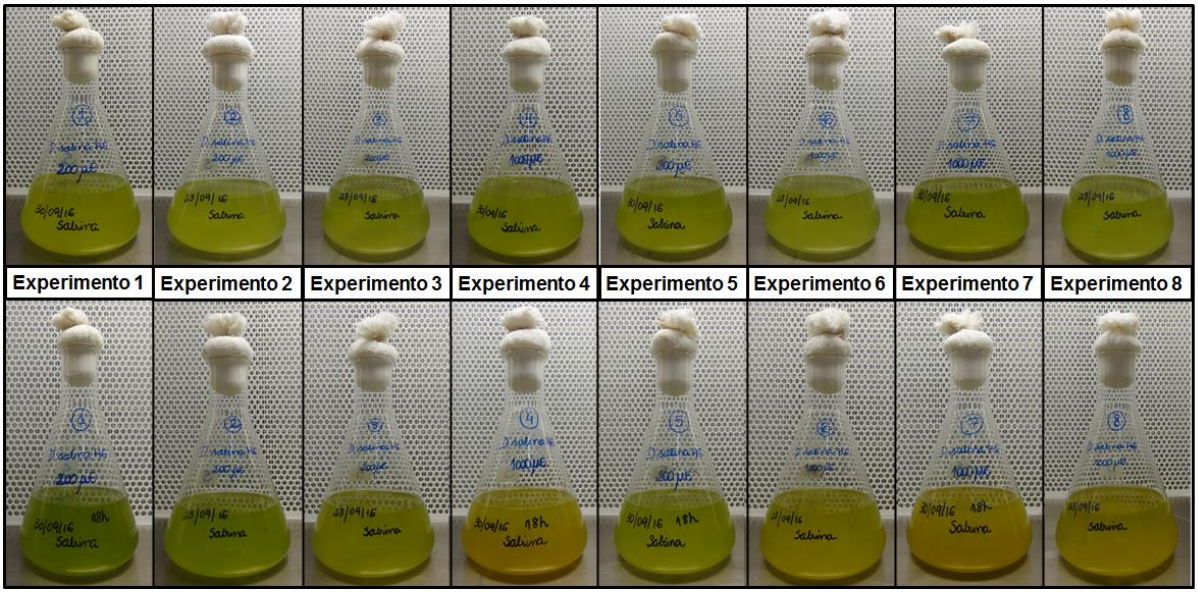


Figura 6.17: Culturas de *D. salina* em diferentes condições estudadas no planejamento de experimentos *Plackett-Burman.* Na primeira fileira encontram-se as culturas dos experimentos antes de serem submetidas ao *P&B*. Na segunda fileira estão as mesmas culturas ao término dos experimentos do *P&B* (após 14 h).

A análise visual dos experimentos 4 e 7 (figura 6.17) corrobora com os resultados de Q_p em β-caroteno obtidos (tabela 6.5), em que os maiores resultados foram encontrados nestas culturas. Conforme pode ser observado na referida tabela, houve grande variação na produtividade de β-caroteno dentre os oito experimentos, sendo a menor no experimento 2 (0,017 $mg.L^{-1}.h^{-1}$) e a maior no experimento 4 (0,252 $mg.L^{-1}.h^{-1}$).

Ainda nesta tabela, pode-se observar os resultados obtidos nos cálculos dos coeficientes (ou efeitos) do modelo matemático gerado neste planejamento, bem como os resultados dos cálculos de significância dos coeficientes das variáveis estudadas. Para aqueles coeficientes em que o zero se encontrava dentro do intervalo correspondente, considerou-se o coeficiente não significativo, uma vez que existe a possibilidade dele também ter valor igual a zero, como no caso do intervalo do coeficiente b_3 que começa em -0,049 e termina em 0,045. Já para os efeitos em que o valor zero estava fora do intervalo, definiu-se como significativos. Portanto, os

efeitos, estatisticamente significativos, para a Q_p em β-caroteno foram b_0, b_1 e b_2, sendo b_1 associado à variável "irradiância" e b_2 à variável "concentração de NaCl".

Tabela 6.5: Matriz do planejamento experimental *Plackett-Burman* com os valores dos limites das variáveis decodificados, a resposta em produtividade volumétrica de β-caroteno e o cálculo de desvio-padrão dos pontos centrais (PCs)

					Variáveis			**Resposta**
Experimento	**Irradiância ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)**	**NaCl (M)**	**PO_4^{3-} (mg/L)**	**NO_3^- (mg/L)**	**X5**	**X6**	**X7**	**Q_p β-caroteno ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)**
1	200	1	18,9	0	-	-	-	0,072
2	200	1	0	310	-	-	-	0,017
3	200	3	18,9	0	-	-	-	0,030
4	1000	1	0	0	-	-	-	0,252
5	200	3	0	310	-	-	-	0,023
6	1000	3	18,9	310	-	-	-	0,061
7	1000	1	18,9	310	-	-	-	0,211
8	1000	3	0	0	-	-	-	0,089
PC 1	600	2	9,45	155	-	-	-	0,118
PC 2	600	2	9,45	155	-	-	-	0,147
Desvio-padrão dos PCs								0,021

Tabela 6.6: Valores dos coeficientes e intervalos de confiança para os coeficientes do modelo

Coeficientes das variáveis		**Cálculo de significância dos coeficientes Intervalo de confiança dos coeficientes**			
Coeficiente	*Valor*	*Coeficiente*	*Coeficiente – t_{tab} x dp dos PC*	*Coeficiente + t_{tab} x dp dos PC*	*Resultado*
b_0	**0,094**	b_0	0,047	0,141	S
b_1	**-0,118**	b_1	-0,165	-0,071	S
b_2	**0,087**	b_2	0,040	0,134	S
b_3	-0,002	b_3	-0,049	0,045	NS
b_4	-0,033	b_4	-0,080	0,014	NS
b_5	0,015				
b_6	0,069				
b_7	-0,009				
t_{tab} x dp dos PC	0,047				
t_{tab}	2,306				

Tabela de *t-Student* usada: bilateral; nível de confiança: 95%; t_{tab}: valor de t tabelado; dp dos PC: desvio-padrão dos pontos centrais; S: Significativo; NS: Não significativo.

A análise do valor de cada coeficiente (tabela 6.6) sinaliza o quanto dado coeficiente contribui no cálculo da variável de resposta (Q_p), podendo os resultados aumentarem ou reduzirem de acordo com o sinal que acompanham o coeficiente.

Após os cálculos dos efeitos, pôde-se gerar o modelo matemático a seguir:

$$Q_P = 0{,}094 - 0{,}118x_1 + 0{,}087x_2 - 0{,}002x_3 - 0{,}033x_4 + 0{,}015x_5 + 0{,}069x_6 - 0{,}009x_7 + \varepsilon$$

Na literatura são encontrados trabalhos que usam a restrição nitrato como estratégia de produção de β-caroteno em *D. salina* e *D. bardawil.* Nestes trabalhos é recorrente a combinação da escassez deste nutriente à elevação da irradiância (MENDOZA et al., 1999; LERS, BIENER e ZAMIR, 1990), sendo estas duas variáveis citadas como os indutoras mais potentes na carotenogênese (LAMERS et al., 2010). Lamers et al. (2012), reportam aumento de 85% na produção de β-caroteno na cultura, quando esta é transferida de meio com 1240 mg/L para ausência de nitrato.

Wongsnansilp, Juntawong e Wu (2016), estudaram a influência de diferentes concentrações de fosfato no conteúdo intracelular de β-caroteno durante o crescimento de *D. salina*. Ao comparar as culturas cultivadas em 13,5 mg/L com àquelas que não continham este nutriente, constataram acréscimo de 13% no acúmulo deste pigmento. Entretanto, em termos de produtividade, culturas sob restrição de fosfato tiveram menor produtividade (0,003 $mg.L^{-1}.h^{-1}$) que àquelas cultivadas em 13,5 mg/L (0,05 $mg.L^{-1}.h^{-1}$).

Embora na literatura sejam apresentados resultados de produção de β-caroteno diante de variações das concentrações de nitrato e fosfato, há de se considerar as particularidades intraespecíficas de diferentes cepas de *D. salina* que podem ou não responder da mesma forma, sob uma mesma condição. Diante das condições usadas no presente trabalho, tem-se somente as variáveis irradiância e concentração de NaCl como importantes na Q_p em β-caroteno. Por isto, estas foram

selecionadas para serem estudadas no planejamento de otimização da produtividade (fatorial completo 2^2), já que as demais não se mostraram significativas no processo.

6.8.2 Produção de ácido α-linolênico

A produção do ácido graxo α-linolênico foi avaliada para que se pudesse visualizar se as variáveis indutoras da síntese de β-caroteno seriam as mesmas para este ácido graxo, visando assim compreender a possibilidade de síntese concomitante destes dois produtos.

De acordo com a tabela 6.7, pode-se notar grande diferença entre os resultados de produtividade em ácido α-linolênico. O maior e menor resultado encontrado foi no experimento 1 e 6, respectivamente. Conforme visto, a produtividade no experimento 6 foi negativa, indicando que não houve produção de ácido α-linolênico durante as 14 h de ensaio, havendo um pequeno decréscimo do conteúdo após este período.

A partir da análise da tabela 6.8, seguindo a mesma forma de interpretação da tabela 6.6, percebemos que os coeficientes e, consequentemente, as variáveis que os acompanham no modelo matemático, consideradas significativas são irradiância de luz e concentração de NaCl, assim como visto nos resultados de Q_p em β-caroteno. Além disso, o coeficiente b_0 que não é acompanhado de variável também é considerado significativo estatisticamente. Com a obtenção dos resultados calculados, pôde-se obter o seguinte modelo matemático:

$$Q_P = 0{,}014 + 0{,}012x_1 + 0{,}009x_2 - 0{,}001x_3 + 0{,}001x_4 + 0{,}009x_5 + 0{,}000x_6 - 0{,}017x_7 + \varepsilon$$

Tendo em vista os resultados desta etapa, as variáveis concentração de NaCl e irradiância foram selecionadas para inclusão no planejamento experimental fatorial.

Tabela 6.7: Matriz do planejamento experimental *Plackett-Burman* com os valores dos limites das variáveis decodificados, a resposta em produtividade volumétrica de ácido α-linolênico e o cálculo de desvio-padrão dos pontos centrais (PCs)

				Variáveis				Resposta
Experimento	**Irradiância ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)**	**NaCl (M)**	**PO_4^{3-} (mg/L)**	**NO_3^- (mg/L)**	**X5**	**X6**	**X7**	**Q_p Ácido α-linolênico ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)**
1	200	1	18,9	0	-	-	-	0,0374
2	200	1	0	310	-	-	-	0,0127
3	200	3	18,9	0	-	-	-	0,0018
4	1000	1	0	0	-	-	-	0,0091
5	200	3	0	310	-	-	-	0,0305
6	1000	3	18,9	310	-	-	-	-0,0004
7	1000	1	18,9	310	-	-	-	0,0171
8	1000	3	0	0	-	-	-	0,0077
PC 1	600	2	9,45	155	-	-	-	0,0036
PC 2	600	2	9,45	155	-	-	-	0,0047
Desvio-padrão dos PCs								0,0008

Tabela 6.8: Valores dos coeficientes e intervalos de confiança para os coeficientes do modelo

Coeficientes das variáveis		**Cálculo de significância dos coeficientes Intervalo de confiança dos coeficientes**			
Coeficiente	*Valor*	*Coeficiente*	*Coeficiente – t_{tab} x dp dos PC*	*Coeficiente + t_{tab} x dp dos PC*	*Resultado*
b_0	**0,014**	b_0	0,012	0,016	S
b_1	**0,012**	b_1	0,010	0,014	S
b_2	**0,009**	b_2	0,007	0,011	S
b_3	-0,001	b_3	-0,003	0,001	N
b_4	0,001	b_4	-0,001	0,003	N
b_5	0,009				
b_6	0				
b_7	-0,017				
t_{tab} x dp dos PC	0,002				
t_{tab}	2,306				

Tabela de *t-Student* usada: bilateral; nível de confiança: 95%; t_{tab}: valor de t tabelado; dp dos PC: desvio-padrão dos pontos centrais; S: Significativo; NS: Não significativo.

6.9 Planejamento Experimental Fatorial Completo

6.9.1 Otimização da Q_p em β-caroteno

O uso do planejamento experimental de otimização fez-se necessário, no caso deste estudo, para visualização da região de máxima produtividade e sua tendência de aumento. Os resultados de Qp em β-caroteno do planejamento *P&B* foram reaproveitados para compor os resultados da matriz do planejamento fatorial completo 2^2. Isso foi possível porque as combinações entre as variáveis irradiância e NaCl presentes no *P&B*, por acaso, seriam as mesmas usadas no fatorial. Além disso, tal avaliação também pôde ser feita, porque as variáveis NO_3^- e PO_4^{3-} foram pouco relevantes, na faixa estudada, garantindo assim que suas influências não foram significativas em todos os resultados de Q_p em β-caroteno. Para melhor entendimento do que foi feito, a figura 6.18 mostra como o planejamento 2^2 foi elaborado.

As diferentes colorações destacam os níveis das variáveis X1 e X2 no *P&B* e correspondem à mesma condição encontrada na matriz 2^2. Por exemplo, o retângulo roxo destaca os experimentos em que as variáveis X1 e X2 se encontram no nível "+1". Essa combinação está presente na matriz do *P&B* e prevista como um experimento na matriz 2^2. Vale ressaltar que na matriz do *P&B* existem dois experimentos para cada combinação equivalente à da matriz 2^2 e,

consequentemente, são vistos dois resultados. Com isso, foram inseridas as médias desses dois resultados em cada experimento equivalente do planejamento fatorial 2^2. Os pontos centrais não fazem parte da matriz de experimentos, tendo seus resultados utilizados para verificar se o comportamento da produção de β-caroteno é linear.

Matriz experimental do planejamento *Plackett-Burman*

	Variáveis							
Experimento	**X1**	**X2**	**X3**	**X4**	**X5**	**X6**	**X7**	**Qp em β-caroteno ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)**
1	+	+	+	-				0,072
2	+	+	-	+				0,017
3	+	-	+	-				0,030
4	-	+	-	-				0,252
5	+	-	-	+				0,023
6	-	-	+	+				0,061
7	-	+	+	+				0,211
8	-	-	-	-				0,089
Ponto Central 1	0	0	0	0				0,118
Ponto Central 2	0	0	0	0				0,147

Matriz experimental do planejamento fatorial completo 2^2

	Variáveis		Q_p em β-caroteno ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)
Experimento	**X1**	**X2**	**Média**
1	-	-	0,075
2	+	-	0,027
3	-	+	0,232
4	+	+	0,045
Ponto Central 1	0	0	0,1325
Ponto Central 2	0	0	

Figura 6.18: Matrizes experimentais dos planejamentos usados. Explicação de como os resultados da matriz *P&B* foram usados na matriz 2^2. Variáveis: X1 – irradiância; X2 – [NaCl]; X3 – [PO_4^{3-}]; X4 – [NO_3].

A observação dos resultados do planejamento (tabela 6.9) mostra a variação da produtividade obtida nos experimentos. A maior produção verificada foi no experimento 3, onde a irradiância e concentração de NaCl foram 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e 1 M, respectivamente. Já a menor produção se deu no experimento 2, sob 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e 3 M.

Tendo em vista as explanações anteriores, pôde-se então calcular os coeficientes do modelo, verificar a presença de curvatura (tabela 6.9) e gerar o gráfico de superfície de resposta (figura 6.19). Ao analisar os coeficientes b_1 e b_{12}, nota-se a influência destes na redução da resposta, enquanto b_2 colabora com o aumento. Esta análise de coeficientes corrobora com o que foi verificado nos

experimentos que mostram o aumento na produtividade com irradiâncias elevadas e com menores quantidades de NaCl.

Como o resultado do ponto central é maior que o valor de b_0, considera-se que existe curvatura no modelo e que está voltada para baixo. Se fosse ao contrário, a curvatura do modelo estaria para cima, e no caso desses valores serem iguais, seria considerada a ausência de curvatura (comportamento linear). Essa investigação foi feita, porque o tipo de equação gerada no planejamento usado não apresenta termos quadráticos que evidenciam a presença ou ausência de curvatura.

Tabela 6.9: Resultados do planejamento experimental 2^2, valor dos coeficientes das variáveis e apresentação do modelo matemático

Experimento	**Q_p em β-caroteno ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)**	**Coeficientes das variáveis**	
1	0,075	b_0	0,094
2	0,027	b_1	-0,118
3	0,232	b_2	0,087
4	0,045	b_{12}	-0,069
PC	0,133		

Modelo matemático linear de Q_p em β-caroteno ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)

$$Q_p = 0{,}094 - 0{,}118x_1 + 0{,}087x_2 - 0{,}069x_1x_2$$

Na figura 6.19, encontra-se o gráfico de superfície de resposta, construído a partir do modelo matemático. É possível observar o aumento gradual na produtividade em β-caroteno quando a irradiância e o NaCl tendem a 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e 1 M, respectivamente. Com isso, a região de maior produtividade está localizada no ponto mais alto da superfície em 3D. Este resultado pode ser explicado pelas propriedades fotoprotetoras e de supressão de espécies reativas de oxigênio que os carotenoides apresentam. Quando as células são submetidas à elevada irradiância, os carotenoides secundários atuam na absorção do excesso de fótons (BIDIGARE et al., 1993). Além disso, sob essa condição, há intensa geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que estimulam a síntese de carotenoides secundários para atuarem na supressão de ERO (EL-AGAMEY; EL BAZ; EL-BAROTY et al.,

2004). Portanto, o β-caroteno é produzido a fim de prevenir possíveis danos ao aparato fotossintético e em outros componentes celulares.

Embora a região verde claro seja a área de maior resultado, percebe-se que se trata de uma faixa estreita, exigindo-se maior controle nas condições para que não haja redução de produtividade. Por isso, ao se pensar numa produção de maior escala, deve-se escolher regiões com boa produtividade, mas em faixas que, caso existam, não permitam que a produção varie fortemente. A figura 6.19b permite melhor visualização da região das condições ótimas.

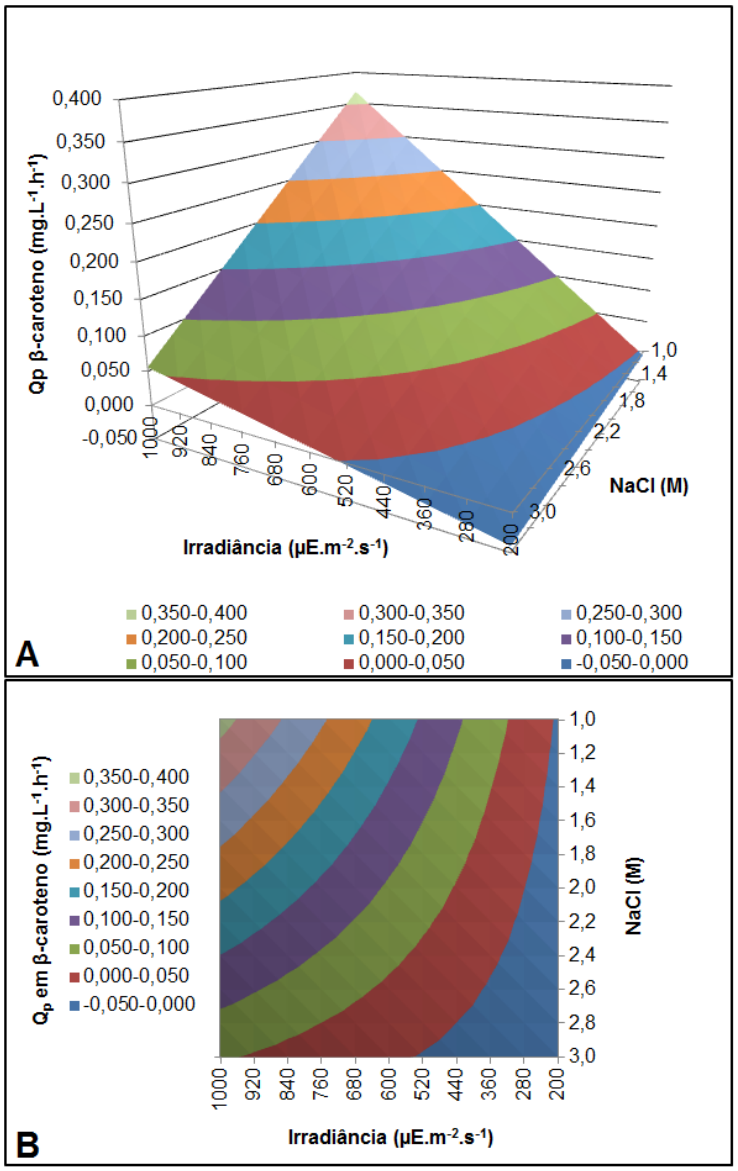


Figura 6.19: Gráfico de superfície de resposta para Q_p em β-caroteno. A) Gráfico 3D; B) Gráfico 2D.

O quadro 6.1 reúne informações acerca da produtividade de carotenoides totais ou β-caroteno em cepas de *D. salina* e *D. bardawil*, sob variação de irradiância ou concentração de NaCl. Como se pode notar, essas espécies e suas cepas são cultivadas em variados meios de cultura e diferentes faixas dessas variáveis. Para duas cepas de *D. salina*, o aumento da irradiância afetou positivamente a produtividade em β-caroteno (WU et al., 2016; LAMERS et al., 2010), corroborando com os resultados apresentados do presente trabalho. Por outro lado, a elevação de irradiância reduziu à metade a produtividade em β-caroteno em *D. salina* e se manteve inalterada em *D. bardawil* (SEUNGHYE; YEW; EONSEON, 2013).

Já ao analisar o efeito do aumento de NaCl sobre a produtividade de carotenoides totais (quadro 6.1), percebemos queda na produtividade em diferentes cepas de *D. salina* (FARHAT et al., 2011; NARVAÉZ-ZAPATA et al., 2011; CIFUENTES et al., 2001), ratificando os resultados obtidos nesta etapa de otimização. Em contrapartida, foi visto o acréscimo na produtividade de carotenoides em cepas de *D. salina* quando submetidas ao aumento de NaCl (NARVAÉZ-ZAPATA et al., 2011; GÓMEZ et al., 2003).

Em relação à produtividade alcançada no presente trabalho, observa-se que foi superior à maioria dos resultados encontrados na literatura, similar ao trabalho de Wu et al. (2016) e 20 vezes menor que o alcançado por Lamers et al. (2010). Destacando-se que nestes dois trabalhos o cultivo foi conduzido em fotobiorreatores, onde condições de cultivo como concentração de CO_2, pH, temperatura e agitação podem ser melhor controlados, resultando em maior produtividade (quadro 6.1).

No que diz respeito ao tempo de cultivo (quadro 6.1), pode-se dizer que o presente trabalho teve menos gastos com luz do que os demais, uma vez que o tempo de cultivo na etapa de crescimento durou, aproximadamente, 72 h; e no planejamento experimental foram gastas 14 h, totalizando em 86 h.

Quadro 6.1 Informações sobre a produtividade de carotenoides totais ou β-caroteno encontradas em trabalhos da literatura

Espécie/cepa	Meio	Irradiância ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)	NaCl (M)	Q_p Carotenoides totais ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)	Q_p β-caroteno ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)	Tempo de cultivo (h)	Referência
D. salina (Tunísia)	Água do mar artificial	135	1,5	0,002	Não avaliado	432	Farhat et al. (2011)
			4,5	0			
*D. salina (*KU31)	Johnsons modificado	69	2	Não avaliado	0,114	264	Wu et al. (2016)
		246			0,265	264	
D. salina (CCAP 19/18)	Água do mar artificial	200	1,5	Não avaliado	0,08	250	Seunghye, Yew e Eonseon (2013)
		400			0,04	300	
D. bardawil (LB 2538)	Água do mar artificial	200	1,5	Não avaliado	0,016	300	
		400			0,016	300	
D. salina (CCAP 19/18)	Meio descrito no artigo	150	1,5	Não avaliado	0	120	Lamers et al. (2010)
		400			4,4	360	
		650			4,7	720	
D. salina (DUNS-1)	f/2	150-180	0,6	0,0009	Não avaliado	552	Narvaéz-Zapata et al. (2011)
			5,1	0,0002		552	
D. salina (DUNS-2)	f/2	150-180	0,6	0,0004	Não avaliado	552	
			5,1	0,011		552	
D. salina (UTEX 200)	J/1	150	0,9	0,006	Não avaliado	840	Cifuentes et al. (2001)
			4,3	0,0006		840	
D. salina (CONC-007)	Água do mar enriquecida com meio Provasoli	40	1	0,011	Não avaliado	672	Gómez et al. (2003)
			3	0,044		672	
D. bardawil (ATCC 30801)			1	0,026		672	
			3	0,022		672	
***D. salina* (CCMA-UFSCar 711)**	Descrito no presente trabalho	1000	1	Não avaliado	**0,232**	**14**	**Presente trabalho**

6.9.2 Otimização da Qp em ácido α-linolênico

Segundo Rabbani et al. (1998) a biossíntese de β-caroteno em células de *D. bardawil* (considerada por alguns autores como *D. salina*), sob condições de estresse, apresenta relação de interdependência com o acúmulo de lipídios. Isto acontece porque o β-caroteno sintetizado em condições de estresse se alocam dentro de glóbulos lipídicos, compostos majoritariamente por triacilglicerídeos. Mendoza et al. (1999), também relatam incremento no conteúdo intracelular de ácidos graxos totais, bem como de carotenoides totais conforme a irradiância é aumentada. Entretanto, Lamers et al. (2010) reportam que elevadas irradiâncias não resultam em acréscimo de ácidos graxos totais, embora tenham observado aumento de β-caroteno.

Diante das controvérsias mencionadas, o planejamento experimental de otimização (2^2) se encaixa como uma ferramenta para visualização do comportamento da produção de ácido α-linolênico nas mesmas regiões estudadas para o β-caroteno. Desta forma, vislumbra-se compreender se é possível obter elevada produtividade em ácido α-linolênico e β-caroteno concomitantemente.

A otimização da produtividade de ácido α-linolênico seguiu os mesmos passos descritos na seção 6.9.1. Os resultados dos experimentos são as médias calculadas a partir dos resultados do *P&B* e encontram-se na tabela 6.10. Conforme observado, a condição de melhor produtividade foi em NaCl 1 M e 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (experimento 4), enquanto o menor resultado foi no experimento 1 (3 M e 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$).

Em relação aos coeficientes, percebe-se que todos contribuem positivamente na produtividade. Comparando o valor do ponto central com o valor do coeficiente b_0, constata-se a presença de curvatura no modelo, voltada para cima.

Tabela 6.10: Resultados do planejamento experimental 2^2, valor dos coeficientes das variáveis e apresentação do modelo matemático

Experimento	Q_p em ácido α-linolênico ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)	Coeficientes das variáveis	
1	0,004	b_0	0,014
2	0,016	b_1	0,012
3	0,013	b_2	0,009
4	0,025	b_{12}	0
PC	0,004		

Modelo matemático linear de Q_p em ácido α-linolênico ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)

$$Q_p = 0{,}014 + 0{,}012x_1 + 0{,}009x_2 + 0x_1x_2$$

O gráfico de superfície de resposta (figura 6.20 a-b) mostra a região azul claro, no ápice do gráfico 3D, como a de maior produtividade, tendo NaCl 1 M e 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. Nota-se a tendência de aumento da produtividade quando NaCl e irradiância convergem para seus menores valores (1 M e 200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$).

Lamers et al. (2010) avaliaram o perfil de ácidos graxos produzidos por *D. salina*, variando a irradiância de 200 para 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e evidenciaram redução de 37% de ácido α-linolênico no conteúdo intracelular. Estes resultados corroboram com o encontrado no presente trabalho, em que se observa a queda de produtividade com o acréscimo de irradiância. Isso pode ser explicado devido à presença de insaturações na molécula deste ácido graxo, tornando-o susceptível à oxidação por espécies reativas de oxigênio produzidas sob elevada emissão de luz (NIYOGI, 1999; LAMERS et al., 2010).

Em contrapartida, Mendoza et al. (1999) relataram aumento de 16% na síntese deste ácido graxo quando a irradiância foi alterada de 80 para 640 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. Já quando a mudança foi de 640 para 1500 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, a produção foi reduzida à metade.

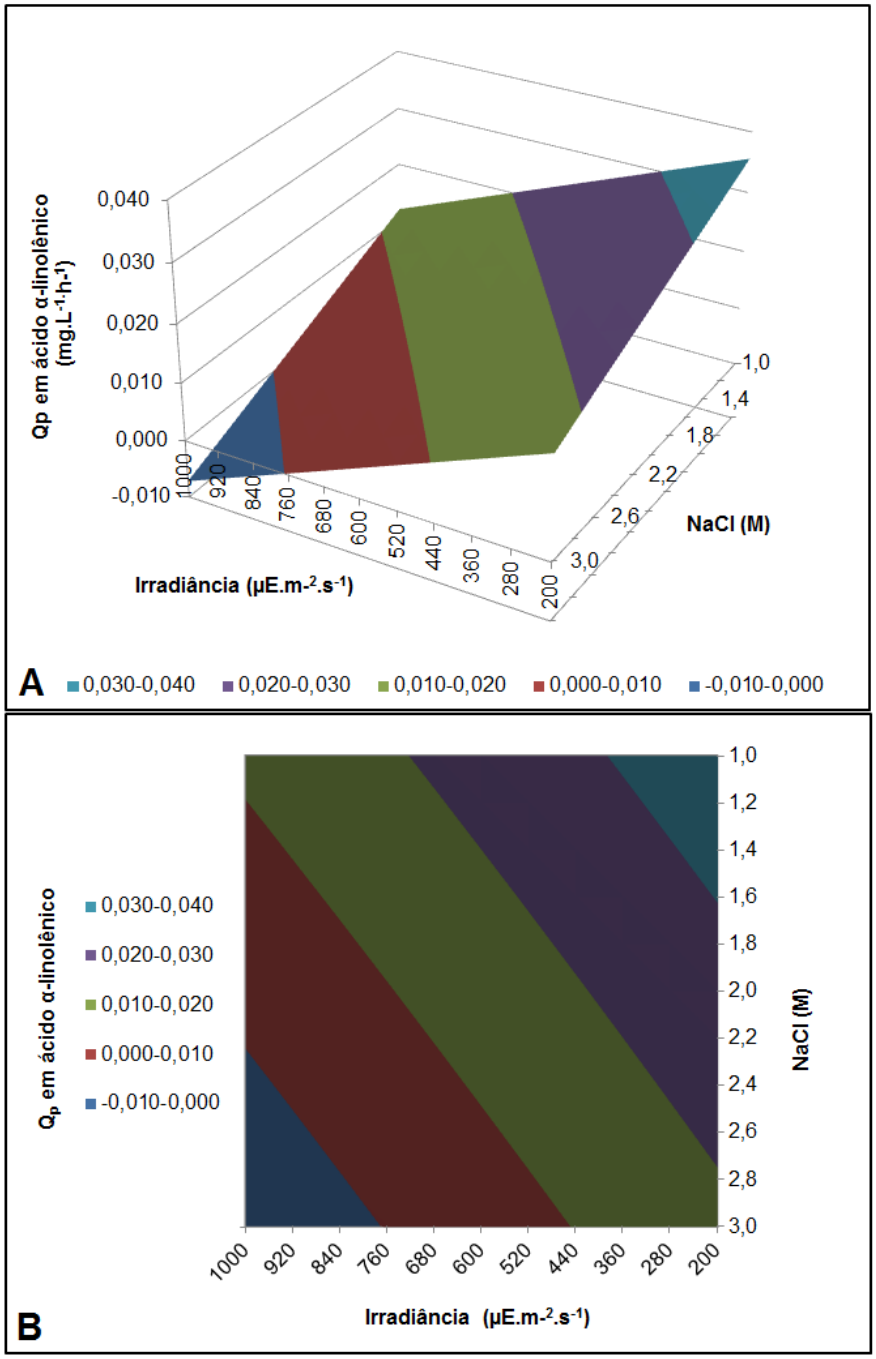


Figura 6.20: Gráfico de superfície de resposta para Q_p em ácido α-linolênico. A) Gráfico 3D; B) Gráfico 2D.

Rismani e Shariati (2017) reportam aumento na produção de ácido α-linolênico em células de *D. salina* quando cultivadas sob 100 µE.m^{-2}.s^{-1} e variação de 0,5 (0,011 mg.L^{-1}.h^{-1}) a 1,5 M de NaCl (0,040 mg.L^{-1}.h^{-1}). Ao aumentar de 1,5 M para 3 M de NaCl, verificou-se um pequeno acréscimo na produtividade, resultando em 0,044 mg.L^{-1}.h^{-1}. Resultado superior ao encontrado na melhor condição

experimental da presente tese (0,025 $mg.L^{-1}.h^{-1}$). Já Fakhry e El Maghraby (2013) obtiveram produtividade de 0,0003 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ em ácido α-linolênico.

Foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram o perfil de ácidos graxos, incluindo o ácido α-linolênico em *D. salina*, *D. bardawil* e *Dunaliella* sp. O método de quantificação usado abrange somente a porcentagem relativa deste produto no extrato, sem demais informações que possam possibilitar o cálculo de produtividade volumétrica. Por isso, o presente trabalho não fez uso de muitas comparações de produtividade com a literatura.

6.9.3 Comparação entre os resultados de otimização da Qp em β-caroteno e ácido α-linolênico

Para melhor visualização na comparação entre os resultados de produtividade obtidos, foram inseridos os gráficos e com essas informações. Como se pôde ser observado, as melhores produtividades em ácido α-linolênico e β-caroteno foram nos experimentos 4 e 3, respectivamente (tabela 6.9 e 6.10), em condições de irradiâncias diferentes. Nos gráficos de superfície (figura 6.21 a-b), são evidenciadas as tendências de aumento de produtividade em direções opostas de irradiância. Para que se tenham produtividades razoáveis de β-caroteno e ácido α-linolênico, é recomendado o cultivo nas condições referentes à região central dos gráficos (figura 6.21 c-d).

Considerando todos os resultados apresentados do *P&B* e da otimização, destaca-se que para reduzir os gastos de produção, pode-se perceber que a salinidade usada no crescimento celular também é a ideal para maiores produtividades em β-caroteno e ácido α-linolênico. Na produção do último, observa-se que a irradiância usada no crescimento celular também é a mais indicada para maiores produtividades. Desta forma, sugere-se que seja feito o crescimento celular e quando a cultura alcançar $3x10^5$ células/mL, a mesma seja submetida a 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, a fim de se obter maior Q_p em β-caroteno. Já quando o objetivo for maior Q_p em ácido α-linolênico, basta encerrar o cultivo quando o crescimento alcançar $3x10^5$ células/mL. Com isso, os custos de produção serão reduzidos, uma vez que um novo meio de cultura com novos componentes não precisará ser utilizado. Entretanto, quando os dois produtos forem o foco da produção, será necessária a

ressuspensão das células em novo meio, com concentração de NaCl que esteja dentro da região delimitada em amarelo (figura 6.21c-d), assim como a irradiância.

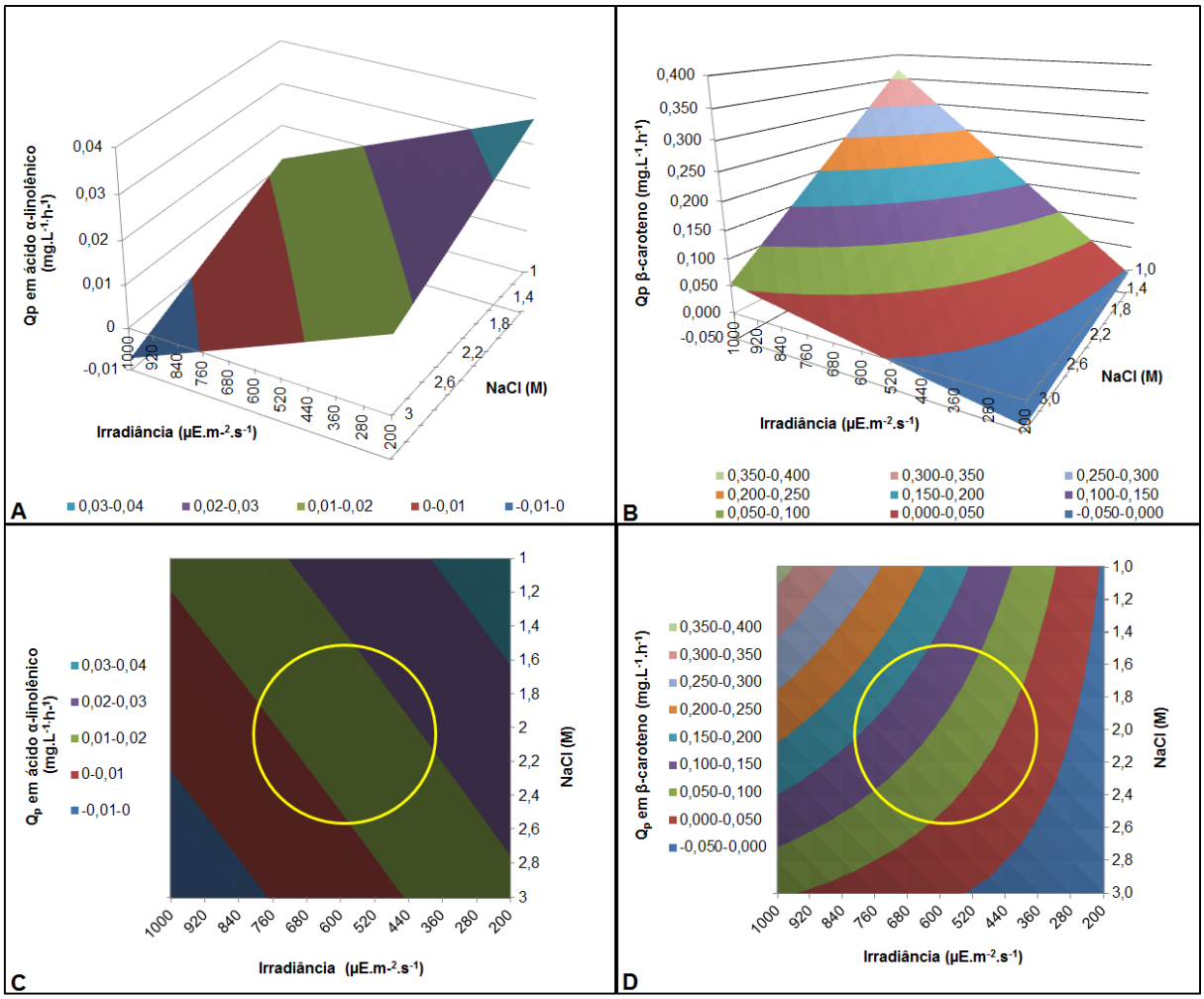


Figura 6.21: Gráficos de superfície de resposta de Q_p em ácido α-linolênico e β-caroteno: A) Gráfico 3D de Q_p em ácido α-linolênico; B) Gráfico 3D de Q_p em β-caroteno; C) Gráfico 2D de Q_p em ácido α-linolênico com região central destacada; D) Gráfico 2D de Q_p em β-caroteno com região central destacada.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que existem espécies brasileiras com potencial de produção de carotenoides. São necessários mais estudos com a espécie *G. radiata*, visando compreender os fatores de indução da produção de cantaxantina, tendo em vista que este pigmento foi detectado nos extratos desta espécie. Este pigmento é, geralmente, sintetizado em resposta ao estresse celular, sendo proveniente do metabolismo secundário. Sendo assim, a presença de cantaxantina sinaliza a possibilidade de produção de carotenoides secundários pela espécie *G. radiata*.

Também conclui-se que a cepa de *D. salina* isolada e estudada na presente tese, trata-se do primeiro registro desta espécie no Brasil, segundo levantamento realizado na base de dados Reflora. Esta cepa se destacou não somente quanto à produção de carotenoides totais frente às demais estudadas, como também em relação ao tempo de cultivo mais curto quando comparada com diferentes cepas de *D.* salina de diversos trabalhos da literatura. Tal fato, implica em menores custos de cultivo, destacando esta cepa para uso em cultivos de larga escala. Além disso, com os resultados obtidos nos experimentos do planejamento experimental fatorial completo, pode-se concluir que as condições de irradiância não são as mesmas para obtenção de máxima produtividade em β-caroteno e ácido α-linolênico. Portanto, não é possível alcançar elevada produtividade de ambos produtos concomitantemente. Porém, em algumas condições de cultivo comuns à produção dos dois produtos, é possível obter quantidade razoável destes ao mesmo tempo.

Perante os resultados apresentados, nota-se a necessidade de mais estudos, a fim de descobrir espécies brasileiras com potencial de produção de carotenoides e outros bioprodutos que possam ou não estar associados à biossíntese destes pigmentos.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ⇨ Explorar melhor as condições de cultivo de *G. radiata*, por análise multivariada, na tentativa de induzir à produção de carotenoides do metabolismo secundário;
- ⇨ Cultivar *D. salina* sob condições ideais de crescimento (200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1M) e quando a cultura atingir a fase exponencial de crescimento ($3x10^5$ células/mL), submetê-la a 1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ de irradiância, por 14 h, e comparar a produtividade em β-caroteno obtida nesta condição com o resultado da melhor condição encontrada no planejamento fatorial completo 2^2 (1000 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1M). Obtendo-se resultados semelhantes, é possível reduzir os custos de produção, uma vez que as células da fase exponencial não necessitarão de ressuspensão em novo meio para alcançar produtividade em β-caroteno similar a encontrada no planejamento fatorial;
- ⇨ Cultivar *D. salina* em condições ideais de crescimento (200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1M) e avaliar a produtividade em ácido α-linolênico 14 h após ter alcançado a fase exponencial ($3x10^5$ células/mL), de maneira a comparar com os resultados da melhor condição de produtividade (200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ e NaCl 1M) encontrada no planejamento fatorial. Sendo a produtividade igual ou superior, a etapa de ressuspensão de células em novo meio, conforme realizada no planejamento, pode ser eliminada, reduzindo assim custos de cultivo;
- ⇨ Avaliar a produtividade em β-caroteno e ácido α-linolênico, na melhor condição de cultivo encontrada, em tempos de cultivo superiores a 14 h;
- ⇨ Realizar planejamento experimental completo 3^2 para obtenção de modelo quadrático, uma vez foi constatada a presença de curvatura nas equações lineares obtidas a partir do planejamento fatorial completo 2^2;
- ⇨ Cultivar *D. salina* em fotobiorreator e avaliar a produtividade em β-caroteno e ácido α-linolênico, nas condições de irradiância e concentração de NaCl sinalizadas como ideais no planejamento fatorial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADARME-VEGA, C. T. et al. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial cell factories**, v. 11, p. 1-10, 2012.

ALGAE BASE. Disponível em: <http:algaebase.org>. Acesso em: fev. 2015.

ALICEWEB. Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br>. Acesso em: jan. 2015.

AMANCIO, R. D.; SILVA, M. V. Consumo de carotenoides no Brasil: a contribuição da alimentação fora do domicílio. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 19, n. 2, p. 130-141, 2012.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

AN, S.; FRIEDL, T. & HEGEWALD, E. Phylogenetic Relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. **Plant Biology**, v. 1, p. 418-428, 1999.

ANDERSEN, R. A.; KAWASHI, M. Traditional microalgae isolation techniques. In: ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques.** China: Elsevier, 2005, p. 91-94.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Portaria n° 540 de 27 de outubro de 1997. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: dez. 2014.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução nº 44 de 1977. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/29906780474588e892cdd63fbc4c6735/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: dez. 2014.

ASSUNÇÃO, P. et al. Molecular taxonomy of Dunaliella (Chlorophyceae), with a special focus on D. salina: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. **Aquatic Biosystems**, v. 8, p. 1-11, 2012.

ASSUNÇÃO, P. et al. Phylogenetic position of *Dunaliella acidophila* (Chlorophyceae) based on ITS and *rbcL* sequences. **Journal of applied phycology**, v. 24, p. 635-639, 2012.

ASSUNÇÃO, P. Phylogenetic analysis of ITS2 sequences suggests the taxonomic re-structuring of *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae, Dunaliellales). **Phycology resource**, v. 61, p. 81-88, 2013.

AZÚA-BUSTOS, A. et al. A novel subaerial Dunaliella species growing on cave spiderwebs in the Atacama Desert. **Extremophiles**, v. 14, p. 443-452, 2010.

BBC. Global carotenoids market to reach $1.4 billion in 2018. Disponível em:<http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-$1.4-billion-2018>. Acesso em: 05 jan. 2018.

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.; SHAISH, A.; AVRON, M. 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 technology**, v. 38, p. 233-235, 1991.

BEN-AMOTZ, A.; TORNABENE, T. G.; THOMAS, H. W. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. **Journal of phycology**, v. 21, p. 72-81, 1985.

BEUTNER, S. et al. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β-carotene in antioxidant functions. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 81, p. 559-568, 2001.

BHOSALE, R. A.; RAJABHOJ, M. P.; CHAUGULE, B. B. Dunaliella salina Teod. As a proeminent source of eicosapentaenoic acid. **International journal on algae**, v. 12, p. 185-189, 2010.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução: as algas do Brasil. In: FORZA, R. C. et al. Instituto de pesquisas jardim botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de pesquisa jardim botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 49-60. vol. 1. Disponível em: <http://books.scielo.org>. Acesso em: abr. 2015.

BIDIGARE, R. R. et al. Evidence of photoprotective function for secondary carotenoids of snowalgae. **Journal of phycology**, v. 29, p. 427-434, 1993.

BING, W. et al. Astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. **Journal of phycology**, v. 39, p. 1116-1124, 2003.

BLIGHT, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, 911-917, 1959.

BOCK, C.; PRÖSCHOLD, T. & KRIENITZ, L. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 638-652, 2011.

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

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β-carotene (provitamin a) production with algae. In: VANDAMME, E. J. **Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors**. EUA: Elsevier, 1989, p. 15-26.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.

BOROWITZKA, M. A. The Mass Culture of Dunaliella salina. In: REGIONAL SEAFARMING DEVELOPMENT AND DEMONTRATION PROJECT, 1990, Bangkok. **Anais eletrônicos.** Bangkok: Thailand, 1990. Disponível em: <www.fao.org/docrep/field/003/AB728E/AB728E06.htm >. Acesso em: 11 jun. 2015.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J.; KESSLY, D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina.* **Journal of applied phycology**, v. 2, p. 111-119, 1990.

BOROWITZKA, M. 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.

BOUSSIBA, S. et al. Changes in pigment profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. **Biotechnology letters**, v. 21, p. 601-604, 1999.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids**. Berlin: 1995. v. 1A, p. 13-18.

BRUNET, C. et al. Pigments and photoacclimation processes. In: ROY, S. et al. **Phytoplankton pigments**. New York: 2012. p. 445-472.

BYUN, Y.; HAN, K. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. **Bioinformatics**, v. 25 p. 1435-1437, 2009.

BYRD, S. M.; BURKHOLDER, J. M.; Environmental stressors and lipid production in *Dunaliella* spp. II. Nutrients, pH, and light under optimal or low salinity. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 487, p. 33-44, 2017.

BYRD, S. M.; BURKHOLDER, J. M.; ZIMBA, P. V. Environmental stressors and lipid production by *Dunaliella* spp. I. Salinity. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 487, p. 18-32, 2017.

CHAITANYA, L. G. Food coloring: the natural way. **Research journal of chemical sciences**, v. 4, n. 2, p. 87-96, 2014.

CHEKANOV, K. et al. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). **Marine drugs**, v. 12, p. 4504-4520, 2014.

CIFUENTES, A. et al. 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.

COLEMAN, A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and DNA sequence. **Protist**, v. 151, p. 1-9, 2000.

COLLOS, Y. et al. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. **Journal of applied phycology**, v. 11, p. 179-184, 1999.

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

CRAFT, N. E. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein an β-carotene in organic solvents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40, 431-434, 1992.

DEL CAMPO, J. A. et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, p. 848-854, 2004.

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.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência rural**, v. 36, n. 6, 2006.

DEVI, S. et al. Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp. **Journal of algal biomass**, v. 3, p. 38-44, 2012.

DOGUC, D. et al. Are there any remarkable effects of prenatal exposure to food colourings on neurobehavior and learning process in rat offspring? **Nutritional neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 12-21, 2015 .

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R. et al. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. **Bioresource technology**, v. 92, p. 209-214, 2004.

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

EL-AGAMEY, H. H. A.; EL BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Production of lipids rich in omega 3 fatty acids from halotolerant alga *Dunaliella salina.* **Biotechnology**, v. 3, p. 102-108, 2004.

EL-BAKY, H. H. A. et al. Production of Lipids Rich in Omega 3 Fatty Acids from the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. **Biotechnology**, v. 3, n.1, p. 102-108, 2004.

EONSEON, J. et al. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p.165-174, 2003.

EONSEON, J.; POLLE, J. E. W. Carotenoid biosynthesis in Dunaliella (Chlorophyta). In: BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J. E. W.; SUBBA RAO, D. V. **The alga Dunaliella**. India: 2009, p. 149-151.

ERNST, H. Recent advances in industrialcarotenoid synthesis. **Pure applied chemistry**, v. 74, n. 11, p. 2213-2226, 2002.

ESATBEYOGLU, T. Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. Food and **Chemical Toxicology**, v. 73, p. 119-126, 2014.

FÁBREGAS, J. et al. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology letters**, v. 20, n. 6, p. 623-626, 1998.

FAKHRY, E. M.; EL MAGHRABY, D. M. Fatty acid composition and biodiesel characterization of *Dunaliella salina*. **Journal of water resource and protection** , v. 5, p. 894 – 899, 2013.

FARHAT, N. et al. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). **Journal of phycology**, v. 47, p. 1072-1077, 2011.

FENGPING, M. et al. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analitycal biochemistry**, v. 352, p. 176-181, 2006.

FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. Brasil: 2010, p. 37.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, p. 466-488, 2014.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: http://floradobrasil.jbrj.gov.br/. Acesso em: jan. 2018.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of biology chemistry**, v. 226, p. 497-509.

FONTANA, J. D. et al. Carotenóides. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, v.13, n. 37, P. 40-45, 2000.

FOOD PRODUCT DESIGN. Global carotenoids sector to hit $1.3 billion by 2017. Disponível em: http://www.foodproductdesign.com/News/2011/10/Global-Carotenoids-Sector-to-Hit-1-3-Billion-by-2.aspx?topic=annatto. Acesso em: jun.2015.

FRANK, H. A.; COGDELL, R. J. The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In: YOUNG, A.; BRITTON, G. **Carotenoids in photosynthesis**. 1993. p. 254.

FUNG, M. P. H. **Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*.** 2010. 104 p. Thesis - Engineering division of environmental science and engineering, National University of Singapore, Singapore, 2010. Disponível em: <http://scholarbank.nus.edu.sg/bitstream/handle/10635/23745/MartinFPH.pdf?sequence=1>. Acesso em: 11 jun. 2015.

GANESAN, P. et al. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 497-503, 2011.

GARCIA, T. S., BOCK C., SANT'ANNA C. L., BAGATINI I. L., WODNIOK S., VIEIRA A. A. H. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, Messastrum gen. nov. and Curvastrum gen. nov. **Fottea**, v. 17, p. 1-19, 2017.

GLEMSER, M. et al. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1077-1088, 2015.

GOKSAN, T.; AK, I. Vegetative growth of the green alga Haematococcus pluvialis cultivated in different light-path lengths. **Asian journal of plant sciences**, v. 5, n. 3, p. 455-460, 2006.

GÓMEZ, P. I. et al. 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.

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.

GONZÁLEZ, M. A. et al. Phylogenetic relationship among strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. **Journal of applied phycology**, v. 37, p. 604-611, 2001.

GORDON, H.; BAUERNFEIND, J. C.; FURIA, T. Carotenoids as food colorants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 18, n. 1, p. 59-97, 1982.

GRACE, M. H. et al. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. **Phytomedice**, v. 16, p. 406-415, 2009.

GRAMA, B, S. et al. Induction of canthaxanthin production in a Dactylococcus microalga isolated from the Algerian Sahara. **Bioresource technology**, v. 151, p. 297-305, 2014.

GUARANTINI, T. et al. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C_{30} reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. **Journal of Brazilian chemical society**, v. 00, n. 00, p. 1-8, 2009.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. **Culture of marine invertebrate animals.** New York: Plenum Publishing Corporation, 1975, p. 48-49.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J.; SILVA, B. V. Usando cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista virtual de química**, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HARARI, A. et al. A 9-cis b-Carotene–Enriched Diet Inhibits Atherogenesis and Fatty Liver Formation in LDL Receptor Knockout Mice. **The journal of nutrition and disease**, v. 138, p. 1923-1930, 2008.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HEPPERLE, D. Multisequence alignment-editor and preparation/manipulation of phylogenetic datasets. Win32-Version. Disponível em: <http://www. sequentix. de>, 2004.

HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

IGARASHI, M. et al. Recommended methods of fatty acid methylester preparation for conjugated dienes and trienes in food and biological samples. **Journal of nutrition science and vitaminology**, v. 50, p. 121-128, 2004.

IMAMOGLU, E.; DALAY, M. C.; SUKAN, F. V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **New biotechnology**, v. 26, p. 199-204, 2009.

INDUSTRY EXPERTS. Omega-3 polyunsaturated fatty acids – A global market overview. Disponível em: < http://industry-experts.com/verticals/healthcare-and-pharma/omega-3-polyunsaturated-fatty-acids-pufas-a-global-market-overview>. Acesso em : 05 jan. 2018.

JACKSON, H.; BRAUN, C. L.; ERNST, H. The chemistry of novel xantophyll carotenoids. **The American journal of cardiology**, v. 101, p. 50-57.

JEFFREY, S. H.; EGELAND, E. S. Pigments of green and red forms of Dunaliella, and related Chlorophytes. In: BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J. E. W.; SUBBA RAO, D. V. **The alga Dunaliella**. India: 2009, p. 130.

JEFFREY, S. W.; WRIGHT, S. W.; ZAPATA, M. Microalgal classes and their signature pigments. In: ROY, S. et al. **Phytoplankton pigments**. New York: 2012. p. 3-78.

JOBB, G. TREEFINDER, versão de outubro de 2008. Programa distribuído pelo autor. Munich, Germany. Disponível em: <http://www.Treefinder.de>, 2008.

KANNAN P. R. et al. Significance of 18S rDNA specific primers in the identification of genus Dunaliella. **Journal of experimental sciences**, v. 1, p. 27-31, 2010.

KATSUYA, A.; HIROAKI, H.; MORIO, H. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. **Food chemistry**, v. 100, p. 656-661, 2007.

KIM, K. B. et al. α-linolenic acid: nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. **Food and chemical toxicology**, v. 70, p. 163-178, 2014.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free radical biology & medicine**, v. 7, p. 617-635, 1989.

KUS-YAMASHITA, M. M. M.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos. In: KUS-YAMASHITA, M. M. M.; MANCINI-FILHO, J. **Funções plenamente reconhecidas**. São Paulo: 2017. p. 40.

LAMERS, P. P. et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed Dunaliella salina. **Biotechnology and bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 338-648, 2010.

LAMERS, P. P. et al. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications**. Trends in biotechnology**, v. 26, n. 11, 2008.

LAMERS, P. P. et. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. **Journal of biotechnology**, v. 162, p. 21-27, 2012.

LEMAHIEU, C. et al. Impact of food supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. **Food chemistry**, v. 141, p. 4051-4059, 2013.

LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoids astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. **Photosynthesis research**, v. 106, p. 155-177, 2010.

LERS, A.; BIENER, Y. ZAMIR, A. Photoinduction of massive β-carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. **Plant physiology**, v. 93, p. 389-395, 1990.

LICHTENTHALER, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350–382.

LING, X. et al. Microalgal bioreactors: challenges and opportunities. **Engineering in life sciences**, v. 9, n. 3, p. 178-189, 2009.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MARIN, B.; KLINGBERG, M.; MELKONIAN, M. Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. **Protist**, v. 149, p. 265-276, 1998.

MARTINS, D. A. et al. lternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. **Marine drugs**, v. 11, p. 2259-2281, 2013.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLIZEK, M. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. Handbook of microalgal culture. New Delhi: 2013, p. 3-21.

MATA-GÓMEZ, L. C. et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n.12, p. 1-11, 2014.

MATA-GÓMEZ, L. C. et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial cell factories**, v. 13, p. 1-11, 2014.

McCANN, D. et al. Food additivies and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **The lancet**, v. 370, 2007.

MENDOZA, H. et al. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina.* **Journal of applied phycology**, v. 11, p. 11-19, 1999.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. **Analytical chemistry**, v. 33, n. 3., p. 363-364.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). Biodiversidade brasileira. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em: 11 jun. 2015.

MPOUNTOUKAS, P. et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and chemical toxicology**, v. 48, p. 2934-2944, 2010.

MULDERS, K. J. M. et al. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. **Algal research**, v. 6, p. 8-16, 2014.

MULDERS, K. J. M. et al. Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acids esters: a carotenoid metabolism study. **Journal of applied phycology**, v. 27, p. 125-140, 2015.

MULDERS, K. J. M. et al. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of phycology**, v. 50, p. 229-242, 2014.

MULLER, T. et al. Distinguishing species. **RNA**, v. 13, p. 1469-1472, 2007.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 1150-1154, 2000.

NARVAÉZ-ZAPATA, J. A. et al. Different physiological responses influenced by salinity in genetically related *Dunaliella salina* isolates. **Biotechnology letters**, v. 33, p. 1021-1026, 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank. Disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 20 ago. 2014.

NGUYEN, K. D. Astaxanthin: a comparative case of synthetic vs. natural production. Chemical and biomolecular engineering, 2013. Disponível em: <http://trace.tennessee.edu/utk_chembiopubs/94/> . Acesso em: jun.2015.

NIYOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 50, p. 333-359, 1999.

NYLANDER, J. MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University 2, 2004.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microbial biotechnology: from the test tube to the market place. **Biomolecular engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLIVEIRA, J. M.; LUZIA, L. A.; RONDÓ, P. H. C. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3: saúde cardiovascular e sustentabilidade ambiental. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 19, p. 89-96, 2012.

OLMOS, J.; PANIAGUA, J.; CONTRERAS, R. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. **Letters in applied microbiology**, v. 30, p. 80-84, 2000.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida.** 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PALOZZA, P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 9, 1998.

PELAH, D.; SINTOV, A.; COHEN, E. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 20, p. 483-486, 2004.

POLLE, J. E.; STRUWE, L.; JIN, E. Identification and characterization of a new strain of the unicellular green alga *Dunaliella salina* (Teod.) from Korea. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, p. 821-827, 2008.

POLOTOW, T. G. et al. Astaxanthin supplementation delays physical exhaustion and prevents redox imbalances in plasma and soleus muscles of wistar rats. **Nutrients**, v. 6, p. 5819-5838, 2014.

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

PREISIG, H. R.; ANDERSEN, R. A. Historical review of algal culturing techniques. In: ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques.** China: Elsevier, 2005, p. 1-13.

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.

RABANNI, S. et al. Induced β-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition int the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. **Plant physiology**, v. 116, p. 1239-1248, 1998.

RAHIMIAN, H.; RAYBURN, W. R. The effect of calcium on growth ad seta formation in *Golenkinia minutissima*. **Botanical gazette**, v. 140, n. 1, p. 5-10, 1979.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, A. Tracer Version 1.4.. Disponível em: <http://beast. bio. ed. ac. uk/Tracer>, 2007.

RYCHEBOSCH, E. et al. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. **Food chemistry**, v. 160, p. 394-400, 2014.

RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain history and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of genetic and microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RISMANI, S.; SHARIATI, M. Changes of the total lipid and omega-3 fatty acid contents int two microalgae *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* under salt stress. **Brazilian archives of biology and technology**, 60, p. 1-11, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Seleção de variáveis. In: RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos & otimização de processos. Brasil: Cárita, 2009, p. 233-293.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. Harvestplus handbook for carotenoid analysis, 2004. Washington: 2004. 58 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides. Brasília: 2008. 99 p.

ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O. & CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microlitre format PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 173-174, 1993.

SANTOS, R. R. **Estudo de diferentes condições de cultivo de Chlorella vulgaris visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios.** Rio de Janeiro, 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) , Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

SATO, G. S. et al. Tendência de mercado para corantes na indústria de alimentos. Agricultura em São Paulo, v. 39, p. 1-50, 1992.

SEIBEL P. N. et al. 4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. **BMC Bioinformatics,** v. 7, p. 1-7, 2006.

SEUNGHYE, P.; YEW, L.; EONSEON, J. Comparison of the responses of two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. **Algae**, v. 28, n. 2, p. 203-211, 2013.

SiBBr (SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA). A biodiversidade brasileira. Disponível em: <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>. Acesso em: 11 jun. 2015.

SLUIJS, I. et al. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. **Nutrition, metabolism & cardiovascular diseases**, v. 25, p. 376-381, 2015.

SOLOVCHENKO, A. E. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. **Russian journal of plant physiology**, v. 60, n. 1, p. 3-16, 2013.

STÖVER, B. C. & MÜLLER, K.F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics, v.** 11, p. 1-9, 2010.

SWADESH, K. D. et al. Fucoxanthin Induces apoptosis in osteoclast-like cells differentiated from RAW264.7 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 6090-6095, 2010.

SWOFFORD, D.L. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts., 2002.

TAFRESHI, A. H.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. **Journal of applied microbiology**, v. 107, p. 14-35, 2009.

TAGHI, S. M. Microbial canthaxanthin: perspectives on biochemistry and biotechnological production. **Engineering in life sciences**, v. 13, p. 408-417, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. PLANT PHYSIOLOGY. Massachusetts: 2002. 621 p.

TEBANNI, S. et al. Microalgae. In: TEBANNI, S. CO_2 biofixation by microalgae. London: 2014, p. 17.

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

TEODORESCO, E.C. Organisation et développement du Dunaliella, nouveau genre de Volvocacée - **Polyblepharidée. Beihefte zum Botanischen Centralblatt**, v. 18, p. 215-232, 1905.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310-313, 2001.

TUCCI, A. et al. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas 34: Chlorophyceae (Golenkiniaceae e Micractiniaceae). **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 307-314.

UGWU, C.U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource technology**, v. 99, p. 4021-4028, 2008.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VANITHA, A. et al. Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* and *Dunaliella salina.* **International journal of of food sciences and nutrition**, v. 58, p. 373-382, 2007.

WEEDON, B. C. L.; MOSS, G. P. Structure and Nomenclature. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids. Berlin: 1995. v. 1A, p. 31-33.

WHITE, A. L.; JAHNKE, L. S. Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and photoprotection of β-carotene int two *Dunaliella* spp. **Plant cell physiology**, v. 42, n. 8, p. 877-884, 2002.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M.; JANSSEN, M. Cultivation of Dunaliella for high value compounds. . In: BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J. E. W.; SUBBA RAO, D. V. The alga Dunaliella. India: 2009, p. 99-100.

WONGSNALSILP, T.; JUNTAWONG, N.; WU, Z. Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation. **Journal of biological research**, v. 89, p. 51-55, 2016.

WU, Z. et al. The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2016.

YASUJI, O. et al. Identification of antimutagenic substancesin an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (Asadusa-nori). **Cancer Letters**, v. 100, p. 235-240, 1996.

YOUNG, A. J. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. **What's new in plant phydiology**, v. 83, p. 702-708, 1991.

YUAN-KUN, L. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of applied phycology**, v. 13, p. 307-315, 2001.

ZAMANI, H.; MORADSHAHI, A.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R. Characterization of a new *Dunaliella salina* strain MSI-1 based on nuclear rDNA ITS sequences and its

physiological response to changes in composition of growth media. **Hydrobiologia**, v. 658, p. 67-75, 2011.

ZHANHUA, T. et al. Monitoring and rapid quantication of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cellsusing laser tweezers Raman spectroscopy. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 314, p. 42-48, 2011.

ZHI-WEI, Y.;JIAN-GUO, J.; GUANG-HONG, W. Biosynthesis and regulation of carotenoids in Dunaliella: progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 352-360, 2008.

10. APÊNDICES

11. APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PREPARO DE MEIO WC MODIFICADO PARA NÃO CONTER SÍLICA, SEGUNDO DESCRITO POR GUILLARD E LORENZEN (1972)

	Solução de Tris		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
Tris (2-Amino-2-hidroximethil-propano-1,3-diol)	0,5	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 1000 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

Para preparar 1 L de meio WC:

- ✓ Adicionar 1 mL de cada solução-estoque na solução de tris, exceto a solução de ácido H_3BO_3 que deve-se adicionar 100 µL. Este preparo deve ser feito com as soluções já estéreis e em condições assépticas;
- ✓ Ajustar o pH para 8,00, utilizando soluções estéreis de HCl para acidificar e NaOH para basificar o meio.

Preparo de soluções-estoque:

	Solução-estoque de $NaNO_3$		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
$NaNO_3$	8,5000	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de $NaHCO_3$		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
$NaHCO_3$	1,2600	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de $CaCl_2.2H_2O$		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
$CaCl_2.2H_2O$	3,6760	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de $MgSO_4.7H_2O$		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
$MgSO_4.7H_2O$	3,6970	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de K_2HPO_4		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
K_2HPO_4	0,8710	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de H_3BO_3		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
H_3BO_3	1,0000	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de vitaminas		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
Tiamina	0,1000	Solubilizar todos os componentes juntos em água destilada	Filtrar em membrana de acetato de celulose com poro 0,22 µm, em condições assépticas
Cianocobalamina	0,0005		
Biotina	0,0005		

Solução-estoque de metais-traço				
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**	
Na_2EDTA	4,3600	Solubilizar em água destilada todos os componentes juntos e avolumar para 900 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm	**Solução de ferro quelado**
$FeCl_3.6H_2O$	3,1500			
$CuSO_4.5H_2O$	0,9800	Solubilizar em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm	Após as soluções estarem estéreis e em temperatura ambiente, adicionar 1 mL de cada uma dessas soluções à solução de ferro quelado (Na_2EDTA+ $FeCl_3.6H_2O$) e avolumar para 1000 mL com água estéril para se obter a solução-estoque de metais-traço
$ZnSO_4.7H_2O$	2,2000	Solubilizar em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm	
$CoCl_2.6H_2O$	1,0000	Solubilizar em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm	
$MnCl_2.4H_2O$	18,0000	Solubilizar em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm	
$NaMoO_4.2H_2O$	0,6300	Solubilizar em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm	

12. APÊNDICE B – PROTOCOLO DE PREPARO DE MEIO SALINO, SEGUNDO DESCRITO POR BEN-AMOTZ, SHAISH E AVRON (1992)

<table>
<tr><th colspan="5">Solução 1</th></tr>
<tr><th>Componente</th><th>Massa pesada (g)</th><th>Preparo da solução</th><th>Esterilização</th><td rowspan="6">Após as soluções estarem estéreis e em temperatura ambiente, misturá-las em condições assépticas, misturá-las</td></tr>
<tr><td>$NaHCO_3$</td><td>4,2000</td><td rowspan="2">Solubilizar em água destilada os dois componentes juntos e avolumar para 500 mL</td><td rowspan="2">Autoclavar por 30 min a 1 atm</td></tr>
<tr><td>KH_2PO_4</td><td>0,0272</td></tr>
<tr><th colspan="4">Solução 2</th></tr>
<tr><th>Componente</th><th>Massa pesada (g)</th><th>Preparo da solução</th><th>Esterilização</th></tr>
<tr><td>NaCl</td><td>58,5000*

* Massa necessária para 1 L de meio conter NaCl 1M</td><td>Solubilizar em água destilada o componente e avolumar para 500 mL</td><td>Autoclavar por 30 min a 1 atm</td></tr>
</table>

Solução 3				
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**	Após a solução estar estéril e em temperatura ambiente, misturar com a solução formada pelas soluções 1 e 2
KCl	0,3730	Solubilizar em água destilada todos os componentes juntos e avolumar para 5 mL	Autoclavar por 30 min a 1 atm	
Na_2SO_4	0,7105			
$NaNO_3$	0,4250			

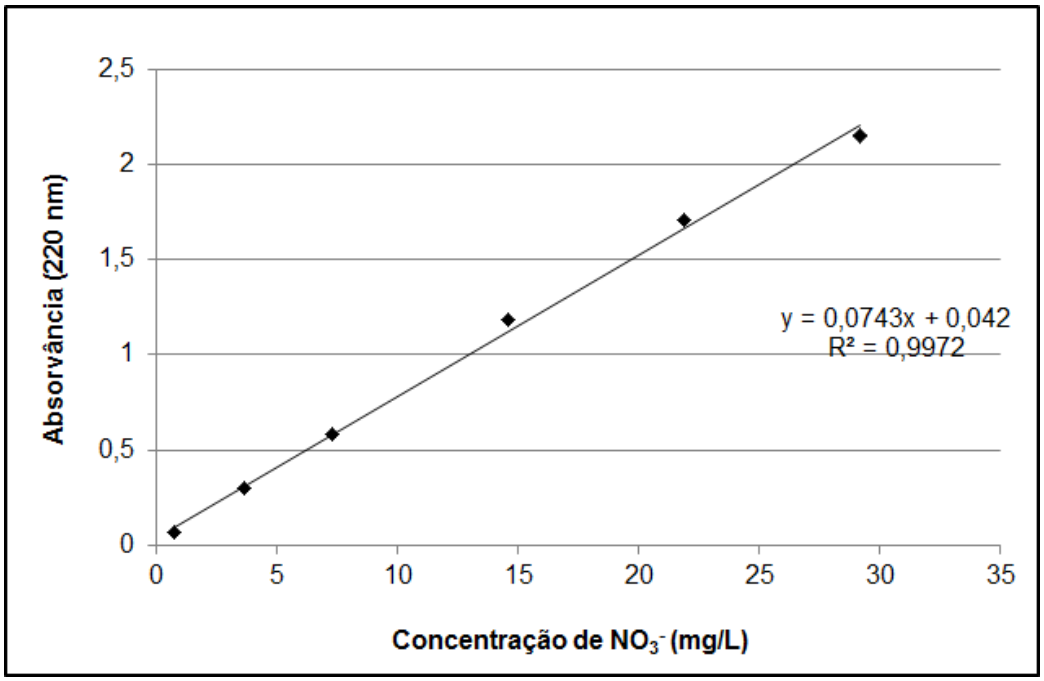
Solução 4				
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**	Após a solução estar estéril e em temperatura ambiente, misturar com a solução formada pelas soluções 1, 2 e 3
$MgCl_2.6H_2O$	1,0165	Solubilizar em água destilada e avolumar para 3 mL	Autoclavar por 30 min a 1 atm	

Solução 5				
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**	Após a solução estar estéril e em temperatura ambiente, misturar com a solução formada pelas soluções 1, 2, 3 e 4
$CaCl_2.2H_2O$	0,0294	Solubilizar em água destilada e avolumar para 3 mL	Autoclavar por 30 min a 1 atm	

<table>
<tr><th colspan="6">Solução-estoque de metais-traço</th></tr>
<tr><th>Componente</th><th>Massa pesada (g)</th><th>Preparo da solução</th><th>Esterilização</th><td rowspan="5">Após as soluções estarem estéreis e em temperatura ambiente, misturá-las em condições assépticas</td><td rowspan="5">Acrescentar 1 mL da solução-estoque de metais-traço, em condições assépticas, na mistura de soluções 1, 2, 3, 4 e 5. Ajustar o pH para 8,00</td></tr>
<tr><td>$FeCl_3$</td><td>0,5407</td><td rowspan="2">Solubilizar juntos os dois componentes em água destilada e avolumar para 200 mL</td><td rowspan="2">Filtrar em membrana de acetato de celulose com poro 0,22 µm em condições assépticas</td></tr>
<tr><td>Na_2EDTA</td><td>1,8612</td></tr>
<tr><td>$MnCl_2$</td><td>1,3856</td><td>Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 200 mL</td><td>Autoclavar por 30 min a 1 atm</td></tr>
<tr><td>$CuCl_2$</td><td>0,1346</td><td>Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 200 mL</td><td>Autoclavar por 30 min a 1 atm</td></tr>
</table>

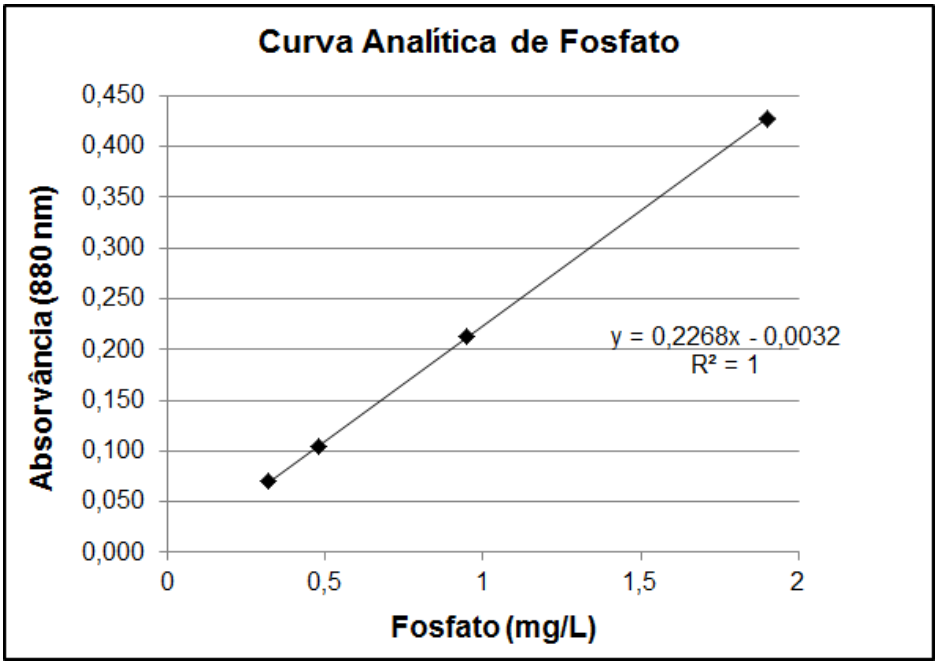
$ZnCl_2$	0,1364	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 200 mL	Autoclavar por 30 min a 1 atm		
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1,2359	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 190 mL	Autoclavar por 30 min a 1 atm		
$CoCl_2.6H_2O$	0,2379	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 50 mL	Autoclavar por 30 min a 1 atm	Após a solução estar estéril e em temperatura ambiente, misturar 10 mL desta solução com a mistura de soluções descrita acima. Com isso, será obtido 1 L de solução-estoque de metais-traço	

13. APÊNDICE C – CURVA ANALÍTICA DE NITRATO (NO_3^-)

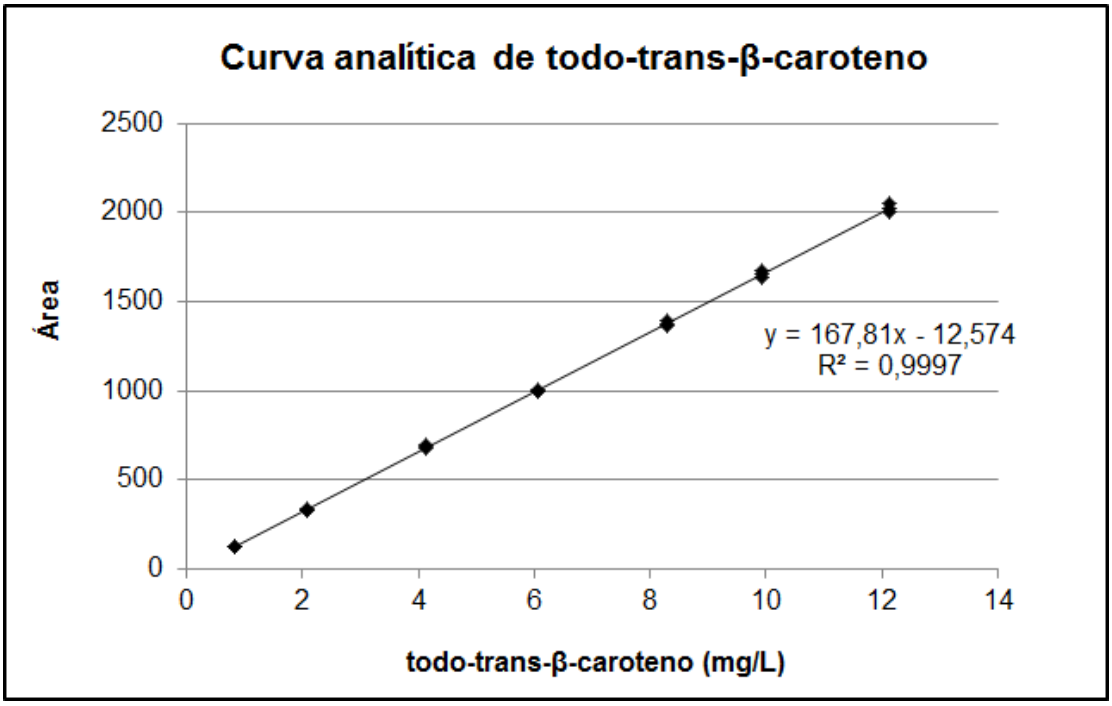


14. APÊNDICE D – REAGENTES E CURVA ANALÍTICA DE FOSFADO USADOS NA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE FOSFATO SEGUNDO GRASSHOFF, EHRHARDT E KREMILING (1983)

1) Solução de H_2SO_4 (4,5 M) - preparar a solução adicionando-se 250 mL de H_2SO_4 a 750 mL de água.
2) Solução de ácido ascórbico acidificado – solubilizar 5 g de ácido ascórbico em 25 mL de água destilada. Adicionar 25 mL de solução de H_2SO_4 (4,5 M) a esta solução, transferir para um frasco de vidro âmbar e estocar na geladeira. Esta solução pode ser usada enquanto estiver incolor.
3) Reagente mistura para fosfato – solubilizar 12,5 g de heptamolibdato de amônio tetrahidratado $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) em 125 mL de água destilada. Em seguida, solubilizar 0,5 g de tartarato de antimônio e potássio em 20 mL de água destilada. Adicionar a solução de heptamolibdato à 350 mL da solução de H_2SO_4 (4,5 M) e submeter à agitação. Após isto, adicionar a solução de tartarato e homogeneizar. Estocar em frasco de vidro e manter em geladeira.



15. APÊNDICE E – CURVA ANALÍTICA DE TODO-TRANS-β-CAROTENO, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO



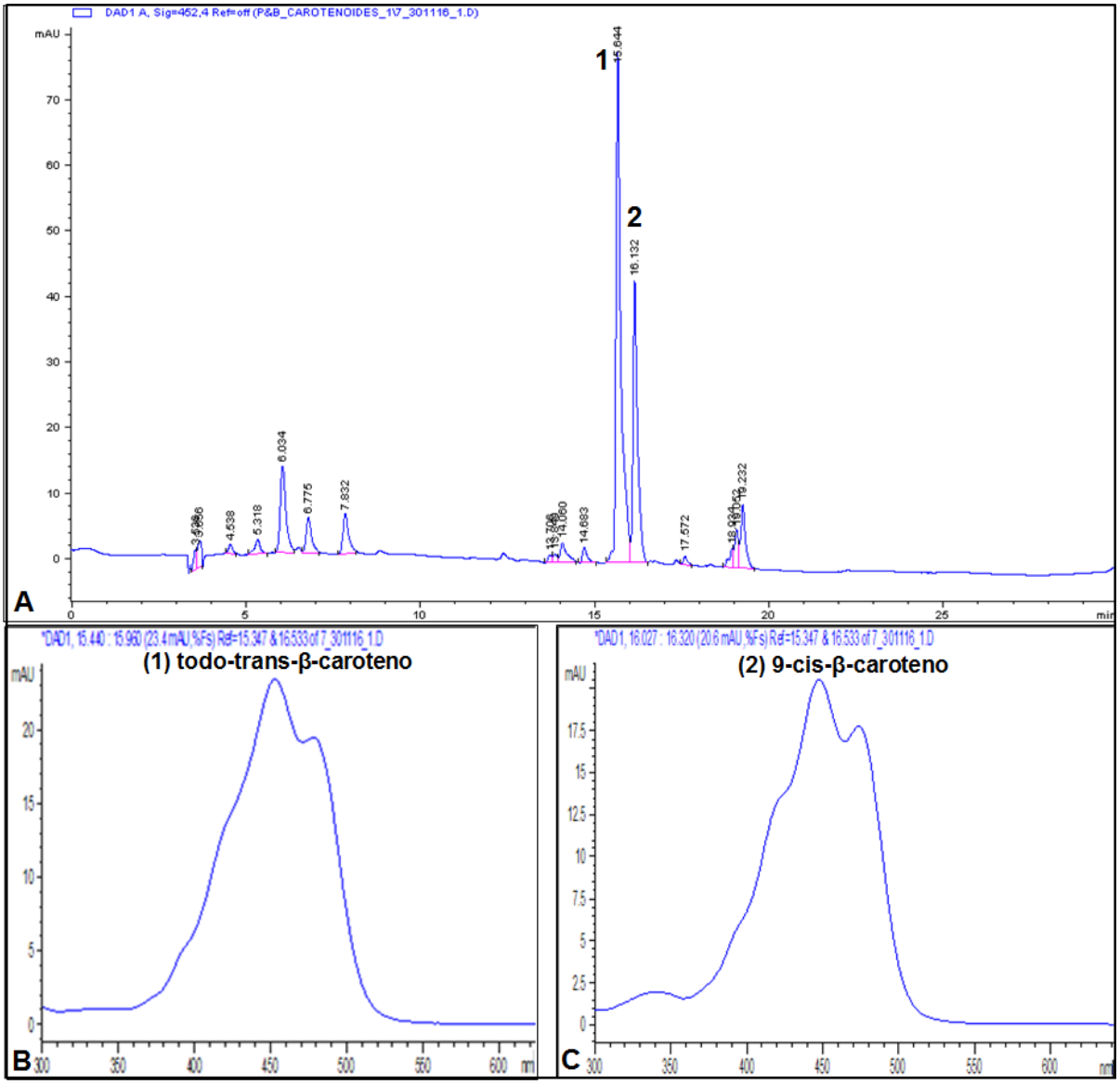
Pontos da curva analítica	Concentrações de β-caroteno (mg/L)
1	0,83
2	2,07
3	4,14
4	6,07
5	8,28
6	9,94
7	12,14

Limite de detecção encontrado (LD): 0,25 mg/L

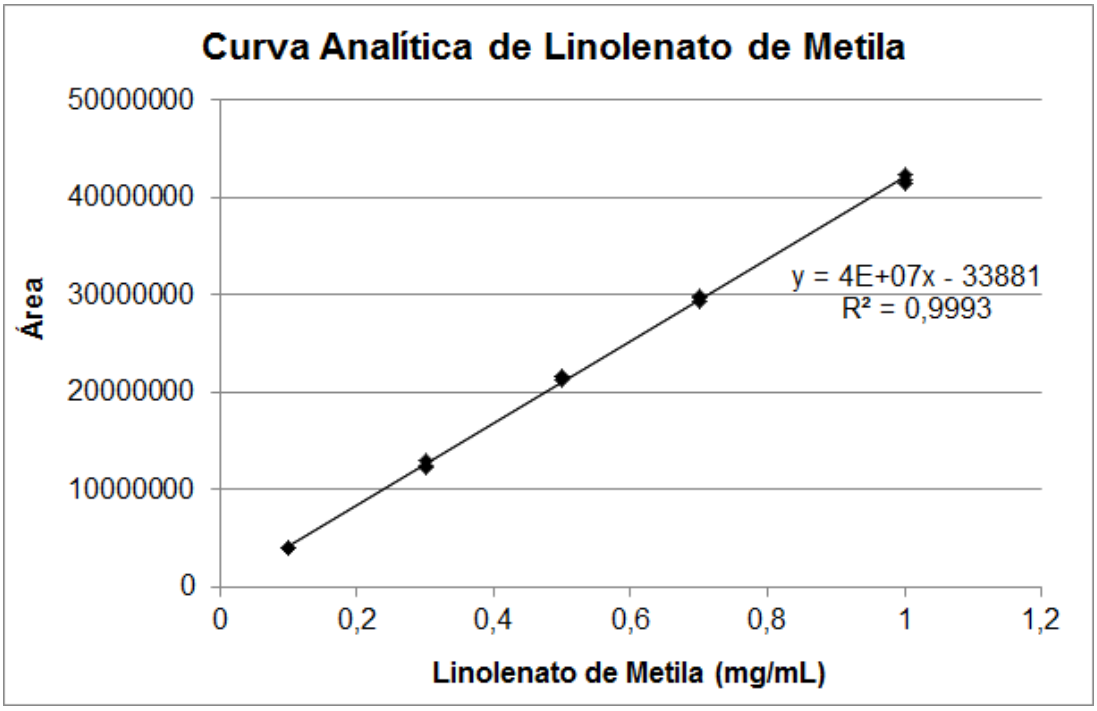
Limite de quantificação calculado (LQ): 0,75 mg/L

Faixa de linearidade estudada: 0,83 a 12,14 mg/L

16. APÊNDICE F – CROMATOGRAMA DO EXTRATO DE CAROTENOIDES DE *D. salina* CCMA-UFSCar 711 (A) E ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS ISÔMEROS DE β-CAROTENO QUANTIFICADOS (B-C)



17. APÊNDICE G – CURVA ANALÍTICA DE LINOLENATO DE METILA, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO



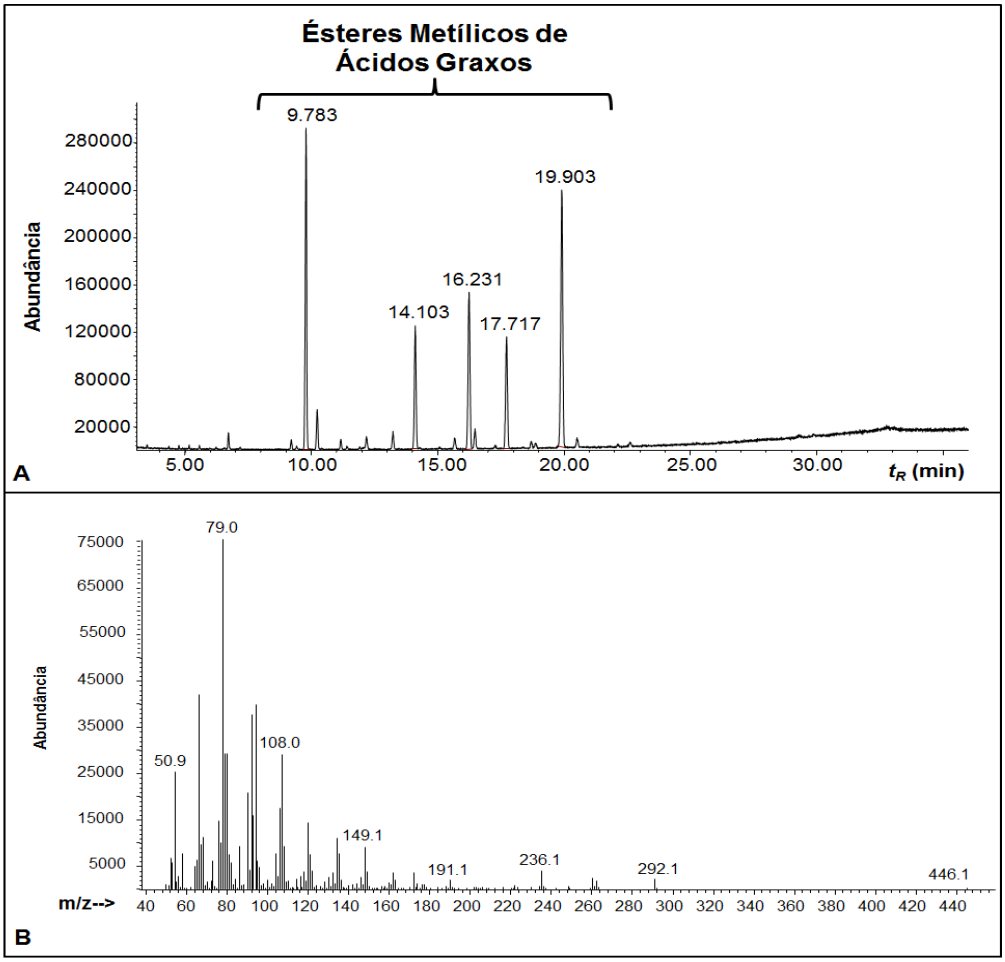
Pontos da curva analítica	Concentrações de linolenato de metila (mg/mL)
1	0,10
2	0,30
3	0,50
4	0,70
5	1,00

Limite de detecção encontrado (LD): 0,009 mg/mL

Limite de quantificação calculado (LQ): 0,30 mg/mL

Faixa de linearidade estudada: 0,10 a 1,00 mg/mL

18. APÊNDICE H – CROMATOGRAMA COM ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS DE *D. salina* CCMA-UFSCar 711 (A) E ESPECTRO DE MASSAS DO LINOLENATO DE METILA (B)



Identificação de analitos do cromatograma	
t_R	**Analito**
9,783	Palmitato de metila (éster metílico do ácido palmítico/éster metílico do ácido hexadecanóico)
14,103	Não identificado
16,231	Oleato de metila (éster metílico do ácido oleico/éster metílico do ácido 9-decenoico)
17,707	Linoleato de metila (éster metílico do ácido linoleico/éster metílico do ácido 9,12-octadecadienoico)
19,903	Linolenato de metila (éster metílico do ácido linolênico/éster metílico do ácido 9,12,15-octadecatrienoico)

19. APÊNDICE I – PROTOCOLO DE PREPARO DE SOLUÇÕES-ESTOQUE DO MEIO F/2 MODIFICADO PARA NÃO CONTER SÍLICA, SEGUNDO GUILLARD (1975)

	Solução-estoque de $NaNO_3$		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
$NaNO_3$	7,5	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

	Solução-estoque de $NaH_2PO_4.2H_2O$		
Componente	**Massa pesada (g)**	**Preparo da solução**	**Esterilização**
NaH2PO4.2H2O	0,5	Solubilizar o componente em água destilada e avolumar para 100 mL	Autoclavar por 30 minutos a 1 atm

Solução-estoque de metais-traço
Vide APÊNDICE A

Solução-estoque de vitaminas
Vide APÊNDICE A

<u>Enriquecimento da água da salina:</u>

- ✓ Para cada litro de água da salina, previamente filtrada, foi adicionado 1mL de cada solução.