



**Pós-Graduação em Biotecnologia
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia**

Cíntia Jesus Almeida

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES E O
PERFIL DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM MICROALGAS
SUBMETIDAS À CONDIÇÕES DE ESTRESSE.**

Salvador
2012

CÍNTIA JESUS ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES E O PERFIL
DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM MICROALGAS
SUBMETIDAS À CONDIÇÕES DE ESTRESSE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Suzana Telles da Cunha Lima

Salvador
2012

Ficha catalográfica

A447 Almeida, Cíntia Jesus

Produção de pigmentos carotenóides e o perfil de expressão
protéica em microalgas submetidas à condições de estresse /
Cíntia Jesus Almeida. – Salvador, 2012.

102 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Suzana Telles da Cunha Lima

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Microalgas. 2. Pigmentos. 3. Estresse. I. Lima, Suzana
Telles da Cunha. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 632.952



TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**“PRODUÇÃO DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES E O
PERFIL DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM MICROALGAS
SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE”**

Elaborada por:

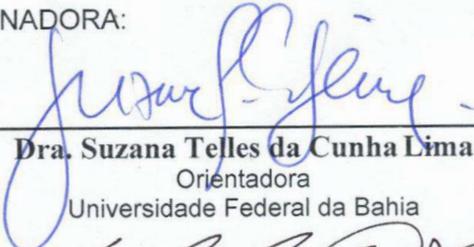
CÍNTIA JESUS ALMEIDA

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Salvador, Bahia, 20 de agosto de 2012.

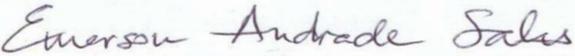
BANCA EXAMINADORA:



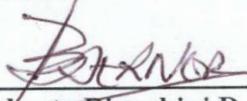
Dra. Suzana Telles da Cunha Lima
Orientadora
Universidade Federal da Bahia



Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha
Examinador Interno
Universidade Federal da Bahia



Dr. Emerson Andrade Sales
Examinador Externo
Universidade Federal da Bahia



Dr. Roberto Bianchini Derner
Examinador Externo
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais, por todo apoio e amor incondicional.
Aos meus irmãos, pelo companheirismo e carinho.
Dedico-lhes com muito amor.

AGRADECIMENTOS

São tantos a agradecer, mas a cada um faço de forma especial diante do grande desafio que foi o mestrado.

Então, agradeço imensamente a DEUS por ter sido minha fonte de perseverança, principalmente nos momentos de fraqueza. Vejo que nessa jornada a entrega e a fé foram os principais motivos para conseguir chegar até aqui.

Cabe também agradecer infinitamente, aos meus pais por todo amor, carinho e incentivo, estando presentes nos momentos de sorrisos e lágrimas. E aos meus irmãos queridos por todo apoio, carinho e orientação. “Aonde quer que eu vá, levo vocês no olhar”.

À Fabrício Rocha por todo amor, carinho e atenção. Obrigada por estar ao meu lado, por ter sorrido junto comigo e enxugado algumas lágrimas que teimaram em escorrer!

À minha querida orientadora, Suzana, que desempenhou muito além do que uma orientação! Obrigada por acreditar em mim, pelo carinho, atenção e paciência. Principalmente, naqueles momentos críticos em que me mostrou sua força, o que incentivou a minha persistência e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus avaliadores da banca examinadora, que não hesitaram em aceitar meu convite. Agradeço por estarem contribuindo para minha formação. Obrigada a todos!

Ao grupo LABEC, pelas suas contribuições na condução do trabalho, principalmente ao coordenador Prof. Emerson por disponibilizar abertamente o laboratório para o desenvolvimento da minha pesquisa. Agradeço também a todas as pesquisadoras do laboratório, especialmente a Louise Lins e Rosana Galvão, por serem companheiras fiéis em muitos os momentos.

À equipe de estudantes de iniciação científica, pesquisadores e professores do LBM. Especialmente a Igor Prado, por ter sido parceiro, me ajudando a enfrentar muitos géis.

À equipe do Teclim – Rede de Tecnologias Limpas da Bahia.

Às equipes dos laboratórios parceiros, que contribuíram no desenvolvimento do trabalho, estando disponíveis para empréstimos e orientações.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, possibilitando a realização da pesquisa.

Aos amigos, por me incentivarem diante das dificuldades e pelos necessários momentos de descontração. Especialmente àqueles amigos que *“são como estrelas: que você nem sempre os vê, mas sabe que sempre estão lá”*.

“...por que é na fraqueza que a força se manifesta. Pois, quando eu me sinto fraco, é então que sou forte”.
(2 Co 11.30)

“Mas o pior não é não conseguir. É desistir de tentar”.
(Trecho da música de Vanessa da Mata)

ALMEIDA, Cíntia Jesus. Produção de pigmentos carotenóides e o perfil de expressão protéica em microalgas submetidas à condições de estresse. 102 f. il. 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

RESUMO

As microalgas podem ser consideradas verdadeiras fábricas fotossintéticas, sendo fontes potenciais de uma vasta gama de bioprodutos. Dentre os produtos de alto valor agregado e de interesse biotecnológico estão os pigmentos carotenóides que são matérias-primas para indústria farmacêutica, de suplementos alimentares e de cosméticos. *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são exemplos de microalgas com grande potencial de síntese de carotenóides como β -caroteno e astaxantina, respectivamente e, quando submetidas a condições estresse acumulam grandes quantidades no interior das células. Neste trabalho essas duas espécies de microalgas foram submetidas às condições de estresse por deficiência de nitrogênio e estresse luminoso, com intuito de avaliar a produção dos pigmentos carotenóides em cada condição, além de conhecer o perfil protéico dessas microalgas a partir de análises de eletroforese, a fim de observar a expressão de proteínas que possam estar relacionadas com a resposta cada tipo estresse. A partir dos resultados, concluiu-se que a privação do nitrogênio no meio de cultura limitou o crescimento das duas microalgas. A microalga *D. salina* atingiu elevadas concentrações celulares quando cultivada em elevada intensidade luminosa. No entanto, o mesmo não foi observado para microalga *H. pluvialis*, onde a exposição contínua a alta luminosidade atuou de forma negativa ao aumento do número de células. Em relação ao conteúdo de beta-caroteno e astaxantina, a luz contribuiu de forma significativa para o aumento da produção dos pigmentos nas microalgas. No entanto, a privação do nitrogênio no meio resultou em um menor número de células, o que pode ter influenciado na produção de pigmentos. Porém, foi observado microscopicamente e visualmente, que a ausência desse elemento possibilitou a produção mais rápida do pigmento nas células, resultando na mudança precoce da cor do cultivo. Avaliando a expressão das proteínas nas microalgas submetidas as condições de estresse, foi observada uma variação de bandas nas diferentes culturas. A presença de bandas em torno de 29 e 45kDa foram comuns as duas microalgas, independente das condições de cultivo. Para a microalga *D. salina* foi destacada a expressão de proteínas em torno de 50, 60, 66, 90 e 95 kDa em ambas condições de estresse. Já para microalga *H. pluvialis* foi observada a presença de bandas de 17 e 20kDa nas condições de estresse. A expressão de determinadas proteínas com diferentes pesos moleculares foram apontadas como possíveis HSPs em resposta da *D. salina* e *H. puvialis* às condições ambientais analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: Condições de estresse; síntese de pigmentos; perfil protéico; *Dunaliella salina*; *Haematococcus pluvialis*.

ALMEIDA, Cíntia Jesus. Production of carotenoid pigments and protein expression profile in microalgae subjected to stress conditions. 102 f. il. 2012. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ABSTRACT

The microalgae can be considered true photosynthetic plants being potential sources of a wide range of bioproducts. Among the products of high added value and biotechnological interest are the carotenoid pigments which are raw materials for pharmaceuticals, food supplements and cosmetics. *Dunaliella salina* and *Haematococcus pluvialis* are examples of microalgae with great potential for synthesis of carotenoids such as β -carotene and astaxanthin, respectively, and when subjected to stress conditions accumulate large amounts inside the cells. In this paper these two microalgae species were subjected to stress conditions by nitrogen deficiency and light stress, in order to evaluate the production of carotenoid pigments in each condition, besides knowing the protein profile of these microalgae from electrophoresis analyzes, the to observe the protein expression that may be related to stress response each type. From the results, it was concluded that the nitrogen deprivation in the culture medium the growth of both limited microalgae. The microalga *D. salina* reached high cell concentrations when grown in high light intensity. However, this was not observed for microalgae *H. pluvialis*, where continuous exposure to high light acted negatively increasing the number of cells. Regarding the content of beta-carotene and astaxanthin, the light contributed significantly to increased production of pigments in microalgae. However, deprivation of nitrogen in the medium resulted in a smaller number of cells, which may have influenced the production of pigments. However, it was observed visually and microscopically, the absence of this element enabled faster production of the pigment cells, resulting in premature color change of cultivation. Assessing the expression of proteins in microalgae undergo stress conditions, we observed a variation of bands in different cultures. The presence of bands around 29 and 45kDa were common both microalgae, regardless of culture conditions. For the microalga *D. salina* was highlighted the expression of proteins of approximately 50, 60, 66, 90 and 95 kDa in both stress conditions. As for microalgae *H. pluvialis* was observed the presence of bands of 17 and 20kDa stress conditions. A expression of certain proteins with different molecular weights were identified as possible HSPs in response *D. salina* and *H. puvialis* environmental conditions analyzed.

KEYWORDS: Terms of stress, synthesis of pigments, protein profile, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Tipos de fotobioreatores utilizados para produção em massa de microalgas	27
Figura 2.2 – Ilustração do processo de captura de CO ₂ em fotobioreatores, utilizando microalgas	28
Figura 2.3- Estrutura química de alguns pigmentos carotenóides encontrados em microalgas	31
Figura 2.4 – Esquema ilustrativo dos estágios da biossíntese de carotenóides e algumas enzimas envolvidas	34
Figura 2.5- Esquema da célula vegetativa da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	36
Figura 4.1 - Ilustração da disposição dos erlenmeyers nas prateleiras de cultivo, com iluminação das lâmpadas fluorescentes	50
Figura 4.2 - Gráficos com o perfil das absorvâncias dos pigmentos extraídos das microalgas pelo método Sedmark e os padrões utilizados	56
Figura 5.1- Gráficos com as curvas de crescimento da microalga <i>Dunaliella salina</i> em diferentes condições de cultivos	61
Figura 5.2 – Gráfico com as taxas instantânea de crescimento (células/ml/dia) da microalga <i>D. salina</i> no controle e nas condições de estresse	62
Figura 5.3- Imagens da <i>D.salina</i> nos ensaios no sexto dia de cultivo	64
Figura 5.4 – Gráficos com as curvas de crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em diferentes condições de cultivos	65
Figura 5.5 - Imagens da <i>H. pluvialis</i> nos ensaios no sexto dia de cultivo	67
Figura 5.6- Gráfico com as taxas instantânea de crescimento (células/ml/dia) da microalga <i>H.pluvialis</i> no controle e nas condições de estresse	68
Figura 5.7 – Imagens obtidas através das análises de eletroforese das proteínas extraídas da <i>D. salina</i>	72
Figura 5.8 – Imagens com os resultados das análises de eletroforese das proteínas extraídas da <i>H. pluvialis</i>	76
Figura 5.9 – Gráficos com as concentrações obtidas de β-caroteno	79
Figura 5.10 – Gráficos com as concentrações obtidas de astaxantina	81
Figura 5.11- Gráfico com as concentrações de β-caroteno obtidas em cada condição de cultivo da <i>H. pluvialis</i>	83

Figura 5.12 – Cromatograma das amostras dos pigmentos extraídos a partir das microalgas 85

Figura 5.13 – Amostras dos pigmentos extraídos das microalgas 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição do meio Conway para cultivo da <i>Dunaliella salina</i>	46
Tabela 3.2 – Composição do Meio Rubic's para cultivo da <i>Haematococcus pluviallis</i>	47
Tabela 3.3 – Composição dos géis de separação e empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviações

DMSO	Dimetilsulfóxido
EDN	Estresse por Deficiência de Nitrogênio
EL	Estresse Luminoso
HSP	do inglês <i>Heat Shock Protein</i> , proteína de choque térmico
sHSP	do inglês <i>small Heat Shock Protein</i> , pequena proteína de choque térmico
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> , solução tampão de fosfato salino
SDS-PAGE	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i> . Dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida.
MAPK	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
PUFAs	do inglês <i>Polyunsaturated fatty acids</i> , ácidos graxos poli-insaturados.
Rf	Fator de retenção
RM	Meio Rudic

Letras gregas

μ	Taxa instantânea de crescimento	[dia ⁻¹]
β	Beta	

Siglas

LABEC	Laboratório de Bioenergia e Catálise
LABIMUNO	Laboratório de Imunologia
LBM	Laboratório de Biologia Molecular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2 .FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 MICROALGAS: UMA BREVE DESCRIÇÃO	23
2.2 CULTIVO DE MICROALGAS NO MUNDO E NO BRASIL	25
2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS	26
2.4 SÍNTESE DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES A PARTIR DE MICROALGAS	30
2.4.1 <i>Dunaliella salina</i> fonte natural de β -caroteno	32
2.4.2 <i>Haematococcus pluvialis</i> e a produção de astaxantina	33
2.5 FATORES INDUTORES DA SÍNTESE DE CAROTENÓIDES	38
2.5.1 Luz	39
2.5.2 Nutrientes	41
2.6 FATORES DE ESTRESSE E A EXPRESÃO DE HSP	42
3. OBJETIVOS	43
3.1 GERAL	44
3.2 ESPECÍFICOS	44
4. METODOLOGIA	45
3.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	46
3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	47
3.2.1 <i>Dunaliella salina</i>	48
3.2.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	49
3.3 CONDIÇÕES INDUTORAS DE ESTRESSE	50
3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS HIDROSOLÚVEIS	51
3.5 ANÁLISES DE ELETROFORESE	52
3.6 EXTRAÇÃO DOS PIGMENTOS	54
3.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	56
3.8 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E TAXA INSTANTÂNEA DE CRESCIMENTO	60

4.1.1 <i>Dunaliella salina</i>	60
4.1.2 <i>Haematococcus pluvialis</i>	65
4.2 ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)	70
4.2.1 Perfil protéico da microalga <i>D.salina</i>	70
4.2.2 Perfil protéico da microalga <i>H. pluvialis</i>	75
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS	79
4.3.1 Produção de β -caroteno a partir da <i>Dunalella salina</i>	79
4.3.1 Produção de astaxantina pela <i>Haematococcus pluvialis</i>	81
4.4 ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	84
5. CONCLUSÃO	86
5.1 Sugestões para trabalhos futuros	89
5.2 Limitações no desenvolvimento do trabalho	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICES	98
ANEXOS	100

As microalgas representam um grupo extremamente diversificado, porém altamente especializado de micro-organismos adaptados a diferentes habitats ecológicos. Essa habilidade de sobreviver e proliferar em um amplo espectro ambiental é, em grande parte, refletida em sua diversidade e na capacidade de modificar o seu metabolismo de forma eficiente em resposta a mudanças no ambiente (HU et al., 2008).

Por realizarem fotossíntese, as microalgas atuam como sistemas de sequestro de CO₂ atmosférico convertendo-o em carboidratos e biomassa, desempenhando um grande papel na cadeia alimentar e sendo os produtores primários de energia. Além disso, a fixação de CO₂ por culturas fotoautotróficas de microalgas tem o potencial de diminuir a liberação de CO₂ para a atmosfera, ajudando a amenizar os problemas do aquecimento global (FIELD *et al.* 1998; ONO e CUELLO, 2005).

Segundo Cohen (1986) e Chisti (2007), o cultivo de microalgas apresenta outras vantagens, tais como: são facilmente cultivadas; são capazes de sobreviver e se proliferar em uma ampla gama de condições ambientais quando comparadas com espécies de vegetais superiores, o que resulta em enorme produtividade; ocupam pequenas áreas de produção e permitem a manipulação das condições de cultivo.

Do ponto de vista biotecnológico, as microalgas são muito ricas em sua composição, podendo conter carboidratos, ácidos graxos, proteínas, pigmentos, vitaminas, entre outras substâncias, o que as tornam fontes potenciais para obtenção de diversos bioprodutos utilizados para alimentação humana e animal, indústrias farmacêuticas, de biocombustíveis e cosméticas (POTVIN; ZHANG, 2010).

Dentre os produtos de alto valor agregado e de interesse biotecnológico estão os pigmentos carotenóides. O cultivo de microalgas como fonte de pigmentos se ampliou após década de 80, tornando-se uma alternativa substancial e viável (LOURENÇO, 2006). Do ponto de vista comercial, os carotenóides e as ficobiliproteínas parecem ser os mais importantes pigmentos produzidos pelas microalgas. Carotenóides são uma classe generalizada de pigmentos lipossolúveis que além de seu papel na coloração, atuam como pró-vitamina A e antioxidantes biológicos, protegendo as células e tecidos dos efeitos nocivos de espécies reativas

de oxigênio (HALLMANN, 2007). Por isso, muitos carotenóides são utilizados como matéria-prima na indústria farmacêutica, de suplementos alimentares e de cosméticos.

Carotenóides produzidos naturalmente por microalgas compreendem apenas uma fração do mercado mundial, isso devido ao predomínio de formas sintéticas. No entanto, dois fatores vêm sustentando a continuidade da produção de carotenóides por microalgas: o primeiro está relacionado as propriedades das moléculas nativas, uma vez que tratando-se do β -caroteno, isômeros *cis* e *trans* podem ser produzidos naturalmente e a presença dos mesmos pode acarretar em maior atividade biológica. Já sinteticamente, apenas a forma *trans* da molécula é possível (LOURENÇO, 2006). O outro fator é o grande interesse mundial no consumo de produtos naturais o que tem alavancado a abertura de empresas em vários países

Carotenóides. Os carotenóides são hidrocarbonetos conhecidos como carotenos, enquanto que derivados oxigenados desses hidrocarbonetos são conhecidos como xantofilas. A mais proeminente das xantofilas é a astaxantina, que pode ser extraída a partir da microalga verde *Haematococcus pluvialis* (HALLMANN, 2007). O β -caroteno e outros carotenóides também são produzidos em larga escala pela *Dunaliella salina*. Grandes instalações de produção comercial nos EUA e Israel já processam a biomassa da *Dunaliella salina* como fonte de β -caroteno (SPOLAORE *et al*, 2006).

Para sintetizarem grandes quantidades de pigmentos carotenóides as microalgas são induzidas por fatores que estimulem a carotenogênese. Então, quando submetidas a condições ambientais adversas para seu crescimento, produzem esses pigmentos levando ao acúmulo em grande quantidade no interior das células (HENRIQUES *et al*, 1998).

Nessas condições, a microalga *Dunaliella salina* pode ser fortemente estimulada podendo exibir coloração amarela progressivamente mais intensa devido à grande síntese do β -caroteno, podendo compor 14% do peso seco. Já as células da *Hematococcus pluvialis* assumem a coloração avermelhada, com formação de cistos densos e sem flagelos, com amplo acúmulo de astaxantina (LOURENÇO, 2006).

Conhecer o perfil protéico dessas microalgas em condições de estresse é necessário, uma vez que elas têm sido amplamente utilizadas na engenharia de produção na biossíntese de diversos pigmentos naturais (TRAN *et al*, 2009). No entanto, a compreensão de como cada fator de estresse pode modificar a expressão proteica é um fator chave, ainda pouco estudado. Utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é possível conhecer o perfil das proteínas expressas em microalgas quando submetidas a determinadas condições ambientais adversas, como também indicar proteínas alvos envolvidas na resposta a cada tipo de estresse. Além disso, é importante conhecer como cada fator de estresse pode atuar na produção dos carotenóides presentes nas microalgas *D. salina* e *H.pluvialis*, uma vez que as condições de cultivo podem interferir na produção e na composição dos pigmentos, como observado por Yuan e Chen (1998).

Neste contexto, buscou-se determinar de forma quantitativa e qualitativa a produção de pigmentos em duas espécies de microalgas, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, submetidas ao estresse pela falta de nitrogênio e alta luminosidade, assim como identificar proteínas que possam estar envolvidas em cada uma dessas condições.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MICROALGAS: UMA BREVE DESCRIÇÃO

As microalgas pertencem a um grupo bastante heterogêneo de organismos (OLAIZOLA, 2003), sendo os primeiros a crescerem e se proliferarem nos oceanos a mais de 3 bilhões de anos atrás, quando o ambiente da Terra era formado. Também chamados de fitoplactons, as microalgas possuem clorofila *a* e através do mecanismo da fotossíntese imobilizam o dióxido de carbono atmosférico na presença de luz, convertendo a energia solar em energia química, produzindo compostos orgânicos e oxigênio (SUMI, 2009; HARUN et al., 2010)

As microalgas podem ser consideradas fábricas fotossintéticas celulares (METTING; PYNE, 1986), sendo descritas como plantas "inferiores" que não possuem caules verdadeiros, raízes e folhas, mas que desempenham um grande papel na cadeia alimentar. São os produtores primários de energia responsáveis pela produção primária líquida de aproximadamente 52 milhões de toneladas de carbono orgânico por ano, que corresponde a pelo menos 50% do total de carbono orgânico produzido na terra a cada ano (FIELD *et al*, 1998).

A quantidade exata de espécies ainda é desconhecida, porém estima-se que haja cerca de 100.000 microalgas diferentes distribuídas em todo o mundo, vivendo não somente nos oceanos, como também podendo ser encontradas em águas doces e na superfície de todos os tipos de solos (SUMI, 2009; TOMASELLI, 2004a). Estas são capazes de sobreviver em outros tipos de habitat, os quais podem ser bastante extremos, tais como ambientes hipersalinos, de baixa temperatura ou águas ácidas. Assim, constituem um grupo altamente diversificado de espécies podendo encontrar um amplo espectro de fenótipos diferentes: indivíduos unicelulares, coloniais ou filamentosos, sendo a maioria geralmente de vida livre e algumas espécies simbióticas (HALLMANN, 2007; TOMASELLI, 2004b).

As microalgas são separadas em grandes grupos de acordo com as características citológicas, morfológicas, químicas e reprodutivas. Os microrganismos eucarióticos autótrofos são geralmente divididos de acordo com o tipo de luz refletida por seu aparato fotossintético: Rhodophyta (algas vermelhas), Chrysophyceae (algas douradas), Phaeophyceae (algas castanhas) e Chlorophyta (algas verdes). Seu aparato fotossintético é organizado nos cloroplastos, que contêm camadas alternadas de membranas de lipoproteínas (tilacóides) e a fase

aquosa, o estroma (MASOJÍDEK *et al*, 2004). Os sistemas atuais de classificação consideram além dos tipos de pigmentos, outros critérios como produtos naturais estocados e os constituintes da parede celular (LOURENÇO, 2006; TOMASELLI, 2004).

Dentro desse contexto destaca-se a Divisão Chlorophyta, grupo considerado mais diversificado, que compreende as algas verdes, englobando uma série de organismos com variações morfológicas indo das formas microscópicas às macroscópicas. Esses organismos são dotados de pelo menos um plasto fotosintetizante, variando o número e a forma de acordo com as espécies. Possuem pigmentos de clorofila *a*, *b*, e carotenóides encontrados nos cloroplastos. De forma exclusiva nas algas verdes o amido é produzido dentro dos cloroplastos como substância de reserva, assim como nas plantas. Em geral as clorófitas são providas de paredes celulares rígidas constituídas, em alguns gêneros, por uma estrutura fibrilar de polissacarídeos tais como celulose e inserida em uma matriz não fibrilar de hemicelulose e substâncias pécticas incorporadas à celulose (RAVEN, 1996).

As características do aparato flagelar constituem importantes marcadores filogenéticos para distribuição dos grupos que compõem as Chlorophyta. Algumas são células vegetativas flageladas, enquanto outras apresentam essa estrutura apenas nas células reprodutivas. Existe uma grande variedade de padrões e detalhes nos ciclos sexuais das algas verdes, a reprodução vegetativa ocorre através de divisão celular simples, comum entre algas. Outros tipos de reprodução assexuada ocorrem pela fragmentação e pela produção de esporos, nomeados zoósporos se flagelados e aplanósporos os não flagelados. A reprodução sexual não é uma característica universal nas algas, embora ocorra no ciclo de vida da maioria das espécies, onde ocorre a combinação de gametas havendo muitas vezes a diferenciação na morfologia e na dimensão (isogamia, anisogamia e oogamia), a partir de dois organismos da mesma espécie. Nos indivíduos unicelulares ocorrem duas divisões mitóticas que resultam na formação de quatro gametas haplóides que são as células vegetativas. Os gametas das clorófitas são células especializadas (LEE, 1999 *apud* LOURENÇO, 2006, p.125), cujo pareamento, fusão e a cariogamia resultam na formação de um zigoto diplóide, que se divide por meiose gerando células haplóides vegetativas (RAVEN, 1996); TOMASELLI, 2004; LOURENÇO, 2006).

Diante da enorme variabilidade morfológica, reprodutiva e no modo de vida das microalgas, não somente da Divisão Chlorophyta, tem sido despertado um notável interesse na área da pesquisa, buscando novas descobertas e vastas aplicações com importância econômica, tornando as microalgas organismos promissores em cultivos de larga escala para produção industrial.

2.2 CULTIVO DE MICROALGAS NO MUNDO E NO BRASIL

A utilização dos benefícios provenientes das microalgas não é um fato novo. Espécies de algas verde-azuladas (cianofíceas) têm sido utilizadas como um alimento rico em nutrientes por muitos séculos na Ásia, África e México (OLAIZOLA, 2003; RAVEN, 1996; SPOLAORE et al., 2006a). Os primeiros registros históricos que indicam a utilização de microalgas por humanos foram feitos pelas civilizações chinesas que usaram o gênero *Nostoc* como fonte alternativa de alimento há 2000 anos (SPOLAORE et al., 2006b).

No entanto, o cultivo em larga escala de microalgas apenas começou após a Segunda Guerra Mundial, quando os Estados Unidos, Japão e Alemanha enfrentaram escassez de alimentos, sendo forçados a considerar fontes alternativas de proteína para o aumento da demanda populacional (POTVIN e ZHANG, 2010). De acordo com Lourenço (2006), o cultivo de altas densidades e volumes de microalgas começou a ser realizado no ano de 1940, por meio de experimentos conduzidos de forma independente nestes três países e praticamente todos os estudos de produção de microalgas envolviam o cultivo do gênero *Chlorella*.

A cultura em escala comercial de biomassa microalgal iniciou-se no Japão na década de 60, onde empregava-se o cultivo de *Chlorella*. Em 1970 surgiram os primeiros campos de aquacultura (BOROWITZKA, 1999; PULZ e SCHEIBENBOGEN, 1998). Nos anos 80, já existiam 46 grandes fábricas na Ásia que produziam mais de 1.000 kg de microalgas/ por mês, principalmente *Chlorella*, seguido da produção comercial de *Dunaliella salina*, como fonte de β -caroteno, tornando a Ásia o terceiro maior polo industrial na produção de microalgas em 1986. Logo após, outras plantas de cultivo comercial foram sendo instaladas em Israel e nos EUA e ultimamente, várias plantas foram instaladas para produção da microalga

Haematococcus pluvialis como uma fonte de astaxantina nos EUA e na Índia (PULZ; GROSS, 2004).

Lourenço (2006), relata que as atividades de cultivo de microalgas no Brasil começaram a ser desenvolvidas apenas quando, em nível internacional, já havia uma grande diversificação dos estudos e aplicações biotecnológicas em vários países. Os primeiros estudos foram realizados na década de 70, na Universidade Federal de São Paulo, onde também foi iniciada a criação das primeiras coleções de microalgas marinhas. Somente a partir dos anos 80, o cultivo de microalgas começou a se difundir para outros estados do país, envolvendo pesquisadores e universidades. Nos últimos 15 anos tem sido mais notável a participação brasileira no cenário internacional, com trabalhos envolvendo diferentes especialidades referentes ao cultivo de microalgas.

Atualmente, muitos estudos estão sendo realizados buscando-se melhores soluções para o cultivo de microalgas, integrando desde melhores condições de cultivo em termos nutricionais até a busca do aperfeiçoamento no design de sistemas de cultivo que promovam maior produtividade de biomassa. Na Figura 2.1 são representados alguns sistemas de produção de biomassa microalgal.

2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS

As microalgas naturalmente já desempenham um papel de grande importância na natureza, pois como produtores primários possuem uma elevada participação no balanço global da fotossíntese. Assim, segundo Ono e Cuello (2005) a fixação de CO₂ por culturas fotoautotróficas de microalgas tem o potencial de diminuir a liberação de CO₂ para a atmosfera, ajudando a amenizar os problemas relacionados com aquecimento global.

Da mesma forma, Kurano e colaboradores (1995) afirmam que o cultivo em larga escala de microalgas surge como uma alternativa para reduzir os níveis atmosféricos de CO₂, pois possuem rápido crescimento e podem ser cultivadas de maneira intensiva, podendo representar uma contribuição para diminuição do “efeito estufa”.

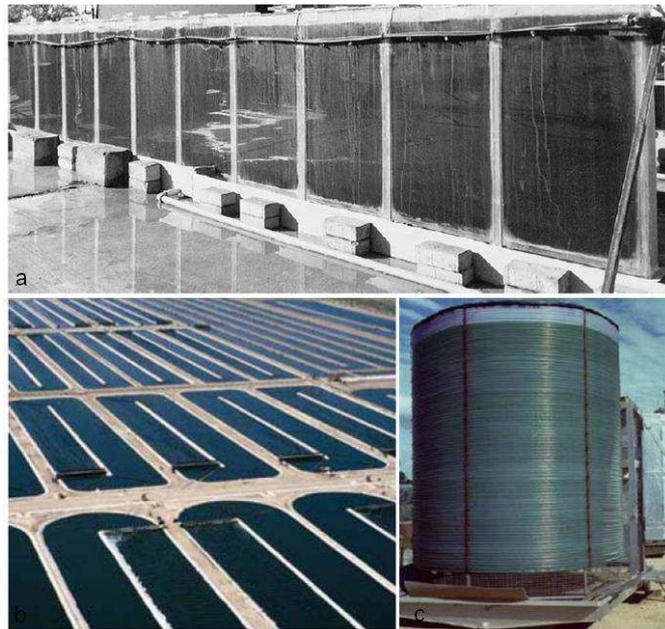


Figura 2.1- Em a) Fotobioreator tipo placa plana de vidro, produção em massa de *Nannochloropsis sp* (Fonte: CHENG-WU *et al*, 2001); b) Produção de *Spirulina* em raceway (Fonte: BENEMANN, 2008); c) Fotobioreator tubular helicoidal (Fonte: CHISTI, 2007).

Em sua composição básica, a biomassa de algas é rica em lipídios, carboidratos e proteínas o que determina seu valor econômico global. Aliadas a essas características naturais, juntamente com a facilidade no cultivo, as microalgas se tornaram objeto de pesquisa nas mais modernas áreas de investigação, como na biotecnologia e no melhoramento genético.

Para Henriques (1998), a utilização biotecnológica das microalgas obedece ao pressuposto de usufruir da sua capacidade fotossintética com objetivo de produzir biomassa que pode ser usada como fonte alimentar, energética ou para produção de compostos químicos. Assim como qualquer outro microrganismo, as microalgas reagem a variações do meio externo com alterações metabólicas internas, o que permite a manipulação das condições de cultivo para que estimule a biossíntese de compostos que vai de enzimas a fármacos e até alguns produtos de elevado valor comercial. Na Figura 2.2 são apresentadas as diferentes aplicações para o uso da biomassa microalgal.

Atualmente, toneladas de algas são destinadas a cada ano para as indústrias biotecnológicas com diferentes fins. A biomassa microalgal ainda é muito usada principalmente para a alimentação de animais e como suplemento nutricional para consumo humano, devido às suas diferentes propriedades químicas, alto conteúdo de proteínas, de vitaminas e valor nutritivo (POTVIN; ZHANG, 2010).

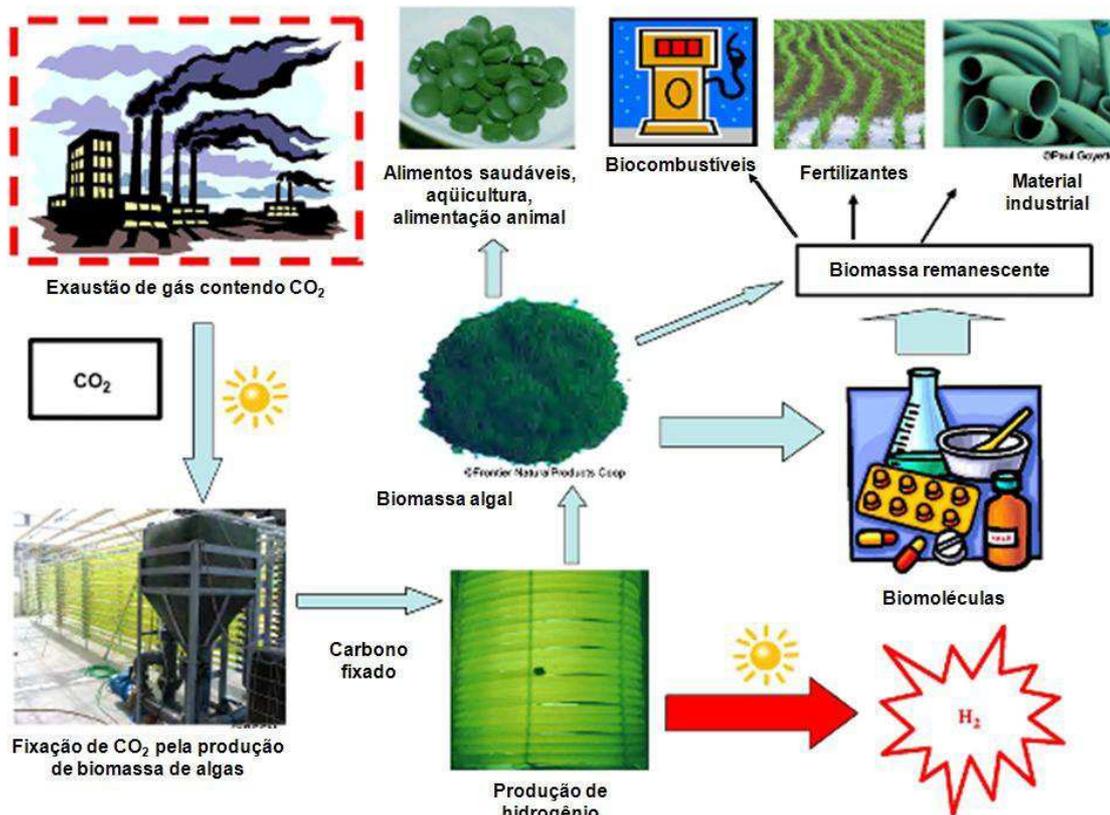


Figura 2.2 – Ilustração do processo de captura de CO₂ em fotobioreatores, utilizando microalgas (Fonte: Adaptado de (Skjånes, 2007))

Microalgas destinadas para nutrição humana são comercializadas em diferentes formas, tais como comprimidos, cápsulas e líquidos, sendo o mercado liderado por produtos contendo os gêneros *Chlorella* e *Spirulina* (PULZ; GROSS, 2004). Muitos estudos apontam que a biomassa de microalgas pode ser incorporada na alimentação para uma grande variedade de animais, sendo que 30% da produção mundial de algas é destinada para a alimentação animal, prevalecendo a produção e a utilização da microalga *Spirulina* (BECKER, 2004).

A importância das microalgas na aquicultura não é surpreendente, uma vez que são também fontes naturais de alimentos para moluscos, camarões e algumas espécies de peixes, como o salmão (HALLMANN, 2007). As principais aplicações de microalgas na aquicultura estão associadas com a nutrição, utilizada como

componente único ou como aditivo alimentar básico de nutrientes, de forma fresca (SPOLAORE et al., 2006).

Atualmente, o valor potencial das microalgas para produzir biocombustíveis é amplamente reconhecido. O interesse em microalgas para a produção de óleo é devido ao elevado teor de lipídios de algumas espécies, tornando-se um alvo considerável para a indústria de biodiesel (RODOLFI *et al.*, 2009a; WILLIAMS e LAURENS, 2010). Sob condições ambientais desfavoráveis ou sob algum tipo de estresse, muitas microalgas são capazes de alterar sua via de biosíntese de lipídios direcionando-a para a formação e acúmulo de lipídios neutros, principalmente de triacilgliceróis, os quais são os melhores substratos para produzir biodiesel (HU *et al.*, 2008). Outras microalgas têm sido avaliadas para conversão da biomassa em metano ou etanol através da fermentação anaeróbica. Além disso, a biomassa residual após a extração do óleo pode ser utilizada para produzir fertilizantes e corretivos para solos, especialmente para horticultura (HALLMANN, 2007; RODOLFI *et al.*, 2009b).

As algas oferecem um reservatório inexplorado de valiosos compostos químicos e farmacêuticos. Atualmente, muitas pesquisas são direcionadas principalmente para utilização bioprodutos oriundos de microalgas como ácidos graxos, pigmentos, vitaminas e outros compostos bioativos.

Uma grande importância tem sido dada ao suprimento das fontes de ácidos graxos poli-insaturados. Isto ocorre devido ao acentuado aparecimento de uma série de doenças relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como a sua reconhecida significância terapêutica, especialmente àqueles da família Ômega-3 e Ômega-6 (DERNER *et al.*, 2006; SIMOPOULOS, 2002). Becker (2004) afirma que em algumas espécies os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais, tornando essas espécies alvos muito promissores no ramo da biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais.

Além disso, as microalgas também representam uma valiosa fonte de quase todas as vitaminas essenciais como, A, do complexo B, C, E, ácido fólico, entre outras (BECKER, 2004). Em trabalho realizado por Brown e colaboradores (1999), foi sugerido que as microalgas podem fornecer níveis adequados de vitaminas para as cadeias alimentares na aquicultura.

Na área da farmacologia alguns trabalhos já estão sendo desenvolvidos utilizando extratos de cianobactérias para serem usados como imuno-moduladores em produtos farmacêuticos (PULZ; GROSS, 2004).

2.4 SÍNTESE DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES A PARTIR DE MICROALGAS.

As microalgas não possuem apenas as clorofilas que conferem a muitas espécies a coloração verde, mas também os pigmentos carotenóides que permitem que algumas espécies de microalgas possuam diferentes tonalidades variando entre o vermelho, laranja e amarelo. Dentre as classes de pigmentos produzidos em algas estão as clorofilas, ficobilinas e carotenóides, estes últimos mais explorados comercialmente (LOURENÇO, 2006; HALLMANN, 2007).

Os carotenóides representam um grande grupo de cromóforos biológicos, existindo cerca de 400 conhecidos na natureza. Pertencem a uma classe de pigmentos lipofílicos e solúveis em solventes orgânicos, cuja estrutura é composta por uma cadeia de polieno - 40 carbonos, associada com grupos cíclicos (anéis), como mostrado na Figura 2.3. Assim, os carotenóides são divididos em: carotenos, que são hidrocarbonetos como o α -caroteno e β -caroteno; xantofilas, que são derivados oxigenados desses hidrocarbonetos que possuem o oxigênio presente como grupos-OH (por exemplo, a luteína), como oxi-grupos (por exemplo, cantaxantina) ou como uma combinação de ambos (por exemplo, astaxantina) (GUEDES, 2011; HALLMANN, 2007; MASOJÍDEK *et al*, 2004).

Na maioria das microalgas verdes, os carotenos e as xantofilas são sintetizadas dentro de plastídeos, onde se acumulam. Por outro lado, algumas xantofilas, como exemplo da astaxantina no gênero *Haematococcus*, se acumulam no citoplasma, o que levanta a possibilidade de haver um sítio de biossíntese extra-plastídica de carotenóides. Alternativamente a essa consideração, essas xantofilas sintetizadas no cloroplasto podem ser exportadas e, conseqüentemente, se acumularem no citoplasma justificando assim a sua presença em todos os compartimentos celulares (JIN *et al.*, 2003; RABBANI *et al.*, 1998).

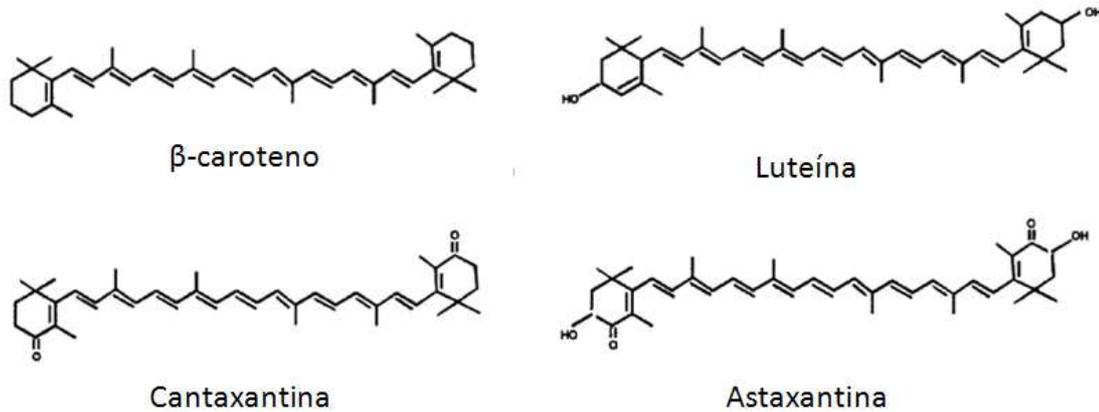


Figura 2.3- Estrutura química de alguns pigmentos carotenóides encontrados em microalgas (Fonte: Adaptado de JIN *et al*, 2003).

Os carotenóides desempenham funções importantes nas microalgas, atuando como pigmentos acessórios possibilitando o aumento da captação de luz a ser transferida para excitação da Chl *a*. Também contribuem para estabilização da estrutura e ajuda no funcionamento dos complexos fotossintéticos, desempenhando um papel de filtro que protege os fotossistemas quando há excesso de luz. Possuem além disso, a atividade intrínseca como antioxidante, o que constitui a base para sua ação protetora contra o estresse oxidativo, sendo capazes de inativar os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (MASOJÍDEK *et al*, 2004; LOURENÇO, 2006; GUEDES *et al*, 2011).

Do ponto de vista biotecnológico, carotenóides como o β-caroteno e astaxantina, se destacam no uso comercial. O crescente interesse industrial por esses pigmentos pode ser explicado por que além de serem bastante utilizados como corantes naturais em alimentos e como aditivo alimentar para homem e animais, também desempenham propriedades terapêuticas e nutricionais, pois atuam como provitamina A e como antioxidantes biológicos. Além disso, têm sido encontrados indícios de que essas moléculas possam a função de quimiopreventivos terapêuticos com efeito anticancerígeno (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2005; GOUVEIA e EMPIS, 2003; HALLMAM, 2007; SPOLAORE *et al.* 2006).

Vale ressaltar também o crescente interesse no uso dos carotenóides em produtos farmacêuticos e em cosméticos. Como são componentes antioxidantes de uma fonte natural, a sua aplicação em cosméticos está se desenvolvendo rápido, especialmente para cosméticos que possam oferecer proteção contra os efeitos do

sol, em combinação com outras substâncias antioxidantes ou bioativas a partir de microalgas, representando uma área de alta demanda. Em aplicações farmacêuticas, propriedades antiinflamatórias são atribuídas aos carotenóides, podendo servir como alternativa na terapia contra determinados tipos de doenças inflamatórias (PULZ; GROSS, 2004).

Entretanto, os carotenóides oriundos de microalgas (natural) representam uma pequena fração no mercado mundial, existindo a prevalência das formas sintéticas. Este fato está relacionado com o domínio do processo de produção que eleva ainda o custo final dos produtos. Embora as formas sintéticas sejam muito menos dispendiosas do que as naturais, carotenóides de microalgas têm a vantagem de fornecer tipos de isômeros na sua razão natural (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2005; GUERIN *et al*, 2003). No que diz respeito às propriedades diferenciadas dos isômeros produzidos, no caso do β -caroteno, os isômeros naturais são considerados superiores a forma *trans* sintética (SPOLAORE *et al* 2006; SINGH, 2005). O β -caroteno natural ainda é preferido pelo mercado no ramo da saúde porque é uma mistura dos isômeros *trans* e *cis*, mistura que dificilmente pode ser obtida através da produção sintética e, além disso, acredita-se que a presença dos dois isômeros na substância natural acarrete em uma atividade biológica mais acentuada e que os isômeros *cis* possuam características antineoplásicas (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 2002).

Sendo assim, os compostos naturais são fontes constantes de novos produtos e drogas, oferecendo uma diversidade de moléculas que estão sub-representadas em compostos sintéticos.

2.4.1 *Dunaliella salina* fonte natural de β -caroteno

O gênero *Dunaliella* pertence ao grupo das Chlorophyta, estando na classe *Chlorophyceae*, sendo caracterizado por microrganismos unicelulares móveis, biflagelados e de forma celular ovóide (geralmente na forma de uma pêra), com o lado basal da célula mais largo e estreito na parte superior, onde se localizam os flagelos. As células de *Dunaliella* carecem de uma rígida parede celular polissacarídica e estão envolvidas por uma membrana fina e elástica. A falta de uma parede celular rígida permite às células rápidas mudanças de volume, em resposta a alterações na pressão osmótica extracelular. O gênero *Dunaliella* pode ser

encontrado em diferentes habitats marinhos desde que predomine nos corpos d'água concentrações muito elevadas de sal e altos níveis de magnésio (BEN-AMOTZ, 2004).

Este gênero halotolerante, sob concentrações extremas de sal acima da saturação, perde seus flagelos e as mucosas circundantes, tornando-se células redondas com a formação de uma parede espessa, tornando-se um cisto resistente a desidratação, associada com a produção de glicerol. A concentração intracelular de glicerol é diretamente proporcional à concentração de sal extracelular, que funciona como uma substância osmoreguladora equilibrando a microalga com o meio externo, sendo suficiente para suprimir todas as necessidades citoplasmáticas (KATZ *et al.*, 2007).

A microalga *Dunaliella salina* não é somente capaz de crescer em concentrações muito elevadas de sal, mas também de acumular níveis extremamente altos de β -caroteno. Segundo Metting (1996), *D. salina* é considerado o organismo mais adequado para a produção em massa de β -caroteno, uma vez que pode produzir deste pigmento até 14% do seu peso seco.

Em condições normais a microalga é estimulada a crescer, apresentando a coloração tipicamente verde. A síntese de β -caroteno aumenta com a desestabilização das condições fisiológicas das células criadas por algum tipo de estresse. Com as alterações no balanço fisiológico, há a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio e, nessas condições a carotenogênese é fortemente estimulada. Assim para se proteger e continuar crescendo, as células são destinadas a gerar quantidades adicionais de β -caroteno, levando ao predomínio da coloração alaranjada progressivamente mais intensa (BOUSSIBA *et al.*, 1992; PISAL e LELE, 2005).

O β -caroteno produzido na *Dunaliella* se acumula dentro de distintos glóbulos lipídicos nos espaços intertilacoidiais, sendo composto principalmente de dois estereoisômeros *trans* e *cis*. A via biossintética de carotenóides é a mesma encontrada em outros organismos eucarióticos e nas plantas, com os mesmos substratos e produtos intermediários (Figura 2.4). No entanto, a reação de isomerização biológica que eventualmente produz 9-*cis* β -caroteno em *Dunaliella*, ainda não é identificada (EBENEZER e PATTENDEN, 1993).

A espécie *D. salina* pode ser cultivada em taques abertos em virtude da sua capacidade de crescer em ambientes de salinidade extrema, o que diminui os níveis de contaminação com outras microalgas e por também ser tolerante a grande amplitude de temperaturas. Além disso, alguns autores ainda consideram as seguintes vantagens em relação a *D. salina*: a ruptura das células é mais fácil do que em outras algas por que a natureza da parede é mais simples; facilidade de cultivo em laboratório e crescimento relativamente rápido; resistência a diversas condições ambientais é maior do que em outras algas.



Figura 2.4 – Esquema ilustrativo dos estágios da biossíntese de carotenóides e algumas enzimas envolvidas. (Fonte: Adaptado de HENRIQUES *et al.*, 1998; VALDUGA, 2009)

Por essas características raras a outros microrganismos, o cultivo extensivo da *D. salina* é crescente, já existindo plantas operacionais com várias unidades de produção industrial em Israel, EUA, China e Austrália, sendo que nesta última encontra-se o maior produtor desta estirpe no mundo, a Cognis Nutrition and Health (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2005). São comercializados produtos que derivam de *D. salina* em forma de extratos de β -caroteno, em pó para uso humano e a biomassa seca destinada à alimentação animal. Os preços desses produtos nos EUA variam de US\$ 300 a 3000/kg, de acordo com as especificações e da demanda (BEN-AMOTZ, 2004).

Neste contexto, a produção da microalga halotolerante *Dunaliella salina* tem sido muito explorada e estabelecida em muitos países. E com os avanços da biotecnologia nos últimos anos, a produção de biocompostos como o β -caroteno tem sido bastante visada, o que faz desta microalga um alvo para uma ampla gama de aplicações e para produção em larga escala do pigmento.

2.4.2 *Haematococcus pluvialis* e a produção de astaxantina

A espécie *Haematococcus pluvialis* também pertence a classe *Chlorophyceae*, porém na ordem *Volvocales*. A espécie caracteriza-se por microalgas verdes de água doce, cujo habitat natural característico são pequenas piscinas temporárias com água fresca, periodicamente preenchidas com água da chuva, sendo pouco tolerantes a altas salinidades. Ocasionalmente, *H. pluvialis* aparece em grande quantidade em rios ou às margens de lagos, quando a seca expõe grandes áreas de rochas (GHIGGI, 2007).

Trata-se de microalgas unicelulares com células ovóides ativamente móveis por dois flagelos localizados na região apical. Durante seus estágios de crescimento, ambas as formas móveis e não-móveis (ou cistos) podem ocorrer. A estrutura celular é em forma de pêra, contendo um cloroplasto parietal com formato de taça, com numerosos pirenóides dispersos e vacúolos contráteis. A particularidade da célula é marcada por sua parede celular, que é fortemente espessada, estando normalmente ligada ao protoplasto por fios protoplasmáticos. Na sua forma não-móvel a estrutura celular é a mesma que na sua forma vegetativa, diferindo apenas os protoplastos esféricos envolvidos dentro de uma membrana estreitamente aderente e a ausência dos flagelos (TOMASELLI, 2004).

Uma vez que as condições de cultivo se tornam desfavoráveis, há um aumento drástico do volume celular em conjunto com a síntese de paredes de celulose mais espessas e resistentes e a perda dos flagelos. Este processo geralmente é denominado encistamento. Na forma de cistos, ocorre uma mudança de pigmentação de verde para vermelho-alaranjado, devido ao aumento da deposição de astaxantina fora do cloroplasto, Figura 2.5 (BOUSSIBA, 2000; LEE e DING, 1994).

A microalga *Haematococcus pluvialis* há tempos tem despertado interesse considerável devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades do pigmento

astaxantina, muito utilizado comercialmente. A astaxantina pertence ao grupo dos derivados de carotenos oxigenados, denominados de xantofilas. De acordo com Guerin e colaboradores (2003), acredita-se que a microalga *Haematococcus pluvialis* acumula os mais altos níveis de astaxantina na natureza, sendo a mais rica fonte natural do pigmento. O interesse crescente nesta alga como uma fonte alternativa para este pigmento vermelho, gerou vários projetos de pesquisa para a otimização e caracterização das suas condições de crescimento, como também para o acúmulo da astaxantina (OROSA et al., 2001).

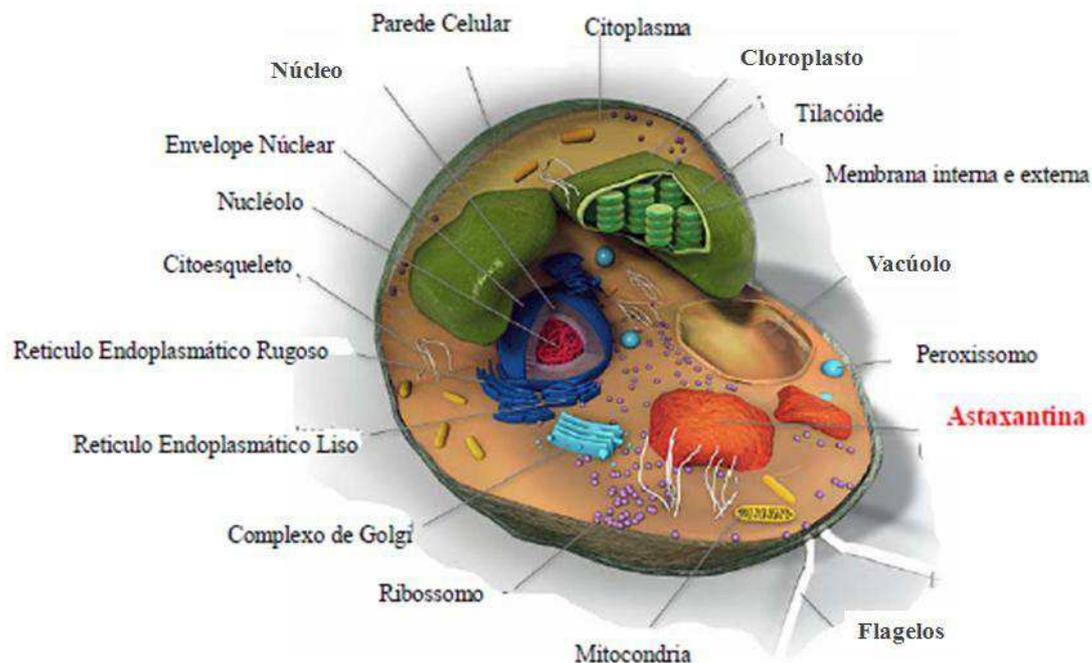


Figura 2.5- Esquema da célula vegetativa da microalga *Haematococcus pluvialis* (Fonte: Adaptado de LGPM, 2012).

A astaxantina é o pigmento carotenóide principalmente encontrado em animais aquáticos e está presente em muitos frutos do mar, incluindo salmão, truta, camarão, ovos de lagostas e peixes, conferindo-lhes a cor característica da carapaça, pele e carne (SEABRA e PEDROSA, 2010), estando também presente em aves, tais como flamingos e codornas. Este pigmento carotenóide representa um produto valioso não só como um agente de coloração para peixes e crustáceos na aquicultura, mas uma vez que é um antioxidante natural potente pode ter também importantes aplicações na indústria nutracêutica, cosmética e na medicina (PALOZZA e KRINSKY, 1992).

A astaxantina é um agente de coloração forte e com grande potencial antioxidante. Nos animais aquáticos onde pode ser encontrada, a astaxantina tem várias funções biológicas essenciais, incluindo proteção contra a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados essenciais, proteção contra os efeitos de luz UV, participa na resposta imune, pigmentação, comunicação e até mesmo no comportamento reprodutivo (LORENZ e CYSEWSKI, 2000)

Na utilização humana os benefícios não são diferentes, a astaxantina é considerada uma boa proteção para os fosfolípidios membranosos e outros lipídios contra a peroxidação, evitando a reação em cadeia de produção de espécies reativas de oxigênio, iniciada pela degradação de ácidos graxos poli-insaturados, que podem dramaticamente acelerar a degradação das membranas lipídicas (NAGUIB, 2000; PALOZZA e KRINSKY, 1992). Ainda de acordo com alguns pesquisadores, a astaxantina pode ser significativamente mais eficaz que o β -caroteno e luteína na prevenção da fotooxidação de lipídios pela luz UV, uma vez que os carotenóides têm um papel importante na proteção dos tecidos diretamente expostos à luz solar. Segundo Okai e Higashi-Okai (1996), também já foram apontadas propriedades imunomoduladoras para astaxantina desempenhando papel nas atividades de proliferação celular. Alguns estudos sobre as células do sangue humano também têm demonstrado o papel da astaxantina com um reforço na produção de imunoglobulinas em resposta a estímulos de células T-dependentes, *in vitro* (JYONOUCHI et al., 1995). Paralelo à isso foram atribuídas outras funções relacionadas com a saúde do coração, da pele e dos olhos, propriedades anti-câncer e em doenças neurodegenerativas, como descritas por Guerin e colaboradores (2003).

A produção de astaxantina pela *H. Pluvialis* pode ser estimulada pelo cultivo, alcançando uma concentração de pigmentos nas células em torno de 1,5% a 3% do peso seco (SPOLAORE *et al*, 2006). Logo, a astaxantina é o segundo mais importante carotenóide extraído a partir de microalgas, fato que têm impulsionado o cultivo da *H. pluvialis* em escala industrial. Desde o final da década de 90, várias áreas de produção foram instaladas nos EUA, na Índia, em Israel e em outros países. No entanto, hoje os maiores produtores de astaxantina, não apenas a partir da *Haematococcus*, mas também através da síntese química é a Alemanha (BASF) e a Suíça (Hoffman-La Roche) (OLAIZOLA, 2003).

O principal mercado para a utilização da astaxantina é na aquicultura, como um aditivo alimentar para pigmentação, tendo hoje como maior consumidor a indústria de ração de salmão. O valor médio desse pigmento no mercado é de US\$ 2500/kg (HEJAZI e WIJFFELS, 2004; LORENZ e CYSEWSKI, 2000). No entanto, em razão do alto preço, a astaxantina produzida naturalmente pela *H. pluvialis* não tem como competir por nenhum mercado com o produto sintético, porém em algumas aplicações específicas a astaxantina natural é preferida e, além disso o consumidor final torna-se cada vez mais exigente, passando a optar pelo uso de ingredientes fontes de naturais (GUERIN et al., 2003). Segundo Olaizola (2003), essa opção no geral ainda é pouco consciente, pois o público não está disposto a pagar um preço mais elevado para salmão naturalmente pigmentado. A maioria dos consumidores provavelmente não percebem que a maior parte do salmão consumido hoje é alimentado com a forma sintética do pigmento. Enquanto houver pouca divulgação e desinformação dos consumidores haverá pouca demanda pela astaxantina natural.

Uma vez viável economicamente, a partir do cultivo da microalga *H. pluvialis* será possível reduzir ainda mais os custos na produção da astaxantina, somado a maior sensibilização para o consumo de produtos naturais pelos consumidores finais. Por outro lado, pode-se contar com o mercado das indústrias farmacêutica e cosmética que tem tendência de aquecimento, o que aumentaria a demanda por astaxantina natural, esta muito valorizada ultimamente por sua capacidade como antioxidante e às propriedades terapêuticas atribuídas.

2.5 FATORES INDUTORES DA SÍNTESE DE CAROTENÓIDES

O interesse nesse grupo de organismos fotossintéticos encontra-se no potencial uso da biomassa para produção de bioprodutos utilizando energia solar (TORMASELLI, 2004). Para isto, muitas vezes é necessário que haja manipulação nas condições de cultivo para que possa induzir a síntese e o acúmulo dos compostos de interesse. Neste sentido, alguns fatores como a intensidade luminosa, a temperatura, pH, composição química do meio de cultura e a disponibilidade de nutrientes podem mudar o perfil metabólico da microalga a ser cultivada.

Assim, a produção de alguns compostos de interesse comercial, como pigmentos carotenóides e ácidos graxos poli-insaturados, também pode ser alterada

de forma significativa em função das condições de cultivo e, estas conseqüentemente, interferem no metabolismo das células direcionando para síntese de determinadas substâncias (LOURENÇO, 2006). Sendo assim, a produtividade de um determinado tipo de cultivo dependerá das condições nutricionais e físicas do meio de cultura, afetando não somente o crescimento celular, mas também a produção de pigmento (VALDUGA et al., 2009)

As microalgas podem acumular vários tipos de carotenóides e a biossíntese desses pigmentos pode ser conduzida em resposta ao estresse das condições ambientais as quais são expostas. De acordo com Boussiba (2000), são definidas como condições indutoras aquelas em que existam fatores que conduzam ao acúmulo de pigmento. Como mencionados anteriormente, numerosos fatores têm sido mostrados para o acúmulo maciço de carotenóides, entre eles pode-se citar, a luz e a temperatura como fatores críticos na produção de pigmentos, como também outros que são considerados muito importantes como, a salinidade, a deficiência de nutrientes no meio e o pH.

A seguir será dada ênfase a dois tipos de fatores que estimulam a carotenogênese em microalgas, a luz e a deficiência de nutrientes, tendo como foco principal o nitrogênio.

2.5.1 Luz

A presença de luz é um dos pilares para o crescimento das microalgas sendo fator condicionante para que a fotossíntese seja realizada. Apesar de ser essencial para o processo fotossintético, o excesso de luz pode ser nocivo para o cultivo de microalgas podendo causar fotoinibição, momento no qual a fotossíntese torna-se progressivamente menos eficiente até chegar a um patamar de saturação pelo excesso de luz (MASOJÍDEK *et al*, 2004). Neste sentido, os pigmentos carotenóides são sintetizados para proteger as células do excesso de luz. Assim, a intensidade luminosa elevada nos cultivos também desempenha um papel crucial na carotenogênese. Dependendo da espécie, existe uma faixa de intensidade luminosa para que haja o estímulo na produção de pigmentos.

Em estudos realizados com a microalga *H. pluvialis* com objetivo de aumentar a produção de astaxantina, foi observado que a carotenogênese foi induzida por

uma intensidade luminosa de $150 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com o aumento do conteúdo de carotenóides de 1,7 para 4,8 mg/L (CIFUENTES et al., 2003). Relatos similares foram confirmados por outros autores como Boussiba e colaboradores (1992), que indicaram que uma das condições para levar ao acúmulo de astaxantina é a alta luminosidade em torno de $175 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. De forma diferente, para cultivar a *H. pluvialis* em condições indutoras de astaxantina, as células foram expostas a intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para que se atingisse a forma de cisto, no qual houve o acúmulo de astaxantina (BOUSSIBA, S. et al., 1999). Já para Fábregas e colaboradores (2003), a manutenção das culturas em torno de $240 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 15 dias assegurou a transformação para a forma de cistos e o acúmulo de astaxantina, considerando que altos níveis de luz aceleram o processo de síntese de astaxantina.

No que se diz a respeito à microalga halotolerante *D. salina* a acumulação de β -caroteno também depende da intensidade de luz em que é exposta durante o ciclo celular. Isto pode ser conseguido em altas irradiâncias em torno de 200 a $1250 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ORSET; YOUNG, 2000). No entanto, para observar as características fotossintéticas adaptativas da *D. salina* rica em β -caroteno a microalga foi exposta à alta irradiância de $2000 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (GÓMEZ-PINCHETTI et al, 1992).

De acordo com os resultados conseguidos por Pisal e Lele (2004), apesar de ter obtido concentrações de 1,6 pg/cel de β -caroteno sob condições normais de cultivo, esse valor foi maior quando a *D. salina* foi exposta a alta irradiância, onde foi obtido 8,28 pg/cel do pigmento. Em trabalho desenvolvido por Park e colaboradores (2006), células da *D. salina* foram expostas por 48h a alta intensidade luminosa de $1000 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, observando as alterações na expressão genética da células para manter elevada eficiência fotossintética e minimizar a formação de espécies reativas de oxigênio em resposta às mudanças nas condições de luz.

2.5.2 Nutrientes

A presença de nutrientes no meio de cultura de microalgas desempenha um papel indispensável no crescimento das células e na produtividade. Diferentes nutrientes em concentrações variáveis são necessários para o cultivo de microalgas.

Carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e fósforo são alguns dos elementos que são considerados macronutrientes necessários para todas as algas. Esses elementos, juntamente com os micronutrientes, desempenham funções altamente diversificadas nas microalgas e sendo essencialmente necessários, pois constituem várias biomoléculas, membranas e reguladores de atividades metabólicas (LOURENÇO, 2006).

Depois do carbono, o nitrogênio é o nutriente mais importante que contribui para produção de biomassa. A quantidade desse elemento na biomassa microalgal pode variar de 1% a mais de 10% (GROBBELAAR, 2004), sendo um componente fundamental de substâncias estruturais das células, como proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes. Assim, se o nitrogênio encontra-se em concentrações baixas no meio, ocorre a diminuição da taxa de crescimento celular, além da redução da concentração de proteínas e clorofila (LOURENÇO et al., 2004). Também são respostas típicas à limitação de nitrogênio, a descoloração celular com um aumento dos carotenóides e diminuição das clorofilas, a acumulação de compostos orgânicos, tais como polissacáridos (produtos de reserva) e certos óleos (BECKER, 2004).

Para aplicações específicas, no entanto, o nitrogênio é propositadamente limitado para que sejam obtidas elevadas concentrações de pigmentos carotenóides. Ben-Amotz e colaboradores (1982), mostraram que ocorreu um aumento da produção de β -caroteno nas células de *Dunaliella* em cultivos deficientes de nitrogênio. Pisal e Lele (2004), também observaram que ao cultivar a microalga *D. salina* em meio de cultura contendo nitrato e em outro meio sem esse nutriente, neste último a divisão celular da microalga foi cessada, porém houve um aumento considerável do conteúdo de β -caroteno em torno de 7,0 pg/cel. Esse aumento da concentração do pigmento foi atribuído ao fato da formação em excesso de espécies reativas de oxigênio nessa condição de estresse.

Borowitzka e colaboradores (1991), mostraram que baixa concentração de nitrogênio é um fator importante para estimular a síntese e acúmulo de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*. Em estudos mais recentes, a microalga *H. pluvialis* foi exposta condições de privação de nitrogênio e fosfato. Em ambas as condições houve a drástica redução da divisão celular, observando o aumento do tamanho celular e, concomitantemente, o acúmulo de astaxantina em até 4% da biomassa seca, sugerindo que o aumento do conteúdo de astaxantina observado sob privação de nitrogênio pode estar relacionado a danos celulares impostos por esse estresse (BOUSSIBA, *et al*, 1999). De forma semelhante, em trabalho desenvolvido por Fábregas e colaboradores (2003), quando *H. pluvialis* foi submetida ao cultivo em que houve a combinação de limitação de nitrogênio e alta intensidade de luz, a concentração de astaxantina aumentou de níveis não detectáveis até um máximo de 23 mg/L. E após 15 dias, sob essas condições, foi observado que todas as células se transformaram em aplanóporos bem definidos, repletos de astaxantina, contendo em média 270 pg do pigmento por célula.

2.6 FATORES DE ESTRESSE E A EXPRESSÃO DE HSP

Ainda se tratando de condições adversas, muitos organismos incluindo as microalgas, respondem a algum tipo de estresse alterando seu perfil protéico. Assim, as microalgas podem sintetizar proteínas em resposta ao estresse e expressar também as conhecidas proteínas de choque térmico (do inglês heat shock proteins-HSPs).

Tende-se a pensar que a expressão de HSP esteja relacionada apenas a exposição ao excesso de calor em função do termo *Heat*, porém fatores ambientais extremos levam a mudanças na transcrição de numerosos genes que codificam proteínas, possibilitando a expressão de HSPs. As HSPs são um grupo de proteínas altamente conservadas e envolvidas na manutenção da homeostase protéica dentro das células (TORRES *et al.*, 2008). De certa forma, as HSPs atuam como chaperonas moleculares que ajudam a restaurar o estado das proteínas nativas após a sua desestabilização por algum estresse externo, garantindo a homeostase da proteína (Proteostase) (TOMALA e KORONA, 2008). Formando um grupo dividido de acordo com o seu peso molecular, pode-se encontrar quatro famílias

principais de proteínas de estresse HSP 90, 70, 60 e HSP pequenas (sHSP) com 16-24 kDa (FEDER e HOFMANN, 1999).

Foi observado em *Chlamydomonas reinhardtii* a expressão de vários genes nucleares de proteínas de choque térmico 70 (HSP70), incluindo HSP70b, que codifica para uma chaperona localizada no cloroplasto. Este estudo teve o objetivo de investigar um possível papel de HSP70b plastídica na fotoproteção e reparação do fotossistema II (SCHRODA *et al.*, 1999).

Em seus resultados Shen e Lee (1997) observaram que HSPs poderia ser induzida em cultura de *Chlorella* por meio de tratamento de choque térmico de 40°C ou 45°C por 30 min. Proteínas de 95, 73, 60 e 43 kDa estiveram sempre presentes nas células *Chlorella* durante o crescimento à temperatura de 35°C, e o tratamento térmico resultou em maiores quantidades destas HSPs. No entanto, a HSP 27 kDa só foi encontrada em culturas expostas ao tratamento de 45°C durante 30 min.

Uma análise proteômica também foi realizada por Wang e colaboradores (2004), após indução da *H. pluvialis* a um estresse oxidativo através da adição de acetato de sódio e de sulfato ferroso (FeSO₄), sob a iluminação contínua de 150 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Foram identificadas além da HSP81-1, HSP81-3 e DnaK (tipo de chaperona molecular precursora de HSP70) ortólogas, duas outras proteínas de estresse HSP70 e HSP60, a partir do parede celular de *H. pluvialis*, sendo que em contraste a maioria das outras proteínas de choque térmico, as HSP81-1 e HSP81-3 também foram expressas em células vegetativas verdes.

O conhecimento do perfil protéico de microalgas em condições de estresse é de grande importância, pois permite identificar algumas proteínas cuja expressão é aumentada em determinadas condições de estresse. Apesar de não estar incluído nos objetivos deste estudo, a caracterização e a identificação de possíveis HSP ou de proteínas que são expressas para proteger as células contra a algum estresse, pode ser útil na seleção de microalgas mais resistentes e com maior capacidade de produção de pigmentos. Dessa forma, gerando informações importantes que podem ser aproveitadas e aplicadas em atividades de natureza biotecnológica e até mesmo comercial.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a produção de pigmentos carotenóides e o perfil protéico das microalgas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* quando submetidas a condições de estresse.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o crescimento celular e a produção de pigmentos durante a exposição aos dois tipos de estresse e na condição normal de cultivo (controle);
- Determinar os padrões de expressão protéica;
- Quantificar a produção de β -caroteno e astaxantina;
- Avaliar qualitativamente o β -caroteno e a astaxantina extraídos por cromatografia em camada delgada;

4. METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados e descritos os materiais e os métodos utilizados para o desenvolvimento do trabalho. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC), na Escola Politécnica e no Laboratório de Biologia Molecular Carmem Lemos, no Instituto de Biologia, na Universidade Federal da Bahia.

4.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Na realização do presente trabalho foram utilizadas duas espécies de microalgas a *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, provenientes do banco de cepas do LABEC. Estas cepas foram provenientes do banco de microalgas do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas, coordenado pelo Prof. Sérgio Lourenço (Universidade Federal Fluminense, RJ). Os microrganismos ficam mantidos em uma incubadora de fotoperíodo (411 FDP, Nova ética), com a temperatura em torno de 22 °C e iluminação constante utilizando lâmpadas fluorescente de 30 Watts fornecendo luminosidade de cerca 35 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As espécies foram cultivadas em meios de culturas já estabelecidos e descritos na literatura, tendo estas composições características para cada microalga. A espécie *D. salina* foi cultivada em Meio Conway (WALNE, 1966 *apud* LOURENÇO, 2006) e a *H. pluvialis* em Meio Rudic – RM (RUDIC, 2000), cujas composições são apresentadas nas tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

Tabela 4.1- Composição do meio Conway para cultivo da *Dunaliella salina*

Componentes	Volume/ Quantidade
Água do mar	1L
Solução principal	1ml
Solução de vitaminas	1ml
I. Solução principal	
EDTA (Na sal)	45,0g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,30g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36g
H ₃ BO ₃	33,6g
NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O	20,0g
NaNO ₃	100g
Solução de metais	1ml
II. Solução de metais 1ml/100ml de água destilada	
ZnCl ₂	2,1g
CoCl ₂ .6H ₂ O	2g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,90g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2g
III. Solução de Vitaminas em 1L de água destilada	
Tiamina	100mg
Cianocobalamina	2mg
Biotina	1mg

Tabela 4.2 – Composição do Meio Rubic's para cultivo da *Haematococcus pluviallis*

Componentes	Quantidade/ Volume
Água deionizada	1L
NaNO ₃	0,3g
K ₂ HPO ₄	0.08g
KH ₂ PO ₄	0.02g
MgSO ₄	0.01g
CaCl ₂	0.0585g
EDTA	0.0075g
NaCl	0.02g
Solução de metais	1 ml
II. Solução de metais em 1L de água destilada	
H ₃ BO ₃	0.3g
MnSO ₄ .H ₂ O	1.5g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.3g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.26g
FeCl ₃ .6H ₂ O	17g

Para pesar a quantidade dos nutrientes nos meios, foi utilizada uma balança analítica (Satorious, TE2145), com uma incerteza na medida de $\pm 0,0001$ mg.

4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.

4.2.1 *Dunaliella salina*

Para realizar os experimentos de indução de estresse, foi preparado um cultivo-mãe que posteriormente foi utilizado como inóculo. O meio de cultura Conway foi preparado em erlenmeyer de 2L e esterilizado por autoclavagem a 121 °C, 1 atm, por 15 min (Autoclave Vertical *plus* Phoenix). A inoculação foi realizada em uma bancada de fluxo laminar vertical (Pachane), pela transferência de um volume contendo as células da microalga provenientes do estoque do banco de cepas, equivalente a 10% do meio fresco.

Para possibilitar o crescimento celular, o erlenmeyer foi colocado em prateleiras iluminadas com lâmpadas fluorescentes de 15 Watts, como mostra a Figura 4.1, fornecendo uma luminosidade de aproximadamente 70 μmol de fótons $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ na superfície do mesmo, medida por Quantômetro (LI-250A, LI-COR® - incerteza da medida foi de $\pm 0,2$), mantidos a uma temperatura ambiente média de 23 °C. A agitação do cultivo foi conseguida por borbulhamento constante de ar estéril

em filtro de 0,20 µm, com uso de compressor de ar e mangueiras conectadas a pipetas, garantindo a turbulência e aeração do meio dentro do erlenmeyer.

O acompanhamento do crescimento da biomassa foi realizado por meio de contagens de células em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio (Zeiss, Axiostar plus). O número de células por mL foi determinado de acordo com Equação 4.1 seguir:

$$Células/ml = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10000 \quad (4.1)$$

Como se trataram de células móveis em todas as contagens realizadas as amostras foram previamente fixadas com solução Transeau (água: álcool: formaldeído - 6: 3: 1) (PARRA e BICUDO, 1995).

Ao final do tempo cultivo, foi realizada a determinação do peso seco (PS). Para tal procedimento foi retirada uma alíquota de 50 mL e o PS foi determinado por meio de filtração a vácuo do volume selecionado através de um microfiltro de fibra de vidro (Macherey-Nagel, 70mm, GF-1), previamente seco e pesado. A biomassa filtrada foi seca em estufa (402/N, Nova ética) a 70 °C por 24h e, posteriormente a 100°C por 2h. O peso seco livre de cinzas foi estabelecido pela diferença entre o peso do filtro seco (m_1) e o peso do filtro contendo a biomassa seca (m_2), dividido pelo volume de cultura que foi filtrado Equação (4.2).

$$PS = \frac{(m_2 - m_1)}{V} \quad (4.2)$$

A concentração inicial de células foi de $6,75 \times 10^4$ células/mL e, após 7 dias de cultivo atingiram $5,50 \times 10^5$ células/mL, em torno de 0,60 mg/mL de biomassa seca. Então, três volumes de 125 mL do cultivo foram separados e centrifugados (Centrifuga 5702, Eppendorf) por 10 minutos a 3500 rpm em tubos falcon de 50 mL para que os pellets de células fossem utilizados na fase de indução de estresse.

4.2.2 *Haematococcus pluvialis*

Da mesma forma que a microalga anterior, foi preparado um cultivo-mãe que serviu como inóculo para os ensaios de estresse. Porém o meio de cultura utilizado foi RM que também foi esterilizado por autoclavagem. Posteriormente, foi realizada a

inoculação com volume de 200 mL contendo células da *H. pluvialis* e cultivo foi posto em prateleiras iluminadas sob as mesmas condições de luminosidade, temperatura e aeração que o cultivo-mãe da *D. salina*.

O crescimento também foi acompanhado por contagens de células na câmara de Neubauer e igualmente foi seguido o procedimento de determinação do peso seco por meio de filtração e secagem.

A concentração inicial de células foi de $1,75 \times 10^4$ e após 7 dias de cultivo atingiram $5,25 \times 10^4$ células/mL, em torno de 0,18 mg/mL de biomassa seca. De forma semelhante, três volumes de 125 mL do cultivo foram separados e centrifugados por 5 minutos a 3500 rpm em tubos falcon de 50 mL para que os pellets de células fossem utilizados na fase de indução de estresse.

4.3 CONDIÇÕES INDUTORAS DE ESTRESSE

Para realizar a fase de estresse foram preparadas três condições diferentes de cultivo para cada microalga, todas em triplicata. Para o acompanhamento do crescimento da biomassa foram coletadas amostras durante o período de cultivo para serem realizadas as contagens de células na câmara de Neubauer e que foram também utilizadas para a extração de proteínas. Durante execução dos experimentos houve o acompanhamento do pH em todos os ensaios (pHmetro Tec-5, Tecnal). A incerteza da medida neste equipamento foi de $\pm 0,02$.

O cultivo controle foi preparado em com condições normais, com concentrações de nutrientes não limitantes, onde os pellets contendo as células dos volumes centrifugados provenientes dos inóculos foram ressuspensos em 250 mL dos meios de cultura frescos. A luminosidade foi mantida aproximadamente igual a do inóculo fornecendo $70 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na superfície do erlenmeyers, com a temperatura ambiente em torno de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação constante por borbulhamento de ar, Figura 4.1 (a) e (d).

Para a indução do estresse por falta de nitrogênio, os meios Conway e RM foram preparados sem a adição de NaNO_3 , elemento que é fonte de nitrogênio nos meios. Os pellets contendo as células procedentes dos inóculos foram ressuspensos em 250 mL dos meios de cultura frescos, sem nitrogênio. Para que apenas a limitação do nitrogênio atuasse como fator de estresse, os erlenmeyers foram

transferidos para as prateleiras de cultivo onde foram ajustados de forma que a intensidade luminosa ficasse equivalente a do controle, em aproximadamente $70 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A temperatura e aera\u00e7\u00e3o foram igualmente mantidas.

Para as microalgas serem cultivadas sob as condi\u00e7\u00f5es de estresse luminoso, as c\u00e9lulas centrifugadas provenientes dos in\u00f3culos foram ressuspensas em 250 mL de meio de cultura fresco, com concentra\u00e7\u00f5es n\u00e3o limitantes de nutrientes. Partindo-se do pressuposto que os meios de cultura s\u00e3o enriquecidos com diversos nutrientes necess\u00e1rios em maiores concentra\u00e7\u00f5es para permitir o crescimento r\u00e1pido das microalgas, principalmente os macronutrientes, como por exemplo, nitrog\u00eanio, f\u00f3sforo e ferro (LOUREN\u00c7O, 2006), n\u00e3o havendo, dessa forma, o esgotamento r\u00e1pido dos nutrientes no meio e sim, o consumo gradual dos mesmos.

Desse modo os erlenmeyers foram mantidos em prateleiras iluminadas pelos dois lados com lâmpadas fluorescentes, totalizando em quatro lâmpadas, como pode ser observada na Figura 3.1 em (c) e (f). Os erlenmeyers foram dispostos nas prateleiras de forma a ser fornecido em torno de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de um lado e $70 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do outro. Como a elevada intensidade luminosa pode elevar a temperatura, os cultivos foram colocados na \u00faltima prateleira e a temperatura do cultivo foi acompanhada atrav\u00e9s da utiliza\u00e7\u00e3o de um term\u00f4metro imerso em \u00e1gua. A temperatura na prateleira ficou em torno de $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

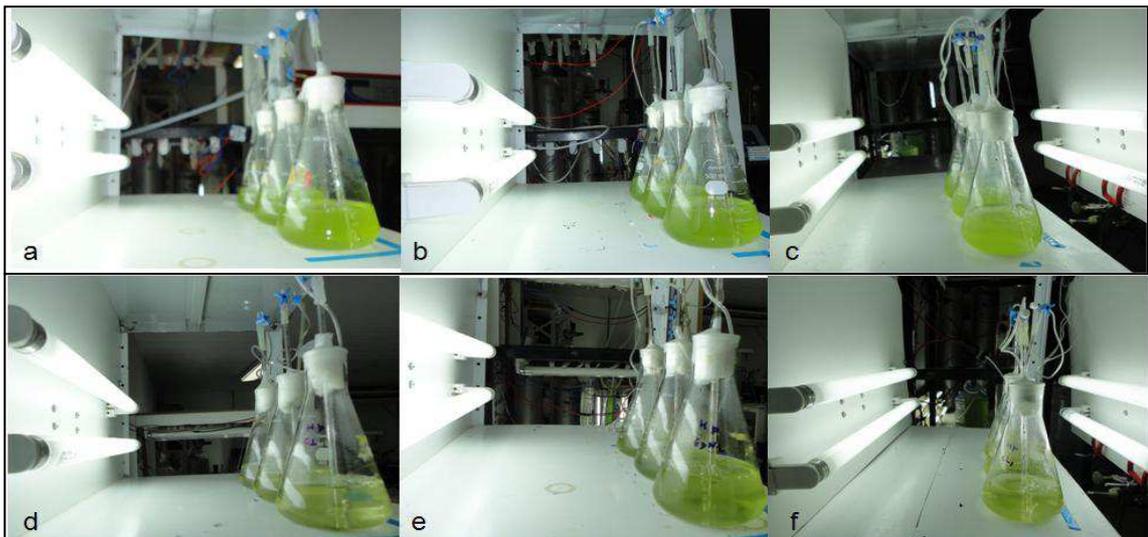


Figura 4.1 – Cultivo das microalgas *Dunaliella de salina* e *Haematococcus pluvialis*. Em a, b, c: *Dunaliella salina* cultivo controle, cultivo em estresse por defici\u00eancia de nitrog\u00eanio (EDN) e cultivo em estresse luminoso (EL), respectivamente. Em d, e, f. *Haematococcus pluvialis* cultivo controle, cultivo em estresse por defici\u00eancia de nitrog\u00eanio (EDN) e cultivo em estresse luminoso (EL), respectivamente. Em c e f. a ilumina\u00e7\u00e3o dos cultivos em dois lados para condi\u00e7\u00f5es de estresse luminoso.

Mesmo considerando a concentração de nutrientes não limitante, em ensaios preliminares pequenas alíquotas do cultivo controle e do cultivo sob estresse luminoso foram coletadas para análise da quantidade de nitrogênio para observar se esse elemento tornou-se escasso, devido a maior quantidade de células produzida em função da elevada intensidade luminosa, para que essa funcionasse apenas como fator condicionante do estresse, dados no Apêndice A.

4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS HIDROSOLÚVEIS

Para quantificação das proteínas hidrosolúveis foi realizada uma curva padrão com diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA) em função da absorbância obtida a 595nm, com $R^2=0.99$ (ANEXO A). O método coloração por Bradford (1976) é uma técnica para determinação de proteínas hidrosolúveis, que utiliza o corante azul brilhante de Coomassie. Este método de forma adaptada consiste, basicamente, na mistura de 10 μ l da amostra protéica em 790 μ l de água Mili-Q e posterior adição de 200 μ l do reagente de Bradford. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente são lidas as absorbâncias e os resultados são expressos em mg de proteína por mL (mg/mL) comparando-se com a curva padrão.

Nos dias em que foram realizadas as contagens celulares, os volumes coletados foram congelados para que ao final do período de cultivo fossem utilizados na extração das proteínas. Preocupou-se em coletar um volume adequado, para que essa retirada não interferisse na concentração celular, não ultrapassando assim o valor de 10% do volume do cultivo. De acordo com Lourenço (2006) na estocagem de algas em N_2 líquido ou em freezer são raros os danos sofridos pelas células, assumindo que a conservação das amostras pode perdurar por prazos longos, já que não há mudanças no ambiente que circunda as células, mantendo o metabolismo das mesmas inertes.

Assim, para extração das proteínas as alíquotas de cada dia dos cultivos foram descongeladas em recipiente com gelo e, então centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm para que o sobrenadante fosse descartado. Ao pellet de células foram adicionados 1,5 mL de tampão de fosfato salino (PBS), seguido pela maceração em nitrogênio líquido utilizando cadinho e pistilo de porcelana, sob um recipiente contendo gelo.

Após a decantação do debrís celular, o sobrenadante leitoso foi recolhido para que fosse realizada a precipitação de proteínas pela adição de sulfato de amônio (SCOPES, 1988). De forma adaptada tal processo consistiu na adição de uma determinada quantidade do sal na solução protéica de modo que a concentração final ficasse em 50% de sulfato de amônio, sendo homogeneizada por meio de um agitador magnético (IKAC- MAG HS7), em recipiente com gelo. As amostras foram deixadas na geladeira com temperatura em torno de 4 °C, ainda em gelo, durante 24h.

O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi coletado para a dosagem das proteínas, seguindo o método de Bradford (1976) adaptado. Assim, 10 µl do extrato protéico foi misturado em 790 µl de água Mili-Q e posterior adição de 200 µl da solução reagente de Bradford. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas a 595 nm e os resultados das concentrações protéicas expressos em mg/mL, obtidos através da média das leituras de absorvâncias correlacionadas com a curva padrão de BSA. O material com os extratos protéicos foi separado em pequenos volumes e estocados para posteriormente serem utilizados nas análises de eletroforese.

As leituras de absorvância foram feitas utilizando um espectrofotômetro (700 *plus*, Femto, incerteza medida no equipamento de $\pm 0,001$).

4.5 ANÁLISES DE ELETROFORESE

Análises eletroforéticas de proteínas em condição desnaturante foram descritas por Laemmli (1970). A eletroforese em gel de poliacrilamida que utiliza o SDS como agente desnaturante de proteína é denominada SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis). Desse modo o SDS desnatura e carrega as proteínas negativamente, sendo que o número de moléculas de SDS ligado à proteína é proporcional ao seu tamanho e quando aplicadas no gel as proteínas são submetidas a uma corrente elétrica e migram através de um campo elétrico para o pólo positivo. Assim, após o processo coloração do gel é possível notar a expressão de bandas de proteínas de acordo com seu tamanho, expressas Daltons.

As análises por SDS- PAGE foram desenvolvidas de acordo com método estabelecido por Laemmli (1970). Foram utilizados géis cuja concentração foi 10% de acrilamida, polimerizados em placas de vidro (7,8 x 9,2 cm) à temperatura

ambiente, usando sistema BioRad. A Tabela 4.3 contém a composição dos géis utilizados neste trabalho.

Para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida, foi padronizada uma quantidade de proteína de 3 µg a ser aplicada nos géis. No total foram feitas análises por eletroforese para cada espécie de microalga e em cada tipo de estresse nos quais foram submetidas, como também para o controle. As alíquotas de proteínas aplicadas nos géis foram correspondentes aos dias em que foram coletadas as amostras para as contagens celulares, ou seja, em função do tempo de exposição ao estresse. Os extratos protéicos foram misturados na proporção 1:1 em tampão de carregamento (constituído por 2.0 mL glicerol, 2.0 mL 10% SDS, 0.25 mg azul de bromofenol, 2.5 mL do tampão de empilhamento, 0.5 mL β-mercaptoethanol para um volume de 10 mL) e aplicados no gel.

Tabela 4.3 - Composição dos géis de separação e empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE.

COMPONENTES	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE EMPILHAMENTO
H ₂ O	3.1 mL	1 mL
Solução de Acrilamida 30%: acrilamida: bisacrilamida (30:0,8% - m/v)	2.4 mL	300
Solução de separação pH 8.8 (Tris base; 10% SDS; HCl)	1.9 mL	-
Solução de empilhamento pH 6.8 (Tris base; 10% SDS; HCl)	-	1.9mL
Persulfato de amônio a 10%	112 µl	28
TEMED	5 µl	5 µl

As análises foram realizadas em uma cuba de eletroforese (*Mini-protean 3 cell Eletroforesis*®, Biorad), a 75 Volts em tampão de corrida (composição concentrada com 15g Tris base; 72g glicina; 50mL de SDS 10%, completando para 500 mL com água destilada) e finalizada quando o azul do bromofenol chegasse a borda inferior do gel. A fonte utilizada foi *Gibco BRL Eletrophoresis Power Supply*, modelo 250, da *Life Technologies*.

Os géis foram revelados por meio de coloração em nitrato de prata (MORTZ et al., 2001), seguindo protocolo padronizado no LABIMUNO – ICS/UFBA, com algumas adaptações. A coloração consiste basicamente de imersões e lavagens dos géis em diferentes soluções, seguindo as etapas de: fixação, para insolubilizar proteínas e para remover compostos interferentes presentes; incubação, na qual o gel é sensibilizado para aumentar a subsequente formação da imagem; coloração, quando ocorre a impregnação com o nitrato de prata; e a revelação quando ocorre o desenvolvimento da imagem. Em algumas colorações houve a substituição do metanol pelo etanol nas soluções de fixação, na tentativa de evitar a coloração alaranjada indesejada nos géis.

Após o bloqueio da reação os géis eram colocados em solução de secagem contendo glicerol, etanol e água (1:5:19).

Foi utilizado como marcador de peso molecular o SigmaMarker™ (*Wide range*, 6.500-200.000 Daltons, Sigma- Aldrich®). Neste marcador estão presentes as seguintes proteínas com seus pesos em daltons: Aprotinina, pulmão de bovino (6.500); α -lactalbumina, leite bovino (14.200); Inibidor de tripsina, de soja (20.000); tripsinogênio, pâncreas bovino (24.000); anidrase carbônica, eritrócitos de bovinos (29.000); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, músculo de coelho (36.000); Ovalbumina, ovo de frango(45.000); Desidrogenase glutâmico, fígado bovino (55.000); Albumina, soro bovino (66.000); Fosforilase B, músculo de coelho (97.000); β -galactosidase, E. coli (116.000); Miosina, coração de suínos (200.000)

4.6 EXTRAÇÃO DOS PIGMENTOS

Para extração da astaxantina oriunda da *Haemtococcus pluvialis* e do β -caroteno da *Dunaliella salina* foi utilizado o método descrito por Sedmak et al. (1990), com algumas modificações. Resumidamente o procedimento baseou-se na maceração de 2 mL das amostras dos cultivos, seguida pela centrifugação em tubos falcons à 4000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado ao sedimento 1 mL de DMSO, sendo agitada em vortex por 20-30 segundos e depois deixando reagir por 5 minutos. Para a separação dos carotenóides foi adicionado 0,1mL de fosfato de sódio 0.01M (pH 7.0) em 1ml do solvente orgânico (acetona), colocados imediatamente nos tubos falcons. Os tubos foram novamente agitados em

vortex por 30-40 segundos para misturar as fases, que posteriormente foram então separadas por centrifugação 4000 rpm por 5 minutos. O procedimento foi repetido até o possível esgotamento da cor. Os sobrenadantes foram recolhidos para a determinação da absorbância. Para este procedimento, os tubos falcon foram recobertos com papel alumínio para evitar a exposição à luz.

Foi utilizado como padrão para quantificação de β -caroteno extraído da microalga *D. salina*, o pigmento sintético *Trans* β -caroteno tipo I (B-carotene Sigma-Aldrich®, com 93% de pureza) e a para astaxantina extraída da *H. pluvialis* a ração para peixe Astacolor® (fabricante Tropical®, Apêndice B), cuja quantidade de astaxantina contida é de 120 mg/kg, também derivada da *H. pluvialis*. Assim, na tentativa de estimar a concentração de pigmento contido na microalga, utilizaram-se os mesmos solventes e o mesmo processo de extração para retirar astaxantina presente na ração de peixe.

Foram feitas leituras em diferentes comprimentos de onda, como pode ser observado na Figura 4.2 em (a) e (b), para ratificar o que está na literatura indicando 450nm para β -caroteno e a 470 ou 480nm para astaxantina, como comprimentos de onda para leitura dos pigmentos. A partir deles foram construídas curvas padrão para β -caroteno e para astaxantina, com leituras das absorbâncias em função das diferentes concentrações dos pigmentos, obtendo-se o valor do $R^2= 0.99$ e 0.96 , respectivamente.

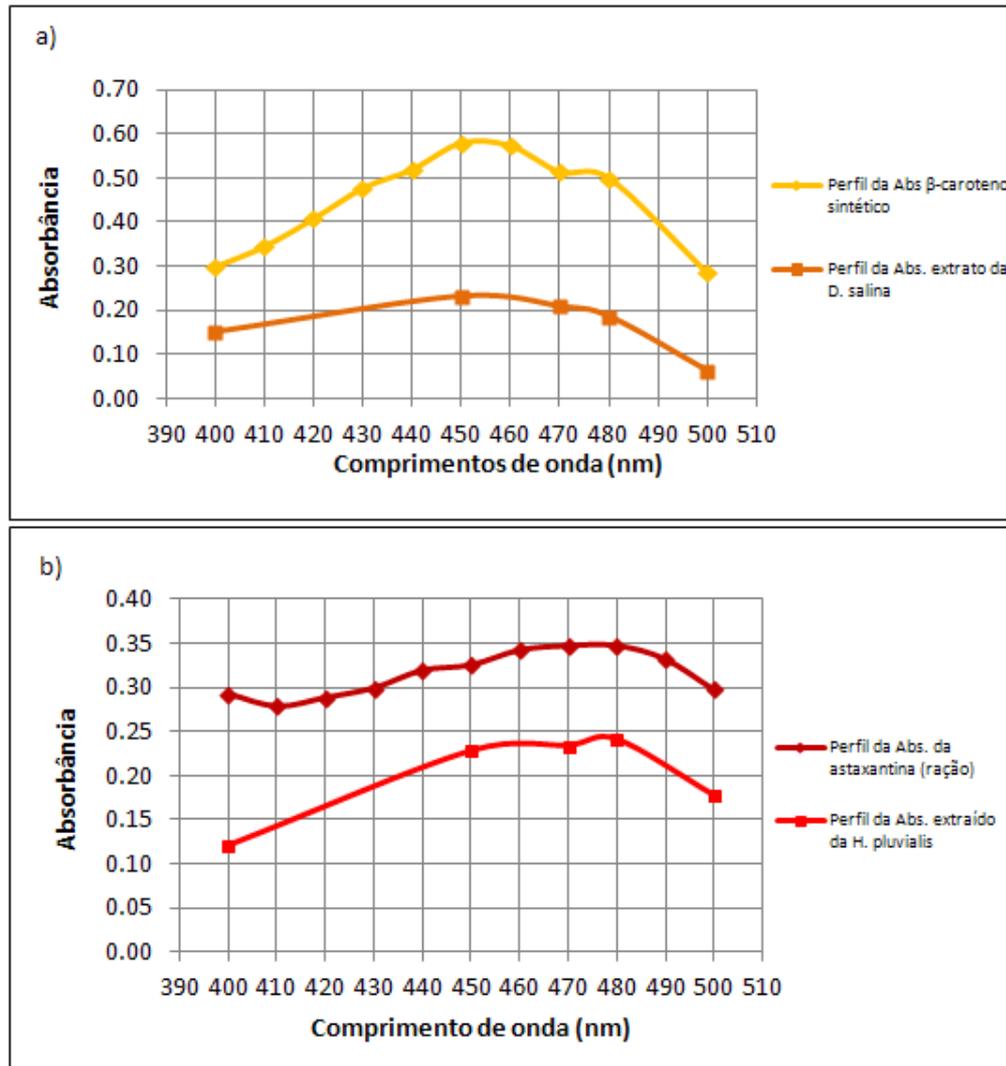


Figura 4.2- Gráficos com o perfil da absorbância dos pigmentos extraídos das microalgas pelo método Sedmark e os padrões utilizados. Em (a) absorbâncias obtidas pelo padrão de β -caroteno sintético e pelo extrato de *D. salina*. Em (b) absorbâncias obtidas pelas extrações da ração e pelo extrato de *H. pluvialis*.

4.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para confirmar a composição nos extratos dos pigmentos oriundos das microalgas, utilizou-se algumas amostras da biomassa estocada a -3°C , repetindo-se o processo de extração para realizar a análise de cromatografia em camada delgada.

A cromatografia é um método físico-químico de separação, que está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma amostra, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a *fase móvel* e a *fase estacionária*. A interação dos componentes da amostra com estas duas fases é

influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iônica, bipolar, apolar, e específicos efeitos de afinidade e solubilidade. Desse modo, a cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos por comparação com padrões previamente existentes (DEGANI *et al*, 1998). Com este objetivo tal procedimento foi desenvolvido seguindo protocolo já adotado no LABEC/UFBA, com alteração de um componente da fase móvel.

Foram preparadas em placas de vidro as fases estacionárias contendo uma fina camada de sílica gel (marca MERK 60PF), as quais foram previamente secas na estufa a 70 °C. A fase móvel ou a solução eluente foi composta por clorofórmio, acetona e ácido acético na proporção de 95:5:1, que foi saturada em um recipiente pela absorção em filtro de papel. A análise constituiu-se em usar um pequeno volume dos padrões (β -caroteno sintético e astaxantina oriunda da ração de peixe) e dos pigmentos extraídos das microalgas, utilizando o método descrito na seção anterior e, com o uso de um capilar aplicou-se o extrato dos pigmentos sobre as placas de sílica, a certa distância da base. A placa foi incubada em recipiente contendo a solução eluente, onde o deslocamento do solvente foi observado, e a corrida foi interrompida quando o mesmo atingiu uma altura próxima à margem superior da placa. Após secagem por aproximadamente 5 minutos em temperatura ambiente, a placa foi levada para recipiente contendo iodo sólido e aguardou-se até a revelação completa das manchas na placa.

A interpretação dos resultados foi feita com a comparação do Fator de Retenção (R_f) da mancha obtida pelo padrão, com os R_f s das manchas obtidas das amostras dos pigmentos extraídos a partir das microalgas. Onde, R_f é definido como a razão da distância percorrida pela mancha da amostra e a distância percorrida pelo eluente.

4.8 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Para realização do presente trabalho, os cultivos das microalgas *D. salina* e *H. pluvialis* aconteceram de forma não simultânea. O primeiro bloco de experimentos foi realizado com *H. pluvialis*, sendo submetida às condições de estresse, e ao término do tempo de cultivo foram feitas as extrações dos pigmentos. No segundo bloco foi realizado o cultivo da *D. salina* sob as mesmas condições,

seguido também pelas extrações. As mesmas condições de temperatura, luminosidade e aeração foram mantidas para o cultivo das duas microalgas.

A partir das contagens celulares foi possível estimar o crescimento da população microalgal em função do tempo, como também a taxa instantânea de crescimento que representa uma medida relativa de variação da densidade de células em momentos distintos. Este parâmetro foi estabelecido através da Equação (4.3) (ONO E CUELLO, 2007). Para calcular a taxa de crescimento de cada experimento, foi considerada a fase exponencial do cultivo.

$$\mu = \frac{\text{Ln} \left(\frac{X_2}{X_1} \right)}{T_2 - T_1} \quad (4.3)$$

Onde: μ = taxa instantânea de crescimento
 $(T_2 - T_1)$ = intervalo de tempo decorrido em dia.
 X_1 = densidade celular inicial;
 X_2 = densidade celular final.
 Ln = logaritmo natural.

Através da correlação com a curva obtida a partir dos padrões dos pigmentos foi possível estimar os efeitos de cada condição de cultivo na qual as microalgas foram submetidas sobre produção de pigmentos, observando se houve diferença e qual foi mais significativa. Para isso foi utilizado o programa computacional Microsoft Excel®, para análise dos dados através da ANOVA e também do teste t , considerando um intervalo de confiança de 95%.

As extrações e as quantificações de proteínas foram logo seguidas pelas análises eletroforéticas que também foram realizadas em duas etapas com cada microalga. Os resultados dos padrões de bandas de proteínas obtidos nos géis foram analisados e interpretados junto ao que já foi publicado na literatura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

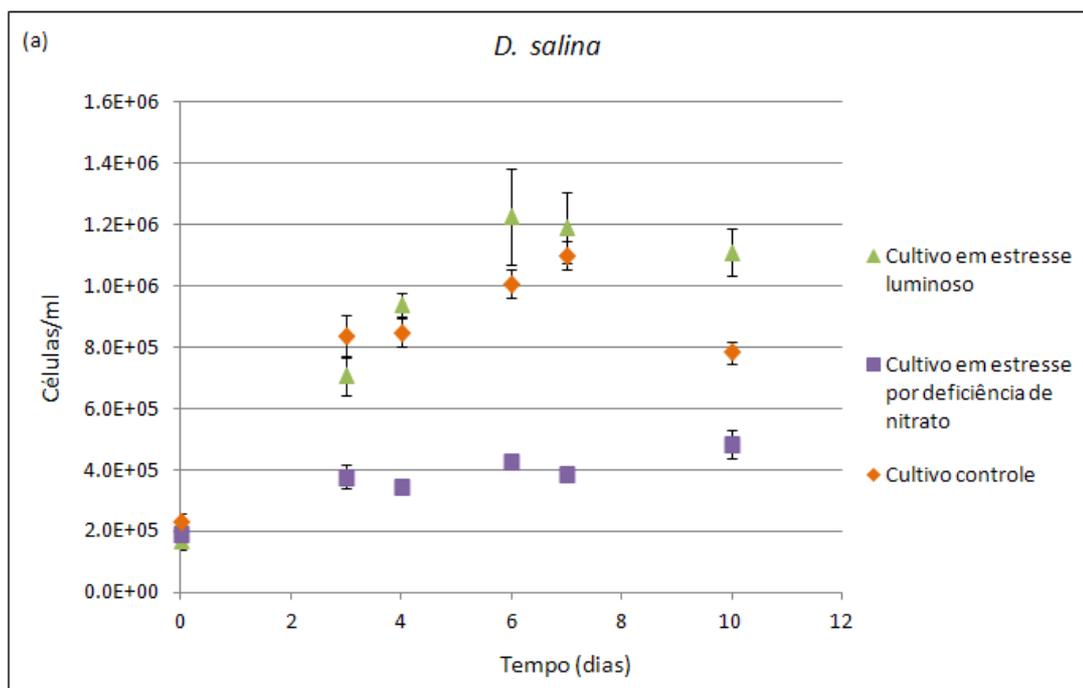
Neste capítulo são apresentados os resultados do presente trabalho, referentes ao crescimento da biomassa por intervalo de tempo em cada condição, os perfis das proteínas nas análises de eletroforese, a quantificação dos pigmentos extraídos a partir das microalgas e os padrões cromatográficos dos pigmentos extraídos. Juntamente com os mesmos serão discutidos e comparados com trabalhos publicados na literatura.

5.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E TAXA INSTANTÂNEA DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento referem-se ao número de células/mL em função do tempo em dias, consistindo na média das contagens de células das réplicas de cada condição de cultivo, construída no software Microsoft Excel.

5.1.1 *Dunaliella salina*

A partir das contagens celulares foi possível construir as curvas de crescimento da microalga *Dunaliella salina* em cada condição de cultivo. A concentração celular obtida foi referente às médias das contagens realizadas em cada condição considerando as respectivas réplicas. Na Figura 5.1, em (a), pode ser observada a variação do número de células desde o tempo zero (dia em ocorreu a inoculação) até o décimo dia dos cultivos controle, em estresse por falta de nitrogênio e em estresse luminoso.



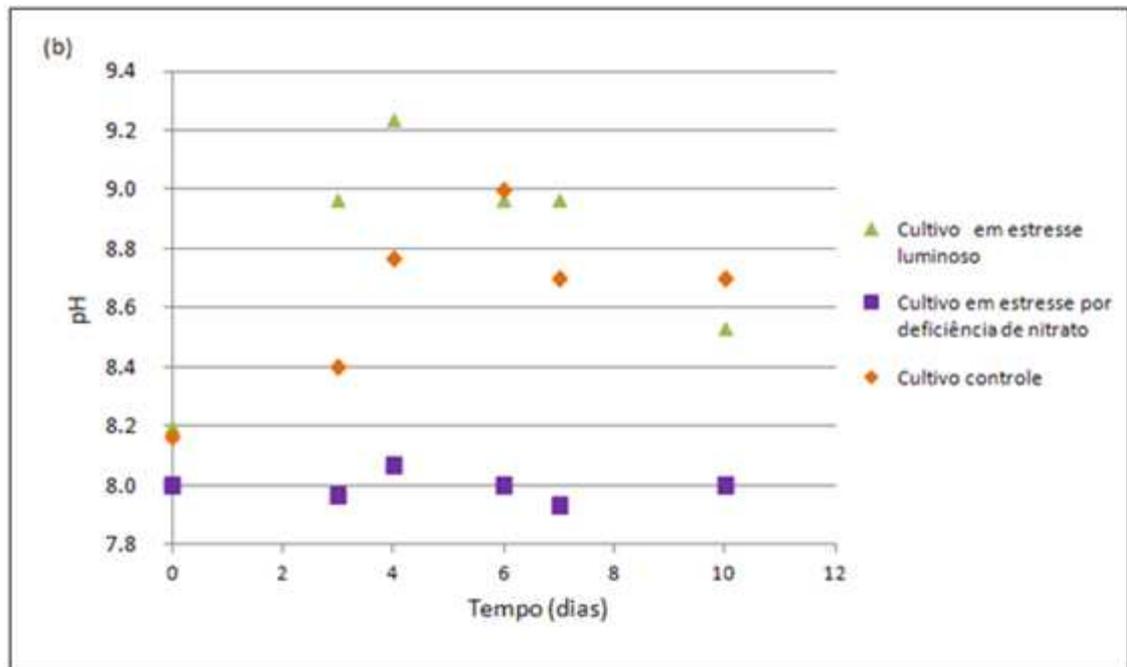


Figura 5.1- Em (a) gráfico com as curvas de crescimento da microalga *Dunaliella salina* em diferentes condições de cultivo. Em (b) Gráfico com o acompanhamento do pH em função dos dias em cada condição.

A partir dos resultados preliminares optou-se que as contagens fossem realizadas após alguns dias da inoculação, uma vez que no período inicial de crescimento pode ocorrer uma redução no número de células. De acordo com Derner (2006), essa redução pode ser considerada como a fase de indução (ou fase Lag), que ocorre pós-inoculação não havendo aumento na população devido à adaptação das microalgas às novas condições.

Em 72 horas após a inoculação, houve um aumento significativo no número de células, com maior valor obtido pelo controle de 8.35×10^5 cel/mL, seguido pelo cultivo que foi submetido ao excesso de luz com concentração de 7.09×10^5 cel/mL, Figura 5.1 em (a). Apesar das flutuações no número de células durante o tempo de cultivo, aquele em que houve a ausência de nitrogênio a densidade máxima de células foi de 4.82×10^5 cel/mL, alcançada apenas no último dia do cultivo. Enquanto que a maior concentração de células foi obtida pelo cultivo em estresse luminoso com 1.23×10^6 cel/mL no sexto dia e a concentração máxima do controle ficou em 1.1×10^6 cel/mL.

Resultado semelhante foi observado em estudo no qual a *D. salina* foi cultivada em elevada luminosidade (medida em lux), cuja densidade máxima obtida em

experimentos autotróficos foi de $5,56 \times 10^5$ células/mL, quando se utilizou o nível máximo de salinidade e luminosidade (ALMEIDA e JORQUERA, 2010). Taxas de crescimento máximas conseguidas para *D. salina* foram relatadas ocorrendo acima de $127 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, embora seja considerada uma complexa interação entre os fatores salinidade, luz e temperatura na determinação das taxas de crescimento (GIORDANO e BEARDALL, 2009).

Em cultivos em larga escala, a produção de biomassa dessa microalga foi considerada satisfatória quando cultivada em um sistema semi-contínuo em fotobioreatores mantendo a intensidade luminosa em torno de $200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, dessa forma García-González e colaboradores (2005) obtiveram uma densidade celular máxima de 6×10^9 células/L na primeira semana de cultivo.

A partir dos dados obtidos pelas curvas de crescimento foi possível calcular a taxa instantânea de crescimento celular para cada condição de cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento até próximo ao alcance da densidade celular máxima, onde foram considerados T_1 e T_2 o dia 0 e 6, respectivamente. A taxa de crescimento específico da cultura define a fração do aumento da biomassa sobre uma unidade de tempo, ou seja, o aumento da biomassa a partir de cada célula existente por dia. Na Figura 5.2 podem ser visualizadas as taxas de crescimento obtidas para cada tipo de cultivo, calculadas a partir da fórmula (4.3).

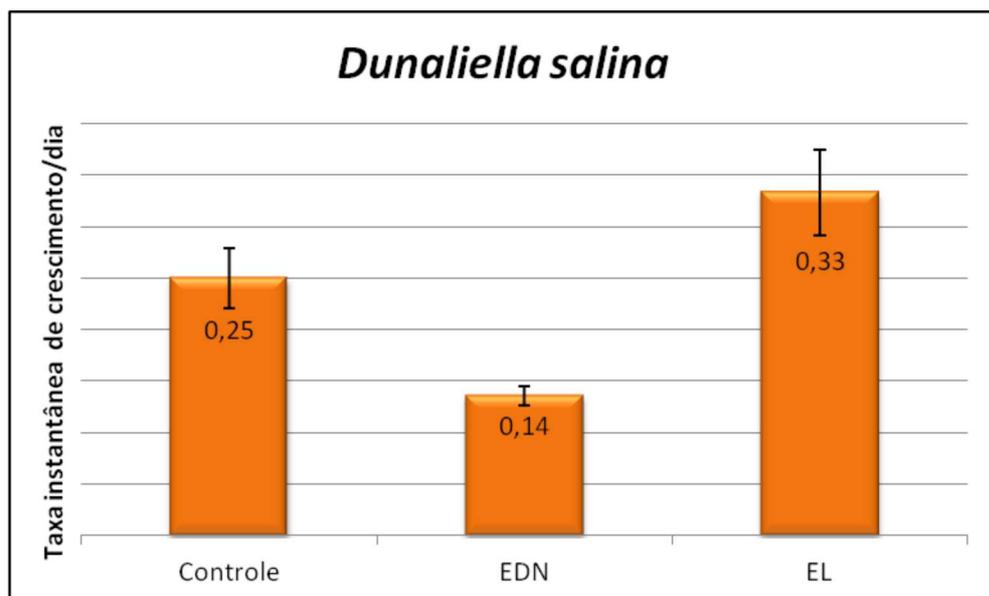


Figura 5.2 – Gráfico com as taxas instantânea de crescimento (células/ml/dia) da microalga *D. salina* no controle e nas condições de estresse. EDN- Estresse por deficiência de nitrato; EL- Estresse luminoso.

A partir dos valores da taxa instantânea de crescimento pode-se observar que no período considerado, o aumento da densidade do cultivo em alta intensidade luminosa foi de 0,33 células/mL/dia, enquanto a do cultivo controle foi de 0,25 cel/mL/dia. No entanto, deve-se considerar que o tratamento considerado como estresse luminoso, a iluminação aplicada foi ótima e não estressante uma vez que resultou em uma maior taxa de crescimento.

Comparando-se com obtidos por García-González e colaboradores (2005), em regime de cultivo semi-contínuo em fotobioreatores foi conseguido crescimento ativo da cultura da microalga *D. salina* mantendo-as numa intensidade luminosa em torno de 200 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, onde foi conseguida uma taxa de crescimento específico em cerca de 0,18 d^{-1} .

Os resultados obtidos mostraram que em elevada luminosidade obteve-se uma alta densidade de células da *D. salina* comparando com o controle e com o cultivo deficiente de nitrogênio, estando de acordo com o que foi observado por Richmond (2004), o qual afirma que um fluxo elevado de fótons pode ser capturado pelas microalgas, resultando em alta densidade de células que tende a aumentar exponencialmente até todos os fótons fotossinteticamente disponíveis sejam absorvidos. No entanto, deve-se considerar que uma boa produção de biomassa só pode ser obtida quando requisitos nutricionais da cultura forem satisfatórios e a temperatura seja ideal, havendo uma forte interação entre esses fatores com a luminosidade.

Assim, o fator luz também é de fundamental importância, uma vez que a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético irá repercutir na fixação de carbono e determinará conseqüentemente a taxa de crescimento das microalgas, conforme afirmado por Derner (2006).

No que diz respeito ao cultivo deficiente de nitrogênio, a partir da curva de crescimento e pelo cálculo da taxa de crescimento observou-se que este elemento limita de forma significativa o número de células. Fato observado pela densidade celular máxima alcançada nesta condição, que foi de apenas 4.82×10^5 cel/ml. Num estudo em que foi observado o conteúdo de lipídio produzido pela *D. salina* quando cultivada em níveis baixo/alto de luz e de nitrogênio, foi observado também que

quando mantidas em condições limitantes de nitrogênio o crescimento da biomassa em ambos níveis de luz foi retardado (WELDY e HUESEMANN, 2007).

Esse menor número de células pode ser justificado pelo fato do nitrogênio ser um componente fundamental nas células, sendo constituinte essencial de todas as proteínas estruturais e funcionais. As microalgas, em geral, têm uma capacidade limitada para o armazenamento de nitrogênio e, quando são cultivadas em condições de nitrogênio limitado, apesar da fotossíntese ainda continuar ocorrendo em uma taxa reduzida, é observada uma marcante diminuição da taxa de divisão celular. De acordo com Lourenço e colaboradores (2004), verifica-se também a redução da concentração de proteínas e de clorofila e o carbono fixado na fotossíntese sob estas circunstâncias é desviado do caminho da síntese de proteínas sendo conduzido a uma síntese lipídica, ou de hidratos de carbono.

No entanto, foi observado que o cultivo em estresse luminoso manteve a cor verde das células por mais tempo e na condição de estresse por falta de nitrogênio a mudança na coloração da cultura foi mais notável e mais rápida quando comparada com a condição de estresse luminoso. No sexto dia de cultivo, o predomínio da cor amarelada já era observado no cultivo submetido ao estresse por falta de nitrogênio, como demonstrado na Figura 5.3. Apesar da pequena concentração de células presente no cultivo, este parece ser um fator que induz a produção de β -caroteno de forma mais rápida.

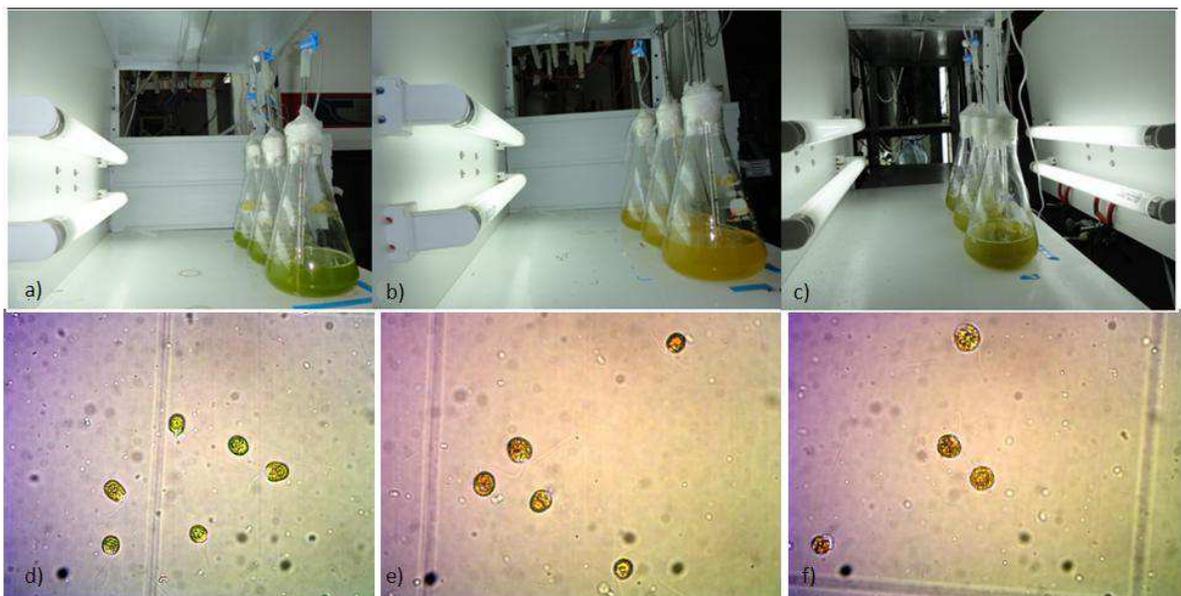
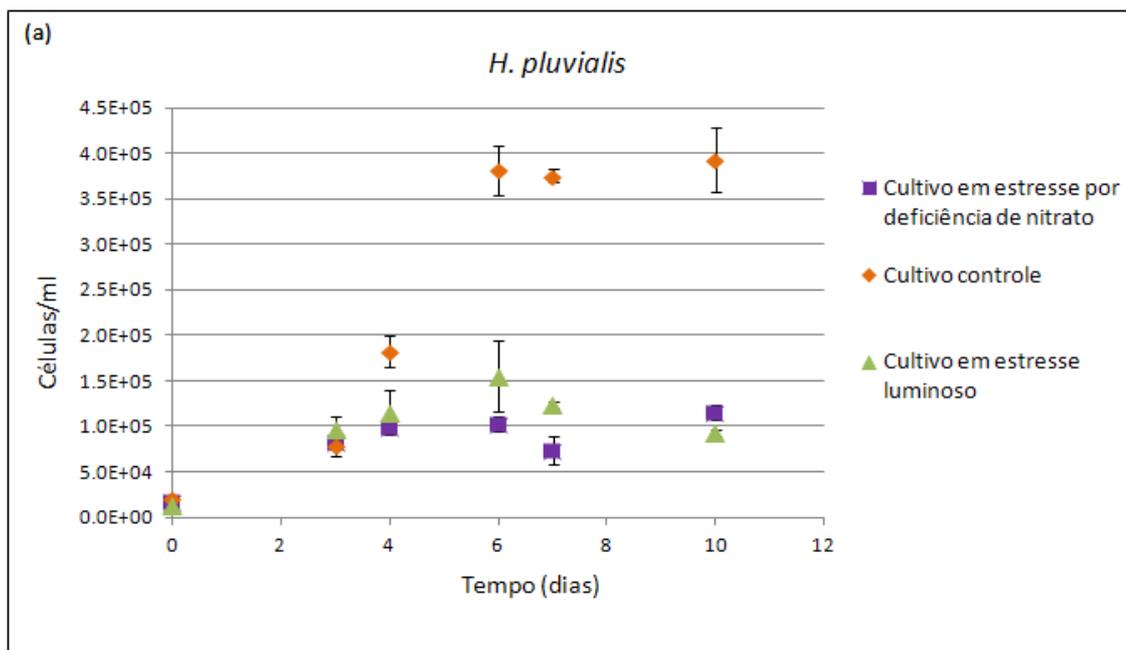


Figura 5.3- Imagens da *D. salina* nos ensaios no sexto dia de cultivo. Em (a), (b) e (c) os cultivos controle, EDN e EL, respectivamente. Em (d), (e) e (f) imagens das células da microalga também nas respectivas condições de cultivo.

Em relação ao acompanhamento do pH Figura 5.1 (b), os valores referentes ao mesmo nas três condições de cultivo não ultrapassaram de 9,2, e este aumento do pH para valores acima de 8,0 decorre do consumo natural de CO₂ no meio, tornando-o mais alcalino (LOURENÇO, 2006a). O pH mais alto foi conseguido pelo cultivo submetido a elevada intensidade luminosa, podendo considerar que o maior número de células possibilitou o aumento do consumo do CO₂ dissolvido no meio conduzindo a uma elevação do pH da cultura. Porém, o valor do pH enquadrou-se dentro dos limites ótimos, considerado adequado para o crescimento das microalgas podendo variar entre 7,5-9,0, no caso da *D. salina*, podendo chegar a faixa de 5,5 e 10 (KHALIL *et al.*, 2010). Pôde-se notar também que no cultivo deficiente em nitrato, não houve um aumento considerável dos valores do pH, isso pode ser justificado por que a presença deste íon no meio tende a torná-lo mais alcalino (LOURENÇO, 2006b).

5.1.2 *Haematococcus pluvialis*

Abaixo na Figura 5.4, são apresentados os gráficos relativos às curvas de crescimento da microalga *H. pluvialis* em cada condição de cultivo, referentes ao número de células em função do tempo, representando a média das contagens celulares das réplicas.



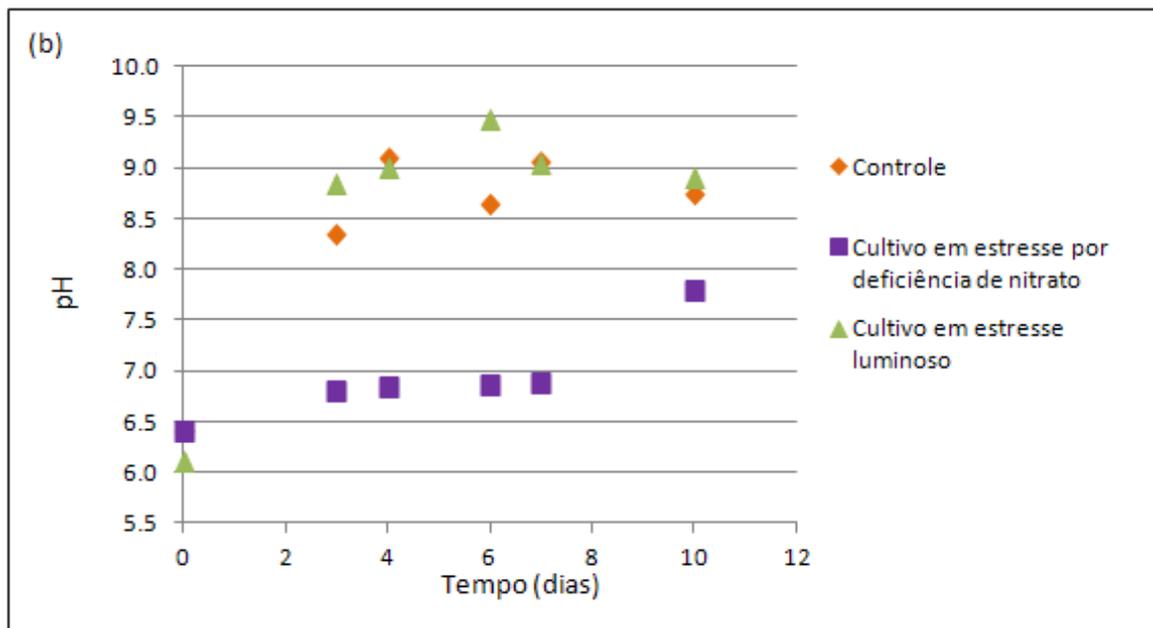


Figura 5.4 – Em (a) gráfico com as curvas de crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em diferentes condições de cultivo. . Em (b) Gráfico com o acompanhamento do pH em função dos dias em cada condição.

Na Figura 5.4 em (a), pode ser observado o crescimento do cultivo controle o qual obteve no sexto dia $3,82 \times 10^5$ células/mL, existindo pouca variação no número de células nos dias posteriores, podendo considerar que a partir deste dias o cultivo atingiu a fase estacionária. A densidade celular máxima atingida neste cultivo foi de 3.92×10^5 células/mL, no décimo dia.

Também foi possível notar que no cultivo deficiente em nitrato, não houve aumentos significativos no número de células. Após as 72h da inoculação até o sétimo dia o número de células oscilou entre $8,25 \times 10^4$ e $7,33 \times 10^4$ células/mL. A densidade máxima do cultivo foi atingida no último dia de $1,15 \times 10^5$ células/mL. Como esperado, a ausência do nitrogênio no meio de cultura exerceu o mesmo efeito no número de células daquele observado na microalga *D. salina*, retardando de forma significativa o crescimento das células. Apesar da falta do nitrogênio ser um fator limitante para o crescimento da biomassa, no cultivo da *H. pluvialis* a ausência deste elemento também pareceu ser o fator de indução que mais rápido levou à produção de astaxantina, sendo observada a presença do pigmento nas células já no terceiro dia de cultivo, possibilitando a mudança da coloração do meio (em todas as réplicas) em menos tempo, quando comparado com o cultivo em estresse luminoso, como pode ser visto na Figura 5.5.

O cultivo mantido em elevada intensidade luminosa obteve o maior número de células no sexto dia, que correspondeu também à densidade celular máxima alcançada de 1.55×10^5 células/mL. No entanto, a partir do sétimo dia houve uma redução no número de células, tendo uma maior queda no décimo dia, o que pode ser conseqüência do cultivo já ter alcançado o seu limite de exposição à luz e que a mesma estivesse atuando de forma negativa no crescimento das células.

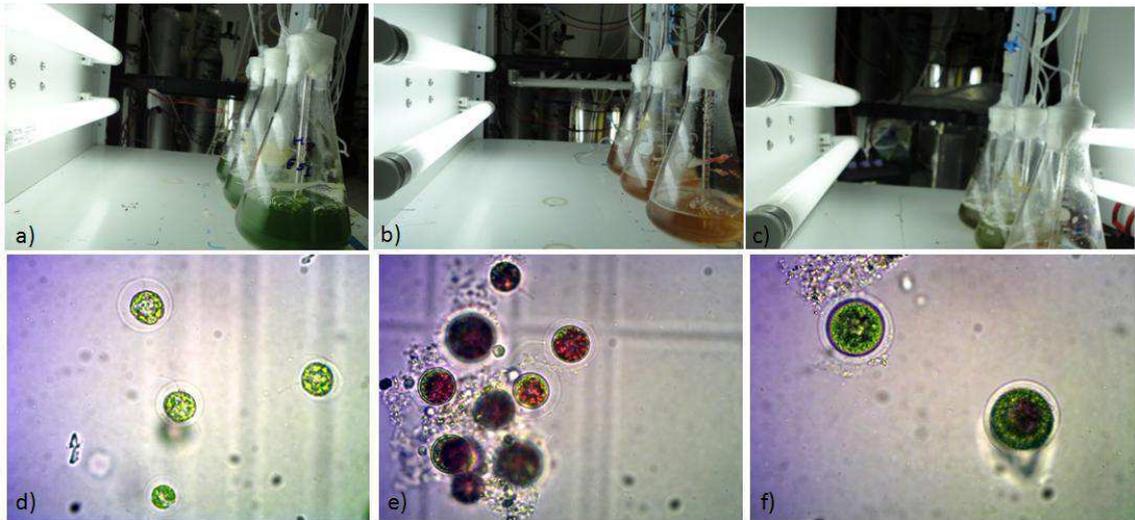


Figura 5.5 - Imagens da *H. pluvialis* nos ensaios no sexto dia de cultivo. Em (a), (b) e (c) os cultivos controle, EDN e EL, respectivamente. Em (d), (e) e (f) imagens das células da microalga também nas respectivas condições de cultivo.

De maneira semelhante a partir dos valores de taxas de crescimento, pode-se considerar que de certa forma o excesso de luz desempenhou um efeito adverso no crescimento das células, como pode ser visto na Figura 5.6

O cultivo mantido em estresse luminoso obteve um valor de 0,42 células/mL/dia, sendo este um pouco menor do que esperado, ficando abaixo do valor obtido pelo cultivo controle.

Quando mantido em elevada intensidade luminosa era esperado que a taxa instantânea de crescimento do cultivo da *H. pluvialis* fosse maior quando comparada com as outras condições, pelo fato da luz mais intensa condicionar um crescimento mais acelerado resultando em maior número de células.

Como visto anteriormente, no cultivo no qual a *D. salina* foi submetida ao estresse por deficiência de nitrato, a ausência deste nutriente também exerceu uma grande influência na taxa de crescimento, sendo o mesmo efeito observado para a

microalga *H. pluvialis* que obteve um aumento da densidade do cultivo de apenas 0,30 células/mL/dia.

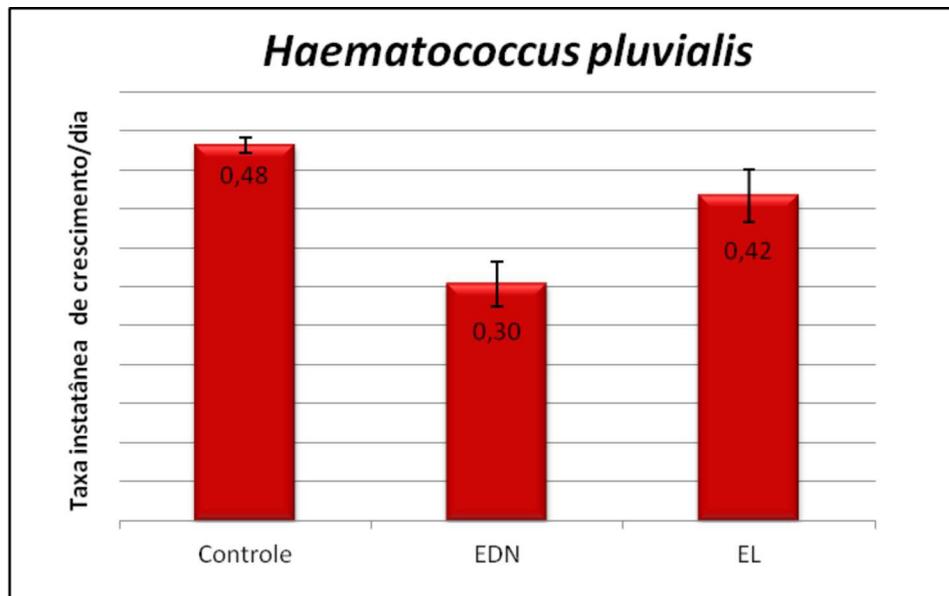


Figura 5.6- Gráfico com as taxas instantânea de crescimento (células/mL/dia) da microalga *H.pluvialis* no controle e nas condições de estresse. EDN - Estresse por falta de nitrogênio; EL - Estresse luminoso.

Porém, de acordo Richmond (2004) uma vez atingida a densidade celular máxima, a massa de células mantém-se em um valor constante, até que algum substrato no meio de cultura torna-se excessivamente baixo, ou que a luz, alternativamente, desempenhe uma atividade inibitória ao crescimento celular. Assim, a partir dos resultados foi observado que após alcançado o ponto máximo de crescimento, a manutenção do cultivo sob elevada intensidade luminosa, não resultou no aumento adicional na taxa de crescimento, mas sim tornou-se prejudicial acarretando na redução da taxa de crescimento.

A exposição do cultivo por um tempo prolongado à luz excessiva pode resultar numa depressão da taxa fotossintética induzida pela luz intensa que se manifesta como uma diminuição do rendimento quântico máximo da fotossíntese, um processo denominado de fotoinibição (VONSHAK e TORZILLO, 2004).

Em resposta ao excesso de luz durante o período de cultivo foram feitas duas outras observações. Primeiramente, foi notado que no sexto dia de exposição à elevada intensidade luminosa, já era possível visualizar microscopicamente, a formação de cistos celulares com o espessamento da parede celular das microalgas em duas das réplicas, acompanhado pela mudança da gradativa da coloração do

cultivo para tom amarronzado, pela presença de células ainda verdes e células com a cor vermelha, característica da produção de astaxantina pela *H. pluvialis*, como pode ser visto na Figura 5.5 (f). No entanto, a mudança da coloração dos meios foi mais tardia em relação ao cultivo em estresse por deficiência em nitrato.

O processo de encistamento e síntese de astaxantina pela *H. pluvialis* foi observado também por Galvão (2011), que notou que apesar do valor alto na taxa de crescimento para tal microalga quando cultivada em elevada intensidade luminosa, este crescimento acelerado não implicou em um aumento na produtividade de biomassa, pois a alta intensidade de luz desfavoreceu o crescimento vegetativo e beneficiou o acúmulo de astaxantina.

Resultados semelhantes foram descritos por Zhang e colaboradores (2009), que atestaram um aumento no acúmulo de astaxantina em elevadas intensidades luminosas causado por mudanças do metabolismo celular, o que implicou em uma alteração no crescimento das microalgas, diminuindo dessa forma a produção da biomassa final.

No acompanhamento dos valores de pH durante realização dos experimentos observado na Figura 5.4 (b), notou-se que o valor máximo desse parâmetro físico-químico foi conseguido pelo cultivo em estresse luminoso que atingiu o pH de 9,5 no sexto dia de cultivo. Dessa forma, pode-se levar em conta que uma maior intensidade de luz favorece o processo da fotossíntese, elevando pH devido ao consumo de CO₂ no meio, fato também observado durante os experimentos da *D. salina*.

Considerando que a espécie *Haematococcus pluvialis*, normalmente, cresce de maneira satisfatória em culturas com pouco sal e com pH ideal em torno de 7,0 - 8,0 (SARADA *et al*, 2002; ZHANG *et al.*, 2009), em trabalho recente realizado por Galvão (2011) foi observado que quanto mais alta a luz incidente no meio, mais rapidamente ocorreu o aumento do pH, o que desfavoreceu o crescimento vegetativo das células, resultando no aumento da produção de astaxantina nas células da *Haematococcus pluvialis*.

De forma semelhante, quando mantida a faixa de pH inicial de 6,0 -7,0 esta microalga apresentou os melhores resultados de velocidade de crescimento e produtividade média (GHIGGI, 2007). Em resultados apresentados por este mesmo

autor, quando a *H. pluvialis* foi mantida em meios com pH 8,0 e 9,0, eles foram os primeiros a apresentar produção de astaxantina com rápida degradação da clorofila.

No presente trabalho, a produção de astaxantina pelas células da *H. pluvialis* foi observada quando o pH atingiu 9,5 no sexto dia de cultivo na condição de estresse luminoso. No terceiro dia de cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio em pH 7,0, já podia ser observada, microscopicamente, a presença de cistos celulares com acúmulo aparente de astaxantina, como visto na Figura 5.5 em (e).

5.2 ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Os géis de eletroforese foram feitos com as amostras obtidas através dos métodos de extração citados acima, precipitação com sulfato de amônio a 50% e quantificação de proteínas pelo método de Bradford. Os resultados abaixo mostram as imagens dos géis conseguidas por fotografia (câmera fotográfica digital Sony) para cada microalga, nas condições de cultivo especificadas na legenda. Para cada gel é mostrado o padrão de bandas desde o início até o último dia do cultivo, com a padronização da quantidade de proteína aplicada para cada dia, em 3µg.

5.2.1 Perfil protéico da microalga *D.salina*

As análises por eletroforese com as amostras do cultivo controle, no tempo-0, foram observadas a presença de bandas de 45, 36 e 29 kDa, que se repetiram ao longo dos dias de cultivo, como mostra a Figura 5.7 em (a). No terceiro dia foram observadas bandas com 10, 17, 78 e 97kDa que se tornaram mais fortes no último dia. No sexto dia foram notadas bandas com 90 e 95 kDa que se repetiram no décimo dia, onde também apareceram bandas de 62 e 87kDa. A *lane* do sétimo dia foi desconsiderada por não ser possível visualizar bandas definidas.

No cultivo em estresse por deficiência de nitrato, no tempo-0, bandas de 29 e 45 kDa estiveram presentes, Figura 5.7 em (b). No terceiro dia notou-se a presença de uma banda de 50kDa, que se manteve definida durante os outros dias de exposição ao estresse, como também a presença discreta de bandas com peso de 14 e de 84kDa, que se mantiveram nos outros dias, a primeira se tornando mais forte no décimo dia. No quarto dia bandas de 20, 66, 87, 90 e 95 kDa, aumentaram

sua intensidade, a qual foi mantida até o final do cultivo. As três primeiras também foram observadas no último dia do cultivo controle. Bandas de 58 e 60 kDa apareceram apenas depois do sétimo dia de cultivo.

No cultivo em estresse luminoso Figura 5.7 em (c), no tempo 0 foram observadas bandas com 29 e 45 kDa, que se mantiveram no decorrer dos dias. No quarto dia notou-se o surgimento discreto de uma banda próxima de 10 kDa que se tornou mais forte no sexto dia e outra banda com peso de 6.5kDa. No sexto dia, como dito, notou-se o aumento da expressão da banda de 10kDa, como também foram observadas bandas com peso de aproximadamente 50, 60 e 66 KDa. No sétimo dia, pode ser observada uma banda fraca em torno de 6,5 KDa, que se manteve da mesma forma no décimo dia. No último dia do cultivo foram observadas bandas com peso de 90 e 95 kDa, estas mais aparentes no quarto dia no cultivo em estresse de nitrogênio.

Podemos considerar que as bandas com peso de 90 e 95 kDa observadas no último dia do cultivo controle e na condição de estresse luminoso indiquem um aumento na expressão protéica em resposta a possível escassez de nutriente. Três bandas foram observados entre 55 e 66 kDa a partir do sexto dia no cultivo em estresse luminoso também vistas no quarto dia de cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio. A expressão de três bandas entre 55 e 66 kDa, apesar de aparecerem em tempos distintos nos cultivos em condição de estresse, parecem está relacionados a algum tipo de resposta a condições adversas de crescimento.

Foi observado que as bandas em torno de 29 e 45 kDa permaneceram presentes independente das condições de cultivo, podendo considerar a expressão das mesmas como característica comum da microalga.

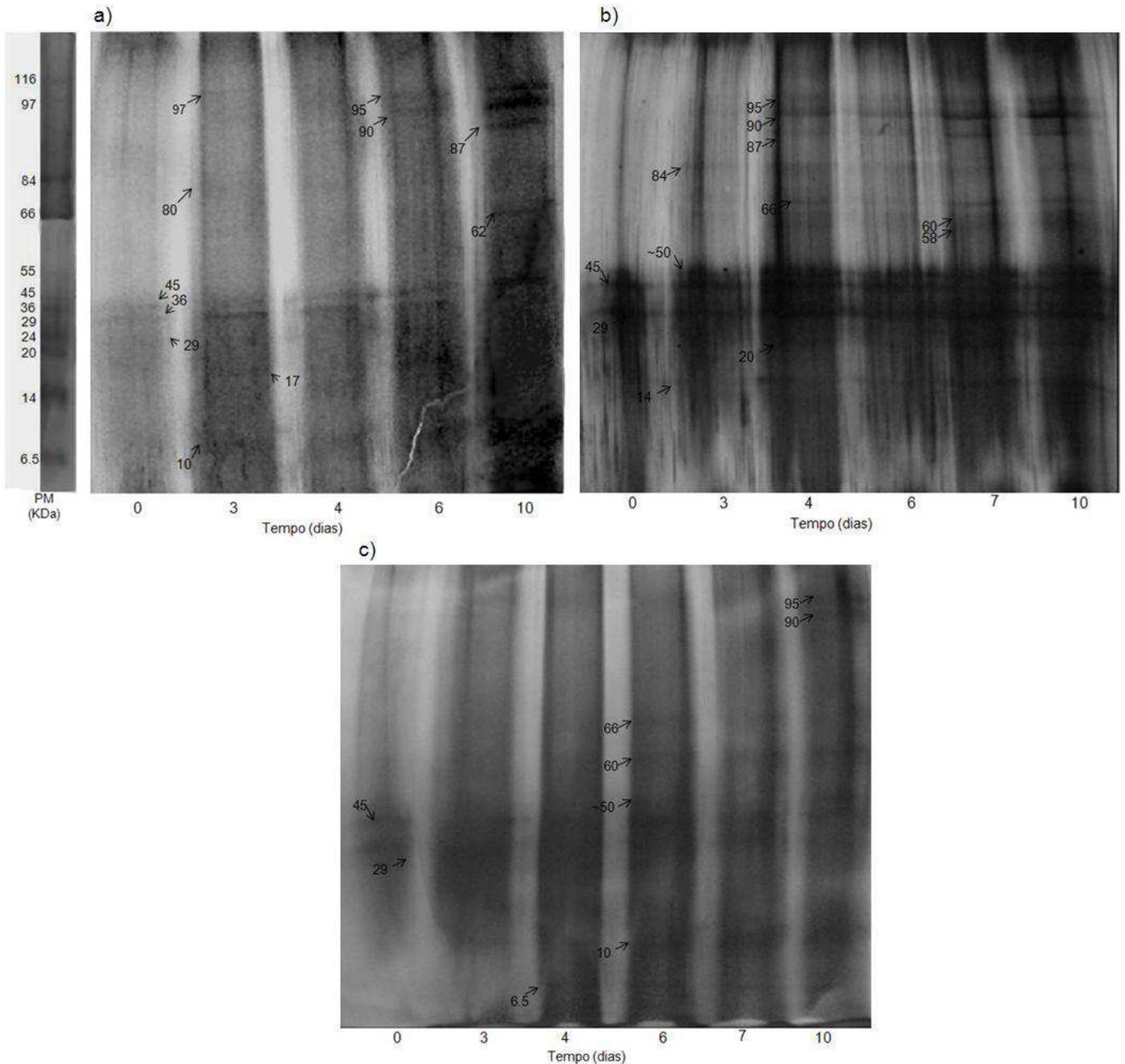


Figura 5.7 – Imagens obtidas através das análises de eletroforese das proteínas extraídas da *D. salina*. Em (a) perfil protéico do cultivo controle em função dos dias de cultivo; em (b) perfil protéico do cultivo EDN; em (c) perfil protéico do cultivo EL. As setas com os números indicam os pesos moleculares estimados em KDa.

Bandas com pesos em torno de 87, 90 e 95 kDa, podem estar relacionadas a um tipo de resposta a escassez de nutriente no meio, uma que vez apareceu no último dia do cultivo controle e em estresse luminoso, porém no cultivo em que houve a privação do nitrato, esse padrão de banda esteve presente desde o quarto dia de cultivo tendo sua expressão aumentada no último dia.

Considerando-se os dados obtidos no trabalho desenvolvido por Liska (2003), a partir da análise de proteínas de *Dunaliella* sp. por espectrometria de massa, pode-se comparar alguns resultados com os conseguidos no presente trabalho. Segundo o autor, as proteínas em torno de 60 kDa (observada nos últimos dias de cultivo em ambos os tipos de estresse, em nosso estudo) e 29, 36 e 45kDa (observadas em todos os cultivos no tempo 0), podem estar relacionadas com o processo de aquisição de carbono na *D. salina*. No entanto proteínas com 58 e 60 kDa na *D. salina*, também presentes nos últimos dias dos cultivos em estresse no nosso trabalho, podem estar envolvidas em processos energéticos e na biosíntese ou degradação protéica. Proteínas de 66kDa podem ser consideradas como participantes da biosíntese de amido e na via das pentoses-fosfato. De acordo com Liska (2003), bandas com pesos em torno de 97, 95, 90 (as duas últimas presentes nos últimos dias, em ambas as condições de estresse, em nosso estudo) e 87 kDa, podem representar proteínas que façam parte do grupo das chaperonas, com possíveis indicações de serem HSPs.

Shen e Lee (1997), notaram que a expressão de uma HSP de 27kDa só pôde ser encontrada na célula da *Chlorella* quando submetida ao tratamento sob a temperatura de 45°C durante 30 min, sugerindo a possibilidade de que a HSP de 27kDa em *Chlorella* possa estar também ligada a proteção aos danos causados pela alta temperatura. Apesar de ser de um gênero diferente, mas pertencente às Chlorophyta, é possível que a presença das bandas abaixo de 20kDa presentes na *D. salina* nos cultivos em estresse possam também ser consideradas como HSPs. Como mostrado na Figura 5.7 (a), a banda de com peso em torno de 10kDa esteve presente no cultivo controle desde o terceiro dia até o último, onde se tornou mais forte. Esta mesma banda foi observada a partir do sexto dia no cultivo em estresse luminoso, onde provavelmente a luz condicionou maior crescimento celular resultando em maiores quantidades desta possível HSP.

Considerando que a multiplicidade da família 20 das HSPs seja muito variável entre diferentes organismos, a síntese de pequenas HSPs provavelmente está restrita a condições que compartilhem a necessidade de células especializadas em diferentes fases de desenvolvimento ou em estados de estresse (WATERS, LEE e VIERLING, 1996). As pequenas HSP são uma classe diversa de proteínas que diferem das outras famílias de HSP de maneira que apenas curtas sequências na

fração N-terminal são conservadas. Dentre as características comuns entre elas estão o baixo peso molecular (15-24kDa) e a função de chaperonas *in vitro* (EHRNSPERGER, GAESTEL e BUCHNER, 2000).

A microalga *D. salina* também pode expressar cascatas de MAPKs (Mitogen-activated protein kinase) que desempenham papéis importantes no desenvolvimento, proliferação e diferenciação de todos eucariontes sob estresses biótico e abiótico (LEI *et al*, 2011). A presença das MAPKs foi confirmada em estudo também realizado por Lei e colaboradores (2008), que isolou e caracterizou o gene da MAPK proveniente da *D. salina* e a partir dele conseguiu prever a codificação de uma proteína com 53KDa. Neste mesmo trabalho observou-se o nível de expressão da MAPK na *D. salina* em resposta a baixa temperatura e ao estresse hiperosmótico, concluindo que o nível de expressão MAPK diminui gradualmente desde o início do estresse.

Partindo do pressuposto que a banda encontrada em torno de 50kDa possa ser algum tipo de MAPK, pode-se considerar que nas condições de estresse por nitrogênio, esta foi expressa no início da exposição, aumentando de forma discreta a sua expressão no decorrer dos dias. Já no cultivo submetido ao excesso de luz, notou-se a expressão dessa possível proteína no sexto dia de indução ao estresse, de forma discreta. Assim, pode-se deduzir que, a partir do sexto dia da exposição prolongada ao excesso de luz, é possível estar havendo uma resposta metabólica, ao nível de expressão protéica, ao estresse. Já no caso do cultivo deficiente em nitrogênio essa mudança no perfil protéico foi iniciada logo nos primeiros dias, possivelmente, como forma das células alterarem seu metabolismo para se desenvolverem em um meio pobre em nitrogênio. Essa resposta pode estar associada ao processo de produção de β -caroteno pela microalga, uma vez que a presença do pigmento nas células e a mudança da coloração do meio ocorreram por volta desses dias.

O nível de expressão da quinase do tipo MAP em *D. salina* foi afetado por mudanças de temperatura e salinidade, como observado por Lei e colaboradores (2008), condições que também influenciam o acúmulo de β -caroteno, porém a produção do pigmento não foi abordado neste estudo. No entanto, a confirmação da expressão dessas proteínas nas condições de estresse trabalhadas fica como

sugestão para o desenvolvimento de estudos futuros em que possam ser realizadas análises mais detalhadas, como por espectrometria de massa e que também permita estabelecer se existe relação entre a presença da MAPK ou de outras quinases no mecanismo de carotenogênese da *D. salina*.

5.2.2 Perfil protéico da microalga *H. pluvialis*

De acordo com a interpretação dos géis obtidos pelas análises eletroforéticas, pode se considerar que quando cultivada em condições ideais para seu crescimento, representado pelo gel do cultivo controle, foi possível observar que do primeiro até o último dia foi observado bandas de proteínas com pesos moleculares em torno de 27, 29, 45 e 50kDa (esta última não muito bem definida), apresentada na Figura 5.8 em (a). No terceiro dia de cultivo observou-se uma banda acima de 116 kDa que nos dias seguintes tornou-se menos aparente, com possível diminuição da expressão. No sétimo dia notou-se uma banda em torno de 95 kDa, mantida também no último dia.

No gel em que foram aplicadas amostras do cultivo em estresse por deficiência em nitrogênio, do primeiro até o último dia foi observado um padrão de bandas de proteínas com pesos moleculares de 20, 29, 45, 50 kDa, e em torno de 17kDa. Como também bandas de 6.5kDa e em torno de 5.5kDa, Figura 5.8 (b). As cinco primeiras bandas mencionadas acima se mantiveram durante os outros dias, porém aparentando uma redução da sua expressão. As duas bandas de 6.5 e 55 kDa foram visualizadas de forma reduzida até o sexto dia (exceto no quarto dia em que a *lane* encontra-se desfocada), não estando presente nos dois últimos dias.

Na condição de estresse luminoso, os resultados da análise por SDS-PAGE, mostraram que apesar de não muito bem definidas as bandas de 29, 45 e 50kDa estiveram presentes no primeiro dia (dado não mostrado), sendo melhor visualizadas nos dias seguintes, como pode ser visto na Figura 5.8 (c). Ainda no primeiro dia destacaram-se duas bandas com peso molecular de 6.5kDa e em torno de 5.5kDa com forte expressão, também visualizada no terceiro dia, mas que reduzia sua expressão nos dias subsequentes. A partir do quarto dia foram notadas duas bandas com peso molecular de 17 e 20 kDa que se mantiveram até o último

dia, podendo está relacionado a algum tipo de resposta ao tempo excessivo à elevada luminosidade.

Comparando-se os perfis protéicos observados em cada condição de cultivo, foi observado que as bandas com pesos em torno de 50, 45 e 29KDa, foi comum a todos os géis, podendo ser proteínas expressas pela microalga independente da condição de cultivo. A banda de 95KDa, foi apenas observada no cultivo controle nos últimos dias de cultivo. Uma banda acima de 116KDa, foi observada no cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio e no cultivo controle, aparentando neste último uma possível diminuição da expressão protéica.

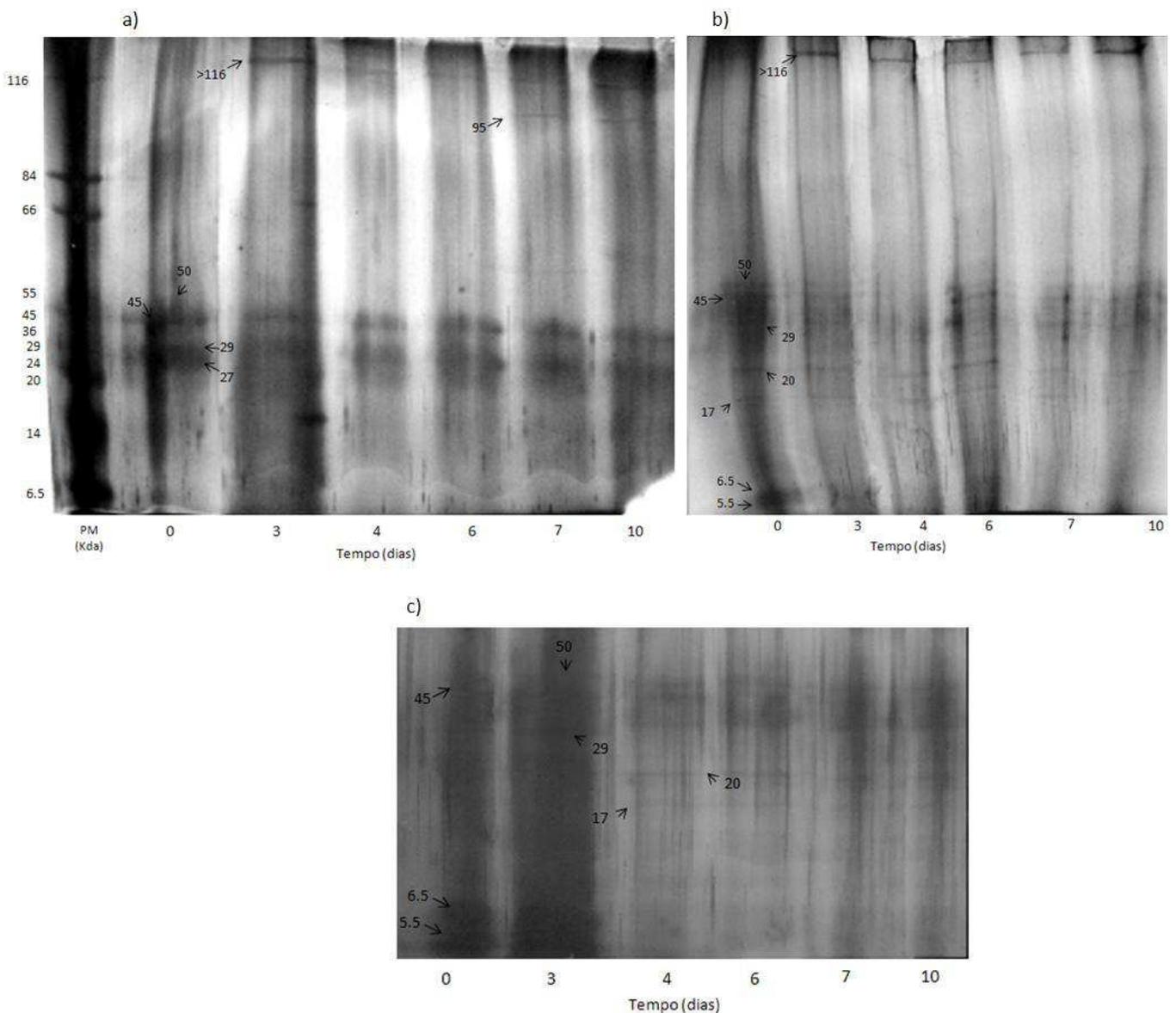


Figura 5.8 – Imagens obtidas através das análises de eletroforese das proteínas extraídas da *H. pluvialis*. Em (a) perfil protéico do cultivo controle em função dos dias de cultivo; em (b) perfil protéico do cultivo EDN; em (c) perfil protéico do cultivo EL. As setas com os números indicam os pesos moleculares estimados em KDa.

Os cultivos em condições de estresse tiveram em comum a presença das bandas de 17 e 20 kDa, sendo que no cultivo em que o nitrogênio esteve ausente, essas bandas foram visualizadas no início do cultivo. Já em condições de estresse luminoso elas só se tornaram aparentes no quarto dia quando possivelmente, este fator já estava exercendo algum efeito no metabolismo protéico das células. As bandas de 6.5 e 5.5 kDa também estiveram presentes em ambas condições de estresse, sendo igualmente expressas no primeiro dia (mais forte no estresse luminoso) e com a redução da expressão nos dias subsequentes. É possível que esses dois fatores atuem de forma a reduzir a expressão de tais proteínas em função do tempo de exposição ao estresse.

Em resultados publicados por Tran e colaboradores (2009), foi possível observar o perfil protéico da microalga *H. lacustris* após 1 h de indução ao estresse por excesso de luz combinado à depleção de nitrogênio, por SDS-PAGE. Entre as proteínas identificadas, seis foram apontadas com expressão aumentada no período de uma hora, mantendo-se assim até seis horas após a indução e, depois desse período, cinco proteínas diminuíram sua expressão, sendo algumas delas de 17, 21 e 23kDa.

Bandas com pesos moleculares próximos a 17, 21 e 23kDa, foram observadas no cultivo da *H. pluvialis* em estresse por deficiência de nitrogênio no primeiro dia (tempo-0), tornando-se mais fracas nos dias posteriores. No entanto, no cultivo em estresse luminoso, essas bandas só se tornaram aparentes no quarto dia, mantendo-se até o décimo. Por meio de análises de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, os mesmos autores observaram proteínas chaperonas com peso molecular em torno de 21,5 e 26,8kDa que tiveram sua expressão aumentada após a 1h de indução. Eles identificaram a primeira como uma HSP26.8 e a outra como uma glutathione peroxidase, ambas relacionadas com defesa ao estresse ou resposta ao estresse oxidativo. Considerando as condições de estresse semelhantes, porém tratadas de forma separada em nosso estudo, pode ser possível que a presença da banda de 20kDa nos cultivos em estresse luminoso e em estresse por privação de nitrogênio seja a chaperona mencionada. Somado a isso, acumulação celular de astaxantina pode estar relacionada com a presença desta proteína, já que observamos a mudança de coloração nas células para cada condição de cultivo em dias distintos.

Em resposta ao estresse oxidativo induzido pela adição de acetato e Fe^{2+} , combinado com a exposição ao excesso de luz, foram identificadas mudanças nos padrões de expressão de proteínas na microalga *H. pluvialis*, em trabalho desenvolvido por Wang e colaboradores (2004). Foram identificadas proteínas de 116kDa, que tiveram sua expressão diminuída em função do tempo de exposição ao estresse oxidativo. Comparativamente aos resultados obtidos no presente trabalho, foram observadas bandas em torno de 116kDa tanto cultivo controle como no cultivo em estresse por falta de nitrogênio. Porém, no controle foi observada uma tênue redução da expressão com o passar dos dias.

Proteínas com peso próximo a 95kDa, que tiveram sua expressão pouco significativa nos primeiros dias de estresse oxidativo, mas que depois tiveram o aumento da expressão no estudo de Wang e colaboradores (2004), foram observadas no presente trabalho, porém no cultivo controle em que essa banda tornou-se visível no sétimo e no décimo dia. Ainda de acordo com este autor, proteínas de 52kDa foram consideradas como a subunidade grande da Rubisco, cujos níveis de expressão foram alterados sob estresse. Em nosso trabalho bandas em torno 50kDa foram observadas em todas as condições de cultivo da *H. pluvialis*, sendo observadas alterações nos cultivos em estresse, nos quais ocorreu a redução de sua expressão. Também foi identificada por Wang e colaboradores (2004) a presença de uma possível HSP-like de 22 kDa, podendo ser semelhante àquela encontrada por Tran e colaboradores (2009) com 21.5KDa na *H. lacustris*.

No desenvolvimento do presente estudo, em que foram trabalhadas as condições de estresse luminoso e estresse por privação de nitrogênio, separadamente, foi possível observar como cada um desses fatores pode interferir no crescimento da *H. pluvialis*, levando ao desenvolvimento de sistemas de defesa a nível proteico para lidar com o estresse gerado nas células e que, em última análise, induz a produção de astaxantina. Embora existam muitos trabalhos que extensivamente afirmem a capacidade que as células de *Haematococcus* possuem de desenvolver sistemas de defesa em resposta a condições de estresse, tais mecanismos ainda são pouco compreendidos a nível molecular.

Metodologias para um rompimento eficiente da parede celular da microalga *H. pluvialis* na sua forma de cisto continuam sendo o grande foco para muitos estudos,

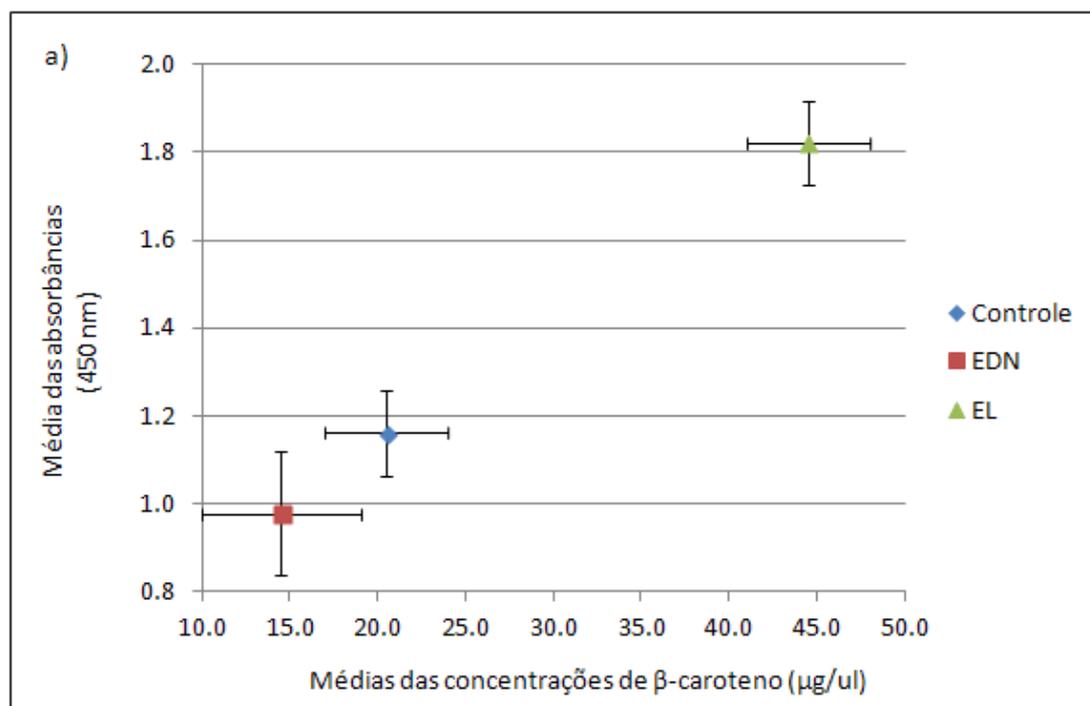
alguns já baseados na proteômica da parede celular e na modificação genética da microalga.

5.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS

Para realizar a extração dos pigmentos carotenóides contidos nas microalgas *D.salina* e *H.pluvialis* foi seguido o método Sedmak (1990) com algumas modificações. Através da construção de uma curva padrão para cada um dos pigmentos foi possível quantificar o total de β -caroteno e a astaxantina produzidos pelas microalgas após o final do tempo de cultivo para cada condição trabalhada.

5.3.1 Produção de β -caroteno a partir da *Dunaliella salina*

A produção de β -caroteno pela microalga *Dunaliella salina* em cada condição de cultivo é apresentada após o processo de extração e quantificação do pigmento. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.9, onde (a) refere-se às médias das absorvâncias (à 450nm) em função das médias das concentrações ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtidas para cada condição de cultivo, a partir das réplicas. Em (b), é mostrado a produção do pigmento destacando-se o número de células presentes em cada condição de cultivo.



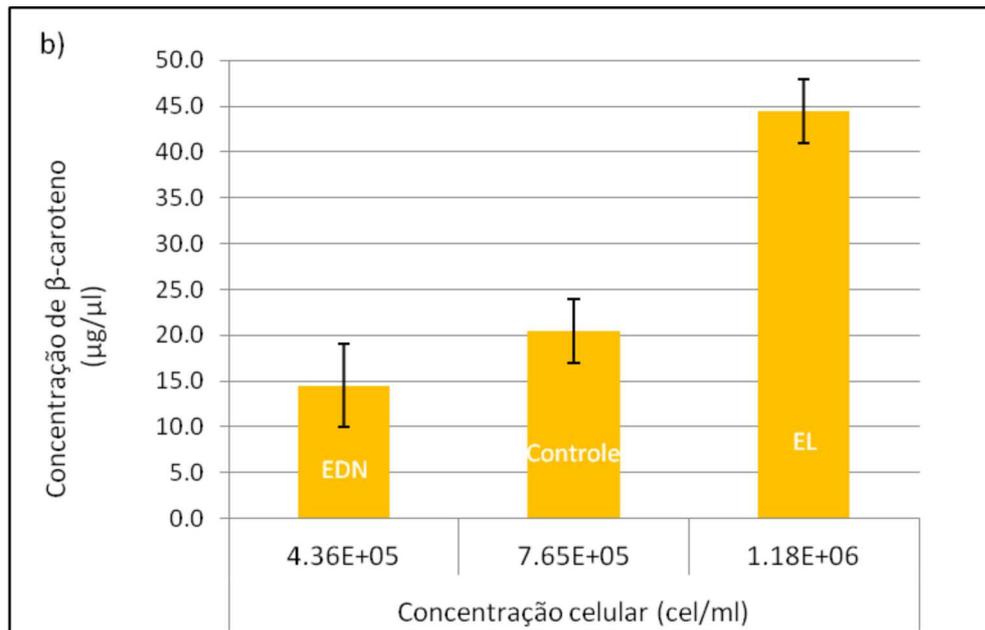


Figura 5.9 – Gráficos com as médias das absorvâncias obtidas em função das médias das concentrações de β-caroteno, em (a). As concentrações do pigmento em cada condição com respectivos números de células/mL, em (b).

A partir dos resultados puderam ser feitas duas observações. Primeiramente, a partir da análise dos dados por ANOVA realizada pelo software Microsoft Excel, considerando valor-p ≤ 0.05 como significativos, foi constatada que existiu uma diferença significativa entre concentrações de β-caroteno obtidas nas distintas condições de cultivo. No entanto, pelo teste-t, considerando um intervalo de 95% de confiança, essa diferença nas concentrações do pigmento foram significativas quando comparadas as concentrações obtidas entre cultivo em estresse luminoso com o controle, valor-p de 0.024, e entre a quantidade de pigmento conseguida pelo cultivo em estresse por deficiência em nitrato com o cultivo em estresse luminoso, valor-p de 0.020 (Ver Anexo C).

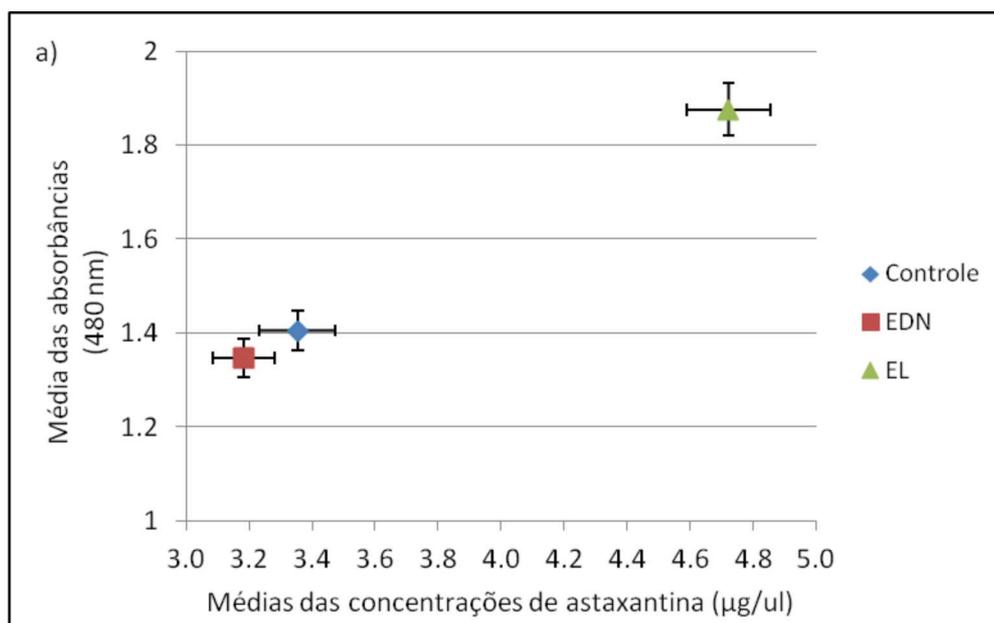
Logo, a produção de β-caroteno no cultivo em estresse luminoso foi mais expressiva em relação aos outros, na Figura 5.9 em (b), pôde-se constatar que o cultivo em elevada intensidade luminosa foi que conseguiu maior número de células, como mencionado anteriormente, justificando essa maior concentração do pigmento. Também foi constatado que o uso da metodologia de extração descrita por Sedmak (1990) foi satisfatória, sendo possível obter o esgotamento da cor da biomassa em todos os ensaios de extração, repetindo apenas uma vez o processo. Assim, uma vez que essa metodologia já havia sido testada por Ghiggi (2007) para extração de astaxantina a partir da *H. pluvialis*, pelos resultados obtidos e no desenvolvimento do

processo de extração neste trabalho, pode-se considerar aplicável o uso deste método para extrair β -caroteno a partir da *D. salina*.

5.3.2 Produção de astaxantina pela *Haematococcus pluvialis*

Na Figura 5.10, são apresentados os resultados referentes à produção de astaxantina pela microalga *Haematococcus pluvialis* em cada condição de cultivo através do processo de extração e quantificação do pigmento. Em (a) na Figura 5.10, podem ser visualizados os resultados referentes às médias das absorvâncias (à 480nm) em função das médias das concentrações ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtidas para cada condição de cultivo, a partir das réplicas. Em (b), é mostrada a produção do pigmento de acordo com o número de células presentes, em cada condição de cultivo.

Partindo das mesmas análises de dados, considerando valor- $p \leq 0.05$ como significativos, foi constatado que houve uma diferença significativa entre concentrações de astaxantina obtidas nas diferentes condições de cultivo. No entanto, pelo teste-t, considerando um intervalo de 95% de confiança, essa diferença deve-se considerada apenas na comparação entre as concentrações conseguidas pelo cultivo controle com a do cultivo estresse luminoso, com valor- p de 0.01, e deste com cultivo em estresse por deficiência em nitrato, com valor- p de 0.008 (Ver Anexo C).



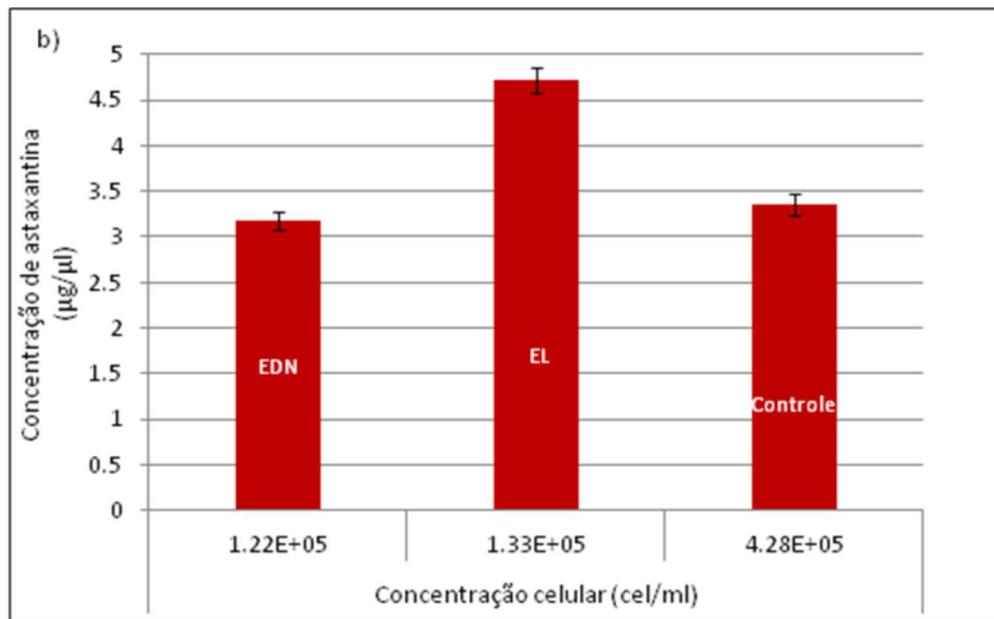


Figura 5.10 – Gráficos com as médias das absorvâncias obtidas à 480 nm, em função das médias das concentrações obtidas de astaxantina, (a). Médias das concentrações do pigmento em cada condição, com respectivos números de células/mL, (b).

Assim, pode-se considerar que a produção de astaxantina no cultivo sob estresse luminoso foi mais expressiva em relação aos outros, pois mesmo com o número de células inferior ao controle, o cultivo com alta intensidade luminosa obteve maior concentração do pigmento. No entanto, é importante ressaltar que o cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio foi aquele em que, microscopicamente, observou-se mais rapidamente a formação dos cistos em *H. pluvialis* com acúmulo de astaxantina no interior das células.

BOUSSIBA e colaboradores (1999), em trabalho realizado com a microalga *H. pluvialis*, analisaram por HPLC alterações no perfil de pigmentos durante período de privação de nitrogênio, observando no primeiro dia de exposição ao estresse a presença de um pico para β -caroteno no cromatograma. Em segunda análise, em que o tempo de exposição foi de 14 dias, este pico não estava mais presente, prevalecendo picos de ésteres de astaxantina. Assim, considerando que a via de síntese da astaxantina envolva o β -caroteno em uma das etapas, optou-se em quantificar também a produção deste pigmento na *H. pluvialis*, avaliando a existência de variações das concentrações nos diferentes tipos de cultivo, como mostra a Figura 5.11.

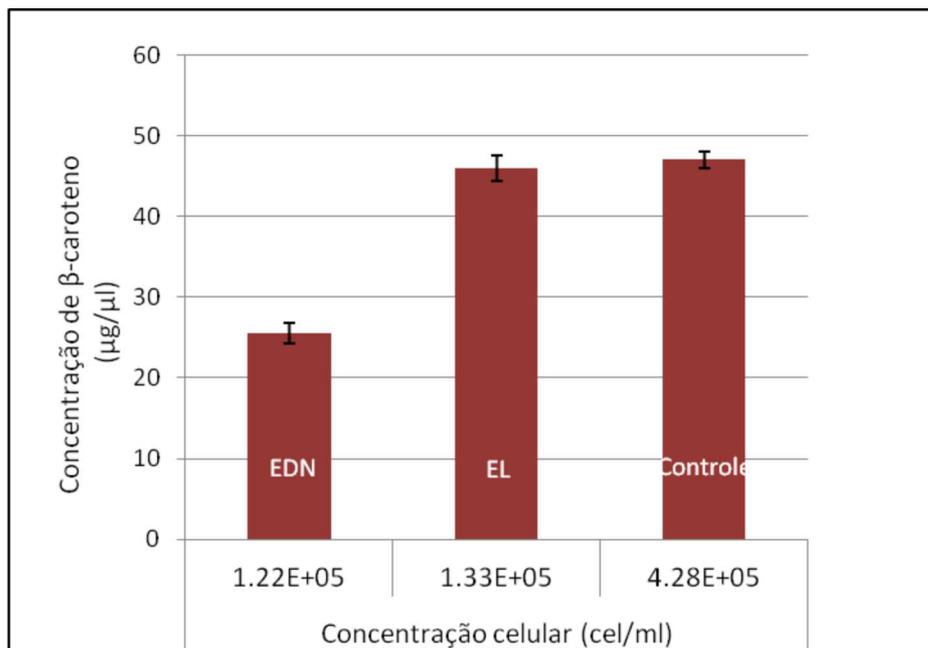


Figura 5.11- Gráfico com as concentrações de β-caroteno obtidas em cada condição de cultivo da *H. pluvialis*, com respectivos números de células/mL.

Sendo a concentração celular a mesma utilizada para comparação com a concentração de astaxantina, a partir das análises estatísticas dos dados observou-se diferença significativa para as concentrações de β-caroteno, porém quando foram comparadas as concentrações do pigmento no cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio com o controle e deste com o cultivo em estresse luminoso, com valor-p de 0.003 e 0.007, respectivamente (Ver Anexo C).

Para microalga *Haematococcus pluvialis*, não foi observada a mesma eficiência na extração, sendo necessárias 3 repetições do processo para que houvesse o clareamento da cor do pellet de células. Mesmo assim, nas amostras do cultivo em estresse luminoso e em uma réplica do cultivo em estresse por deficiência de nitrato, não foi possível obter um bom esgotamento da cor. Isto pode ser justificado pela formação de uma rígida parede celular na fase encistamento em resposta ao estresse, o que deve ter dificultado a extração.

Muitos autores consideram a mistura de outros solventes mais eficientes, como o caso do diclorometano:metanol (25:75v/v), para completa extração de ésteres de astaxantina, considerando essa mistura com maior pontencial extrator, seguida pela acetona (YUAN E CHEN, 2000). Porém, para realização desse trabalho optou-se pela utilização de acetona e DMSO pela baixa toxicidade e melhor

aplicabilidade em relação aos demais testados. O DMSO possui uma intensa capacidade de livre penetração através das membranas celulares, assim muitas substâncias quando associadas ao DMSO podem ser carreadas através de membranas. Dessa forma já foram verificadas mais de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a combinação molecular (SOJKA *et al*, 1990). Isso o torna mais aceitável para distintas aplicações nas indústrias de farmacologia, cosmetologia e na terapêutica.

Através da realização do processo de extração adotando tal metodologia, também se pode ratificar o procedimento realizado por Ghiggi (2007), já que em nosso estudo não se tornou necessário o pré-aquecimento do DMSO para extrair a astaxantina, evitando dessa forma a possível degradação do pigmento, o que consideramos ser uma padronização importante da técnica.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos na extração dos pigmentos, fica como sugestão para trabalhos futuros, o desenvolvimento de processos de purificação dos pigmentos extraídos das microalgas *H. pluvialis* e *D. salina*.

5.4 ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para confirmação de que, através do desenvolvimento da metodologia adaptada descrita por Sedmak (1990), houve a real extração dos pigmentos nas microalgas, foram feitas análises de cromatografia em camada delgada na qual foram utilizados os padrões de β -caroteno e astaxantina e os extratos dos pigmentos oriundos das microalgas *D. salina* e *H. pluvialis*. A interpretação dos resultados foi baseada na comparação do Rf da mancha obtida pelo padrão com o Rf das manchas das amostras dos pigmentos extraídos das microalgas. A Figura 5.12, mostra as placas de cromatografia em camada delgada das amostras dos pigmentos extraídos da *D. salina* em (a) e *H. pluvialis* em (b).

De forma qualitativa, os resultados mostram que ao comparar Rf das manchas formadas pelo padrão sintético com àquelas formadas pelas amostras dos pigmentos extraídos da microalga, a extração de β -caroteno a partir microalga *D. salina* foi satisfatória através da metodologia empregada, pois os perfis das manchas

são os mesmos para o padrão e para o extrato. O mesmo pode ser afirmado para astaxantina extraída da *H.pluvialis*, apesar do processo de extração para esta microalga ter sido mais dificultoso, necessitando de mais repetições do procedimento. Nota-se que não houve a presença de resíduos na origem da placas cromatográficas para as amostras provientes das microalgas. Apenas no padrão utilizado para astaxantina isso é observado, o que pode ser justificado por se tratar de uma ração para peixe, na qual a pureza do pigmento é desconhecida e ocorrendo também a presença de outras moléculas. Na Figura 5.13 são demonstrados os tubos de vidro com as amostras dos pigmentos extraídos das microalgas.

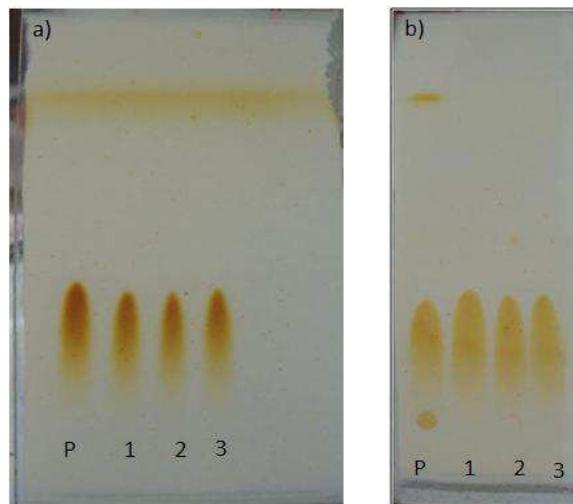


Figura 5.12 – Cromatograma das amostras dos pigmentos extraídos a partir das microalgas. a) amostras do β -caroteno extraído da *D.salina* e (b) amostras de astaxantina extraída da *H. pluvialis*. P – padrão; 1- cultivo controle; 2-cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio; 3- cultivo em estresse luminoso



Figura 5.13 – Amostras do β -caroteno extraído da *D.salina* (a), onde 1- cultivo controle; 2-cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio; 3- cultivo em estresse luminoso. Em (b) amostras de astaxantina extraída da *H. pluvialis*, onde 1- cultivo em estresse por deficiência de nitrogênio; 2- cultivo controle; 3- cultivo em estresse luminoso.

6. CONCLUSÃO

No desenvolvimento do presente trabalho foi possível acompanhar e observar o crescimento, a produção de pigmentos e o perfil protéico das microalgas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* quando cultivadas em condições ideais para seu crescimento e em condições de estresse provocado pela privação de nitrogênio nos meios de cultura e pela exposição do cultivo ao excesso de luz.

A partir da interpretação das curvas de crescimento e pelo cálculo das taxas instantâneas de crescimento, tornou-se claro que a ausência do macronutriente nitrogênio limita de forma significativa o crescimento celular, pela redução da frequência de divisões celulares, além da diminuição protéica e da clorofila. A luz, considerada um fator condicionante para a fotossíntese, atua até certo ponto favorecendo o aumento de células nos cultivos, no entanto, a exposição por um período prolongado ao excesso de luz pode desenvolver um efeito negativo ao crescimento, podendo levar a uma forte redução no número de células no cultivo, como foi observado para a microalga *H. pluvialis*. No entanto, foi observado que este fator não influenciou reduzindo o número de células no cultivo *D. salina*, No entanto, deve-se considerar que o tratamento considerado como estresse luminoso, concluiu-se que a iluminação aplicada foi ótima e não estressante uma vez que resultou em uma maior taxa de crescimento que pode ser justificado pela capacidade desta microalga de crescer em variadas condições ambientais. Foi também confirmado que o aumento da luz no meio, pode condicionar a alterações nos valores do pH e o acompanhamento e controle deste parâmetro no meio de cultivo é de grande importância, pois também pode influenciar no crescimento celular e condicionar a síntese de pigmentos.

Os resultados também mostraram que a luz foi o fator que induziu maior produção do pigmento. Deve-se considerar que a elevada intensidade luminosa possibilitou uma maior concentração celular, o que pode ter refletido no aumento da produção de β -caroteno. Com privação do nitrogênio no meio, o número de células no cultivo foi menor, como mencionado acima, conseqüentemente, a produção de β -caroteno pode ter sido influenciada por este fator. Porém, foi observado microscopicamente e visualmente, que a ausência desse elemento possibilitou a produção mais rápida do pigmento nas células, resultando na mudança precoce da cor do cultivo.

Diferentemente, a microalga *H. pluvialis* mesmo com menor número de células em comparação com o cultivo controle, o cultivo em estresse luminoso foi aquele que conseguiu maior concentração de astaxantina. No entanto, da mesma forma que no cultivo da *D. salina*, a ausência do nitrogênio no meio, culminou em um menor número de células, o que pode ter interferido na produção da astaxantina, mas foi este que também possibilitou a produção mais rápida do pigmento nas células, resultando na mudança da cor do cultivo. No desenvolvimento do presente trabalho, foi considerada a produção de β -caroteno pela *H. pluvialis*, sendo congruente maior concentração para este pigmento pelo cultivo controle, concluindo que esta microalga possa sintetizar β -caroteno em concentrações razoáveis quando mantidas em condições ideais, porém, isto também é possível em células em condições de estresse já que este pigmento é um precursor na síntese astaxantina. Desse modo, a acumulação astaxantina vai depender da natureza do estímulo imposto sobre às células da *H. pluvialis*.

Os dados conseguidos pelas análises de eletroforese demonstraram que bandas em torno de 29 e 45 kDa foram comuns às duas microalgas, independente das condições de cultivo. A microalga *D. salina* em ambas condições de estresse obteve a expressão de proteínas em torno de 50, 60, 66, 90 e 95 kDa, havendo possibilidade de que a presença destas bandas esteja relacionada a algum tipo de resposta aos estímulos. Sendo que primeira banda mencionada, possa estar relacionada a uma MAPK, já encontrada na *D. salina*. Na microalga *H. pluvialis* destacou-se a presença de bandas de 17 e 20kDa encontradas nas duas condições de estresse, possivelmente se tratando de pequenas proteínas de choque térmico (sHSP), como também foi notado a forte diminuição da expressão das bandas em torno de 5.5 e 6.5 kDa em função ao tempo em que a microalga foi exposta a cada fator. Ao comparar com resultados já publicados na literatura, a expressão de certos padrões de bandas nos cultivos em estresse luminoso e estresse por deficiência de nitrogênio podem ser indicativos HSPs de diferentes tipos, necessitando maiores estudos para discriminação entre elas.

É importante ressaltar que a ausência do elemento nitrogênio pode ter limitado de forma expressiva a síntese de proteínas, assim como a presença de uma rígida parede celular em resposta ao estresse luminoso pode ter dificultado o processo de extração de proteínas na microalga *H. pluvialis*.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Análise gráfica das bandas obtidas nos géis de eletroforese para uma melhor estimativa dos pesos moleculares obtidos;
- O uso de métodos que permitam isolar e identificar de forma mais eficiente as proteínas com expressão diferenciada, como por purificação em HPLC e sequenciamento protéico. Como alternativa, estaria o isolamento de bandas diretamente do gel e espectrometria de massa sem isolamento cromatográfico, o que é uma alternativa mais rápida;
- A pesquisa e a aplicação de metodologias que permitam a purificação dos pigmentos extraídos das microalgas;
- Pesquisar e desenvolver métodos que permitam a elaboração de produtos utilizando pigmentos extraídos de microalgas.

6.2 LIMITAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

- A dificuldade na extração das proteínas, principalmente em relação ao rompimento da rígida parede celular na *H. pluvialis* pode ser considerado um importante interferente na extração protéica.
- O volume da amostra coletado para a extração pode ter sido pequeno, pois se evitou que a retirada de alíquotas não interferisse na concentração celular, não ultrapassando assim o valor de 10% do volume total do cultivo.
- O método de Bradford apesar de ser barato, simples e amplamente usado na determinação de proteínas, pode subestimar as concentrações protéicas em algas para teores menores. Isso ocorre porque o azul brilhante de Coomassie liga-se a alguns aminoácidos carregados positivamente e a aminoácidos aromáticos, e a maioria das algas apresenta baixos níveis de dois aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano), bem como de dois aminoácidos positivamente carregados (lisina e histidina). Assim, a ligação do corante ocorre fundamentalmente com a arginina e fenilalanina.
- A qualidade das imagens dos géis pode ter sido influenciada por algumas limitações laboratoriais, as quais envolvem condições inadequadas de equipamentos e reagentes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. J. ;JORQUERA, O. . Cultivo mixotrófico da microalga *Dunaliella salina*, utilizando o melaço da cana-de-açúcar como fonte alternativa de carbono. **Rev. Magistra**, v. 11, p. 61 - 67, 2010.
- BECKER W. **Microalgae in human and animal nutrition**. In: Richmond A.(Ed) *Handbook of Microalgal Culture; Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, pp 380-391. 2004.
- BEN-AMOTZ, A.; KATZ, A.; AVRON, M. Accumulation of β -carotene in halotolerant alge: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (*Chlorophyceae*). **Journal of Phycology**, v. 18, n. 4, p. 529-537, 1982.
- BEN-AMOTZ, A. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species: *Dunaliella*. In: Richmond A.(Ed) *Handbook of Microalgal Culture; Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, pp 273-280. 2004.
- BENEMANN, J. R., Opportunities and Challenges in Algae Biofuels Production, 2008.
- BORGES, L. V. **Caracterização do potencial de absorção de carbono por microalgas**. 2005. 58 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Aquicultura Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313-321, 1999.
- BOROWITZKA, M. A.; HUISMAN, J. M.; OSBORN, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 4, p. 295-304, 1991.
- BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. **PHYSIOLOGIA PLANTARUM**, 2000.
- BOUSSIBA, S. et al. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. **Biotechnol Lett**, v. 21, n. 7, p. 601-604, 1999.
- BOUSSIBA, S.; FAN, L.; VONSHAK, A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. 213, p.386-391, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BROWN, M. R. et al. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, n. 3, p. 247-255, 1999.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. 25, 294–306, 2007.

- CHENG-WU, Z. et al. An industrial flat panel reactor for culture of *Nanochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). **Aquaculture**, 2001.
- CIFUENTES, A. S. et al. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. **Biol Res**, v. 36, n. 3-4, p. 343-57, 2003.
- COHEN, Z. Products from microalgae. In: Richmond A (Eds.), *Handbook of microalgal mass culture*. Boca Raton, 421-454, 1986.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia, um breve ensaio. Química Nova**, 7, 1998.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W., III. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2149-53, 2002.
- DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. 2006. 158 Tese (Doutorado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- EBENEZER, W. J.; PATTENDEN, G. cis-Stereoisomers of beta-carotene and its congeners in the alga *Dunaliella bardawil*, and their biogenetic interrelationships. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 16, p. 1869-1873, 1993.
- EHRNSPERGER, M.; GAESTEL, M.; BUCHNER, J. Analysis of chaperone properties of small Hsp's. **Methods Mol Biol**, v. 99, p. 421-9, 2000.
- FABREGAS, J. et al. Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, n. 5-6, p. 545-51, 2003.
- FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 243-82, 1999.
- FIELD, C.B., BEHRENFELD M.J., RANDERSON J.T, FALKOWSKI, P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **Science** 281, 237-240, 1998.
- GALVÃO, R. M. **Modelagem da produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis***. 2011. 77 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 1, p. 81-90, 2005.

- GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. 2007. 119 Dissertação (Mestrado). Pós- Graduação em Processos Biotecnológicos Universidade Federal do Paraná, Brasil.
- GIORDANO, M.; BEARDALL, J. Impact of environmental conditions on photosynthesis, growth and carbon allocation strategies of hypersaline species of *Dunaliella*. **Global NEST**, v. 11, n. 1, p. 79-85, 2009.
- GÓMEZ-PINCHETTI, J. et al. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (*Chlorophyceae, Dunaliellales*) in relation to β -carotene content. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 1, p. 11-15, 1992.
- GOUVEIA, L.; EMPIS, J. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 227-233, 2003.
- GROBBELAAR, J. U. Mineral nutrition. In: Richmond A.(Ed) *Handbook of Microalgal Culture; Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, pp. 93-115. 2004.
- GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Mar Drugs**, v. 9, n. 4, p. 625-44, 2011.
- GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 210-6, 2003.
- HALLMANN, A. Algal Transgenics and Biotechnology. **Transgenic Plant Journal**, v. 1, n. 1, p. 81-98, 2007.
- HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.
- HENRIQUES, N. M. et al. *Dunaliella*: uma fonte natural de β -caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, v. 61, 1998.
- HEJAZI, M. A.; WIJFFELS, R. H. Milking of microalgae. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 4, p. 189-194, 2004.
- HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J**, v. 54, n. 4, p. 621-39, 2008.
- JIN, E. et al. Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application. Seoul, COREE, REPUBLIQUE DE: **Korean Society for Applied Microbiology**, 2003.
- JYONOUCHI, H. et al. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. **J Nutr**, v. 125, n. 10, p. 2483-92, 1995.

KATZ, A. et al. Salt-induced Changes in the Plasma Membrane Proteome of the Halotolerant Alga *Dunaliella salina* as Revealed by Blue Native Gel Electrophoresis and Nano-LC-MS/MS Analysis. 2007.

KHALIL, Z. et al. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1225-1231, 2010.

KURANO, N. et al. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6–9, p. 689-692, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 227, p. 680-685. 1970.

LEE, Y.-K.; DING, S.-Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (chlorophyta)1. **Journal of Phycology**, v. 30, n. 3, p. 445-449, 1994.

LEI, G. et al. Isolation and characterization of a mitogen-activated protein kinase gene in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 1, p. 13-17, 2008.

LEI, G. et al. Effect of Abiotic Stress on Transcription, Translation and Phosphorylation of DsMPK in Halotolerant Algae *Dunaliella salina*. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**. V. 17, n. 1, p. 29-33, 2011.

LGPM. Disponível em: ww.lgpm.ecp.fr/axes_recherche/bioprococes/cellule-haematococcus1. Acessado em: 2012

LISKA, A. J. **Homology-Based Functional Proteomics By Mass Spectrometry and Advanced Informatic Methods**. 2003. 116. Tese (Doutorado). Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade Técnica de Dresden.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends Biotechnol**, v. 18, n. 4, p. 160-167, 2000.

LOURENÇO, S. O. et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 5, p. 798-811, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006, 606 p.

LUBISCO, N. M. I.; VIEIRA, S.C.; SANTANA, I. V. Manual de estilo acadêmico: Monografias, Dissertações e Teses. Salvador: EDUFBA, 4. ed. rev. e ampl, p. 145, 2008.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. **Photosynthesis in Microalgae**. In: Richmond A.(Ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, pp.20-39. 2004.

METTING, B.; PYNE J. W. Biologically active compounds from microalgae. Enzyme and microbial technology, **Elsevier Science**. 8, 386-394, 1986.

METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 477-489, 1996.

MORTZ, E. et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **PROTEOMICS**, v. 1, n. 11, p. 1359-1363, 2001.

NAGUIB, Y. M. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 4, p. 1150-4, 2000.

OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K. Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 18, n. 12, p. 753-758, 1996.

ONO, E., CUELLO, J. L. Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration. Department of Agricultural and Biosystems Engineering, Tucson, U.S.A. 2005.

ONO, E. CUELLO, J.L.. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. **Biosyst. Eng.**, 96, p.129–134. 2007

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003.

OROSA, M. et al. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. **Biotechnol Lett**, v. 23, n. 5, p. 373-378, 2001.

ORSET, S. C.; YOUNG, A. J. Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis beta, beta-carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). **Plant Physiol**, v. 122, n. 2, p. 609-18, 2000.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 297, n. 2, p. 291-295, 1992.

PARK, S. et al. Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. **Mar Biotechnol (NY)**, v. 8, n. 2, p. 120-8, 2006.

PARRA, O.O. BICUDO, C.E.M. Introduccion a La Biologia y Sistemica de lãs Algas Continentales. Barcelona: Ed Omega. p. 268. 1995.

PISAL, D. S.; LELE, S. S. Carotenoid production from *D. salina*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, 2005.

POTVIN, G.; ZHANG, Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 910-8, 2010.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis. v. 59, p. 123-152, 1998.

RABBANI, S. et al. Induced β -Carotene Synthesis Driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicellular Alga *Dunaliella bardawil*. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1239-1248, 1998.

RAVEN, P. H., EVERT, RAY F., EICHHORN, SUSAN E. . **Biologia Vegetal**. Quinta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 738

RICHMOND, A. **Biological Principles of Mass Cultivation**. In: Richmond A.(Ed) *Handbook of Microalgal Culture; Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, pp. 125-177. 2004.

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.

RUDIC, V.; DUDNÍCENCO T., Process For Cultivation of Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). MD Patent Nr. A 2000 0154, 2000.

SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 623-627, 2002.

SCHRODA, M. et al. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. **Plant Cell**, v. 11, n. 6, p. 1165-78, 1999.

SCOPES, R.K. Proteins purification principles and practice. 2. ed. New York: **Springer- Verlag**, 1988. 283p.

SEABRA, L. M. A. J.; PEDROSA, L. F. C. Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição*. 23: 1041-1050 p. 2010.

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

SHEN, H.; LEE, Y. Thermotolerance induced by heat shock in *Chlorella*. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 471-475, 1997.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 8, p. 365-79, Oct 2002.

SINGH, S.; KATE, B. N.; BANERJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. **Crit Rev Biotechnol**, v. 25, n. 3, p. 73-95, 2005.

- SKJÅNES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 4, p. 405-413, 2007.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **J Biosci Bioeng**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- SOJKA, E. J.; KIMMICK, S. V.B.; CARISON, G. P. Dimethyl sulfoxide update- New applications and dosing methods. Proceed AM. Assoc. **Equine Practit**, v.36, p.683-690, 1990.
- SUMI, Y. Microalgae Pioneering the Future: Application and Utilization. **QUARTERLY REVIEW**, 2009.
- TEODORESCO, E.C .1905. Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblépharidée. **Bot Zentralbl Beih**, 18, p.215–232
- TOMALA, K.; KORONA, R. Molecular chaperones and selection against mutations. **Biol Direct**, v. 3, p. 5, 2008.
- TOMASELLI, L. **The Microalgal Cel**. In: Richmond A. (Ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, p.3-19. 2004
- TORRES, M. A. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 71, n. 1, p. 1-15, 2008.
- TRAN, N.-P.; PARK, J.-K.; LEE, C.-G. Proteomics analysis of proteins in green alga *Haematococcus lacustris* (*Chlorophyceae*) expressed under combined stress of nitrogen starvation and high irradiance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 4, p. 241-246, 2009.
- VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, 2009.
- VONSHAK, A., TORZILLO, G. Environmental Stress Physiology. In: Richmond A. (Ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell, Oxford, pp 57-82. 2004
- WANG, S. B. et al. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). **Planta**, v. 220, n. 1, p. 17-29, 2004.
- WATERS, E. R.; LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 296, p. 325-338, 1996.
- WELDY, C. S.; HUESEMANN, M. H. Lipid Production by *Dunaliella salina* in Batch Culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity. **Journal of Undergraduate Research**, v. 7, n. 1, p. 115-122, 2007.
- WILLIAMS, P. J. L. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 5, p. 554-590, 2010.

YUAN, J.-P.; CHEN, F. Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3371-3375, 1998.

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

ZHANG, B. Y. et al. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, n. 3–4, p. 275-281, 2009.

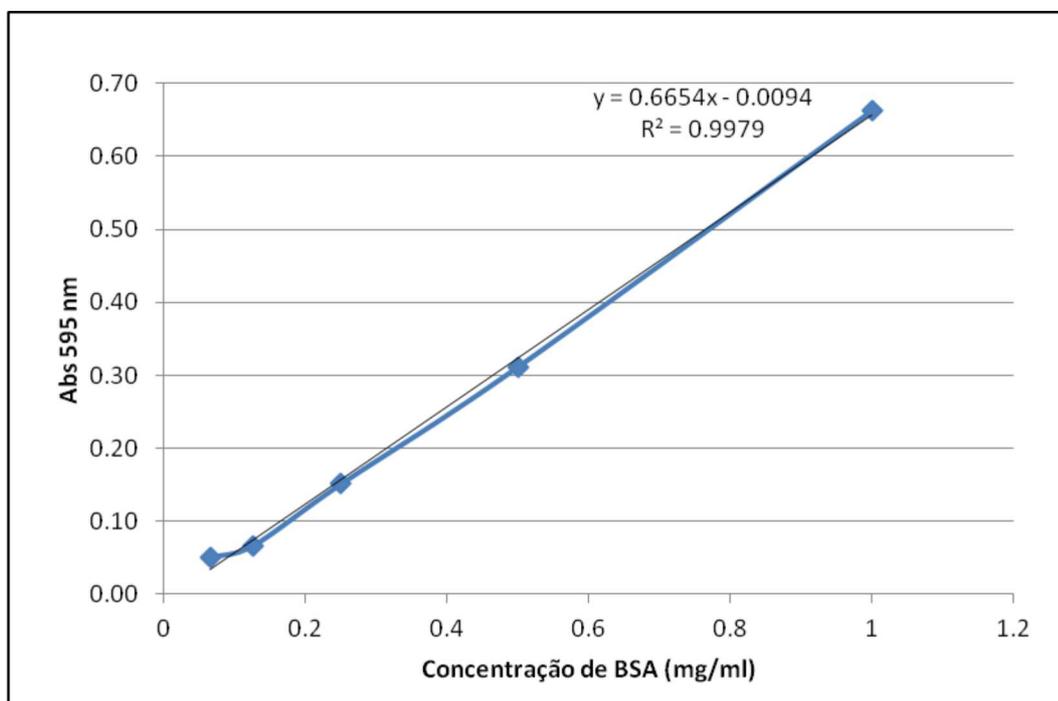
APÊNDICE A – Resultado obtido em análise preliminar da quantidade de nitrato presente meios de cultura realizada no cultivo da microalga *D. salina*, no último dia.

	Concentração de nitrato obtida
Cultivo controle	10mg/L
Cultivo em estresse luminoso	19,46mg/L

APÊNDICE B – Imagem da embalagem da ração de peixe utilizada para estimar quantidade de astaxantina na *H. pluvialis*.



ANEXO A- Curva padrão com diferentes concentrações de BSA em função da absorbância em 595 nm, utilizada para quantificação das proteínas.



ANEXO B – Resultados obtidos pelas análises estatísticas das concentrações dos pigmentos.

Haematococcus pluvialis

Para concentração de astaxantina:

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2.83964214	2	1.4198211	38.24447	0.007332	9.552094
Dentro dos grupos	0.111374622	3	0.0371249			
Total	2.951016762	5				

Teste t

	<i>valor-p</i>
Controle e EDN	0.212
Controle e EL	0.011
EDN e EL	0.008

Para concentração de β -caroteno:

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000589	2	0.000295	60.93103448	0.003724	9.552094
Dentro dos grupos	1.45E-05	3	4.83E-06			
Total	0.000604	5				

Teste t

	<i>valor-p</i>
Controle e EDN	0.003
Controle e EL	0.366
EDN e EL	0.007

Dunaliella salina

Concentração de β -caroteno:

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000984	2	0.000492	14.52785194	0.02863	9.552094
Dentro dos grupos	0.000102	3	3.39E-05			
Total	0.001086	5				

Teste t

	<i>valor-p</i>
Controle e EDN	0.200
Controle e EL	0.024
EDN e EL	0.020