



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Potencial biotecnológico de *Haematococcus pluvialis* Flotow

Clara Sofia Baeta Martins

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Potencial biotecnológico de *Haematococcus pluvialis* Flotow

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Lília Maria Antunes dos Santos (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão (Escola Superior Agrária de Coimbra).

Clara Sofia Baeta Martins

2014

When we love, we always strive to become better than we are. When we strive to become better than we are, everything around us becomes better too.

Paulo Coelho

Agradecimentos

Ao concluir esta importante etapa não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me incentivaram, apoiaram e contribuíram, de uma forma ou de outra, para a concretização deste projeto.

À Professora Doutora Lília Maria Antunes dos Santos, orientadora deste trabalho, pela orientação científica, amabilidade, apoio, confiança, disponibilidade e por todas as correções e ensinamentos prestados.

Ao Professor Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão, co-orientador deste trabalho, pela simpatia, disponibilidade e por todos os esclarecimentos e conhecimentos partilhados.

Às minhas colegas de laboratório, Mariana, Joana e Raquel, um apreço especial por todo o apoio, ensinamentos, amizade, companheirismo e boa disposição que me proporcionaram ao longo deste trabalho.

À D. Isabel Matos e à D. Isabel Benedito por todo o auxílio prestado, pelo convívio e pela animação que sempre se fez sentir no laboratório.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Química da Escola Superior Agrária de Coimbra pela simpatia e disponibilidade prestada.

Aos meus familiares e amigos pelos bons momentos de descontração. Um agradecimento muito especial aos meus pais e ao meu irmão, que são o meu suporte de vida, por estarem presentes em todos os momentos, pelo carinho, compreensão, confiança e por todo o apoio que sempre me proporcionaram, tanto no meu percurso académico como pessoal, permitindo-me ter como profissão aquela que escolhi.

A Coimbra, que me fez crescer!

Índice

Resumo	IX
Abstract	XI
1. Introdução	1
1.1. Microalgas.....	3
1.2. Potencial biotecnológico das microalgas	3
1.2.1. Otimização do crescimento	5
1.2.2. Antioxidantes de extratos algais.....	5
1.2.3. Pigmentos carotenóides e sua ação antioxidante	6
1.2.4. Composição lipídica.....	8
1.3. <i>Haematococcus pluvialis</i>	10
1.3.1. Classificação taxonómica.....	10
1.3.2. Primeiras observações.....	10
1.3.3. Morfologia celular.....	11
1.3.4. Ciclo de vida	13
1.3.5. Citologia e fisiologia.....	15
1.3.6. Distribuição e ecologia.....	18
1.4. Potencial biotecnológico de <i>Haematococcus pluvialis</i>	19
1.4.1. Astaxantina.....	22
1.4.1.1. Transformação e via de síntese.....	23
1.4.1.2. Indução	25
1.4.1.3. Funções e aplicações.....	27
1.5. Objetivos.....	28
2. Material e métodos	29
2.1. Material de estudo.....	31
2.2. Estabelecimento e crescimento de culturas.....	31
2.3. Extração do lípido e análise da composição de ácidos gordos combinados	37

2.4. Preparação dos extratos de <i>H. pluvialis</i> e análise dos antioxidantes	39
2.4.1. Preparação da solução de ABTS e do ensaio antioxidante	41
2.4.2. Preparação da solução de DPPH e do ensaio antioxidante	42
2.5. Análise de pigmentos	43
3. Resultados	47
3.1. Crescimento de <i>H. pluvialis</i> baseada em peso seco	49
3.2. Crescimento celular após 15 e 20 dias	53
3.3. Extração de lípido e análise de ácidos gordos combinados	54
3.4. Ensaio antioxidante através do radical ABTS	56
3.5. Ensaio antioxidante através do radical DPPH	57
3.6. Análise dos pigmentos dos quistos	62
4. Discussão	65
4.1. Obtenção de células móveis e de quistos	67
4.2. Crescimento	68
4.3. Crescimento de células móveis e quistos após 15 e 20 dias	70
4.4. Análise da composição de ácidos gordos combinados no lípido	71
4.5. Atividade antioxidante pelos ensaios ABTS e DPPH	74
4.6. Pigmentos carotenóides	78
5. Conclusões	81
6. Referências bibliográficas	85
7. Anexos	105

Resumo

O crescente interesse no potencial biotecnológico das microalgas deve-se à sua importância nas várias cadeias tróficas mas, principalmente, às diversas substâncias que conseguem sintetizar e que podem ter aplicação comercial em diversas áreas como aquacultura, nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e nas indústrias alimentar, química, e farmacêutica, entre outras. A grande variabilidade da composição bioquímica da biomassa obtida das culturas de microalgas, aliada ao emprego de melhoramento genético e ao cultivo em grande escala têm permitido a utilização comercial de determinadas espécies, nomeadamente *Haematococcus pluvialis*.

O presente trabalho incide sobre o potencial biotecnológico de uma estirpe de *Haematococcus pluvialis* Flotow existente na Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI), com o número de referência ACOI 38, tendo sido analisado o crescimento e determinados a composição em ácidos gordos, em pigmentos carotenóides, particularmente astaxantina e o valor antioxidante, tanto de células móveis como de quistos.

O crescimento das células móveis e dos quistos foi estimado ao longo de 15 e 20 dias, respetivamente, em condições de cultivo diferentes, realizando-se as curvas de crescimento correspondentes. As células móveis cresceram em meio de cultura líquido M7, sob intensidade luminosa de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e temperatura ambiente de 23°C. A biomassa obtida ao fim de 15 dias foi de 0,083g/L. Para o desenvolvimento de quistos as culturas foram sujeitas a um aumento de intensidade luminosa ($43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a borbulhamento com ar, mantendo-se idênticas as restantes condições. A biomassa obtida ao fim de 20 dias foi de 0,450g/L. Foi testada a influência do ácido salicílico na formação de quistos, submetendo-se uma cultura às condições antes referidas, mas com a adição de 50mg/L de ácido salicílico ao meio de cultura. A biomassa total obtida foi de 0,167g/L.

O perfil de ácidos gordos foi analisado recorrendo à extração lipídica com os solventes n-hexano e metanol em banho de ultrassons, seguida de transesterificação com metóxido de sódio e injeção das amostras em cromatografia gasosa. Com base nos cromatogramas obtidos e usando um padrão SupelcoTM 37 Component FAME Mix Catalog No. 47885-U e um padrão interno constituído por uma mistura de n-hexadecano (C6) e pentadecanoato de metilo (C15:0) com concentração de 0,03mg/mL, identificaram-se os ácidos gordos presentes, sendo o ácido esteárico o mais abundante

nas células móveis (0,088mg) e o ácido palmítico o mais abundante nos quistos com e sem ácido salicílico (0,169mg e 1,097mg, respectivamente), valores por grama de biomassa não seca.

Para a identificação dos pigmentos presentes nos quistos efetuou-se cromatografia em coluna, leitura da absorvância no visível das frações eluídas, através de espectrofotometria, e comparação dos espectros de absorção obtidos com os descritos na literatura. Identificaram-se o β -caroteno, a astaxantina e a clorofila a, sendo o β -caroteno o pigmento mais abundante.

O potencial antioxidante foi testado através dos ensaios ABTS e DPPH. Pelo ensaio de ABTS as células móveis apresentaram uma atividade antioxidante maior que os quistos com e sem ácido salicílico (6,59mg/L equivalente a ácido ascórbico *versus* 0,13mg/L equivalente a ácido ascórbico e 2,73mg/L equivalente a ácido ascórbico, respectivamente), comparável ao valor antioxidante da cenoura (5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico). Pelo ensaio de DPPH apenas foi possível a medição da atividade antioxidante nas células móveis, tendo-se registado um valor comparável ao do ABTS.

Os resultados obtidos comprovam que a estirpe de *H. pluvialis* ACOI 38 tem potencialidades associadas à alimentação humana saudável. Com efeito, os principais ácidos gordos identificados, mono e polinsaturados, possuem benefícios conhecidos, tais como redução do risco de doenças cardiovasculares, inflamatórias e melhoria das funções cerebrais. O valor antioxidante determinado foi razoável, devendo-se possivelmente aos pigmentos carotenóides identificados nas células, o que demonstra que esta estirpe também poderá ser cultivada para produção dos carotenóides astaxantina e β -caroteno, que têm potenciais aplicações nas indústrias alimentar, química e farmacêutica, entre outras. Contudo, o crescimento mostrou ser lento e baixo, nesta estirpe, pelo que estudos detalhados de cultivo para otimização do crescimento e da produção dos compostos de interesse deverão ser prioritários antes de um eventual uso comercial.

Palavras-chave: *Haematococcus pluvialis*; crescimento; ácidos gordos; potencial antioxidante; pigmentos

Abstract

The growing interest in the biotechnological potential of microalgae is due to their importance in the food chains but mainly to the many substances they can synthesize which may have commercial application in areas such as aquaculture, nutrition, human and animal health, water treatment waste, energy production and in the food, chemical and pharmaceutical industries, among others. The wide variability of the biochemical composition of the biomass obtained from cultures of microalgae, combined with the genetic improvement and cultivation on a large scale have allowed commercial use of some species such as *Haematococcus pluvialis*.

The present study focuses on the biotechnological potential of a strain of *Haematococcus pluvialis* Flotow existing in the Algoteca of the University of Coimbra (ACOI), with reference number ACOI 38. Growth was analyzed and determination was done of the fatty acid composition, the main pigments, particularly the carotenoid astaxanthin, as well as the antioxidant value of both the motile cells and the cysts.

The growth of motile cells and cysts was estimated during 15 and 20 days, respectively, in different cultivation conditions, corresponding growth curves being established. The motile cells were grown in liquid culture medium M7, under a light intensity of $5.68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a photoperiod of 16h: 8h light/dark and room temperature of 23°C . The biomass obtained after 15 days was 0.083g/L. For the development of cysts, cultures were submitted to an increase of light intensity ($43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and air bubbling, keeping the other conditions identical. The biomass obtained after 20 days was 0.450g/L. The influence of the salicylic acid was tested in the formation of cysts by subjecting the culture to the conditions referred above with the addition of 50mg/L of salicylic acid to the culture medium. The total biomass obtained was 0.167g/L.

The fatty acid profile was analyzed after lipid extraction with the solvents n-hexane and methanol in an ultrasonic bath, followed by transesterification with sodium methoxide and injection of samples in gas chromatography. Based on the chromatograms and by using the SupelcoTM 37 Component FAME Mix Catalog No. 47885-U standard and an internal standard containing a mixture of n-hexadecane (C6) and methyl pentadecanoate (C15:0) with a concentration of 0.03mg/mL, the fatty acids were identified, the most abundant being stearic acid in the motile cells (0.088mg fatty acid/g wet biomass) and palmitic acid in the cysts grown with or without salicylic acid (0.169mg fatty acid/g wet biomass and 1,097mg fatty acid/g wet biomass, respectively).

The separation of the pigments present in the cysts was done by column chromatography and the identification by reading the absorbance of the collected fractions, and comparing the absorption spectra with those described in the literature. The pigments identified were the β -carotene, astaxanthin and chlorophyll a, β -carotene being the most abundant.

The antioxidant potential was tested by the ABTS and DPPH methods. The ABTS assay showed higher antioxidant activity of the motile cells than cysts, either those grown with or without salicylic acid, a value of 6.59mg/L equivalent to ascorbic acid *versus* 0.13mg/L equivalent to ascorbic acid and 2.73mg/L equivalent to ascorbic acid, respectively, comparable to the antioxidant activity showed by carrot (5.98 mg/L equivalent to ascorbic acid). With the DPPH assay was only possible to measure the antioxidant activity in motile cells, being comparable to the registered ABTS value.

The present work shows that this strain of *H. pluvialis* ACOI 38 has some potential linked to the area of healthy nutrition and, consequently, in the improvement of human health. In fact, the major mono- and polyunsaturated fatty acids identified have many benefits such reducing the risk of cardiovascular and inflammatory diseases, and improving brain functions. The amount of antioxidant activity found was reasonable, possibly due to the carotenoids identified in the cells, indicating that this strain can also be cultivated for the production of β -carotene, astaxanthin and other carotenoids, with potential applications in the food, chemical and pharmaceutical industries, among others. However, growth has proved to be slow in this strain, so detailed cultivation to optimize the growth and production of the compounds of interest should be a priority in the next future.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; growth; fatty acids; antioxidant potential; pigments

1. Introdução

1.1. Microalgas

As microalgas têm um papel fundamental como produtores primários, constituindo a base da cadeia alimentar nos sistemas aquáticos. Encontram-se em diferentes ambientes desde nascentes de água doce a lagos salinos ou zonas polares. Apresentam forma de vida planctónica, perifítica ou bentónica, vivendo em suspensão nas zonas fóticas ou aderentes a um substrato e, frequentemente junto ao fundo, no meio de sedimentos (Hoek, 1995; Pereira, 2009; Mostafa, 2012).

O número exato de espécies de microalgas não é conhecido, contudo encontram-se citações que relatam entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Esta grande diversidade deve-se à composição bioquímica supondo-se, desta forma, que as microalgas podem ser uma fonte ilimitada de produtos (Derner *et al.*, 2006).

As microalgas apresentam propriedades únicas, as quais permitem converter o dióxido de carbono em matéria orgânica, utilizando como fonte de energia a radiação solar. A grande variabilidade da composição bioquímica da biomassa obtida das culturas de microalgas, aliadas ao emprego de melhoramento genético e à tecnologia de cultivo em grande escala têm permitido a utilização comercial de determinadas espécies (Pereira, 2009).

1.2. Potencial biotecnológico das microalgas

Nos últimos anos, o interesse no potencial biotecnológico das microalgas tem crescido devido à sua importância nas várias cadeias tróficas mas, principalmente devido às diversas substâncias que estes organismos conseguem sintetizar (Derner *et al.*, 2006) e que podem ter aplicação comercial em diversas áreas como aquacultura, uma vez que são a base da cadeia trófica (Pereira, 2009), nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e nas indústrias alimentar, química, e farmacêutica, entre outras, sendo que o mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas tem apresentado um rápido desenvolvimento em alguns países como França, Estados Unidos, China e Tailândia (Spolaore, 2006).

A composição química varia entre as diferentes espécies e dentro da mesma espécie, pode ser modificada com a alteração de determinados parâmetros de cultura. Numa fase logarítmica tardia de crescimento, as microalgas podem conter entre 30 a 40% de proteína, 10 a 20% de lípidos e 5 a 15% de hidratos de carbono. Numa fase estacionária, a composição pode ser alterada significativamente. Por exemplo, quando

há limitação de nitrato, os níveis de hidratos de carbono podem duplicar (Brown, 2002). A média do conteúdo lipídico pode variar entre 1 e 70%, podendo atingir 90% do peso seco em determinadas condições. As microalgas também representam uma valiosa fonte de vitaminas essenciais (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico). No entanto, as suas quantidades variam consoante as condições ambientais, o cultivo e colheita e o método de secagem das células (Spolaore *et al.*, 2006). Os pigmentos acumulados por diversas espécies, como *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* e *Muriellopsis* sp. são diversos e de grande interesse, como por exemplo, astaxantina, β -caroteno, luteína, entre outros. O cultivo de microalgas tem sido feito visando a produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos como para a obtenção de compostos naturais com elevado valor no mercado mundial. De entre estes compostos, com potencial exploração a nível comercial, estão ácidos gordos polinsaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores de colesterol, etc.), que podem ser empregues especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais devido às suas propriedades nutricionais e farmacêuticas. Algumas espécies são bem conhecidas quanto ao potencial de cultivo e quanto aos compostos que sintetizam (Tabela 1) (Derner *et al.*, 2006).

Tabela 1. Biomassa e produtos obtidos das microalgas e suas principais aplicações (Adaptado de Derner *et al.*, 2006).

	Produto	Aplicações
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais e funcionais Aditivos alimentares Aquacultura Condicionador do solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas Luteína β -caroteno Vitamina C e E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos gordos	Ácido araquidónico – ARA Ácido eicosapentaenóico – EPA Ácido docosahexaenóico - DHA Ácido linoleico – LA	Aditivos alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase Fosfoglicerato quinase Luciferase Enzimas de restrição	Alimentos naturais Ciência Medicina
Polímeros	Polissacarídeos Amido Peptídeos	Aditivos alimentares Cosméticos Medicina

1.2.1. Otimização do crescimento

O crescimento corresponde ao aumento de matéria viva, geralmente o número de células para organismos unicelulares ou massa total de células para organismos multicelulares, sendo a taxa de crescimento o parâmetro mais utilizado para medir a alteração no número de células ou a massa total de células por unidade de tempo (Richmond, 2003).

Para uma produção em larga escala de espécies de microalgas, o cultivo é, frequentemente, em tanques abertos ao ar livre. Contudo, estes sistemas de cultura têm limitações desde contaminações bacterianas e de outras microalgas, predação por protozoários e uso de antibióticos e herbicidas que alteram o potencial a nível farmacêutico, entre outras, sendo a falta de controlo de parâmetros da cultura, em particular da temperatura e luminosidade, outra desvantagem. O cultivo de biomassa depende essencialmente de fatores como a temperatura, a salinidade, a intensidade luminosa e dos nutrientes disponíveis no meio de cultura, sendo necessário ajustar e otimizar o meio de acordo com a espécie que se pretende cultivar, uma vez que para além das diferentes espécies terem necessidades nutricionais distintas, o meio pode influenciar a produção de óleo ou outro composto produzido pelas microalgas (Pereira, 2009; Mata *et al.*, 2013).

1.2.2. Antioxidantes de extratos algais

Nas indústrias alimentar e farmacêutica têm sido utilizados determinados antioxidantes sintéticos que, devido à sua potencial toxicidade, são sujeitos a regulamentos estritos (Safer *et al.*, 1999). Nos últimos anos têm sido efetuadas diversas pesquisas para tentar substituí-los por antioxidantes naturais (Goiris *et al.*, 2012), provenientes de fontes naturais, que sejam mais seguros e económicos, podendo as microalgas serem uma potencial fonte de antioxidantes naturais (Li *et al.*, 2007; Chacón-Lee & González-Mariño, 2010) com benefícios na saúde humana, incluindo a prevenção de doenças cardiovasculares, doenças relacionadas com o envelhecimento e alguns tipos de cancro, assim como aplicações na nutracêutica e na conservação de alimentos (Boussiba, 2000; Kelsey *et al.*, 2010). As microalgas podem constituir uma fonte promissora de antioxidantes, uma vez que produzem uma grande variedade de compostos antioxidantes, incluindo pigmentos, tais como β -caroteno, astaxantina, ficocianina, ficoeritrina e polissacarídeos sulfatados (Boussiba, 2000). Existem estudos que comprovam a existência de potentes antioxidantes, tanto de natureza lipofílica como

hidrofílica, em microalgas e cianobactérias pertencentes aos géneros *Botryococcus* (Rao *et al.*, 2006), *Chlorella* (Wu *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 2010), *Dunaliella* (Herrero *et al.*, 2006), *Nostoc* (Li *et al.*, 2007), *Phaeodactylum* (Guzman *et al.*, 2001), *Spirulina* (Miranda *et al.*, 1998; Jaime *et al.*, 2005; Mendiola *et al.*, 2007), *Haematococcus* (Cerón *et al.*, 2007) e *Chaetoceros* (Goh *et al.*, 2010).

Nas plantas terrestres, a classe de antioxidantes com maior interesse é a dos compostos fenólicos, mais concretamente os flavonóides, que demonstram possuírem mecanismos antioxidantes (Pietta, 2000). No entanto, existe pouca informação acerca da presença de compostos fenólicos nas microalgas. Klejdus e colaboradores (2010) demonstraram que as diversas classes de flavonóides podem ser encontrados em microalgas e em cianobactérias, contudo ainda não se conhece se possuem uma significativa capacidade antioxidante.

1.2.3. Pigmentos carotenóides e sua ação antioxidante

Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas (Derner *et al.*, 2006).

Os carotenóides têm uma ampla distribuição, diversidade estrutural e diversas funções (Rodriguez-Amaya, 2004). Mais de 750 carotenóides estruturalmente definidos já foram encontrados na natureza, concretamente em plantas terrestres, algas, bactérias, incluindo cianobactérias e bactérias fotossintéticas, fungos e animais (Takaichi, 2011). Os carotenóides são terpenóides, geralmente constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de três a quinze ligações duplas conjugadas, o que permite muitas conjugações *cis* e *trans* (Ozório, 2007) (Figura 1).

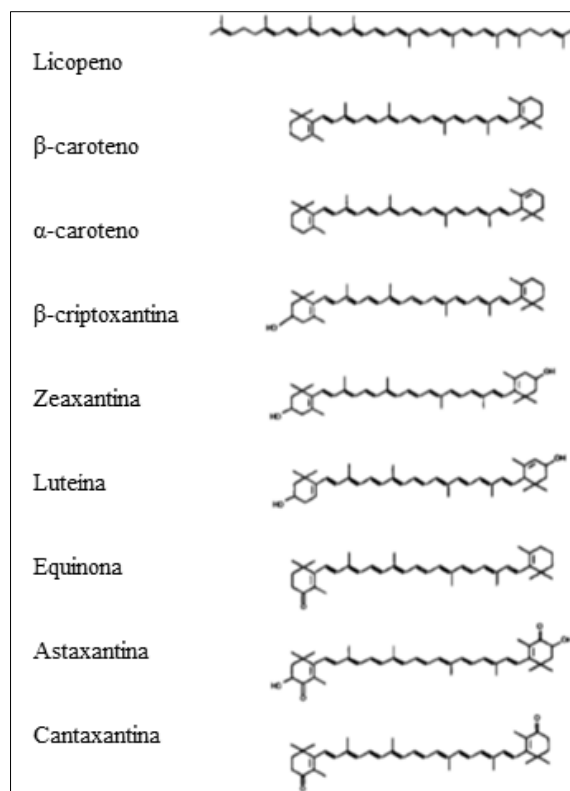


Figura 1. Estrutura química dos principais carotenóides presentes nas algas (Adaptado de Miller *et al.*, 1996).

Uma importante característica nestas moléculas é um sistema de duplas ligações conjugadas, que constitui um cromóforo de absorção de luz, que fornece aos carotenóides a cor atrativa e o espectro de absorção no visível, que serve como uma base para a sua identificação e quantificação (Rodríguez-Amaya, 2004).

Existem dois grupos que são apontados como os mais importantes: os carotenos, como, por exemplo, o β -caroteno e o licopeno (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006), e as xantofilas, como a luteína, β -criptoxantina ou a astaxantina (Rodríguez-Amaya, 2004).

A rígida regulamentação para a aplicação de corantes sintéticos na indústria alimentar tem estimulado pesquisas visando o desenvolvimento produtivo e o uso de carotenóides provenientes de microalgas como aditivo alimentar, uma vez que também apresentam maior resistência à presença de ácido ascórbico, ao calor e aos processos de congelamento (Derner *et al.*, 2006). Atualmente, os mais importantes na alimentação humana são o β -caroteno, o licopeno, a luteína, a β -criptoxantina, a zeaxantina e a astaxantina, sendo estes os mais estudados devido à sua relevância na saúde humana (Rodríguez-Amaya, 2004; Riccioni, 2009).

Os carotenóides têm funções biológicas, nomeadamente no processo de fotossíntese nas plantas e nas algas (Miki, 1991), sendo que os localizados nos

cloroplastos são considerados essenciais no processo de fotossíntese e denominam-se por carotenóides primários (Collins *et al.*, 2011), enquanto os que não são essenciais para a fotossíntese designam-se de carotenóides secundários e possuem atividade antioxidante (Collins *et al.*, 2011). Além disso, são relatados como agentes anticancerígenos e estimuladores do sistema imunológico (Derner *et al.*, 2006). Está comprovado que a sua ingestão conduz a um menor risco de doenças crônicas e cardiovasculares, desenvolvimento de cataratas, degeneração macular e alguns tipos de cancro, estando também relatada a inibição da proliferação celular, o aumento da diferenciação celular, a estimulação da comunicação célula a célula e a filtragem da luz azul (Higuera-Ciajara *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2011). Deste modo, as microalgas já são comercialmente produzidas como fontes de antioxidantes carotenóides para o uso como aditivos e suplementos alimentares e cosméticos (Jahnke, 1999; Pulz & Gross, 2004; Takaichi, 2011).

1.2.4. Composição lipídica

O conteúdo lipídico da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (Peled *et al.*, 2011).

Os lípidos produzidos pelas microalgas geralmente incluem lípidos neutros, lípidos polares, ésteres, esteróis e hidrocarbonetos, assim como derivados de prenilo tais como tocoferóis, carotenos, terpenos, quinonas e derivados de pirrol. Os lípidos produzidos pelas microalgas podem ser agrupados em duas categorias, os lípidos estruturais (lípidos polares) e os lípidos de armazenamento (lípidos não polares) (Sharma *et al.*, 2012).

Os lípidos estruturais tipicamente têm um elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), sendo estes essenciais para os humanos e animais aquáticos. Os lípidos de armazenamento são principalmente em forma de triacilglicerídeos (TAGs) constituídos por ácidos gordos saturados e insaturados, que podem ser transesterificados para produzirem biodiesel (Fukuda *et al.*, 2001; Chisti, 2008; Sharma *et al.*, 2012). Dos lípidos de armazenamento, os TAGs são os lípidos mais abundantes, que podem ser facilmente catabolizados para fornecerem energia metabólica. Estes lípidos possuem uma estrutura comum de ésteres triplos onde, geralmente, três ácidos gordos de cadeia longa estão ligados a uma molécula de glicerol, sendo armazenados em corpos lipídicos citosólicos e reutilizados para a síntese dos lípidos polares (Thompson, 1996; Chen, 2011; Sharma *et al.*, 2012).

Em muitos organismos, como leveduras, bactérias e microalgas, a acumulação lipídica parece ser especificamente induzida em resposta a stresses ambientais, tais como a limitação de nutrientes, incluindo privação de azoto e/ou fósforo, elevada luminosidade, stresse osmótico, pH, temperatura, metais pesados e outros químicos (Hu *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012; Mata *et al.*, 2013). Segundo uma revisão feita por Schuhmann *et al.* (2011), em condições ambientais desfavoráveis ou outras condições de stresse, muitas microalgas alteram as suas vias biossintéticas lipídicas para a formação e acumulação de lípidos neutros (20-50% do peso seco celular), principalmente sob a forma de TAGs, permitindo assim que a microalga tolere essas condições desfavoráveis.

Na alimentação humana existe uma mistura complexa de óleos e gorduras, cujos componentes estruturais básicos são os ácidos gordos. Geralmente, o Homem consome, pelo menos, vinte tipos diferentes de ácidos gordos, que são classificados como saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Os PUFAs n-3, como o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA), que são sintetizados a partir do precursor n-3 α -linolénico, e os PUFAs n-6 de longa cadeia, como o ácido araquidónico (AA), sintetizado a partir do precursor ácido linoleico (Ruxton, 2004), possuem funções na ativação de leucócitos e plaquetas, na regulação das secreções gástricas, na indução de broncoconstrição, na sinalização de dor em células nervosas (Surette, 2008), melhoria do risco de doenças cardiovasculares, inflamatórias, funções cerebrais e saúde mental. Além disso, têm-se colocado hipóteses do possível efeito benéfico na redução do risco do declínio cognitivo, demência e da doença de Alzheimer (Conquer *et al.*, 2000; Ruxton, 2004). Nos últimos anos os PUFAs, especialmente os da família ómega-3, têm revelado grande importância terapêutica assim como interesse na dieta humana (Derner *et al.*, 2006), uma vez que o ser humano não consegue sintetizar todos os ácidos gordos ómega-3, sendo necessário obtê-los a partir da alimentação. Deste modo, as microalgas têm demonstrado ser uma opção promissora (Surette, 2008).

Uma outra área onde o conteúdo lipídico das microalgas têm demonstrado particular interesse é na produção de biodiesel. O biodiesel, sendo um combustível alternativo, tem atraído muita atenção, dado que uma das suas vantagens principais é a substituição do petróleo. Pode ser produzido a partir de uma variedade de matéria-prima, incluindo óleo vegetal puro, óleos residuais e gordura animal. Contudo, a limitação destas matérias-primas tem impedido a expansão da sua produção (Chisti, 2008; Lee *et al.*, 2010; Sander & Murthy, 2010; Prabakaran & Ravindran, 2011).

As questões alimentos *versus* combustível, a exigência de agricultura intensiva, o uso da terra e de água doce são algumas limitações para a produção em larga escala de biocombustíveis utilizando matéria-prima de primeira e de segunda geração (Sander & Murthy, 2010). Perante estas limitações, as microalgas são reconhecidas como potenciais fontes para a produção de biodiesel devido ao seu elevado conteúdo lipídico e à rápida produção de biomassa, sendo designadas de matéria-prima de terceira geração (Brennan & Owende, 2010; Prabakaran & Ravindran, 2011; Sharma *et al.*, 2012). O cultivo de microalgas em larga escala pode ser de 10 a 20 vezes mais produtivo numa base por hectare do que outras culturas, produzindo grandes quantidades de lípidos. (Sharma *et al.*, 2012; Mata *et al.*, 2013). Para além disso, as microalgas têm outras vantagens comparadas com outras culturas energéticas, como ciclo de crescimento curto, baixo uso da terra e sobrevivência em diversas condições climáticas (Sander & Murthy, 2010; McGinn *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012).

Deste modo, a combinação da indução de stresses que fornecem uma ótima produtividade lipídica num sistema de cultivo comercial em larga escala para a produção de biodiesel depende de cada espécie microalgal assim como do suplemento de nutrientes e das condições ambientais (Sharma *et al.*, 2012).

1.3. *Haematococcus pluvialis* Flotow

1.3.1 Classificação taxonómica

De acordo com Algaebase (<http://www.algaebase.org/>), a microalga *Haematococcus pluvialis* pertence ao reino Plantae, filo Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem Chlamydomonadales, família Haematococcaceae e género *Haematococcus*. Atualmente *Haematococcus lacustris* é considerado também um sinónimo taxonómico de *Haematococcus pluvialis*.

Presentemente são conhecidas 16 espécies, dentro deste género.

1.3.2. Primeiras observações

De acordo com uma revisão feita por Lorenz (1999), as primeiras observações de células de *Haematococcus* datarão de 1797, efetuadas por Girod-Chantrons, tendo a primeira descrição de *Haematococcus pluvialis* sido realizada por Flotow, em 1844. A primeira descrição mais extensa sobre o ciclo de vida desta microalga foi elaborada, em 1899, por Hazen e publicada pelo Torrey Botanical Club. Hazen notou que esta

microalga se encontrava, frequentemente, como uma coloração vermelha em determinados locais. Assim, começou a descrever o ciclo de vida como se numa primeira fase existisse um estado de quistos, em que as células teriam uma coloração vermelha e, simultaneamente, um estado móvel, em que as células apresentassem uma coloração verde, seguindo-se novamente um estado de quisto com coloração vermelha. Nesta altura, a natureza química deste corante avermelhado era desconhecida, tendo este sido denominado por hematocrómio. Atualmente já se conhece e sabe-se que se trata do carotenóide astaxantina.

1.3.3. Morfologia celular

A microalga *Haematococcus pluvialis* é unicelular móvel, biflagelada e uninucleada. As suas células apresentam uma forma ovóide, elipsóide ou elipsóide-cilíndrica (Algaebase) (Figura 2).

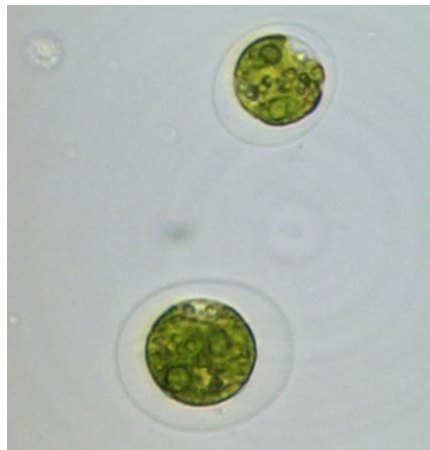


Figura 2. Células móveis de *Haematococcus pluvialis*, ACOI 38, sendo notória a parede celular afastada do protoplasma. Ampliação 800x.

Durante o seu crescimento, tanto pode apresentar formas móveis como formas imóveis. Quando se apresenta móvel, as células em forma de pera podem alcançar 8 a 50 μ m de diâmetro (Boussiba, 2000), apresentam um protoplasma muito afastado da parede celular (Hoek *et al.*, 1995), sendo esta relativamente fina e separada do plasmalema por um espaço mucilaginoso atravessado por fios protoplasmáticos finos. A estrutura celular neste estado é similar para todas as células: núcleo geralmente central com nucléolo volumoso e estruturalmente bem diferenciado (Figura 3), cloroplasto em forma de taça com numerosos e dispersos pirenóides, grãos de amido no exterior dos pirenóides, grande estigma intraplastidial, vacúolos contrácteis geralmente numerosos e

aparentemente distribuídos de forma irregular próximo da superfície do protoplasto, com frequentes inclusões osmofílicas que podem corresponder a reservas de fosfato, plastoglóbulos no estroma dos cloroplastos (Santos & Mesquita, 1984) e dois flagelos isocontos que emergem da papila anterior perfurando a parede celular (Boussiba, 2000).

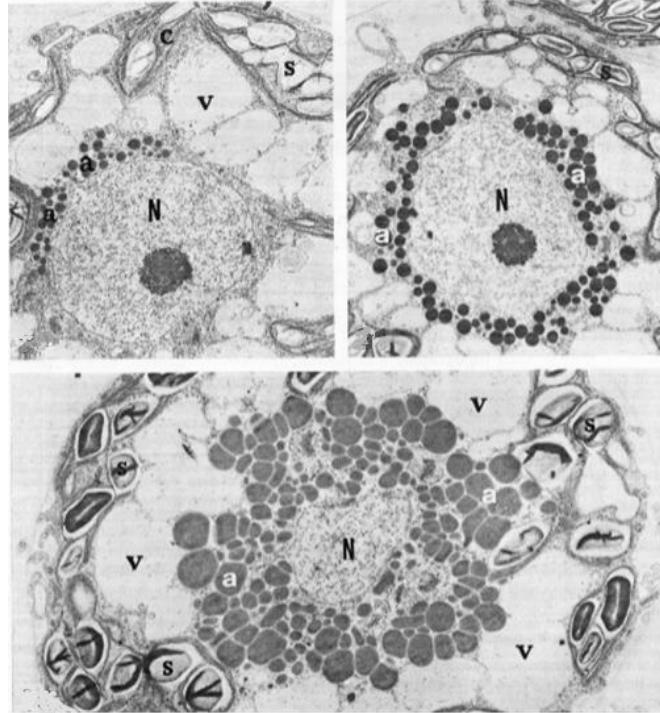


Figura 3. Célula móvel de *H. pluvialis* com 6 e 8 dias de cultura. Os glóbulos de pigmento astaxantina (a) vão-se acumulando cada vez em maior quantidade à volta do núcleo, aumentando de tamanho e dimensão, progredindo em direção à periferia da célula e ocupando todo o citoplasma que se encontra separado por numerosos vacúolos (v). Também são visíveis grãos de amido (s) (Santos & Mesquita, 1984a).

Quando se apresenta na sua forma imóvel, designada de quisto, possui uma parede mais espessa existindo um pequeno espaço periplasmático limitado internamente por um plasmalema bastante sinuoso. Com exceção da ausência de flagelos, as restantes características ultraestruturais do protoplasma são semelhantes às das células móveis, no entanto não se observam estigma nem vacúolos contrácteis (Figura 4).

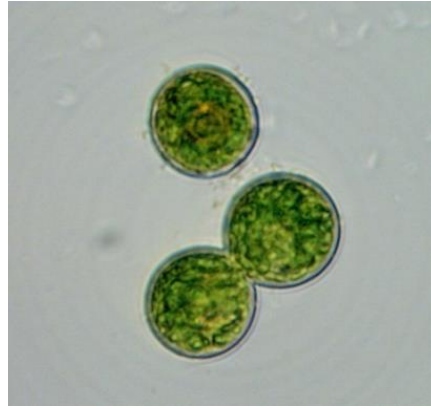


Figura 4. Quistos verdes de *Haematococcus pluvialis*, ACOI38, com parede celular espessa. Ampliação 200x.

Reproduz-se assexuadamente por formação de zoósporos biflagelados, quistos ou aplanósporos. Mas também se reproduz sexuadamente por isogamia. A meiose aparenta ser zigótica (Algaebase).

Em condições de stresse, como escassez de nutrientes, elevada radiação, stresse salino, entre outras, a forma vegetativa móvel converte-se numa forma imóvel mais resistente, denominada de aplanósporo ou quisto. Nesta altura as suas células são facilmente distintas devido à coloração vermelha que assumem. Esta coloração deve-se à acumulação do pigmento astaxantina, um carotenóide secundário (Hoek *et al.*, 1995).

1.3.4. Ciclo de vida

Segundo Lorenz, 1999, a primeira descrição do ciclo de vida da microalga terá sido efetuada por Hazen, em 1899, dois anos mais tarde, Peebles publicaria, detalhadamente, as alterações que ocorriam no pigmento hematocrómio durante todo o ciclo de vida e Elliot, em 1934, acrescentaria mais detalhes à morfologia da célula.

Durante o ciclo de vida, as células vegetativas flageladas crescem (Kobayashi *et al.*, 1997b), sendo predominantes quando existem nutrientes suficientes. Quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis, os quistos tornam-se mais comuns (Lorenz, 1999).

Em 1997, Kobayashi e colaboradores, estudaram o ciclo de vida de *H. pluvialis* ao longo de duas semanas e investigaram os mecanismos das alterações morfológicas (Kobayashi *et al.*, 1997b). Durante o estudo foram adicionados suplementos à cultura, tais como uma solução de acetato de sódio e outra de sulfato de ferro. O ciclo foi dividido em quatro fases distintas (Figura 5): I, Crescimento das células vegetativas; II, Enquistamento; III, Maturação; IV, Germinação. Primeiramente ocorreu o crescimento

das células vegetativas, que depende de fatores ambientais como nutrientes, temperatura, luz e humidade, entre outros. Nesta fase verificaram que as células vegetativas, com formato elipsóide, conseguiam movimentar-se ativamente devido aos dois flagelos, aumentando em número. Mas quando adicionaram elevados níveis de acetato à cultura, as células tornaram-se quistos esféricos imóveis, designando-se esta fase de enquistamento.

Nesta fase, o quisto encontrara-se imaturo, ocorrendo uma série de alterações físicas e ao nível do conteúdo intracelular (Kobayashi *et al.*, 1997b). As células aumentaram drasticamente de volume e entraram numa fase de repouso na qual a célula fica rodeada por uma parede de celulose muito resistente composta, em parte, por substâncias como esporopolenina. O protoplasto ficou completamente vermelho devido à acumulação acentuada de astaxantina (Boussiba, 2000).

Quando os autores adicionaram sulfato de ferro à cultura, a biossíntese de carotenóides nos quistos foi bastante significativa, ocorrendo assim a fase de maturação, em que o quisto imaturo se tornou maturo.

Ulteriormente, os quistos maduros foram transferidos para meio fresco, verificando-se o reaparecimento de células móveis, sendo esta quarta fase denominada de germinação. Estas quatro fases dependeram sempre das condições ambientais presentes no meio em que a microalga se encontrava, podendo ou não ocorrer.

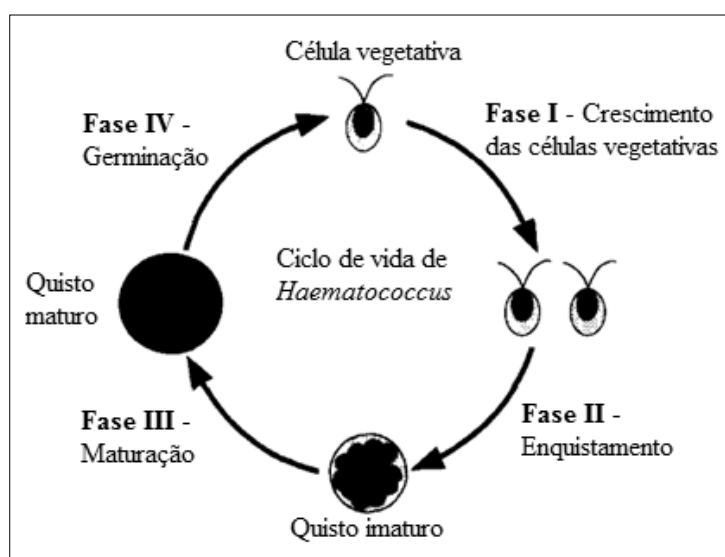


Figura 5. Diagrama do ciclo de vida de *H. pluvialis*, evidenciando as principais fases. (Adaptado de Kobayashi *et al.*, 1997b).

Estes autores referiram que durante o ciclo de vida, as células vegetativas têm níveis elevados de clorofila e proteína, mas têm baixos níveis de carotenóides. Durante o enquistamento ocorre degradação de clorofila e proteínas. A maturação dos quistos é acompanhada pelo aumento da biossíntese de carotenóides e pela degradação acelerada de proteínas. A germinação coincide com a síntese de clorofila e proteínas e degradação de carotenóides.

O conhecimento dos passos do ciclo celular pode revelar-se muito importante devido ao crescente interesse deste microrganismo como fonte biotecnológica de astaxantina. E uma vez que esta alga tem importantes características fotossintéticas, de motilidade e de morfogénese, poderia servir de modelo para investigar a função dos carotenóides noutros microrganismos (Kobayashi *et al.*, 1997b).

1.3.5. Citologia e fisiologia

O género *Haematococcus* é caracterizado por uma distinta matriz extracelular gelatinosa. Possui raios citoplasmáticos que irradiam do protoplasto para a periferia desta matriz. A composição química da matriz extracelular de Volvocales flageladas indicam que esta matriz consiste em glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Woessner & Goodenough, 1994). É composta por múltiplas camadas constituídas por fibras interligadas e por elementos granulares e cristalinos (Roberts, 1974). Tanto a camada interna como a mais externa são fibrosas e formam uma rede contínua. Dentro desta rede tridimensional está incorporada uma camada média cristalina tripartida (Woessner & Goodenough, 1994).

Quanto à parede da célula de *Haematococcus pluvialis*, existe pouca informação. Alguns autores verificaram que o quisto possuía uma parede espessa constituída por esporopolenina (Burczyk, 1987; Mendes-Pinto *et al.*, 2001). Contudo, mais tarde, a formação da parede do quisto foi descrita por uma camada trilaminar com material semelhante a esporopolenina, o algenano (biopolímero resistente existente nas paredes celulares de algumas algas verdes que facilita a sua preservação e registo fóssil) que, alguns autores, assumiram estar relacionado com o aumento da resistência à radiação ultravioleta, como já foi descrito noutras microalgas (Boussiba, 2000; Hagen *et al.*, 2002).

De acordo com Hagen *et al.* (2002), a espessura da parede celular do quisto é caracterizada por uma extraordinária resistência contra o ataque mecânico e químico. A

sua permeabilidade muito baixa impede uma fixação química fácil, podendo ser uma possível causa do baixo conhecimento sobre da morfogénese e ultraestrutura. Estes autores verificaram que a espessura da parede celular dos quistos diminuía a biodisponibilidade dos carotenóides acumulados, levando obrigatoriamente ao uso de técnicas dispendiosas para a fracturação da célula.

As células móveis apresentam uma matriz volumosa, transparente e gelatinosa, característica das células móveis volvocales. Os autores verificaram, do plasmalema para a periferia, uma camada praticamente transparente e de espessura variável (W1 de acordo com a terminologia de Goodenough & Heuser, 1985), preenchida por uma rede de fibras e estruturas granulares, seguida por uma camada média cristalina tripartida (TCL), com uma espessura de 35nm, que se encontrava rodeada por um estrato fibroso (W7), semelhante a W1, estando este estrato em contacto com o meio (Figura 6). A zona W4 verificou-se ser preenchida por estruturas granulosas distribuídas regularmente, com diâmetro de 5nm, enquanto a camada mais externa, W6, complexa e também ordenada, consistia de subunidades repetidas regularmente formando uma estrutura cristalina com um espaçamento de 21-23nm.

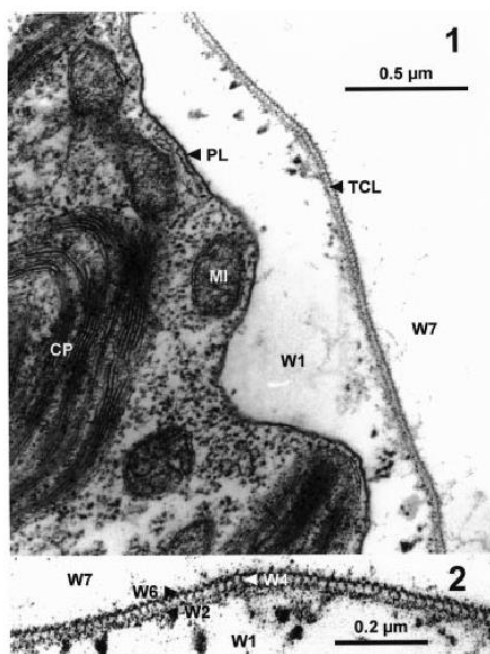


Figura 6. 1. Matriz extracelular de uma célula móvel de *H. pluvialis*: 1. Secção ultrafina da periferia da célula mostrando parte do cloroplasto (CP), mitocôndrias (MI), o plasmalema (PL) e a matriz extracelular adjacente constituída por dois estratos fibrilares, o interior (W1) e o exterior (W7), e por uma camada média cristalina tripartida (TCL); 2. Ampliação da camada média cristalina tripartida, consistindo na camada interna W2, na camada média W4 e na camada mais externa W6 (Hagen *et al.*, 2002).

Os mesmos autores verificaram que a morfogénese da célula móvel para quisto iniciou-se com o arredondamento dos protoplastos, conseqüente perda de mobilidade e formação da parede primária. Subseqüente à parede primária, registaram a formação de uma bainha trilaminar, que foi seguida pela produção de grande quantidade de parede primária, formando-se assim uma parede secundária. Primeiramente, esta parede secundária apresentou uma superfície suave mas, com o aumento da idade dos quistos (de 4 semanas a 3 meses), quando a parede celular adquiriu uma espessura maior, a parede secundária formou protuberâncias que se projetaram para o espaço intermédio. Posteriormente verificaram que nas células mais velhas as restantes camadas formadas anteriormente tinham-se desintegrado.

Deste modo, a parede celular de *H. pluvialis* sofre profundas alterações durante a morfogénese de célula móvel para quisto, considerando existir quatro fases: inicia com a matriz extracelular das células móveis (Figura 7 I), segue-se a deposição da parede primária (Figura 7 II), a diferenciação de uma bainha trilaminar (Figura 7 III) e termina com uma parede secundária (Figura 7 IV). Em paralelo, algumas partes da camada cristalina tripartida são perdidas e, com o desenvolvimento do quisto, a parede primária juntamente com a restante camada cristalina tripartida também são perdidas (Figura 7 V) (Hagen *et al.*, 2002).

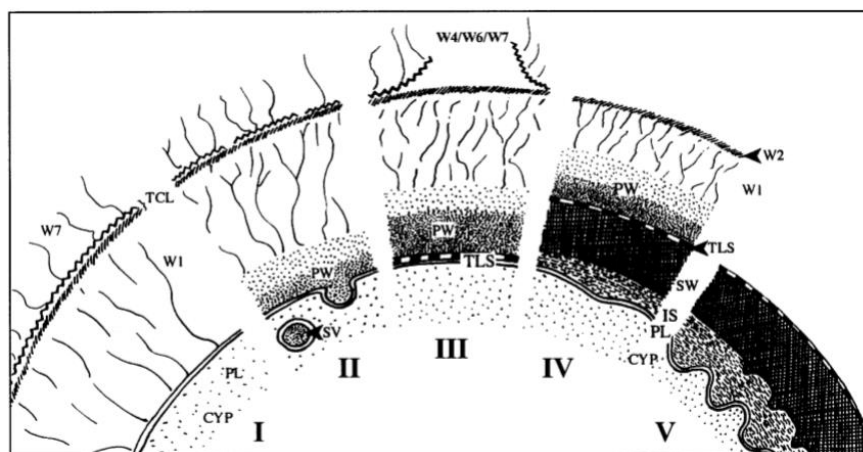


Figura 7. Fases de desenvolvimento da parede celular durante a morfogénese em *H. pluvialis*. I, células móveis com uma semana de cultura; II, células móveis com duas semanas de cultura; III, quistos com duas a três semanas de cultura; IV, quistos com pelo menos três semanas de cultura; V, quistos no seu estado final. CYP, citoplasma; IS, espaço intermédio; PL, plasmalema; PW, parede primária; SV, vesículas secretoras; SW, parede secundária; TCL, camada média cristalina tripartida, TLS, bainha trilaminar; W1 – W7, camadas da matriz extracelular (Hagen *et al.*, 2002).

Em 1984, Santos & Mesquita realizaram um estudo ultraestrutural da divisão celular de *H. pluvialis*. Verificaram que em todo o processo de mitose, o invólucro nuclear permaneceu praticamente intacto, sendo apenas quebrado no final da telófase quando os núcleos-filhos se separaram tornando-se individuais.

Quanto à citocinese, que pode não ocorrer imediatamente a seguir à primeira divisão nuclear, foi efetuada pelos sulcos de clivagem que foram, parcialmente, formados pelo plasmalema. Através da completa ou incompleta invaginação da membrana, verificou-se a formação de novos sulcos de clivagem que levaram à progressiva partição do protoplasto pluri-nucleado em células uninucleadas (Figura 8).

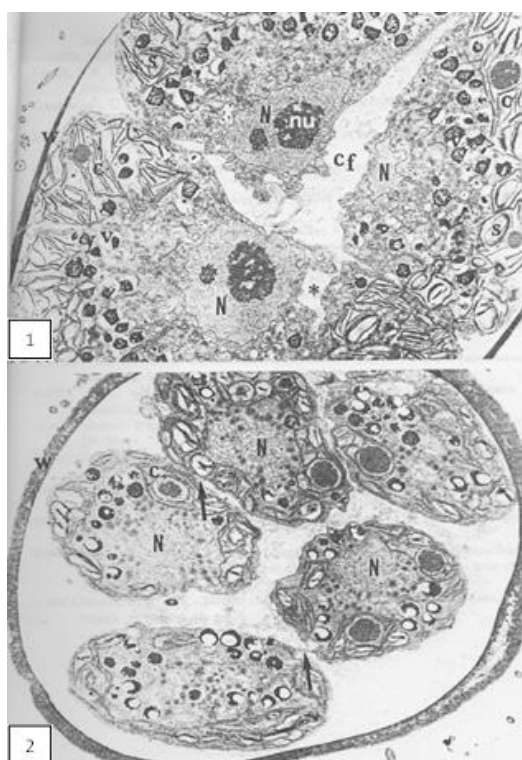


Figura 8. 1. Clivagem do protoplasto. Três perfis nucleares (N) entre os quais se observou o crescimento de sulcos de clivagem (cf) de largura variável. 2. Quisto com cinco zoósporos no seu interior (Santos & Mesquita, 1984b).

1.3.6. Distribuição e ecologia

Segundo Lorenz (1999), Hazen terá relatado que *Haematococcus pluvialis* era bastante comum e se encontrava amplamente distribuído pela Europa. Pocock, em 1937 e 1961, terá descrito a distribuição de espécies isoladas em África, enquanto Almgren, em 1966, referiu a ecologia e distribuição de *Haematococcus* na Suécia, verificando que esta microalga era facilmente encontrada em poças da chuva.

Atualmente esta microalga apresenta uma ampla distribuição, encontrando-se muito facilmente em habitats naturais que incluem pequenas piscinas naturais costeiras e continentais, furos de água e outro habitats de águas naturais e mesmo artificiais (Burchardt *et al.*, 2006).

Sabe-se também que esta microalga sobrevive em condições extremas, tolerando flutuações de temperatura, luz e salinidade, devido ao seu rápido enquistamento. Os quistos conseguem sobreviver em completa dessecação e podem ser transportados pelo vento, podendo germinar quando existem condições favoráveis presentes. Deste modo, ocorre na natureza, em todo o mundo, onde as condições para o seu crescimento sejam favoráveis (Hoek *et al.*, 1995).

1.4. Potencial biotecnológico de *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis apresenta algumas características desvantajosas quando comparada com a produção de outras microalgas à escala comercial devido à complexidade do seu ciclo de vida e ao seu crescimento lento, tal como foi comprovado pelo estudo efetuado por Cifuentes *et al.* (2003) sobre a otimização da sua biomassa, o total de carotenóides e a produção de astaxantina. Para além da influência de fatores como a disponibilidade de nutrientes no meio, intensidade luminosa e stresse salino, estes autores também apontaram a idade da cultura como sendo crucial, uma vez que as células mais jovens foram mais sensíveis aos fatores que desencadeiam condições adversas.

Com o decorrer dos anos, são vários os autores que pretendem otimizar o crescimento de *H. pluvialis* manipulando fatores nutricionais e ambientais, incidindo particularmente na variação de intensidade luminosa e na fonte de azoto (Zhang *et al.*, 1999). Cavalheiro e colaboradores (1999) ao submeterem culturas de *H. pluvialis* durante 900 horas, a uma intensidade luminosa de $70\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12h:12h luz/escuro, e meio adequado com a adição de vitamina B12 e biotina, verificaram que as células móveis predominaram nos primeiros dias sendo substituídas gradualmente pelos quistos, que se tornaram dominantes a partir das 300 horas da experiência, atingindo uma densidade máxima nas 800 horas.

Também Torzillo *et al.* (2005) ao tentarem encontrar uma intensidade luminosa ótima para o crescimento de células móveis de *H. pluvialis* expostas a várias luminosidades concluíram que a intensidade luminosa de $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ era a ideal

para o crescimento, representando um limite acima do qual ocorreriam alterações nos parâmetros fotoquímicos e na composição de pigmentos.

Goksan e colaboradores (2011) analisaram as características de crescimento de *H. pluvialis* quando afetado pela fonte de azoto (nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amónio e ureia), vitaminas e luz. O melhor crescimento ocorreu quando a concentração de nitrato de sódio era de 1,0g/L e a de nitrato de potássio de 0,5g/L, com luminosidades entre 75 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Raposo *et al.* (2012) otimizaram as condições de cultivo para o crescimento e para a carotenogénese, cultivando as células de *H. pluvialis* em meio adequado, com uma temperatura de 21°C, intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12h:12h luz/escuro e borbulhamento de ar. Ao ser atingida a fase estacionária de crescimento, as condições de cultivo foram alteradas para temperatura de 35°C e intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a indução da carotenogénese das células.

Quanto ao conteúdo lipídico, *Haematococcus pluvialis* acumula lípidos e astaxantina nos seus quistos perante condições de stresse. (Damiani *et al.*, 2010). Esta capacidade de crescimento ou sobrevivência numa ampla gama de condições ambientais, em conjunto com a sua capacidade para modificar eficazmente o metabolismo lipídico em resposta a diferentes condições de stresse (Roessler, 1990; Guschina *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008), tornou esta microalga num organismo interessante para o estudo da síntese de triglicéridos (TAGs) (Xu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008; Vasudevan & Briggs, 2008). A formação de corpos lipídicos cloroplasmáticos e extraplastidiais contendo TAGs e carotenóides sob condições de stresse já foi descrita em várias microalgas verdes, como *Dunaliella bardawil*, *Chlorella zofingiensis*, *Scenedesmus* sp. e *Haematococcus pluvialis* (Boussiba, 2000).

Damiani *et al.* (2010) analisou o conteúdo de lípidos e a composição de ácidos gordos de uma estirpe de *H. pluvialis*, sob três formas de cultura diferentes, sendo a primeira o controlo, em que as células foram colocadas, com intensidade luminosa de 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura a 24°C e borbulhamento contínuo de ar com 0,30cm³ de CO₂, a segunda, designada por condições de stresse A, em que as células foram expostas a elevada intensidade luminosa com fonte de azoto suficiente, e a terceira, denominada por condições de stresse B, em que as células foram sujeitas a elevada intensidade luminosa e privação de azoto. Verificaram que as células da cultura de controlo e da cultura com condições de stresse A tiveram um crescimento similar até ao terceiro dia, enquanto as células da cultura de condições de stresse B demonstraram um

crescimento reduzido. As culturas com condições de stresse A e B apresentaram um conteúdo lipídico elevado (percentagem de peso seco = % dw) quando comparado com o da cultura de controlo. O conteúdo de ácidos gordos monoinsaturados foi idêntico entre o controlo e a cultura sujeita ao stresse A. A cultura sujeita ao stresse B obteve um conteúdo maior de ácidos gordos polinsaturados. O perfil dos ácidos gordos foi semelhante para os três tipos de cultura, sendo os principais palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico e linolelaídico.

Céron *et al.* (2007) ao determinarem a influência das condições de cultivo (luz, temperatura, borbulhamento de ar e azoto) na atividade antioxidante e no conteúdo lipídico verificaram que os principais ácidos gordos detetados foram o ácido oleico, o mirístico, o palmítico, e o palmitoleico, sendo que todos variaram consoante a quantidade de azoto disponível. Em condições não limitantes de azoto no meio, as células móveis apresentaram uma quantidade de ácidos gordos menor quando comparadas com os quistos formados em condições limitantes de azoto, dado que nos quistos a quantidade de ácidos gordos atingiu 7,6% do peso seco total. Assim, e tendo em conta o estudo realizado por Schoefs *et al.* (2003) que já tinha mostrado o mesmo resultado, Céron *et al.* (2007) apresentaram a hipótese da acumulação de astaxantina requerer a síntese de ácidos gordos. Mais ainda, os resultados demonstraram que o ácido gordo predominante foi o ácido oleico. Esta correlação entre o ácido oleico e o conteúdo de carotenóides já tinha sido descrita para *Dunaliella salina* e para *Chlamydomonas* sp. por Mendoza *et al.* (1999) e por Bidigare *et al.* (1993), respetivamente. Analogamente, também Zhekisheva *et al.* (2002) tinham concluído que a acumulação de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* era acompanhada pela síntese de ácidos gordos, principalmente pelo ácido oleico, formando monoésteres de astaxantina.

Relativamente à atividade antioxidante, diversos estudos têm sido realizados para comparar a capacidade antioxidante entre as células móveis de *H. pluvialis* e os seus quistos, uma vez que são estes que podem acumular grandes quantidades de astaxantina. Céron *et al.* (2007) verificaram que a fração do extrato de células de *H. pluvialis* que apresentava menor atividade antioxidante era constituída principalmente por carotenóides livres (violaxantina, luteína, clorofila b, astaxantina e neoxantina), enquanto na fração com maior atividade antioxidante predominavam diésteres e monoésteres de astaxantina esterificados principalmente com ácido oleico e palmítico.

Dong *et al.* (2014) averiguaram qual dos extratos de células de *H. pluvialis*, resultantes de quatro métodos de extração de astaxantina, apresentavam maior

capacidade antioxidante. Verificaram que os extratos resultantes do pré-tratamento com ácido clorídrico seguido de extração com acetona foram os que demonstraram maior atividade antioxidante.

Vários autores descrevem que a capacidade antioxidante encontrada em *Haematococcus pluvialis* se deve essencialmente a astaxantina (Armenta *et al.*, 2009a; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Chu, 2011). Contudo, Goodwin & Jamikom (1954) identificaram outros pigmentos produzidos em *Haematococcus* durante a carotenogênese, para além da astaxantina, enquanto nas células móveis identificaram a luteína (75-80%) e o β -caroteno (10-20%) como os carotenóides principais.

Diversos autores têm analisado o conteúdo de carotenóides nas células de *H. pluvialis*, verificando uma acumulação quando as células são expostas a elevadas intensidades luminosas. Collins *et al.*, em 2011, analisaram a carotenogênese e as alterações da composição de pigmentos em células de *H. pluvialis* a fim de seguir a distribuição dos carotenóides. Verificaram que após vinte e quatro horas de stresse, houve evidências da acreção de β -caroteno em regiões distintas do citoplasma, sugerindo que o local da conversão de β -caroteno ocorre, em parte, fora do cloroplasto.

1.4.1. Astaxantina

O pigmento de *Haematococcus* foi denominado de hematocrómio até 1944 quando Tisher identificou o principal carotenóide como sendo astaxantina (Lorenz, 1999). Este pigmento vermelho-alaranjado tem o nome químico 3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona, forma molecular $C_{40}H_{52}O_4$ e peso molecular de 596,82 (Ozório, 2007). Pertence à família das xantofilas, sendo polar (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). É semelhante a outros carotenóides como o β -caroteno, a zeaxantina e a luteína porque compartilha muitas das funções metabólicas e fisiológicas atribuídas a estes compostos (Ozório, 2007). É o principal pigmento existente em diversas espécies aquáticas incluindo crustáceos, salmonídeos e outros peixes de viveiros, e mesmo em espécies não-aquáticas como o flamingo, fornecendo-lhes a desejável cor laranja-avermelhada (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). Estas espécies não produzem astaxantina mas obtêm-na consumindo microrganismos que sintetizam o pigmento (Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2004). Como tal, a microalga *Haematococcus pluvialis* tem sido essencialmente cultivada, a nível comercial, para a obtenção de astaxantina, sendo a aplicação mais comum a aquacultura, para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de

peixes, moluscos, crustáceos, e de outros organismos com interesse económico (Derner *et al.*, 2006).

H. pluvialis pode acumular astaxantina até 8% do seu peso seco celular sob a forma de enantiómero 3*S*, 3'*S* ou numa mistura de mono e diéster (Harker *et al.*, 1996), podendo constituir até cerca de 95% dos carotenóides totais nas células (Lee & Zhang, 1999). Contudo, a sua composição nos quistos está um pouco dependente da idade da cultura, uma vez que a proporção monoéster : diéster diminui com o tempo (Harker *et al.*, 1996). Para além de *H. pluvialis*, este pigmento tem sido identificado noutros organismos, tais como na levedura *Phaffia rhodozyma*, que acumula entre 0,02 e 0,03% (Johnson & An, 1991), *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum* sp. e na bactéria marinha *Agrobacterium aurantiacum* (Yuan *et al.*, 2002).

Segundo Armenta e colaboradores (2009a), a astaxantina encontra-se ligada a lípidos e a quitina através de ligações éster e imina, respetivamente. Além disso também pode estar ligada a proteínas através de ligações imina, designando-se este complexo de carotenoproteínas (complexos estáveis em que os carotenóides estão ligados a lipoproteínas).

1.4.1.1. Transformação e via de síntese

Nos últimos anos têm-se estudado as transformações que ocorrem nas células aquando da acumulação de astaxantina, tendo em conta vários aspetos (Boussiba, 2000).

As modificações estruturais das células associadas com a génese da astaxantina no género *Haematococcus* sempre foram um assunto controverso, especialmente no que respeita aos locais onde o pigmento aparece e os organelos que, eventualmente, intervêm. Segundo Santos & Mesquita (1984a), foi Lang que, em 1968, observou que o pigmento não era sintetizado no interior de um organelo, apontando claramente para uma localização extraplastidial da astaxantina. Lang (1968) descreveu ainda que a região perinuclear onde o pigmento começava a aparecer era uma zona densa, com retículo endoplasmático e rica em ribossomas. Contudo, Lang terá concluído que nem o retículo endoplasmático nem os dictiossomas, apesar da sua localização topográfica, estavam diretamente envolvidos na síntese do pigmento. Observou, também, que os pequenos glóbulos de astaxantina apareciam sempre fora das cisternas do retículo endoplasmático, desenvolvendo-se e formando inclusões grandes. Estas inclusões, depois de circundarem o núcleo, ocupavam todo o espaço entre os lóbulos do cloroplasto, mas nunca apareciam no interior deste. No entanto, de acordo com Santos

& Mesquita (1984a), Sprey, em 1970, considerou que os carotenóides secundários apareciam inicialmente nos plastoglóbulos cloroplastidiais.

Nas suas observações, Santos & Mesquita (1984a) verificaram inclusões de astaxantina sob variadas formas, incluindo formas esféricas, reticuladas e em formas de bastão filamentososo (Figura 9).

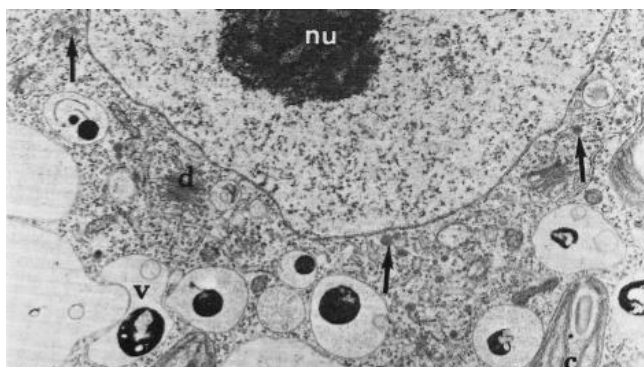


Figura 9. Célula móvel de *H. pluvialis* (com 4 dias). Depósitos de pigmentos de forma globular, embora raros e dispersos no citoplasma (setas). (Santos & Mesquita, 1984a).

Embora a síntese e acumulação do pigmento não tenha ocorrido de forma rigorosa e sincronizada em todas as células de uma só cultura, verificaram que, na maioria das células móveis mais velhas, a astaxantina tinha-se depositado em pequenas quantidades ou estava mesmo ausente. Contudo, nas culturas com quistos vermelhos velhas (11-20 dias), observou-se que o cloroplasto foi pressionado contra a parede celular devido à grande quantidade de astaxantina.

Deste modo, os resultados obtidos por Santos & Mesquita (1984), não suportaram a interpretação de Sprey (1970), estando mais concordantes com Lang (1968), pois verificaram que os depósitos de pigmentos estavam invariavelmente localizados no citoplasma. Embora na fase inicial da deposição do pigmento, os grânulos de astaxantina fossem semelhantes, em dimensão e eletrodensidade, com as vesículas do complexo de Golgi, a relação com o retículo endoplasmático foi mais relevante durante todo este processo. Contudo a síntese da astaxantina continuou muito controversa, pois outros autores, como Boussiba (2000), consideraram o local de síntese de astaxantina ser tanto nos cloroplastos como no citoplasma. Nos cloroplastos porque é nestes que os pigmentos carotenóides são sintetizados, uma vez que existe nos cloroplastos de *Haematococcus* um conjunto de enzimas responsáveis pela síntese de carotenos e de algumas xantofilas. No citoplasma porque também foi encontrado um

outro conjunto de enzimas ou seus precursores na sua forma latente, sendo ativado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) quando a microalga se encontra em condições ambientais desfavoráveis.

Os resultados descritos por Santos & Mesquita (1984) foram comprovados por Mendes-Pinto *et al.* (2001) e Collins *et al.* (2011), ao verificarem que nas células móveis a astaxantina apareceu primeiro em pequenas inclusões esféricas no citoplasma perinuclear. Segundo os mesmos autores, em condições de stresse, o β -caroteno é transportado através da membrana do cloroplasto e é convertido em astaxantina, que fica acumulada em gotículas lipídicas extraplastidiais.

As vias biossintéticas para a formação de astaxantina são diferentes para os vários organismos (Yuan *et al.*, 2002). No entanto, a via de síntese tem sido clarificada utilizando inibidores específicos, de modo a se compreender o papel fisiológico da astaxantina em *H. pluvialis* em resposta às condições de stresse (Gao *et al.*, 2012). Em 2002, Yuan e colaboradores, verificaram que a astaxantina foi sintetizada a partir do β -caroteno por duas reações de hidroxilação, e por duas etapas de oxidação direta de grupos cetônicos. No entanto, a ordem das reações e os produtos intermediários diferem consoante os vários organismos que produzem a astaxantina. Em *H. pluvialis*, a astaxantina é sintetizada a partir de β -caroteno, seguido de equinona, cantaxantina e adonirubina (Boussiba, 2000).

1.4.1.2. Indução

Sob condições de indução de astaxantina, as células verdes móveis são convertidas gradualmente em quistos vermelhos imóveis. Estas têm sido intensivamente estudadas desde os anos 50. Boussiba *et al.* (1991) sumarizaram as condições ótimas para a acumulação de astaxantina em *H. pluvialis* como elevada luminosidade ($175\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), limitação de azoto e fosfato e stresse salino (0,8% de cloreto de sódio). Atualmente sabe-se que o stresse provocado por diversas condições ambientais pode induzir o enquistamento e a acumulação de astaxantina, nomeadamente a luminosidade elevada, a ausência de nutrientes no meio, elevadas salinidades e temperaturas (Boussiba, 2000; Sarada *et al.*, 2002).

Alguns estudos têm indicado que o ácido salicílico também pode estimular a acumulação de astaxantina em *H. pluvialis*, embora o seu papel fisiológico e regulador na carotenogênese ainda não seja claro. Gao e colaboradores (2012) sujeitaram células

de *H. pluvialis* a diferentes concentrações de ácido salicílico e verificaram que ao fim de dezoito dias do tratamento com maior concentração de ácido salicílico, aproximadamente 85% das células móveis encontravam-se completamente vermelhas, apresentando também maior produção de astaxantina, enquanto nas do controlo apenas se notou uma ligeira variação de cor verde para vermelha. Estes autores observaram, também, que durante a carotenogénese, a superfície da célula tinha sofrido alterações, pois os quistos vermelhos apresentavam uma ondulação muito irregular (Figura 10) (Gao *et al.*, 2012).

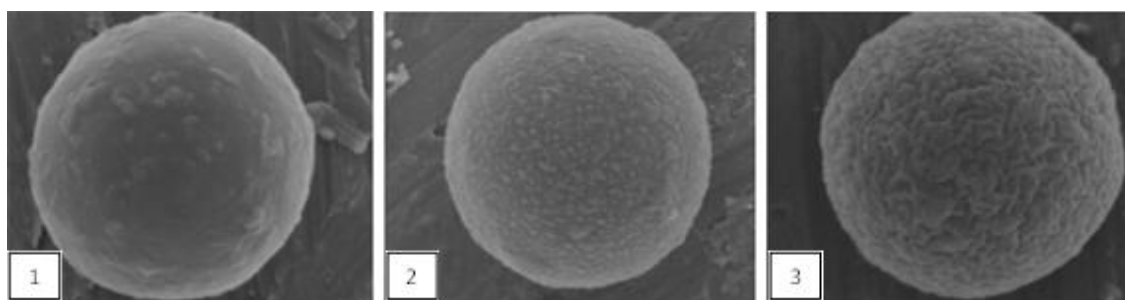


Figura 10. Alterações da superfície celular de *H. pluvialis* durante a carotenogénese induzida pelo tratamento com uma concentração de 50mg/L de ácido salicílico. 1. Célula verde com 0 dias de tratamento. 2. Célula parcialmente vermelha com 9 dias de tratamento. 3. Quisto vermelho com 18 dias de tratamento (Gao *et al.*, 2012).

Em 2001, Sarada *et al.*, também analisaram a influência de stresse na produção de astaxantina em células de *H. pluvialis*, verificando que elevadas concentrações de cloreto de sódio foram letais e que a idade da cultura foi crucial para que o stresse induzido conduzisse à produção da astaxantina, pois apenas as culturas mais velhas acumularam maiores quantidades de astaxantina, apresentando assim uma maior resistência.

No entanto, a estabilidade da astaxantina pode ser afetada por fatores de oxidação como temperaturas elevadas, presença de oxigénio e de luz. Armenta *et al.* (2009b) tentaram compreender o efeito destes fatores de oxidação na estabilidade da astaxantina, sujeitando-a a três fatores e a três níveis de oxidação: iluminação (luz completa, redução de luz e escuro), oxigénio (ar, redução de oxigénio, sem oxigénio) e temperatura (40, 25 e 5°C). Verificaram uma maior oxidação da astaxantina, de aproximadamente 97%, quando foi exposta a luz completa, oxigénio e a 45°C, durante 8 semanas. Alguns autores consideraram o oxigénio como o fator com maior efeito na

oxidação dos carotenóides, pois na ausência de oxigénio, os carotenóides toleram os efeitos das temperaturas relativamente elevadas (Armenta *et al.*, 2009b).

1.4.1.4. Funções e aplicações

A astaxantina é muito utilizada em aquacultura para efeitos da pigmentação e apelo ao consumidor, mas principalmente por ser um componente nutricional essencial para o crescimento e reprodução, sendo o carotenóide mais abundante nos crustáceos, uma vez que nestes pode estar presente na forma diéster, monoéster ou sob a sua forma livre. Além disso, devido à sua cor vermelha-alaranjada muito intensa e ao facto de não provocar reações alérgicas é considerada para aplicações cosméticas (Armenta *et al.*, 2009b).

Tem sido referido como um poderoso antioxidante biológico, possuindo diversos efeitos benéficos à saúde, sendo promissor para aplicações nutricionais (Hussein *et al.*, 2006). Revela uma atividade antioxidante dez vezes maior que outros carotenóides, como a zeaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006) e quinhentas vezes maior que a do α -tocoferol (Armenta *et al.*, 2009b). Isto permite uma potencial proteção numa ampla gama de doenças, nomeadamente no tratamento de cancro, diabetes, deterioração ocular, melhorias no sistema imunológico e anti-inflamatório, regulação do colesterol entre outros (Murillo, 1992; Miki, 1991; Guerin *et al.*, 2003; Armenta *et al.*, 2009b), sendo particularmente um potencial profilático contra o cancro de pele (Zhang *et al.*, 1999). Para além destas funções, a astaxantina também pode ser utilizada como aditivo corante na alimentação e em medicamentos, uma vez que não apresenta toxicidade (Guerin *et al.*, 2003; Armenta *et al.*, 2009b).

A aplicação em aquacultura é a mais promissora, nomeadamente do salmão, conferindo-lhe a cor vermelho-alaranjada (Armenta *et al.*, 2009b). Tendo em conta as aplicações descritas, muitos trabalhos têm focado a identificação, produção e utilização de fontes naturais de astaxantina (algas, leveduras e subprodutos de crustáceos) como alternativa ao pigmento sintético (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

A produção comercial de astaxantina proveniente de *Haematococcus* é muito recente. No entanto, em vários locais, como no Havai, têm sido desenvolvidos sistemas de cultura em larga escala de *Haematococcus* para comercializar a astaxantina como um suplemento alimentar para o consumo humano (Chu, 2011).

1.5. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo reunir informações sobre o potencial biotecnológico de uma estirpe de *Haematococcus pluvialis* Flotow existente na Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) com o número de referência ACOI 38. Para isso fez-se a análise do seu crescimento (por pesagem de biomassa), variando as condições de cultivo, nomeadamente o meio de cultura, a temperatura, a intensidade luminosa e o borbulhamento de ar, entre outros fatores, de modo a obter culturas predominantemente com células vegetativas móveis ou com quistos. Em seguida, fez-se a determinação da composição em ácidos gordos combinados e em pigmentos carotenóides, especialmente astaxantina, bem como do valor antioxidante, utilizando tanto células vegetativas como quistos.

2. Material e métodos

2.1. Material de estudo

A estirpe de *Haematococcus pluvialis* utilizada neste estudo pertence à coleção de microalgas da Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI), foi colhida num tanque granítico em Monsanto, Castelo Branco, por M. F. Santos, em Maio de 1998 e tem o número de referência ACOI 38.

O estudo foi iniciado com duas culturas, designadas por 38-1 e 38-2, com a mesma origem (Figura 11). Inicialmente, as células da cultura 38-1 tinham cor salmão e, a olho nu, não se observavam hifas de fungos, enquanto na cultura 38-2 eram visíveis aglomerados de células assim como hifas de fungos. Nesta existia uma maior concentração de quistos de cor acastanhada.

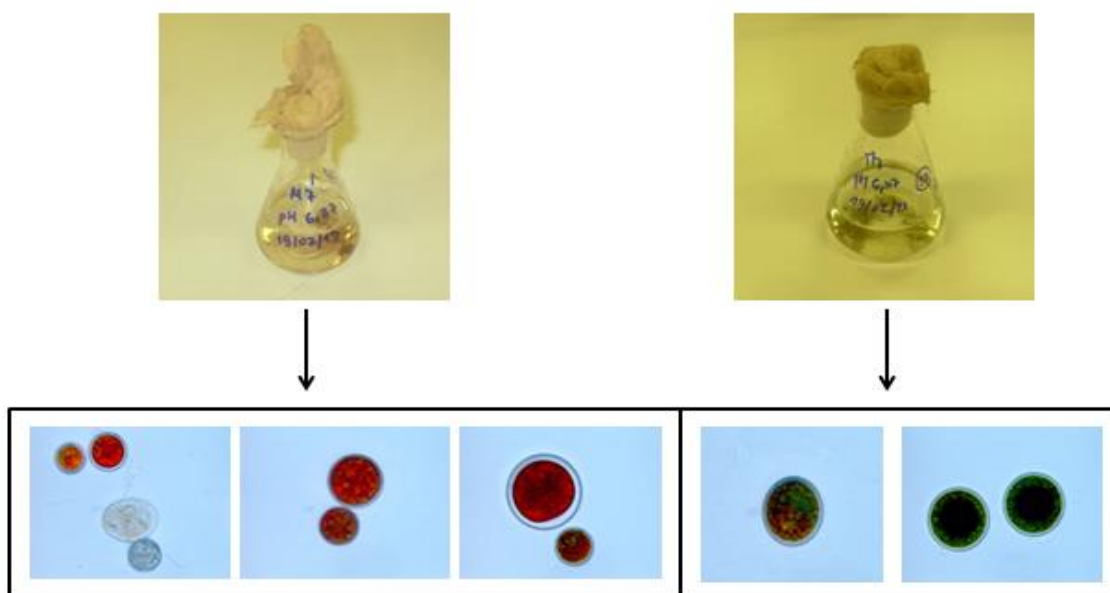


Figura 11. Culturas de *Haematococcus pluvialis* ACOI 38, designadas por 38-1 e 38-2, em balões de 100mL (parte superior) observadas ao microscópio ótico com ampliação de 200x.

1.1. Estabelecimento e crescimento de culturas

As culturas foram colocadas a crescer à temperatura de 23°C, baixa luminosidade aproximadamente $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e num meio de cultura denominado por M7 (Schlösser, 1994).

O meio M7 é constituído por KNO_3 a 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 0,2%, CaSO_4 em solução saturada (10mL/L), extrato de solo (20mL/L), extrato de *Sphagnum* (10mL/L), micronutrientes (5mL/L), vitamina B12 (1mL/L) e água destilada. A solução de micronutrientes é composta por H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. O meio de cultura, após preparação foi sempre esterilizado num autoclave Uniclave 88, durante aproximadamente 15 minutos, a uma temperatura de 120°C e pressão de 1 bar. O pH do meio foi sempre controlado, pois uma grande variação poderia conduzir a alterações indesejáveis nas culturas.

Para o aumento de biomassa o meio de cultura foi renovado, aproximadamente, de duas em duas semanas. Neste período foram monitorizadas potenciais contaminações através da observação ao microscópio ótico composto Leica.

Para a obtenção de quistos vermelhos de *H. pluvialis* realizaram-se várias experiências. Tendo em conta a literatura, experimentou-se o crescimento das células em ácido salicílico tendo como base o estudo de Gao *et al.* (2012). Adicionaram-se diferentes volumes (5, 10, 25, 50, 100 e 200mL) de uma concentração de 25mg/L de ácido salicílico a 100mL de cultura (com 3 semanas de crescimento) a uma temperatura de 23°C , fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e baixa luminosidade, $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não resultando quistos vermelhos. Efetuou-se uma segunda experiência, nas mesmas condições que a anterior, aumentando-se a concentração de ácido salicílico para 50mg/L e variando-se os volumes de ácido salicílico adicionado para 62,5mL, 75mL e 87,5mL. Também não resultaram quistos vermelhos. Realizou-se uma terceira tentativa, com a mesma concentração e os mesmos volumes de ácido salicílico utilizados na segunda experiência, mas com uma intensidade luminosa para $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por uma lâmpada Cool White L36W/840 ligada a um temporizador com fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e borbulhamento de ar, resultando quistos completamente vermelhos (Figura 12). Esta foi uma das soluções adotadas para a produção de quistos vermelhos em análises posteriores.

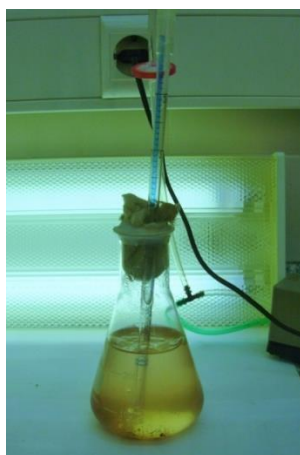


Figura 12. Obtenção de quistos vermelhos através da variação das condições de cultivo (intensidade luminosa de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, borbulhamento de ar e adição de ácido salicílico com uma concentração de 50mg/L ao meio).

Para todas as análises posteriores propiciaram-se diferentes condições de cultivo para as células móveis e para os quistos de *H. pluvialis*. Fizeram-se três réplicas de células móveis que cresceram sob condições de luminosidade de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura a 23°C , sem borbulhamento de ar e com fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro (Figura 13) enquanto as três réplicas dos quistos cresceram com luminosidade de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23°C , fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, borbulhamento de ar proporcionado por uma bomba Resun Air Pump, com e sem a adição de 50mg/L de ácido salicílico no meio (Figura 14).

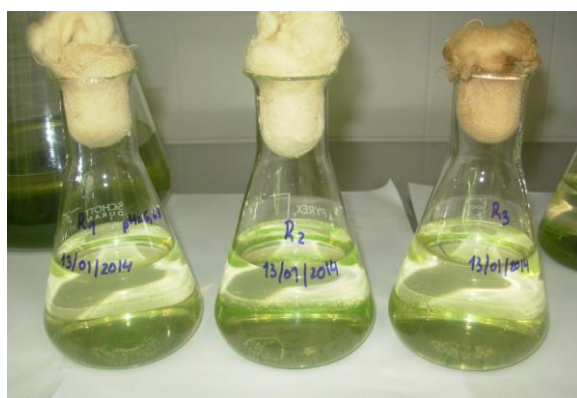


Figura 13. Culturas de células móveis de *H. pluvialis* mantidas a uma temperatura de 23°C , sem borbulhamento e com luminosidade de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



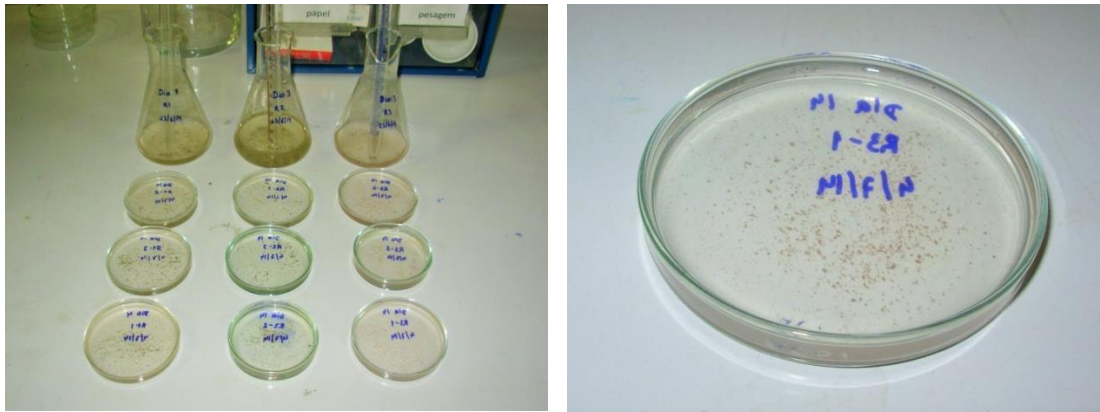
Figuras 14. Culturas de quistos de *H. pluvialis* mantidas a uma temperatura de 23°C , com borbulhamento de ar e com luminosidade de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os primeiros três balões da esquerda correspondem aos quistos que cresceram sem ácido salicílico no meio, enquanto os restantes correspondem aos que cresceram com ácido salicílico no meio.

Antes de qualquer análise, para se obter uma cultura densa, foi efetuado um inóculo, com uma proporção de 4:1 cultura/meio M7, de 5 dias nas condições de

luminosidade de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura a 23°C , sem borbulhamento de ar e com fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro.

O crescimento de *H. pluvialis* foi monitorizado com base no seu peso seco, em condições de crescimento diferentes durante 29 dias. Depois de se obter uma cultura densa, prepararam-se 27 balões Erlenmeyers de 250mL, com uma proporção de 1:1 cultura/meio M7, sendo três balões (R1, R2 e R3) correspondentes a cada dia de pesagem. Determinou-se a densidade celular da cultura no dia 0 e fez-se a contagem de células, em triplicado para cada réplica, ao microscópio ótico Nikon utilizando-se um hemocitômetro Tiefe Depth Profundeur. Foi necessária uma diluição de 0,5mL de cultura para 5 μ L de formaldeído a 37%, para fixar as células. Calcularam-se as médias e os desvios-padrão para cada réplica e utilizou-se uma fórmula para estimar a densidade inicial da cultura, aplicável quando a concentração de células é muito, muito baixa: $1600X + X$ por mL, sendo X o número de células encontradas.

Os balões com as culturas foram colocados a uma temperatura de 23°C , fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, luminosidade de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sem borbulhamento de ar. Fizeram-se pesagens em nove dias sendo que a determinação do peso seco foi feita através de dois métodos, secagem da amostra em caixas de Petri numa estufa Heraeus a 60°C durante, aproximadamente, 24 horas, e através de filtração e posterior secagem dos vidros de relógio com os respectivos filtros também na estufa a 60°C durante o mesmo período de tempo. Para o primeiro método, pesaram-se as caixas de Petri e em cada dia de contagem colheram-se três amostras, cada uma de 20mL, dos balões R1, R2 e R3, sendo colocadas nas caixas de Petri (Figuras 15 e 16) que, ulteriormente, foram a secar à estufa a 60°C . Após a secagem, as amostras foram pesadas e efetuaram-se as respectivas médias e desvios-padrão.



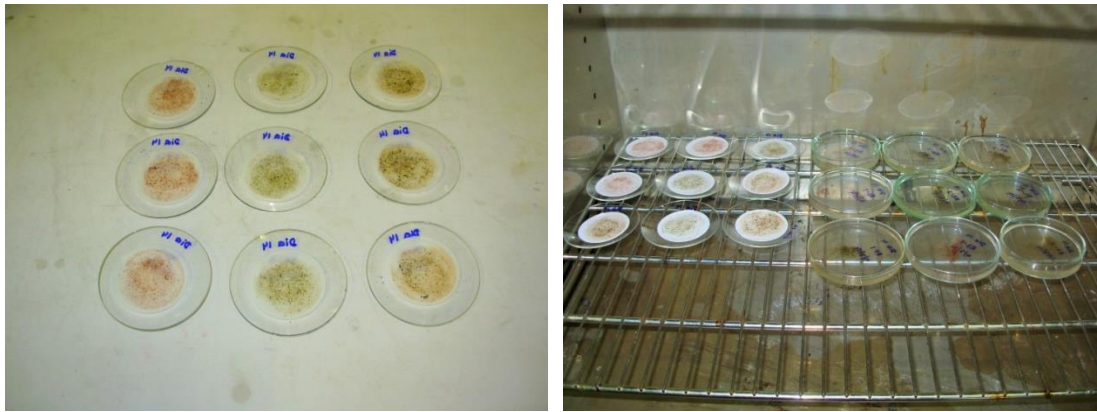
Figuras 15 e 16. Recolha de 20mL de cultura de cada balão para as respectivas caixas de Petri. Caixa de Petri com 20mL de cultura de uma réplica.

Quanto ao método pela filtração e secagem, inicialmente pesaram-se vidros de relógio, cada um com um papel de filtro Whatman. A cada dia de pesagem colheram-se três amostras de 10mL de cada balão R1, R2 e R3, que foram filtradas através do sistema de filtração Buchner com uma bomba de vácuo Millipore (Figura 17) e lavadas com 10mL de água destilada.



Figura 17. Sistema de filtração Buchner ligado à bomba de vácuo.

De seguida, recolheu-se o papel de filtro com a amostra, sobrepôs-se no vidro de relógio (Figura 18) e finalmente foram a secar à estufa a 60°C (Figura 19).



Figuras 18 e 19. Vidros de relógio com os respectivos papéis de filtro, três de cada réplica, depois da filtração de 10mL de cultura e de lavagem com 10mL de água destilada. Secagem das caixas de Petri e dos vidros de relógio com os respectivos papéis de filtro na estufa a 60°C.

Efetuuou-se uma segunda monitorização do crescimento, durante 29 dias, mas com condições de crescimento diferentes, aplicando-se uma intensidade luminosa de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23°C, fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e borbulhamento de ar (Figura 20). O inóculo de cultura foi obtido de forma idêntica ao primeiro. Efetuou-se o mesmo procedimento segundo os mesmos dois métodos de obtenção de peso seco. Posteriormente, com os dados obtidos por estes dois métodos construíram-se os gráficos de crescimento. Os resultados foram expressos em g/L.



Figura 20. Condições de crescimento (intensidade luminosa de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23°C, fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e borbulhamento de ar) das culturas a fim de se obter uma curva de crescimento de *H. pluvialis*.

Para determinar a produção, em 15 e 20 dias, colocaram-se as células móveis e os quistos a crescer nas condições respectivas já referidas anteriormente. Para além disso, também se determinou a produção nos quistos adicionando uma concentração de 50mg/L de ácido salicílico ao meio.

Retiraram-se 15mL de amostra homogeneizada de cada réplica e colocaram-se em cadinhos, previamente pesados, que foram a secar à estufa, a uma temperatura de 60°C. Ao fim de secos foram pesados. O mesmo procedimento foi efetuado ao fim de 15 e 20 dias.

Para se determinar a produção calcularam-se as médias das réplicas e os respetivos desvios-padrão e efetuou-se a subtração entre o peso seco final e o peso seco inicial. O resultado foi expresso em g/L por dias de crescimento.

2.3. Extração do lípido e análise da composição de ácidos gordos combinados

Foram realizadas réplicas para as células móveis, que cresceram durante 10 dias, e para os quistos com e sem ácido salicílico, que cresceram durante 20 dias, nas condições de cultivo mencionadas anteriormente. Ao fim dos 10 dias de crescimento das réplicas das células móveis e ao fim dos 20 dias de crescimento das réplicas dos quistos, os extratos de lípido foram preparados.

Analisou-se a composição em ácidos gordos combinados no lípido de culturas de células móveis e de quistos, com e sem ácido salicílico recorrendo à extração lipídica com solvente hidrofóbico e injeção em cromatografia gasosa. Seguiu-se o protocolo descrito por Lim *et al.* (2012), com algumas modificações. Inicialmente colocaram-se 10mL de biomassa (não seca) num Falcon, previamente pesado, que foi a centrifugar (o tempo de centrifugação depende da quantidade de biomassa) numa centrífuga Heraeus Megafuge 8 Centrifuge, descartou-se o sobrenadante e, logo de seguida voltou-se a pesar o tubo de Falcon com a biomassa centrifugada, a fim de se conhecer o peso desta biomassa. Este processo foi feito em triplicado. De seguida adicionou-se 1mL de n-hexano e 400µL de metanol à biomassa e colocaram-se os tubos durante 15 minutos em banho de ultrassons Bandelin Souvrex RK100 Transistor de frequência de 35kHz e potência de 240W, com 1-2% de detergente. Posteriormente retiraram-se 500µL do sobrenadante para um segundo tubo de Falcon, procedendo-se à transesterificação dos lípidos (transformação dos triglicerídeos e outros lípidos combinados em ésteres metílicos dos ácidos gordos), por adição de 100µL de metóxido de sódio, fazendo-se reagir a amostra durante 2 minutos num vórtex. Num Eppendorf colocou-se 150µL da fase superior do Falcon anterior e adicionou-se 100µL de padrão interno, composto por uma mistura de n-hexadecano (C6) e pentadecanoato de metilo (C15:0) com concentração de 0,03mg/mL. Logo após, injetou-se a amostra no cromatógrafo. A

análise em cromatografia gasosa (GC) foi realizada num cromatógrafo Chrompack CP 9001 equipado com um detetor de ionização de chama e um injetor do tipo divisor/não divisor e com uma coluna capilar TR_CN 100 (60m x 0.25mm de diâmetro interno x 0.20µm de espessura de fase estacionária). O hélio foi usado como gás de arraste com uma pressão no topo da coluna de 150kPa. A temperatura do detetor e do injetor foi de 260°C. O programa de temperatura foi o seguinte: a temperatura inicial manteve-se a 90°C durante 7 minutos após a injeção, de seguida aumentaram-se a 5°C/minuto até aos 220°C e assim foi mantida por 15 minutos. A amostra (1µL) foi injetada usando uma seringa (Hamilton 2µL) em modo não divisor, durante 45 segundos.

Por último analisaram-se os cromatogramas obtidos por comparação com o padrão SupelcoTM 37 Component FAME Mix Catalog No. 47885-U, mostrado na Figura 21. A identificação dos ácidos gordos presentes baseou-se na comparação dos tempos de retenção relativos (RRT) referentes às bandas resultantes das amostras com os do padrão interno e externo. A sua quantificação foi baseada nas áreas dos picos dos cromatogramas após a construção de uma reta de calibração com padrões autênticos, na presença do padrão interno com concentrações conhecidas. Depois de se calcular a média das áreas dos picos, efetuou-se a divisão pela área dos picos dos padrões internos, obtendo-se o resultado em mg ácido gordo/g biomassa (não seca), e em percentagem total de ácidos gordos.

Componente FAME	Peso %	Componente FAME	Peso %
1. Butírico (C4:0)	4	18. Oleico (C18:1n9c)	4
2. Caproico (C6:0)	4	19. Linolelaídico (C18:2n6t)	2
3. Caprílico (C8:0)	4	20. Linoleico (C18:2n6c)	2
4. Cáprico (C10:0)	4	21. Araquídico (C20:0)	4
5. Undecanóico (C11:0)	2	22. γ -Linolénico (C18:3n6)	2
6. Láurico (C12:0)	4	23. cis-11-Eicosanóico (C20:1)	2
7. Tridecanóico (C13:0)	2	24. Linolénico (C18:3n3)	2
8. Mirístico (C14:0)	4	25. Heneicosanóico (C21:0)	2
9. Miristoleico (C14:1)	2	26. cis-11, 14-Eicosadienóico (C20:2)	2
10. Pentadecenóico (C15:0)	2	27. Beênico (C22:0)	4
11. cis-10-Pentadecenóico (C15:1)	2	28. cis-8, 11, 14-Eicosatrienóico (C20:3n6)	2
12. Palmítico (C16:0)	6	29. Erúcico (C22:1n9)	2
13. Palmitoleico (C16:1)	2	30. cis -11,14,17- Eicosatrienóico (C20:3n3)	2
14. Heptadecenóico (C17:0)	2	31. Araquidónico (C20:4n6)	2
15. cis-10-Heptadecenóico (C17:1)	2	32. Tricosanóico (C23:0)	2
16. Esteárico (C18:0)	4	33. cis- 13, 16- Docosadienóico (C22:2)	2
17. Elaídico (C18:1n9t)	2	34. Lignocérico (C24:0)	4
		35. cis- 5, 8, 11, 14, 17- Eicosapentaenóico (C20:5n3)	2
		36. Nervónico (C24:1)	2
		37. cis- 4, 7, 10, 13, 16, 19- Docosahexaenóico (C22:6n3)	2

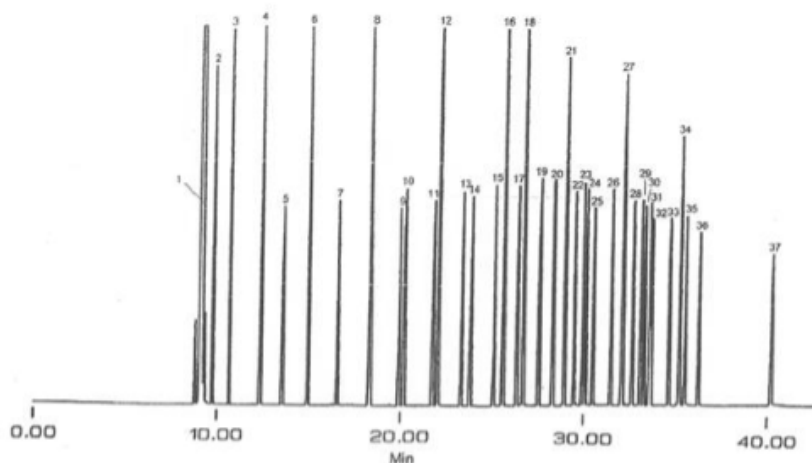
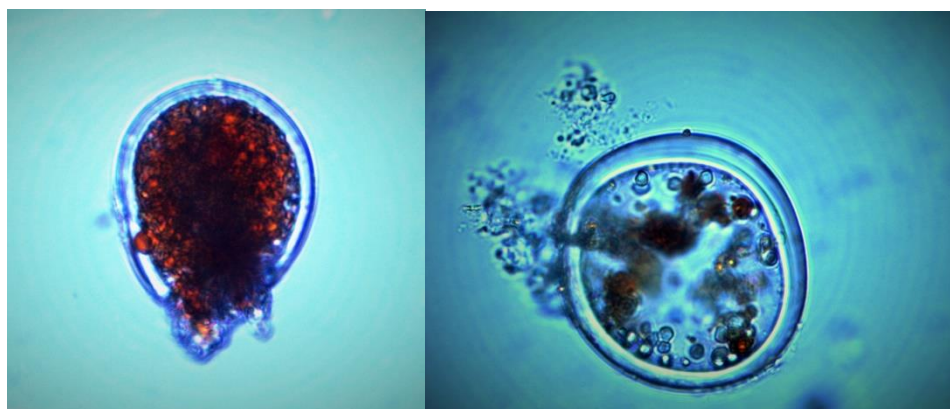


Figura 21. Padrão Supelco™ 37 Component FAME Mix Catalog No. 47885-U utilizado para comparação com os cromatogramas obtidos das injeções das amostras (Adaptado).

2.4. Preparação dos extratos de *H. pluvialis* e análise dos antioxidantes

Foram obtidos para cada réplica de cultura três tipos de extratos de biomassa, utilizando etanol, hexano e acetona. Usaram-se 10mL de cultura para a preparação dos extratos das células móveis e 35mL para a preparação dos extratos dos quistos, que se colocaram em tubos Falcon, previamente pesados, e centrifugaram-se, durante 15 minutos, a uma rotação de 4500rpm, descartou-se o sobrenadante e pesou-se a biomassa (não seca), numa balança analítica Kern 510. Posteriormente, consoante o peso da biomassa (não seca), foi adicionada uma determinada quantidade (em mililitros) dos

solventes etanol, hexano e acetona, de forma a obter-se uma concentração final dos extratos de 10mg de biomassa (não seca) em 1mL de solvente. Colocaram-se os extratos em banho de ultrassons, durante 30 minutos e com baixa luminosidade. Ao fim de 30 minutos, observou-se ao microscópio ótico uma amostra do extrato para verificar se a parede dos quistos tinha quebrado, observando-se apenas uma pequena quantidade de quistos com a parede quebrada. Colocou-se o extrato novamente em banho de ultrassons e ao fim de mais 30 minutos observaram-se as células ao microscópio ótico. Mais uma vez verificou-se que grande parte dos quistos não tinha a parede quebrada. Repetiu-se por mais 30 minutos e obtiveram-se os mesmos resultados. A figura seguinte corresponde a dois quistos que foram observados ao fim de uma hora e trinta minutos em banho de ultrassons, verificando-se apenas uma ligeira quebra da parede.



Figuras 22. Observação ao microscópio ótico de 2 quistos de *H. pluvialis* com a parede parcialmente quebrada ao fim de uma hora e trinta minutos em banho de ultrassons com uma frequência de 35kHz e potência de 240W, com uma ampliação de 800x.

Por fim, colocaram-se os tubos Falcon no congelador durante, aproximadamente, 12 horas, cobertos com papel alumínio para proteger os extratos da luminosidade. Antes do início de cada ensaio antioxidante obtiveram-se os espectros de absorvância no visível correspondentes a cada extrato, utilizando um espectrofotómetro UV-VIS Hitachi U-2000. A Figura 23 mostra os três extratos.

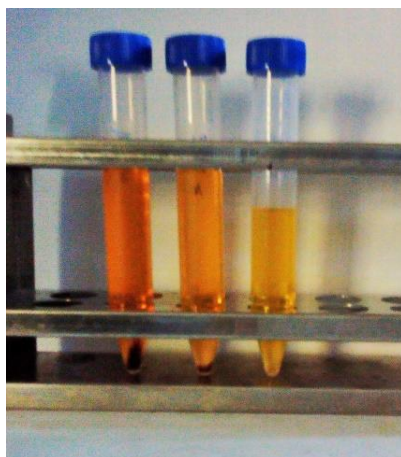


Figura 23. Extratos de quistos de *H. pluvialis* obtidos com acetona, etanol e hexano, respetivamente.

2.4.1. Preparação da solução de ABTS e do ensaio antioxidante

Para se efetuar o ensaio de 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfónico) (ABTS) seguiu-se o protocolo descrito por Guedes e colaboradores (2013) com algumas modificações. O princípio do método consiste em monitorizar o decaimento do radical produzido pela oxidação do ABTS, causada pela adição de uma amostra com compostos antioxidantes (Ribeiro, 2007). Neste trabalho, o $ABTS^+$ foi produzido via reação de 7mol m^{-3} ABTS com $2,45\text{mol m}^{-3}$ $K_2S_8O_4$ usando água como solvente, durante 16 horas, no escuro e à temperatura ambiente. Efetuou-se uma diluição da solução, até se obter uma absorvância a 734nm.

Como a concentração de antioxidantes presente nos extratos de biomassa pode variar numa escala elevada, efetuaram-se diferentes retas de calibração de ácido ascórbico, com concentrações conhecidas e diferentes volumes (10, 50, 100, 200, 300 e 350 μ L), de forma a englobar os diferentes valores de atividade antioxidante, usando-se a reta mais adequada consoante o resultado da atividade antioxidante do extrato.

Quanto ao ensaio analítico, adicionou-se 350 μ L do extrato da microalga a 1mL da solução de $ABTS^+$ diluída. Este procedimento fez-se em quadruplicado para o mesmo extrato. Ao fim de 6 minutos leram-se as absorvâncias utilizando o espectrofotómetro. A média das absorvâncias das quatro repetições foi usada como um ponto de referência. Os resultados foram estimados em mg/L equivalente a ácido ascórbico.

Também se mediu a atividade antioxidante de extratos etanólicos de alimentos que serviram como referência, em que se usou toda a matéria bruta (amora, cenoura, framboesa, mirtilo, morango, tomate e uva, adquiridos no supermercado), adicionando

diferentes volumes destes extratos (50µL do extrato da uva, mirtilo, morango e amora, 100µL do extrato de cenoura e da framboesa e 350µL do extrato de tomate) a 1mL da solução de ABTS⁺, dado que a atividade antioxidante destes difere. Também se obtiveram os seus espectros de absorvância no visível (Anexo 2).

2.4.2. Preparação da solução de DPPH e do ensaio antioxidante

Para efetuar o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) seguiu-se o protocolo descrito por Brand-Williams *et al.* (1994), com algumas modificações, sendo um método muito utilizado na medição da capacidade antioxidante de frutas e vegetais (Sendra *et al.*, 2006). O DPPH dissolvido forma um radical estável em solução, que apresenta uma coloração púrpura com um máximo de absorção a 515nm em metanol. O ensaio baseia-se no princípio de que o DPPH aceita um radical de hidrogénio (H•) a partir da molécula com atividade antioxidante, resultando na redução de DPPH• em DPPH₂, ocorrendo alteração da coloração púrpura para amarela com uma diminuição da absorvância a 515nm (Mishra *et al.*, 2012).

Otimizadas as condições, mediu-se a capacidade antioxidante de cada extrato das células móveis de *H. pluvialis*. Primeiramente, preparou-se a solução de DPPH 0,06mM dissolvendo 4,8 mg de DPPH num balão volumétrico de 200mL e ajustando o volume com metanol. Homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco coberto com papel alumínio, para evitar a exposição à luz.

Através de espectrofotometria, procedeu-se à realização do controlo com uma solução de 1,8mL de DPPH com 0,2mL de solvente (de etanol, hexano ou acetona, consoante o extrato que se estava a medir). De seguida, a partir da solução inicial de DPPH 0,06mM, prepararam-se 6 soluções com concentrações diferentes para se efetuar a reta-padrão de calibração do DPPH (Figura 24), a fim de verificar uma boa estabilização do DPPH. Fez-se a leitura de absorvâncias a 515nm.

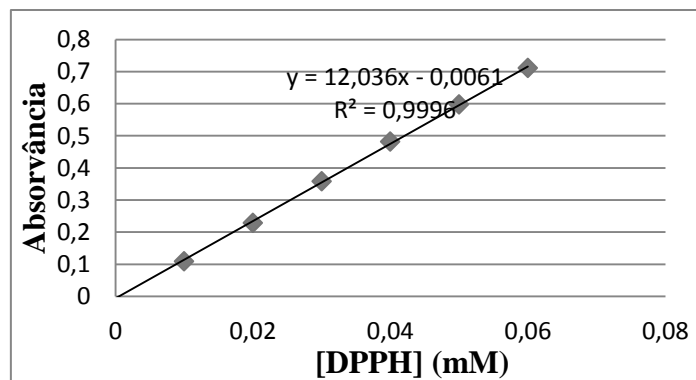


Figura 24. Reta-padrão de calibração da concentração de DPPH medida no comprimento de onda de 515nm.

Fizeram-se diluições para a obtenção de três concentrações de extrato diferentes, 3, 5 e 7mg/mL. Transferiram-se 0,2mL de cada extrato para tubos de ensaio com 1,8mL do radical de DPPH 0,06mM, homogeneizou-se e, ao fim de 15 minutos, fez-se a leitura de absorvâncias a 515nm. Todo este procedimento foi realizado num ambiente protegido da luz.

Para calcular a atividade anti-radical DPPH dos extratos calcularam-se as percentagens de inibição do radical DPPH•, ou seja, a capacidade que o composto antioxidante tem em inibir a presença do radical DPPH•, aplicando-se a fórmula: % inibição = $((Abs_{DPPH\ inicial} - Abs_{amostra}) / Abs_{DPPH\ inicial}) * 100$, e sempre que possível determinou-se o valor de EC₅₀, expresso em mg/mL, que se designa pelo resultado correspondente à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH•. Para tal, determinou-se a equação da reta do gráfico obtido pelas absorvâncias das diferentes concentrações dos extratos (3, 5, 7 e 10mg/mL), substituiu-se o valor correspondente a metade da absorvância inicial do controlo (1,8mL de DPPH com 0,2mL de extrato) pelo y da equação e calculou-se o valor de x da equação (Anexo 3). Tal como no ensaio de ABTS, também se mediu a atividade antioxidante de extratos etanólicos de alimentos (amora, cenoura, framboesa, mirtilo, morango, tomate e uva, adquiridos no supermercado, usando toda a matéria bruta do alimento) que serviram como referência.

2.5. Análise dos pigmentos

Para separar, identificar e quantificar os pigmentos presentes nos quistos vermelhos de *H. pluvialis* recorreu-se à Cromatografia em Coluna baseada no trabalho prático realizado na Escola Superior Agrária de Coimbra segundo o protocolo descrito

por Allinger (1976), seguido da leitura da absorvância no visível de soluções com volume ajustado, através de espectrofotometria. O método foi otimizado após várias tentativas tendo em conta os trabalhos realizados por alguns autores como Tripathi *et al.* (2002) e Torzillo *et al.* (2005). Os quistos cresceram nas condições mencionadas anteriormente sem ácido salicílico durante 22 dias. Uma determinada quantidade de biomassa foi centrifugada, pesada e colocada a secar sob vácuo durante três dias num exsiccador. Depois de seca, a biomassa foi congelada, a uma temperatura de aproximadamente -18°C , durante 24 horas. Com o auxílio de um almofariz, esmagaram-se os quistos, para tentar quebrar as suas paredes rígidas, colocou-se num frasco de vidro transparente, adicionou-se como solvente acetona e proporcionou-se uma atmosfera de azoto. Ulteriormente foi colocado em banho de ultrassons durante, aproximadamente, uma hora e meia. Este processo fez-se em triplicado.

Para a cromatografia, utilizou-se uma coluna cromatográfica de vidro com placa porosa, com cerca de 12,5mm x 30cm, à qual se adicionou primeiro éter de petróleo até cerca de 10cm da sua altura e, de seguida, adicionou-se-lhe a sílica gel G-60, à mesma altura. Manipulando cuidadosamente a torneira da coluna deixou-se sair o éter petróleo até ao nível da sílica, para esta não secar (Figura 25).



Figura 25. Coluna cromatográfica de vidro preparada com éter de petróleo e sílica gel G-60.

Após a amostra e a coluna estarem preparadas, com uma pipeta de Pasteur colocou-se o extrato de acetona da amostra no topo da coluna. Adicionou-se o eluente I (90mL de hexano + 10mL de acetona) para a eluição dos compostos apolares, como os carotenos (Figura 26, 1 e 2), alterando-se posteriormente a polaridade da fase móvel, com a adição do eluente II (80mL de hexano + 10mL de acetona + 10mL de metanol) para eluir as xantofilas (Figura 26, 3 e 4). As frações eluídas resultantes foram

transferidas para balões de diluição de 10mL e de 25mL (Figura 26, 5), ajustando-se, sempre que necessário, o volume com o solvente correspondente. Leram-se as absorvâncias das diferentes frações o mais rapidamente possível, para minimizar as perdas por isomerização e auto-oxidação. Efetuaram-se as médias das três réplicas e os respectivos desvios-padrão.

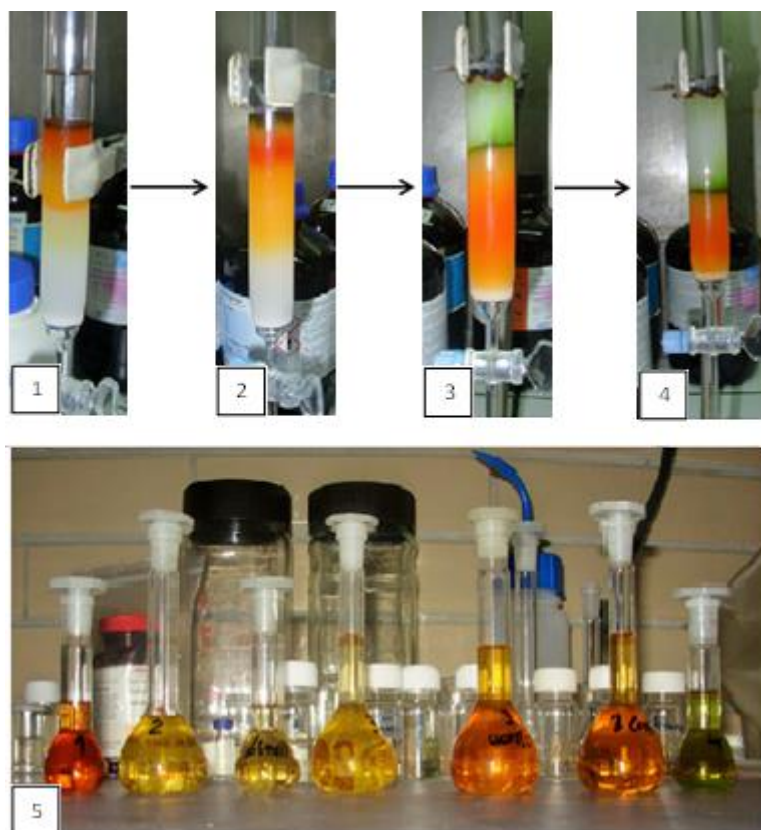


Figura 26. 1-4. As várias fases da cromatografia em coluna. As primeiras bandas (alaranjadas) são referentes aos carotenóides e a última (esverdeada) é referente à clorofila. 5. Recolha das diferentes frações resultantes para balões volumétricos de 10 e 25mL.

Por último identificaram-se os pigmentos com base nos espectros de absorção no visível mencionados por Roy *et al.* (2011) e quantificaram-se efetuando os respetivos cálculos através da lei de Beer-Lambert, com valores do coeficiente de absorvidade molar também descritos por Roy *et al.* (2011), expressando-se em g/1000g de biomassa.

3. Resultados

3.1. Crescimento de *H. pluvialis* baseada em peso seco

Nas culturas que cresceram sem borbulhamento de ar e com luminosidade de aproximadamente $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, estimou-se uma densidade inicial de 1681 células/mL por contagem das células ao hemocítmetro.

Ao fim de 29 dias, o crescimento baseado no peso seco estimado através de secagem de caixas de Petri em estufa a 60°C mostra nos primeiros 3 dias uma fase de latência e entre os dias 3 e 6 uma fase exponencial, mantendo-se posteriormente em fase estacionária durante os restantes 23 dias (Figura 27).

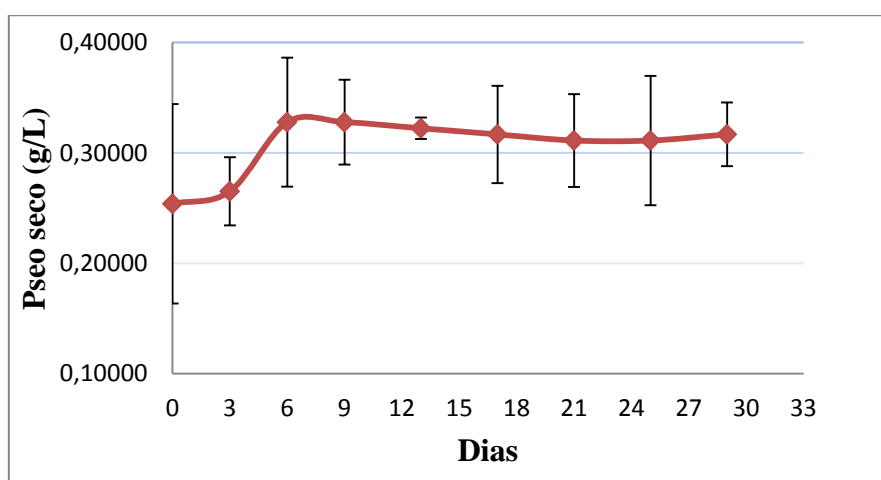


Figura 27. Crescimento de *Haematococcus pluvialis* com intensidade luminosa de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sem borbulhamento de ar, durante 29 dias, baseado no peso de biomassa seco (g/L) estimado por secagem de caixas de Petri em estufa, com os respetivos desvios-padrão.

O crescimento de *H. pluvialis* nas condições mencionadas anteriormente, mas baseado no peso seco estimado por filtração e posterior secagem na estufa a 60°C , mostrou uma fase exponencial nos primeiros 9 dias, uma fase estacionária entre os dias 9 e 25, verificando-se um aumento do dia 25 ao dia 29 (Figura 28).

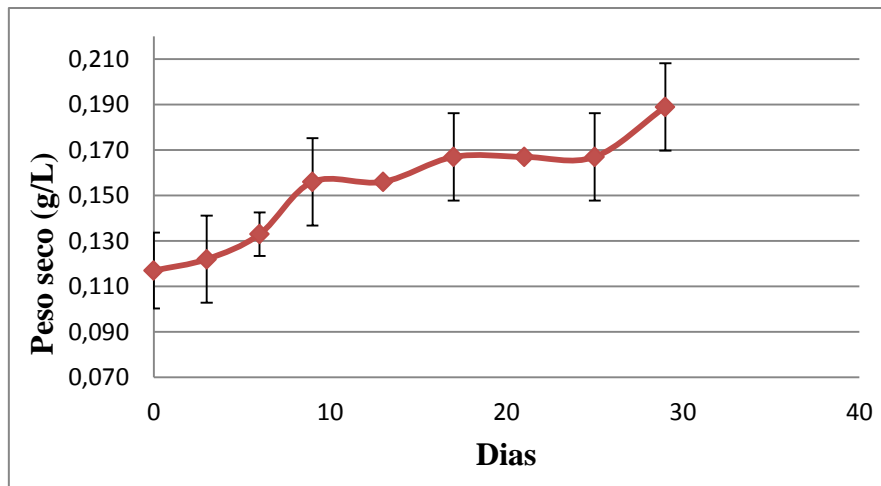


Figura 28. Crescimento de *Haematococcus pluvialis* com intensidade luminosa de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sem borbulhamento de ar, durante 29 dias, baseado no peso de biomassa seco (g/L) obtido por filtração e secagem em estufa, com os respectivos desvios-padrão.

Numa segunda monitorização de crescimento de *H. pluvialis*, as culturas cresceram com borbulhamento de ar e com intensidade luminosidade de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando uma densidade inicial de 1617,01 células/mL.

Ao fim de 26 dias de crescimento, baseado em peso seco estimado através de secagem de caixas de Petri em estufa a 60°C , verificou-se um crescimento exponencial nos primeiros 3 dias, seguido de uma fase estacionária até ao dia 6. A partir do dia 6 até ao último dia observou-se um aumento significativo (Figura 29).

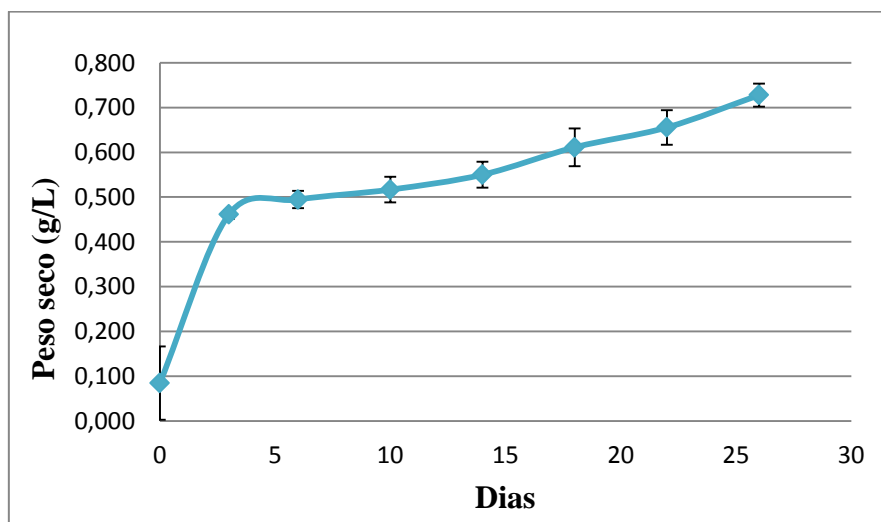


Figura 29. Crescimento de *Haematococcus pluvialis* com intensidade luminosa de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e borbulhamento de ar, durante 26 dias, baseado no peso de biomassa seco (g/L) obtido por secagem de caixas de Petri em estufa, com os respectivos desvios-padrão.

O crescimento de *H. pluvialis* nas mesmas condições referidas anteriormente, mas baseado no peso seco estimado por filtração e posterior secagem na estufa a 60°C, apresentou uma fase de latência nos primeiros 3 dias, seguida de uma fase exponencial até ao dia 10. Entre os dias 10 e 14 a cultura alcançou a fase estacionária e do dia 14 até ao dia 26 verificou-se um ligeiro aumento (Figura 30).

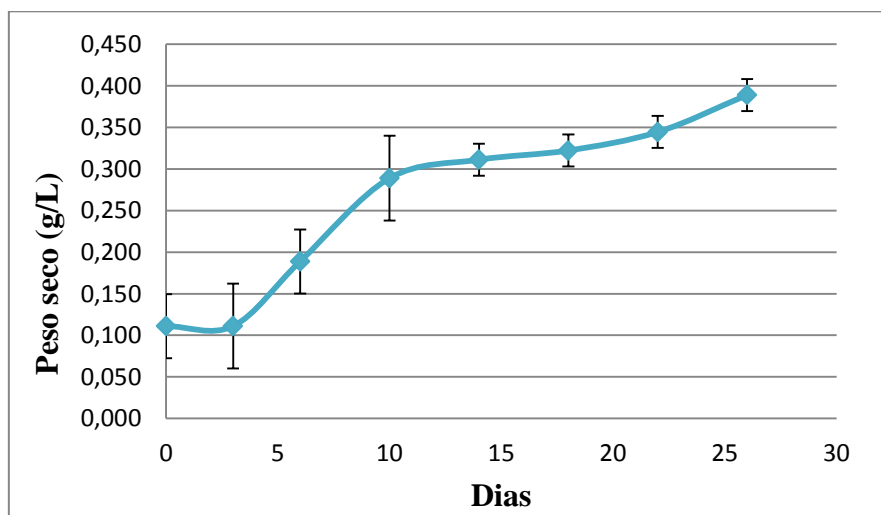


Figura 30. Crescimento de *Haematococcus pluvialis* com intensidade luminosa de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e borbulhamento de ar, durante 26 dias, baseado no peso seco (g/L) estimado por filtração e secagem à estufa, com os respetivos desvios-padrão.

As alterações da morfologia celular foram acompanhadas através da observação ao microscópio ótico e registadas fotograficamente através de câmara fotográfica Leica acoplada ao microscópio (Figura 31 e 32).

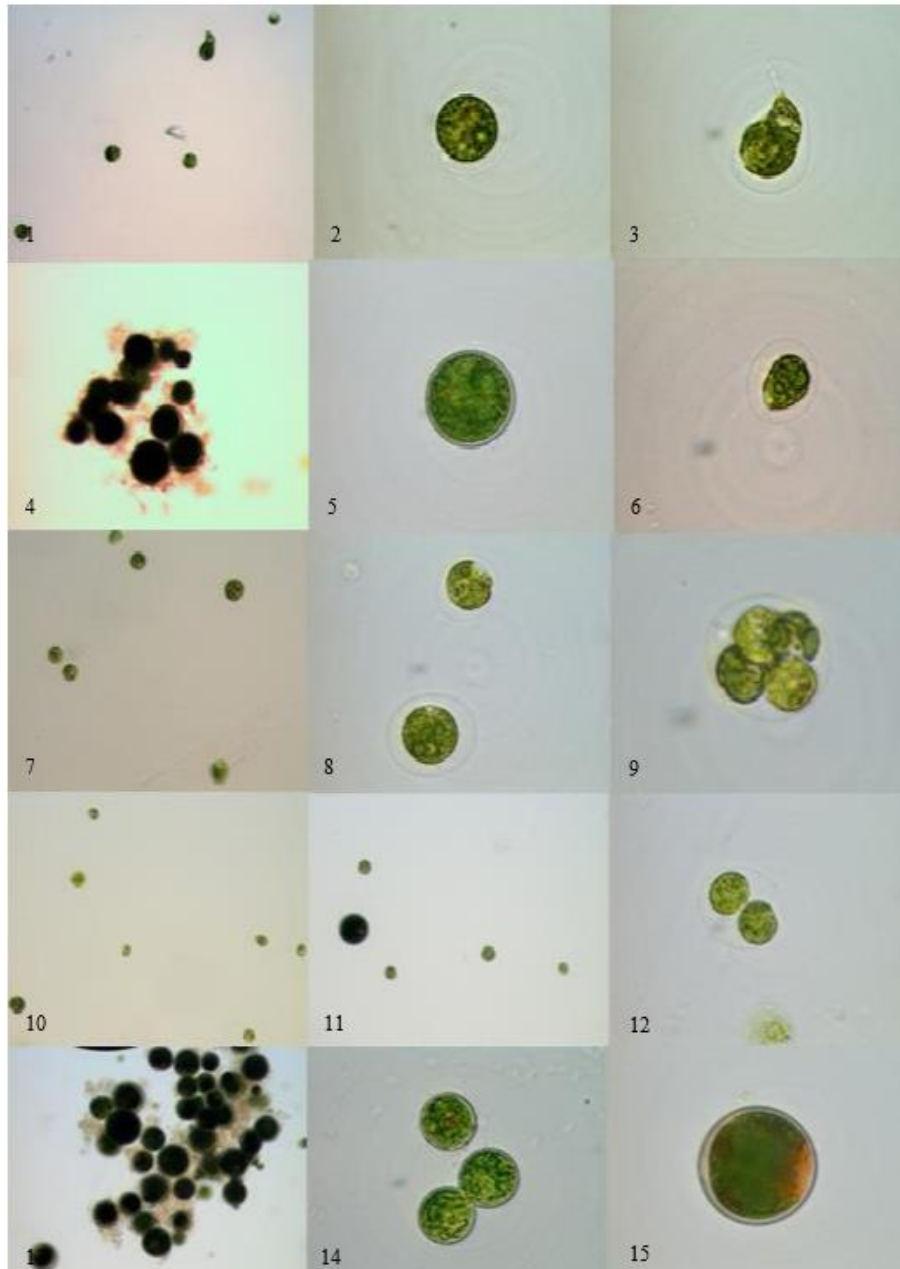


Figura 31. Culturas observadas ao microscópio ótico com diferentes ampliações nos dias 0, 6, 13, 21, e 29 referentes ao crescimento nas condições de intensidade luminosa de $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sem borbulhamento de ar. No dia 0, a cultura apresentava baixa densidade, com algumas células móveis e poucos quistos verdes. As células móveis, cilíndricas, com a camada de mucilagem bem visível, encontravam-se em divisão (Figura 31 - 1, 2 e 3). No dia 6 observaram-se poucos aglomerados de quistos verdes e células móveis verdes (Figura 31 - 4, 5 e 6). No dia 13 observaram-se quistos verdes e divisão de células móveis (Figura 31 - 7, 8 e 9). No dia 21 verificou-se que a cultura estava mais densa (Figura 31 - 10, 11 e 12). No dia 29, a maioria dos quistos eram verdes, existindo alguns laranja-acastanhados (Figura 31 - 13, 14 e 15).

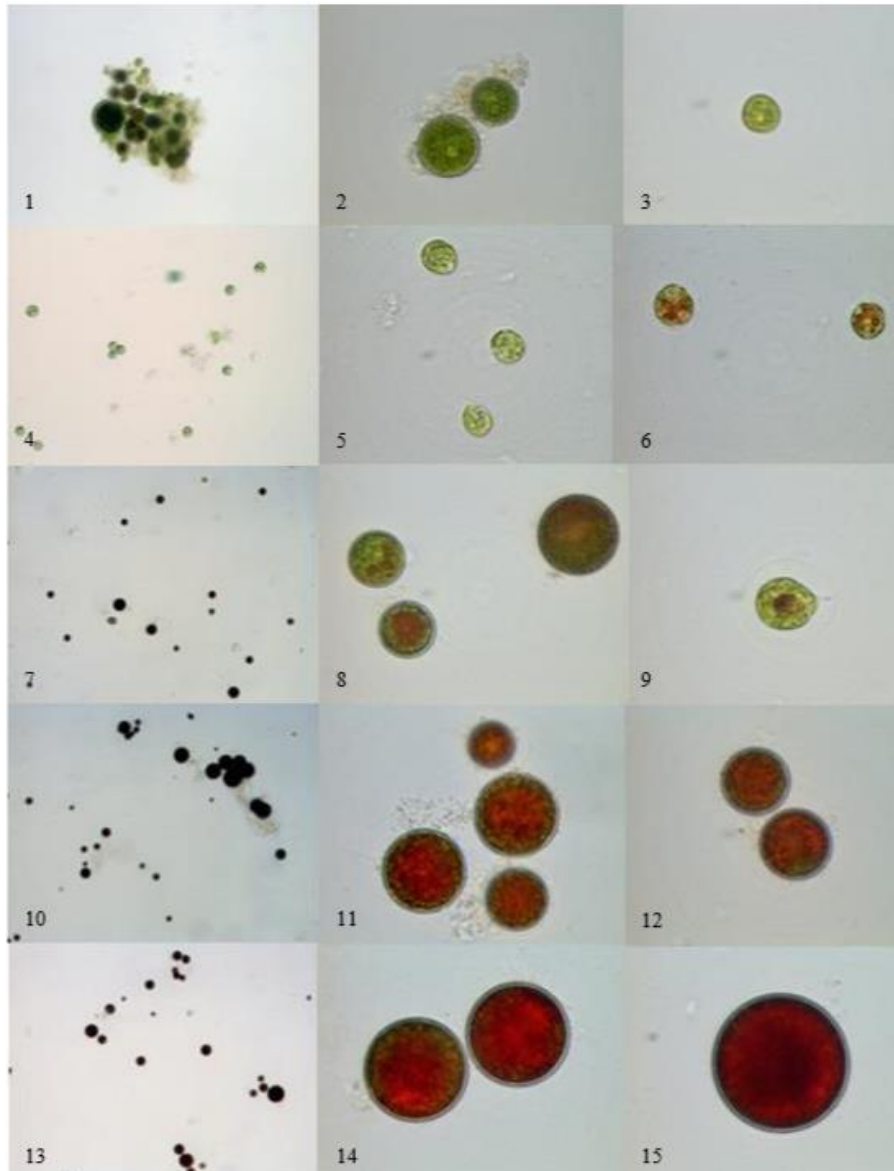


Figura 32. Culturas observadas ao microscópio óptico com diferentes ampliações nos dias 0, 6, 14, 22 e 26 referentes ao crescimento nas condições de intensidade luminosa de $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e com borbulhamento de ar. No dia 0 observou-se pouca densidade, algumas células móveis cilíndricas e alguns aglomerados de quistos verdes, alguns com o centro acastanhado (Figura 32 - 1, 2 e 3). No dia 6 a cultura apresentou maior densidade, com células móveis a adquirirem uma coloração acastanhada e quistos verdes (Figura 32 - 4, 5 e 6). No dia 14 observaram-se as células móveis ainda em divisão e quistos laranja-acastanhados (Figura 32 - 7, 8 e 9). No dia 22 verificou-se uma densidade significativa de quistos, a maioria laranja-avermelhados (Figura 32 - 10, 11 e 12). No dia 26 a maioria dos quistos tinha o citoplasma completamente vermelho (Figura 32 - 13, 14 e 15).

3.2. Crescimento celular após 15 e 20 dias

Atendendo aos resultados obtidos (Tabela 2), verifica-se que a biomassa de células móveis de *Haematococcus pluvialis*, ao fim de 15 dias teve um crescimento de

aproximadamente 0,083g/L, enquanto os quistos sem ácido salicílico cresceram cerca de 0,450g/L em 20 dias e os quistos com ácido salicílico no meio cresceram apenas 0,167g/L no mesmo período de tempo.

Tabela 2. Valores em peso seco da biomassa de células móveis, dos quistos sem ácido salicílico e dos quistos com ácido salicílico no meio, ao fim de 15 e de 20 dias, respetivamente. SA, ácido salicílico.

	Biomassa (g/L)	Σ
Células móveis	0,083	0,002
Quistos sem SA	0,450	0,010
Quistos com SA	0,167	0,004

3.3. Extração de lípido e análise de ácidos gordos combinados

Das amostras das células móveis e dos quistos com e sem ácido salicílico no meio sujeitas à extração do lípido, sendo este transesterificado para obter ésteres metílicos dos ácidos gordos combinados, resultaram os cromatogramas mostrados nas Figuras 33 a 35.

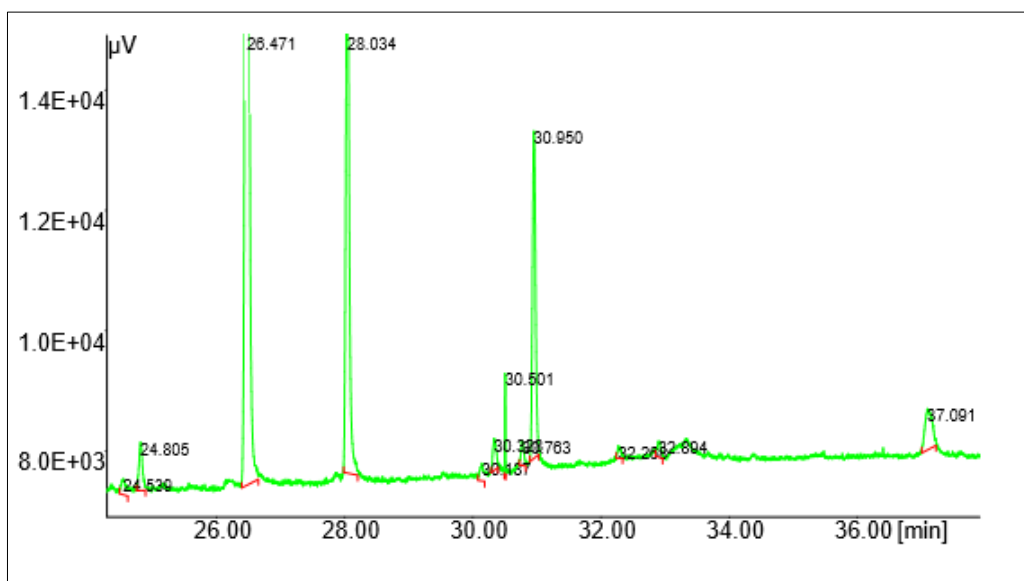


Figura 33. Cromatograma resultante de uma injeção do extrato transesterificado das células móveis de *H. pluvialis*, apresentando como ácidos gordos principais o ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oleico (C18:1n9c).

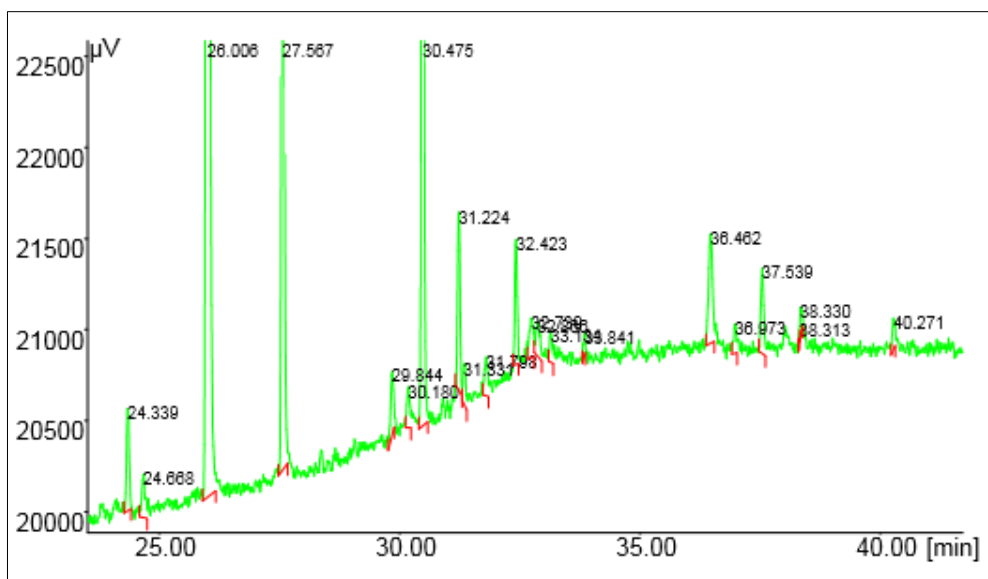


Figura 34. Cromatograma resultante de uma injeção do extrato transesterificado dos quistos de *H. pluvialis* com ácido salicílico, apresentando como ácidos gordos principais o ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9c) e linoleico (C18:2n6c).

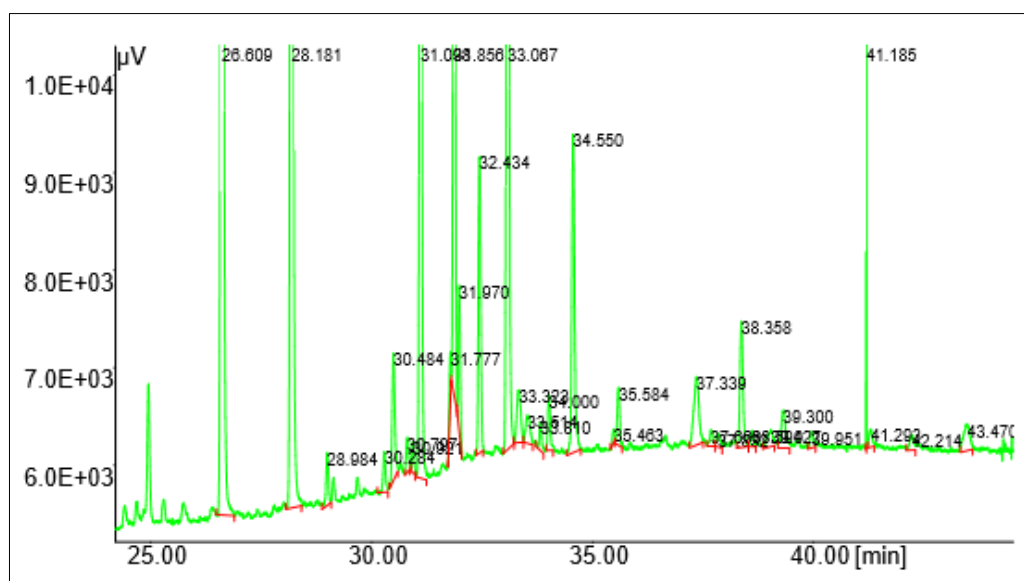


Figura 35. Cromatograma resultante de uma injeção do extrato transesterificado dos quistos de *H. pluvialis* sem ácido salicílico, apresentando como ácidos gordos principais o ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), e linoleico (C18:2n6c).

Após a obtenção dos cromatogramas, efetuou-se a identificação e quantificação, verificando-se que nas células móveis de *H. pluvialis* o ácido gordo em maior quantidade foi o ácido esteárico (0,088mg ácido gordo/g biomassa (não seca)) enquanto nos quistos, tanto os com e sem ácido salicílico no meio, o ácido gordo mais abundante

foi o ácido palmítico (0,169mg ácido gordo/g biomassa (não seca) e 1,097mg ácido gordo/g biomassa (não seca)) (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação e quantificação dos ácidos gordos presentes nas células móveis e nos quistos de *H. pluvialis*, tanto os que cresceram na presença como na ausência de ácido salicílico no meio. SA, ácido salicílico.

Ácido gordo	Fase móvel (mg ácido gordo/g biomassa (não seca))	% Ácidos gordos totais	Quistos com SA (mg ácido gordo/g biomassa (não seca))	% Ácidos gordos totais	Quistos sem SA (mg ácido gordo/g biomassa (não seca))	% Ácidos gordos totais
Ácido palmítico	0,074 ± 0,017	40,00	0,169 ± 0,169	45,19	1,097 ± 1,663	32,57
Ácido heptadecenóico	0,003 ± 0,001	1,62	0,012 ± 0,006	3,21	0,103 ± 0,171	3,06
Ácido esteárico	0,088 ± 0,037	47,57	0,145 ± 0,145	38,77	0,772 ± 0,983	22,92
Ácido eláidico	-	-	-	-	0,028 ± 0,039	0,83
Ácido oleico	0,009 ± 0,001	4,86	0,015 ± 0,015	4,01	0,376 ± 0,565	11,16
Ácido linolelaídico	0,003 ± 0,003	1,62	-	-	0,250 ± 0,405	7,42
Ácido linoleico	0,006 ± 0,005	3,24	0,022 ± 0,022	5,88	0,707 ± 1,083	20,99
Ácido araquídico	0,002 ± 0,001	1,09	0,002 ± 0,001	0,53	0,031 ± 0,042	0,92
Ácido eicosanóico	-	-	0,004 ± 0,004	1,07	-	-
Ácido linolénico	-	-	-	-	0,004 ± 0,001	0,13
Ácido araquidónico	-	-	0,005 ± 0,002	1,34	-	-

3.4. Ensaio antioxidantes através do radical ABTS

A capacidade antioxidante dos extratos de etanol, hexano e acetona das células móveis de *H. pluvialis*, através do ensaio de ABTS foi apenas possível de realizar no extrato etanólico que apresentou uma atividade antioxidante de 6,59mg/L equivalente a ácido ascórbico. A atividade antioxidante dos extratos de hexano e de acetona não se mediu, uma vez que a solução de ABTS é diluída em água e estes solventes não são solúveis em água. Também nos quistos, com e sem ácido salicílico, o ensaio só se efetuou com extratos etanólicos pelas razões anteriormente referidas. No extrato etanólico dos quistos sem ácido salicílico registou-se uma atividade antioxidante de 2,73mg/L equivalente a ácido ascórbico, enquanto o extrato etanólico dos quistos com ácido salicílico obteve uma atividade antioxidante de 0,13mg/L equivalente a ácido ascórbico. Verificou-se que, de entre os extratos etanólicos dos alimentos utilizados como padrão, a amora apresentou uma maior atividade antioxidante (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade antioxidante efetuada pelo teste ABTS dos extratos etanólicos das células móveis, dos quistos com e sem ácido salicílico de *H. pluvialis* e dos extratos etanólicos dos alimentos utilizados como referência. SA, ácido salicílico.

Amostra	Concentração (mg/L equivalente a ácido ascórbico)
Extrato etanólico de células móveis	6,59
Extrato etanólico de quistos	2,73
Extrato etanólico de quistos SA	0,13
Amora	60,02
Morango	55,12
Uva	34,11
Mirtilo	26,90
Framboesa	16,03
Cenoura	5,98
Tomate	0,44

Comparando com a atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos alimentos utilizados como referência, verifica-se que o extrato etanólico das células móveis de *H. pluvialis* apresentou uma atividade antioxidante idêntica à da cenoura, enquanto quistos sem ácido salicílico entre a cenoura e o tomate e os quistos com ácido salicílico obtiveram uma atividade antioxidante inferior à do tomate.

3.5. Ensaio antioxidante através do radical DPPH

Atendendo aos espectros de absorção no visível obtidos dos extratos de etanol, acetona e hexano das células móveis de *H. pluvialis* (Figuras 36 a 38), verifica-se, através da absorvância máxima, que não existiu nenhuma interferência com a absorvância do radical DPPH, o qual absorve a 515nm.

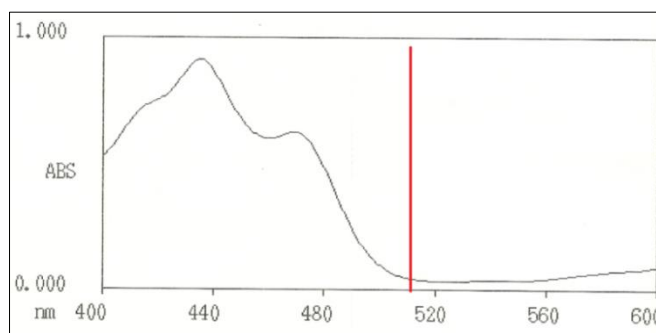


Figura 36. Espectro de absorção no visível obtido do extrato de etanol das células móveis de *H. pluvialis*, com absorvância máxima a 430nm, aproximadamente.

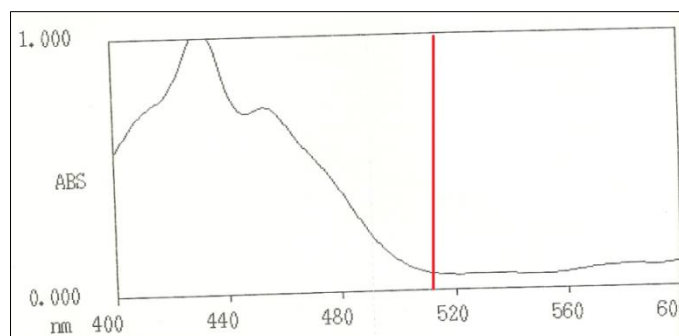


Figura 37. Espectro de absorção no visível obtido do extrato acetona das células móveis de *H. pluvialis*, com absorvância máxima a 430nm, aproximadamente.

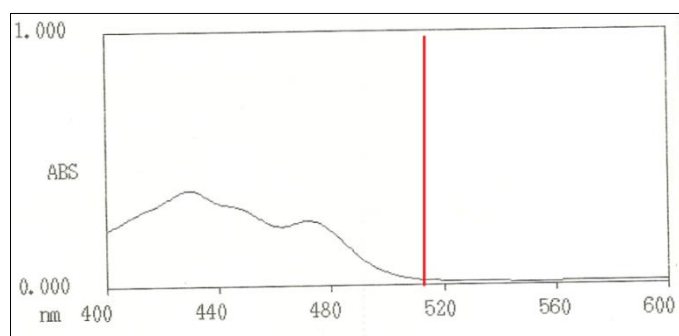


Figura 38. Espectro de absorção no visível obtido do extrato hexano das células móveis de *H. pluvialis*, com absorvância máxima a 430nm, aproximadamente.

Analisando as percentagens de inibição dos extratos obtidas, verifica-se que os extratos com concentrações mais elevadas apresentaram percentagens de inibição do radical DPPH• maiores, sendo que o solvente utilizado para extrair os compostos antioxidantes que apresentou melhores taxas de inibição foi o etanol (Tabela 5).

Tabela 5. Percentagens de inibição do radical DPPH• dos extratos de hexano, acetona e etanol das células móveis de *H. pluvialis*.

Extrato	Concentração de extrato na solução final (mg de extrato/mL de solvente)	% Inibição do DPPH•
Hexano	10	9,9
	7	9,6
	5	9,0
	3	8,5
Acetona	10	13,1
	7	12,3
	5	12,0
	3	11,2
Etanol	10	16,2
	7	12,8
	5	12,5
	3	11,4

Após a medição da atividade antioxidante dos extratos das células móveis de *H. pluvialis*, verificou-se que o extrato etanólico apresentou um valor de EC₅₀ de 65,73mg/mL, o extrato de acetona apresentou um valor de EC₅₀ de 167,71mg/mL e o extrato de hexano exibiu um valor de EC₅₀ de 169,11mg/mL. Assim, o extrato que obteve um melhor valor de EC₅₀ foi o etanólico (Tabela 6). Comparando a atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos alimentos usados como referência com o extrato etanólico das células móveis de *H. pluvialis*, verifica-se que este apresentou um EC₅₀ próximo do exibido pela cenoura.

Tabela 6. Valores de EC₅₀ obtidos pelo ensaio DPPH dos extratos de hexano, acetona e etanol das células móveis de *H. pluvialis* e dos extratos etanólicos dos alimentos utilizados como referência.

Amostra	EC₅₀ (mg/mL)
Extrato hexano	169,11
Extrato acetona	167,71
Extrato etanol	65,73
Amora	0,71
Cenoura	40,46
Framboesa	29,55
Mirtilo	23,86
Morango	9,52
Tomate	83,50
Uva	25,60

Relativamente aos extratos de etanol, acetona e hexano dos quistos com e sem ácido salicílico de *H. pluvialis*, verificou-se que extratos mais concentrados apresentaram menores percentagens de inibição do radical DPPH•, enquanto extratos menos concentrados apresentaram maiores percentagens de inibição do radical DPPH• (Tabela 7).

Tabela 7. Percentagens de inibição do radical DPPH• dos extratos de hexano, acetona e etanol dos quistos de *H. pluvialis* com e sem ácido salicílico. SA, ácido salicílico.

	Extrato	Concentração de extrato na solução final (mg de extrato/mL de solvente)	% Inibição do DPPH•
Quistos com SA	Hexano	10	5,8
		7	6,0
		5	6,7
		3	10,7
	Acetona	10	6,3
		7	7,0
		5	7,6
		3	8,3
	Etanol	10	4,4
		7	6,5
		5	7,2
		3	8,3
Quistos sem SA	Hexano	10	0,4
		7	0,7
		5	4,2
		3	4,9
	Acetona	10	2,9
		7	5,2
		5	6,5
		3	7,0
	Etanol	10	0,8
		7	7,3
		5	8,4
		3	8,8

Perante estes resultados, efetuaram-se os espectros de absorvância no visível dos extratos de etanol, acetona e hexano dos quistos com e sem ácido salicílico (Figuras 39 a 44).

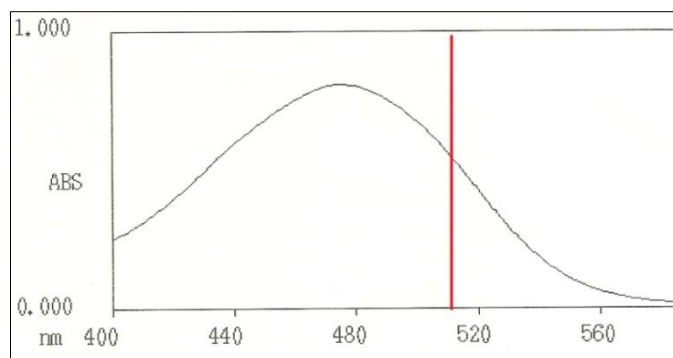


Figura 39. Espectro de absorvância no visível do extrato de etanol dos quistos com ácido salicílico, com absorvância máxima a aproximadamente 480nm.

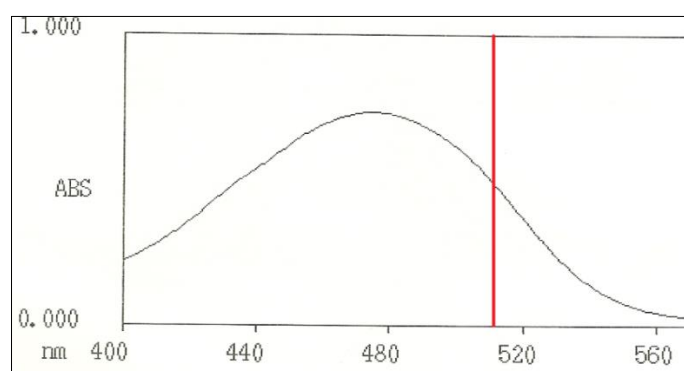


Figura 40. Espectro de absorvância no visível do extrato de acetona dos quistos com ácido salicílico, com absorvância máxima a aproximadamente 480nm.

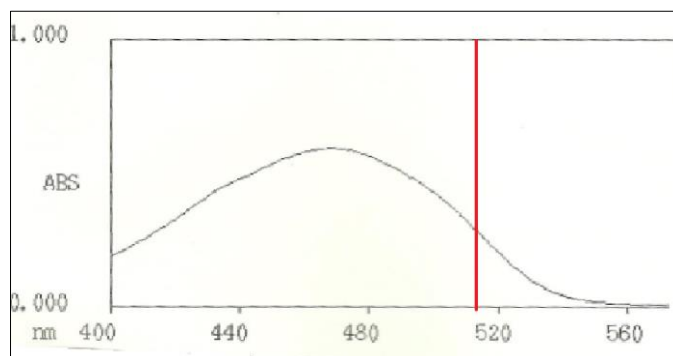


Figura 41. Espectro de absorvância no visível do extrato de hexano dos quistos com ácido salicílico, com absorvância máxima a aproximadamente 480nm.

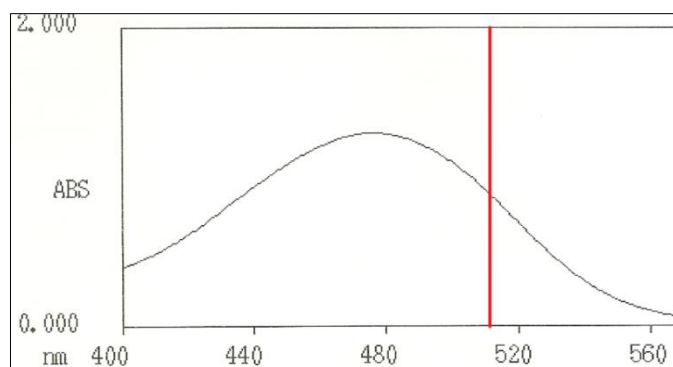


Figura 42. Espectro de absorvância no visível do extrato de etanol dos quistos sem ácido salicílico, com absorvância máxima a aproximadamente 480nm.

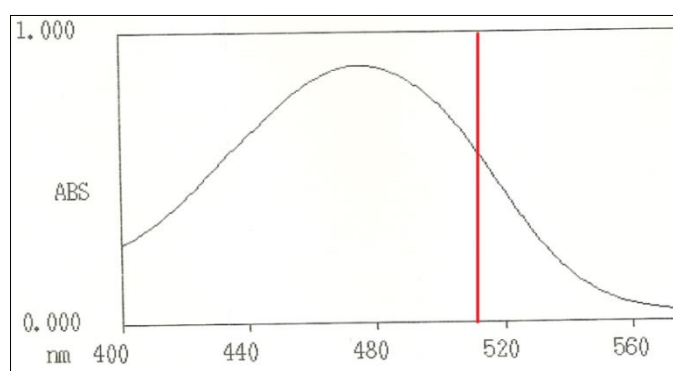


Figura 43. Espectro de absorvância no visível do extrato de acetona dos quistos sem ácido salicílico, com absorvância máxima a aproximadamente 480nm.

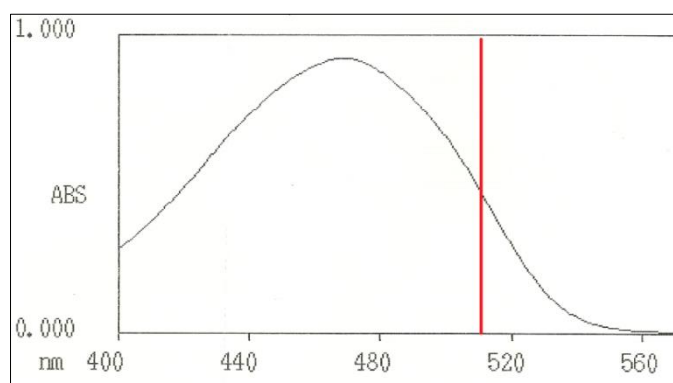


Figura 44. Espectro de absorvância no visível do extrato de hexano dos quistos sem ácido salicílico, com absorvância máxima a aproximadamente 480nm.

3.6. Análise dos pigmentos dos quistos

Nos quistos de *H. pluvialis* com 22 dias de crescimento identificaram-se o β -caroteno, a astaxantina e a clorofila a (Figuras 45 a 47). Em 1000g de biomassa

obtiveram-se 2,21g de β -caroteno, 1,60g de astaxantina e 1,27g de clorofila a (Tabela 8).

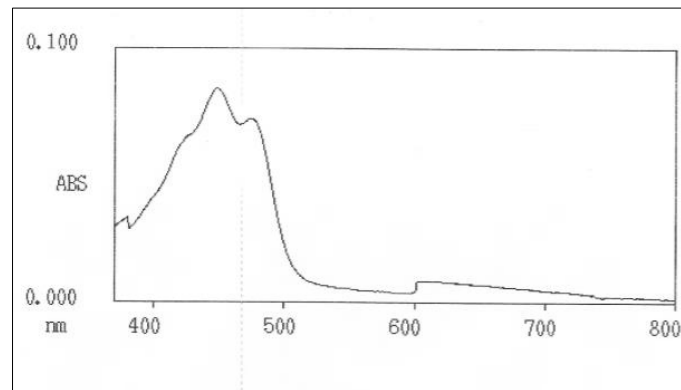


Figura 45. Espectro de absorvância no visível do β -caroteno, com absorvâncias máximas a 447, 466 e 474nm.

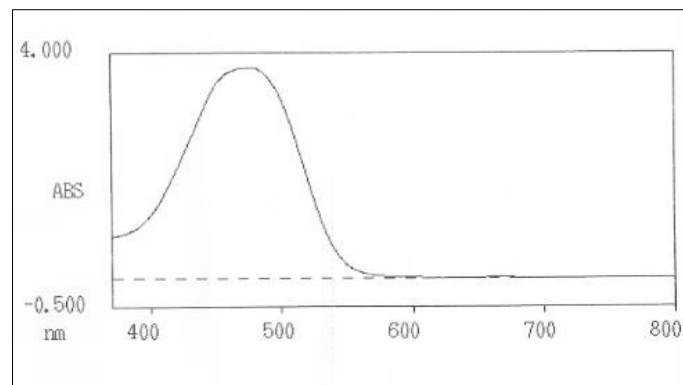


Figura 46. Espectro de absorvância no visível da astaxantina, com absorvância máxima a 476nm.

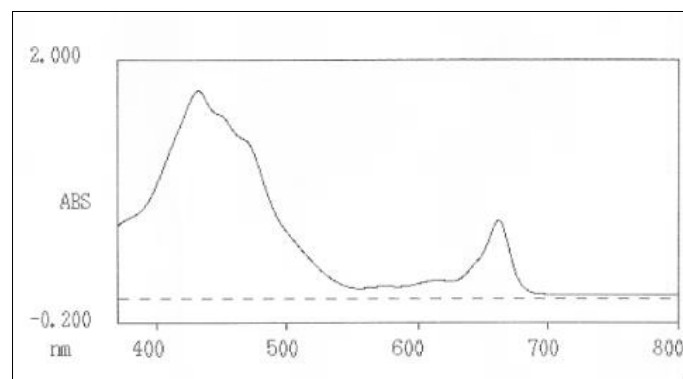


Figura 47. Espectro de absorvância no visível da clorofila a, com absorvâncias máximas a 431e 662nm.

Tabela 8. Pigmentos identificados e quantificados nos quistos de *H. pluvialis* com 22 dias de crescimento.

Ensaio	Peso seco das amostras (g)	Pigmentos (g/1000g de biomassa)		
		β-caroteno	Astaxantina	Clorofila a
1	0,027	0,92	1,82	0,99
2	0,022	3,52	1,08	1,78
3	0,019	2,19	1,91	1,04
Média	0,023	2,21 \pm 1,30	1,6 \pm 0,46	1,27 \pm 0,45

4. Discussão

4.1. Obtenção de células móveis e de quistos

No presente trabalho foram estabelecidas condições para o crescimento das células móveis e desenvolvimento de quistos de *Haematococcus pluvialis*. Para a investigação dos compostos existentes nas células móveis, a cultura teve de ser mantida em condições favoráveis à divisão celular, sem ocorrência de enquistamento. Isto foi conseguido mantendo as culturas em meio M7, sob baixa intensidade luminosa, de aproximadamente $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23°C e fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, uma vez que são vários os estudos que indicam condições idênticas para o crescimento das células móveis, com crescimento ótimo atingido a baixa intensidade luminosa, temperatura ambiente e nutrientes suficientes no meio (Tjahjono *et al.*, 1994; Tripathi *et al.*, 2002; García-Malea *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013). Contudo, alguns autores, como Domínguez-Bocanegra *et al.* (2004) e Torzillo *et al.* (2005), verificaram o crescimento ótimo das células móveis de *H. pluvialis* em condições não limitantes de azoto, mas a uma intensidade luminosa superior, de aproximadamente $177\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respetivamente.

Para a obtenção de uma cultura com quistos, de preferência vermelhos, procedeu-se a uma fase de experimentação inicial, em que se testaram condições de cultivo, como a concentração de ácido salicílico, a luminosidade e o borbulhamento, obtendo-se melhores resultados quando se cultivou *H. pluvialis* em meio M7 com intensidade luminosa de aproximadamente $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23°C , fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e borbulhamento de ar. A adição de ácido salicílico ao meio não foi suficiente para a produção de quistos vermelhos, ao contrário do que Gao *et al.* (2012) referiram. Contudo, segundo o mesmo autor, o papel regulador e fisiológico do ácido salicílico na biossíntese da astaxantina durante a carotenogénese ainda não é claro. Após a cultura ser sujeita a maior luminosidade e borbulhamento de ar é que ocorreu a formação de quistos vermelhos, de acordo com o que foi registado também por vários autores (Boussiba *et al.*, 1991; Tripathi *et al.*, 2002; Cifuentes *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Torzillo *et al.*, 2005; Raposo *et al.*, 2012). Outros fatores de indução descritos na literatura poderiam ser aplicados, como elevada salinidade e temperatura ou privação de nutrientes (Kobayashi *et al.*, 1997a; Boussiba, 2000; Fábregas *et al.*, 2001; Sarada *et al.*, 2002; García-Malea *et al.*, 2005; Goksan *et al.*, 2011), sendo que a luminosidade e a disponibilidade de nutrientes, especialmente o

azoto, são considerados os fatores com maior influência no crescimento e na síntese de astaxantina nesta microalga (Wang *et al.*, 2013).

4.2. Crescimento

A curva de crescimento de *H. pluvialis* apresentou diferenças dependendo do método utilizado para determinação de peso seco.

A curva de crescimento construída tomando o peso seco através de secagem de biomassa em caixas de Petri apresentou três fases, não tendo o aspeto típico de uma curva de crescimento sigmóide de culturas “batch” (Richmond, 2003). A primeira fase que se detetou ocorreu nos primeiros três dias, designando-se por fase de latência, em que ainda não existiu um aumento significativo da população. Seguiu-se uma segunda fase, designada de fase exponencial, que representa a taxa de crescimento máximo perante as condições específicas. Esta fase, que ocorreu entre os dias 3 e 6, caracterizou-se pelo crescimento das células vegetativas elipsóides, que depende muito de fatores ambientais como nutrientes, temperatura, luz e humidade a que a cultura está sujeita (Kobayashi *et al.*, 1997b; Chen *et al.*, 2011). A partir do dia 6 até ao último dia, dia 29, observou-se a fase estacionária de crescimento. Nesta fase, ocorre o esgotamento de nutrientes e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo, que impede a continuação da divisão celular. Contudo, as células podem manter-se viáveis por um longo período de tempo devido às suas reservas endógenas (Richmond, 2003; Rocha *et al.*, 2003). No início desta fase, as células atingiram o crescimento máximo e iniciaram o enquistamento, seguido de uma ligeira acumulação de pigmentos, verificada através da sua coloração - inicialmente verde e terminando em quistos laranja-acastanhados, apresentando também um aumento drástico de volume, tal como descrito por Kobayashi *et al.* (1997b). Sabe-se que o enquistamento advém da exposição da microalga a condições desfavoráveis, portanto um dos fatores que originou este enquistamento foi, possivelmente, o esgotamento de nutrientes.

Não se observou uma fase de declínio. Se a experiência continuasse para além do dia 29, o que possivelmente se observaria era, devido à falta de uma fonte de azoto, um aumento do peso das células devido à acumulação de mais pigmentos e também de lípidos, uma vez que esta microalga em condições adversas acumula o pigmento astaxantina como mecanismo de defesa (Droop, 1955; Hoek *et al.*, 1995; Boussiba, 2000; Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2004). Esta acumulação de pigmentos e lípidos é característica de algumas outras microalgas, para além de *Haematococcus*, quando se

encontram em condições desfavoráveis ao seu crescimento (Illman *et al.*, 2000; Macedo & Alegre, 2001; Liu *et al.*, 2008).

Contudo, estimando o peso seco através do método de filtração e secagem em estufa verificaram-se algumas diferenças. A fase exponencial verificou-se nos primeiros 9 dias, seguindo-se a fase estacionária com um ligeiro aumento de crescimento entre os dias 13 e 17. Do dia 25 ao dia 29 observou-se um novo aumento de peso, mas mais significativo, que se poderá explicar pelo início da acumulação de pigmentos e lípidos, como consequência do esgotamento de nutrientes.

Quando se determinou o crescimento de *H. pluvialis*, sujeitando as culturas a maior luminosidade e borbulhamento de ar, também se registaram diferenças consoante o método utilizado. Com o método de secagem da biomassa em caixas de Petri na estufa detetaram-se apenas duas fases, não apresentando também uma curva de crescimento sigmóide típica de culturas “batch” (Richmond, 2003). A fase exponencial ocorreu apenas nos primeiros 3 dias. Uma vez que as culturas foram sujeitas a maior luminosidade e borbulhamento de ar, estas podem ter sido as causas para as células terem atingido mais rapidamente o seu crescimento máximo (Torzillo *et al.*, 2005). Entre os dias 3 e 10 observou-se a fase estacionária de crescimento. Nesta fase, as células começaram a enquistar, possivelmente devido ao início do esgotamento dos nutrientes, para além da elevada luminosidade e do borbulhamento de ar (Richmond, 2003; Chen *et al.*, 2011), pois, segundo Rocha *et al.* (2003), o borbulhamento é um fator muito importante no crescimento de microalgas, dado que promove a agitação da cultura, afetando tanto a transferência de nutrientes através da membrana celular como a distribuição da luz.

Entre os dias 10 e 26 observou-se uma crescente acumulação de pigmentos nos quistos, verificada também através da sua coloração - inicialmente verde-acastanhados, de seguida laranja-acastanhados, terminando em quistos completamente vermelhos. Esta acumulação de pigmento, que se verificou tanto através da observação a olho nu dos balões com as culturas, em que se observaram culturas mais laranja-avermelhadas, como através da observação, ao microscópio ótico, de quistos com o citoplasma completamente vermelho, confirma as observações de acumulação de astaxantina em *H. pluvialis* sob condições adversas (Harker *et al.*, 1996; Boussiba, 2000; Tripathi *et al.*, 2002; Cifuentes *et al.*, 2003; Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2004; Torzillo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013a). Segundo Chaumont & Thépenier (1995) a acumulação de carotenóides em *H. pluvialis* ocorre na fase estacionária. Contudo outros autores, como

Boussiba & Vonshak (1991) sugeriram que a acumulação dos carotenóides nesta microalga é induzida sempre que a alga se encontra em condições desfavoráveis ao crescimento, podendo ocorrer em qualquer fase. Supõe-se também que poderá ter ocorrido a acumulação de lípidos, como descrito por alguns autores (Zhekisheva *et al.*, 2002; Céron *et al.*, 2007; Damiani *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012; Natarajan *et al.*, 2014).

A curva de crescimento resultante da filtração da biomassa e posterior secagem em estufa apresentou também algumas diferenças. Verificou-se uma fase de latência durante os primeiros 3 dias. Entre os dias 3 e 10 observou-se a fase exponencial e a partir do dia 10 verificou-se a fase estacionária. A partir do dia 14 ocorreu um ligeiro aumento que se observou até ao último dia. Também nesta curva foi possível a observação da acumulação de pigmento devido à alteração da cor das células, evidente a olho nu.

Supõe-se que as diferenças verificadas nas curvas de crescimento obtidas utilizando os dois métodos se devem à precisão de cada um. O método por filtração a vácuo é mais rápido, por ser realizado sob pressão, e preciso, uma vez que as células de *H. pluvialis* são separadas do meio de cultura, ficando retidas sob o filtro (Mustafa *et al.*, 2011). Outro passo existente neste método que poderá ter influenciado é a posterior lavagem das células com água destilada, em que o objetivo é remover impurezas indesejáveis, incluindo nutrientes do meio, que possam influenciar o peso seco final. O peso dos nutrientes influencia em todas as pesagens, uma vez que nos primeiros dias de crescimento das culturas, como existem em maior quantidade, pesam mais. Nos últimos dias de crescimento pesam menos, uma vez que já foram praticamente consumidos, daí ser fundamental a sua lavagem (Rushton *et al.*, 2000).

4.3. Crescimento de células móveis e quistos após 15 e 20 dias

No presente estudo os quistos sem ácido salicílico cresceram 0,450g/L em 20 dias, sendo este o maior crescimento registado, supondo-se, assim, que as condições de cultivo destes quistos foram as mais propícias para o crescimento. Contudo uma comparação direta não pode ser feita, uma vez que as condições e a escala de cultivo são diferentes das descritas por outros autores. Ao longo dos anos, tem sido descrito que o crescimento muito baixo de *H. pluvialis* se deve ao seu ciclo de vida muito complexo, ao tempo de crescimento muito lento e à grande suscetibilidade de contaminação, sendo

esta uma possível explicação para a baixa produção de *H. pluvialis* (Kobayashi *et al.*, 1997b; Fábregas *et al.*, 2001; Cifuentes *et al.*, 2003).

Como já foi referido, muitos autores referem que o crescimento das células de *H. pluvialis* depende muito das condições de cultivo, nomeadamente da disponibilidade de azoto e da intensidade luminosa (García-Malea *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2013b.) Diversos estudos descrevem a manipulação das condições de cultivo desta microalga consoante o uso final que se pretende. Por exemplo, para a produção de astaxantina, geralmente efetuam-se duas fases de crescimento. Na primeira fase, que representa um passo crucial, proporcionam-se condições para um rápido crescimento de células móveis, geralmente otimizando a luminosidade e, numa segunda etapa, as condições são alteradas de modo a serem mais favoráveis para o enquistamento e posterior acumulação de astaxantina (Olaizola, 2000; Fábregas *et al.*, 2001; García-Malea *et al.*, 2005; Torzillo *et al.*, 2005).

Relativamente aos quistos que cresceram na presença de ácido salicílico, também se verificou uma baixa produção ao fim de 20 dias, contrariando, mais uma vez o que foi descrito por Raman & Ravi (2011) e Gao *et al.* (2012), sendo o desconhecimento da função do ácido salicílico na via de síntese da astaxantina a única razão encontrada.

4.4. Análise da composição de ácidos gordos combinados no lípido

No presente trabalho, a composição em ácidos gordos combinados no lípido das células móveis de *H. pluvialis* e dos seus quistos foi identificada. Nas células móveis foram identificados como ácidos gordos principais palmítico, heptadecenóico, esteárico, oleico, linolelaídico, linoleico e araquídico, sendo o ácido esteárico o mais abundante, com $0,088 \pm 0,037$ mg ácido gordo/g biomassa (não seca), representando 47,57% do total de ácidos gordos. Estes resultados estão de acordo com Natarajan *et al.* (2014), que obtiveram exatamente estes sete ácidos gordos, e com Zhekisheva *et al.* (2002) que também obtiveram vários ácidos gordos com cadeias de dezasseis e dezoito carbonos em condições ótimas para o crescimento de células de *H. pluvialis*.

Os quistos com e sem ácido salicílico apresentaram seis ácidos gordos em comum, palmítico, heptadecenóico, esteárico, oleico, linoleico e araquídico, sendo que o ácido gordo presente em maior quantidade para ambos foi o ácido palmítico, com $0,169 \pm 0,169$ mg ácido gordo/g biomassa (não seca), representando 45,19% do total de ácidos

gordos, e $1,097 \pm 1,663$ mg ácido gordo/g biomassa (não seca), com 32,57% do total de ácidos gordos, respetivamente. Para além destes, os quistos com ácido salicílico também apresentaram o ácido eicosanóico, embora em quantidades muito baixas ($0,004 \pm 0,004$ mg ácido gordo/g biomassa (não seca)), enquanto os quistos sem ácido salicílico apresentaram o ácido linolelaídico e o ácido linolénico, com $0,250 \pm 0,405$ mg ácido gordo/g biomassa (não seca) e $0,004 \pm 0,001$ mg ácido gordo/g biomassa (não seca), respetivamente.

Identificaram-se mais ácidos gordos nos quistos de *H. pluvialis* do que nas células móveis, dado que os ácidos gordos eicosanóico, elaídico, linolénico e araquidónico só se registaram nos quistos. Os ácidos gordos em comum entre as células móveis e os quistos (oleico, linolelaídico, linoleico, araquídico, palmítico, heptadecenóico e esteárico) encontram-se em maior quantidade nos quistos, tal como foi descrito em 2007, por Cerón e colaboradores.

Contudo, não pode ser feita uma comparação direta com outros estudos, uma vez que a maioria dos autores tem utilizado biomassa liofilizada, enquanto neste trabalho se analisou o perfil de ácidos gordos utilizando biomassa não seca, tal como Lim *et al.*, (2012).

Vários autores têm descrito a acumulação lipídica induzida em resposta a stresses ambientais tais como stresse osmótico, pH, temperatura, metais pesados e outras substâncias químicas (Hu *et al.*, 2008; Damiani *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012; Mata *et al.*, 2013), limitação de azoto (Yu *et al.*, 1987; Illman *et al.*, 2000; Zhekisheva *et al.*, 2002), elevada luminosidade (Gordillo *et al.*, 1998) ou elevada salinidade (Ching-Piao & Liang-Ping, 2001), dependendo também da idade da cultura e das fases do seu ciclo de vida (Fidalgo *et al.*, 1998; Cifuentes *et al.*, 2003). Os ácidos gordos mais abundantes descritos em *H. pluvialis* quando se encontra em condições desfavoráveis, concretamente sob limitação de azoto e elevada luminosidade, são o ácido oleico, o ácido palmítico e o ácido linoleico (Zhekisheva *et al.*, 2002; Cerón *et al.*, 2007; Damiani *et al.*, 2010). Os resultados do presente trabalho confirmam estes ácidos gordos como os mais abundantes, verificando-se também a presença de grande quantidade do ácido esteárico, que é um precursor do ácido oleico (Martin *et al.*, 2006). Segundo o que alguns autores referem, o ácido esteárico é um ácido gordo muito comum nas microalgas (Demirbas, 2009; Chácon-Lee & González-Mariño, 2010; Lim *et al.*, 2012). O seu aparecimento em maiores quantidades neste estudo poderá estar relacionado com

as condições de cultivo, em que só se aplicou elevada luminosidade e borbulhamento de ar, pois vários estudos demonstram que a composição lipídica difere consoante as condições de cultivo (Gordillo *et al.*, 1998; Huntley & Redalje, 2007; Demirbas, 2009; Damiani *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2011), ocorrendo particularmente um aumento de lípidos quando as células são sujeitas a privação de azoto (Zhekisheva *et al.*, 2002).

Apesar de uma maior identificação e quantificação de ácidos gordos nos quistos do que nas células móveis, verificou-se que os quistos sem ácido salicílico apresentaram uma maior quantidade de ácidos gordos do que os quistos com ácido salicílico. Sabe-se que este ácido é fundamental na regulação da expressão génica induzida por stresses abióticos em plantas superiores, interferindo na rede de sinalização da resposta de defesa, mas não se conhece muito acerca do papel das fito-hormonas na fisiologia das microalgas, especialmente a sua importância na regulação do metabolismo secundário (Czerpak *et al.*, 2002; Tarakhovskaya *et al.*, 2007; Walia *et al.*, 2007; Raman & Ravi, 2011; Gao *et al.*, 2012). Uma vez que a astaxantina funciona como um mecanismo de defesa, acumulando-se sob condições de stresse, poder-se-ia pensar no ácido salicílico como uma molécula de sinalização que desencadeasse esse mecanismo de defesa, podendo intervir na síntese de astaxantina (Tarakhovskaya *et al.*, 2007; Walia *et al.*, 2007; Raman & Ravi, 2011), contudo, os resultados obtidos não confirmaram esta hipótese. O impacto do ácido salicílico foi apenas estudado no crescimento de *Chlorella vulgaris* (Czerpak *et al.*, 2002). No entanto, não se conhece nenhum outro estudo acerca do seu efeito no conteúdo lipídico de microalgas, que corrobore ou não os resultados obtidos.

Tendo em conta o perfil de ácidos gordos monoinsaturados (ácido oleico e eláidico) e polinsaturados (ácido linoleico e linolénico e araquidónico) poderá existir algum potencial desta microalga associado à alimentação, e, conseqüentemente, na melhoria da saúde humana (Ruxton, 2004; Derner *et al.*, 2006; Surette, 2008), uma vez que é essencial que ácidos gordos como o linolénico e o linoleico, presentes em *H. pluvialis*, sejam obtidos a partir da alimentação porque não são sintetizados endogenamente por seres humanos. Diversas publicações evidenciam que os ácidos gordos polinsaturados têm muitos benefícios na saúde humana, tais como melhoria do risco de doenças cardiovasculares, inflamatórias e funções cerebrais, para além de que se têm colocado hipóteses do possível efeito benéfico na redução do risco do declínio cognitivo, demência e da doença de Alzheimer (Ruxton, 2004).

Segundo Durrett e colaboradores (2008), algumas das características referidas para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas podem ser também encontradas nesta alga, dado que de entre os principais óleos utilizados para a produção de biodiesel estão o ácido palmítico e o ácido esteárico, sendo estes os mais abundantes em *H. pluvialis*. Contudo, apesar do perfil de ácidos gordos de *H. pluvialis* sob condições de stresse ser elevado, não é o suficiente para fornecer os requisitos necessários para a produção de biodiesel a nível comercial comparando com outras espécies de microalgas em que o conteúdo lipídico varia entre 20 a 50% do peso seco de biomassa, como as microalgas mais comuns (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrystis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium* e *Tetraselmis*) podendo atingir 75% do peso seco de biomassa em *Botryococcus braunii* (Mata *et al.*, 2009; Singh & Gu, 2010).

4.5. Atividade antioxidante pelos ensaios ABTS e DPPH

No presente estudo, apenas se mediu a atividade antioxidante resultante do extrato etanólico das células de *H. pluvialis*, uma vez que a solução de ABTS é diluída em água e o hexano e a acetona não são solúveis em água. O etanol foi utilizado dado que foi confirmado, por Guedes *et al.* (2013), ser um bom solvente para a extração de carotenóides antioxidantes de *H. pluvialis*.

O método antioxidante utilizado foi o método de decaimento do radical ABTS⁺, uma vez que tem sido otimizado para quantificar a atividade antioxidante intracelular dos extratos de microalgas e cianobactérias (Guedes *et al.*, 2013). O radical ABTS⁺ é um radical cromóforo quimicamente estável que apresenta elevada solubilidade em água (Sucupira *et al.*, 2012). Apresenta uma excelente estabilidade, sendo um dos testes mais simples e rápidos de atividade antioxidante com resultados reprodutíveis.

Após a realização do ensaio antioxidante dos extratos etanólicos de *H. pluvialis*, verificou-se que as células móveis demonstraram uma atividade antioxidante mais elevada, de 6,59mg/L equivalente a ácido ascórbico, do que os quistos vermelhos, tanto os que cresceram com e sem ácido salicílico no meio, para os quais foi registada uma atividade de 0,13mg/L equivalente a ácido ascórbico e de 2,73mg/L equivalente a ácido ascórbico, respetivamente.

Uma vez que os quistos vermelhos de *H. pluvialis* acumulam astaxantina (Goodwin & Jamikorn, 1954; Harker *et al.*, 1996; Lee & Zhang, 1999; Boussiba, 2000) e sendo esta considerada um potente antioxidante muito promissor em diversas áreas, como cosmética, farmacêutica, alimentar, entre outras (Zhang *et al.*, 1999; Guerin *et al.*, 2003; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Hussein *et al.*, 2006; Armenta *et al.*, 2009b; Chu, 2011), era de esperar uma maior atividade antioxidante nos quistos vermelhos do que nas células móveis, as quais quando possuem astaxantina é em níveis muito reduzidos (Goodwin & Jamikorn, 1954; Kobayashi *et al.*, 1997a). Quanto aos quistos com ácido salicílico, verificou-se uma baixa atividade antioxidante. Não foram encontrados estudos sobre a influência do ácido salicílico no potencial antioxidante de microalgas, assim como não se conhece a sua função na via de síntese da astaxantina (Raman & Ravi, 2011; Gao *et al.*, 2012).

No entanto, os resultados obtidos estão de acordo com Jaime e colaboradores (2010), que utilizando o método ABTS, mas exprimindo a atividade antioxidante em mmol Trolox/g de extrato, não sendo por isso possível uma comparação em termos absolutos, também obtiveram uma maior atividade antioxidante nas células móveis do que nos quistos. Segundo os mesmos autores, que analisaram os componentes dos extratos, esta maior atividade deveu-se ao conteúdo de carotenóides livres, principalmente luteína, que se verificou em maior quantidade nas células móveis do que nos quistos. A identificação de luteína como sendo o carotenóide principal nas células móveis, uma vez que se encontra em grandes quantidades (75-80%) já tinha sido descrita por Goodwin & Jamikom (1954).

Contudo, uma outra possível explicação para os resultados obtidos é o facto do tratamento por banho de ultrassons com uma frequência de 35kHz e potência de 240W, durante 30 minutos, na realização dos extratos, não ser suficiente para quebrar as paredes celulares. Como alguns autores descreveram, um dos grandes problemas de extração de conteúdo intracelular dos quistos de *H. pluvialis* deve-se à enorme rigidez da parede, que confere resistência à radiação ultravioleta e uma extraordinária resistência contra o ataque mecânico e químico (Burczyk, 1987; Mendes-Pinto *et al.*, 2001; Hagen *et al.*, 2002). Durante o procedimento de extração do conteúdo celular, o tempo ou a potência dos ultrassons não foram suficientes para quebrar grande parte das células, como foi observado ao microscópio ótico, conduzindo à acumulação dos antioxidantes no interior da célula. Assim não se verificou a atividade antioxidante esperada aquando da realização do método de ABTS. A extração através dos ultrassons

foi a técnica de extração utilizada uma vez que é considerada por muitos autores como um dos métodos mais eficientes (Moulton & Wang, 1982; Kim & Zayas, 1989; Vinatoru, 2001; Natarajan *et al.*, 2014).

Segundo vários autores, ainda não existe um método totalmente eficiente para a extração do conteúdo celular das microalgas. Ao longo dos anos, têm sido estudadas e avaliadas diversas estratégias em *H. pluvialis* para uma extração eficiente da astaxantina que proporcione um elevado rendimento (Guedes *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2014). As técnicas mais testadas têm sido a extração assistida por ultrassons (UAE), extração por maceração, microextração em fase sólida, destilação por arraste a vapor (Zou *et al.*, 2013), utilização de solventes seguidos de pré-tratamentos com ácidos orgânicos e minerais a diferentes temperaturas seguidos de extração por ultrassons com potência elevada (Mendes-Pinto *et al.*, 2001; Sarada *et al.*, 2006; Guedes *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2014). Os resultados demonstram que os ultrassons podem ser um método promissor para a extração de lípidos em microalgas com parede celular rígida, apesar de não se poder considerar um único método de ruptura celular eficiente para todas as espécies de microalgas, uma vez que a eficiência da extração difere de acordo com a espécie e com o método utilizado (Lee *et al.*, 2010).

Relativamente à atividade antioxidante das células de *Haematococcus pluvialis* medida pelo ensaio DPPH, mediu-se a atividade antioxidante dos extratos de etanol, acetona e hexano das células móveis de *H. pluvialis*. Dado que um dos grandes problemas dos compostos antioxidantes é o facto de pertencerem a famílias diferentes, podendo ser polares, como as xantofilas (astaxantina, luteína, zeaxantina) ou apolares, como os carotenos (β -caroteno, licopeno), utilizaram-se, para além do etanol, outros dois solventes, a acetona, solvente para extrair compostos polares, e o hexano, solvente para extrair compostos apolares, para que assim todos os compostos antioxidantes pudessem ser extraídos (Guedes *et al.*, 2013). Tendo em conta os resultados verifica-se que o aumento do efeito antioxidante foi proporcional ao aumento da concentração do extrato, o que já não ocorreu nos quistos de *H. pluvialis*, como será explicado ulteriormente. Analisando o EC₅₀ calculado para cada extrato, verificou-se que o menor valor foi obtido a partir do extrato etanólico, sendo este o extrato que demonstrou maior atividade antioxidante, pois um valor menor de EC₅₀ indica que é necessária uma menor quantidade de amostra para conseguir reduzir 50% da concentração de DPPH. O extrato etanólico também foi o que apresentou maior percentagem de inibição do radical DPPH•. Neste ensaio verificou-se que o etanol (solvente polar) foi o solvente que

conseguiu extrair mais compostos antioxidantes polares, supondo-se, assim, que as xantofilas (polares) apresentaram maior atividade antioxidante que os carotenos (apolares). Estes resultados estão de acordo com Jaime *et al.* (2010) e Guedes *et al.* (2013), que descreveram o etanol como sendo um bom solvente para a extração de antioxidantes em *Haematococcus pluvialis*.

Relativamente à atividade antioxidante dos extratos de etanol, acetona e hexano dos quistos, verificou-se que extratos mais concentrados apresentaram menores percentagens de inibição do radical DPPH•, enquanto extratos menos concentrados apresentaram maiores percentagens de inibição do radical DPPH•. Certamente poderá existir alguma interferência da absorvância máxima dos extratos, que apresentam uma cor vermelha alaranjada, com a absorvância máxima do DPPH, a 515nm, que ao ser oxidado adquire uma coloração amarela alaranjada (figuras 39 a 44). Estes resultados estão de acordo com Jaime *et al.* (2010) e Müller *et al.* (2011). Jaime *et al.* (2010) descreveram que o radical DPPH•, ao possuir uma absorvância máxima entre 482 e 517nm, interferiu com a atividade antioxidante dos extratos, não apresentando resultados viáveis. Müller e colaboradores (2011), através de diferentes métodos, entre eles o método DPPH, compararam valores de atividade antioxidante obtidos numa variedade de carotenos e xantofilas encontrados na dieta humana, conhecidos por serem antioxidantes. Ao utilizarem o método DPPH não detetaram qualquer atividade antioxidante de carotenóides. Quando adicionaram uma solução de carotenóides à solução de DPPH, foi produzida uma cor castanho-púrpura escura, que interferiu com a leitura de absorvância do DPPH, a 515nm. Concluíram que a cor dos extratos, laranja-avermelhada, interferiu com a absorvância do DPPH, dado que, no espectro da luz visível as cores na gama do vermelho absorvem entre 500 e 700nm. Para reduzir esta interferência entre a absorvância do DPPH e a dos carotenóides, os mesmos autores alteraram o comprimento de onda para 540nm, em que o radical DPPH ainda tem uma absorvância significativa, verificando, no entanto, que alguns dos carotenóides como a astaxantina e o licopeno ainda absorviam, não sendo este um bom método para a medição da atividade antioxidante destes compostos. Esta alteração do comprimento de onda devido à interferência do pigmento também foi descrita por Griffiths *et al.* (2011), que sugeriram estratégias para minimizar o erro, incluindo a seleção de um comprimento de onda que minimizasse a absorção do pigmento.

No presente trabalho efetuou-se o método de determinação da atividade antioxidante com DPPH por ser um método simples, preciso, rápido e económico,

podendo ser utilizado na determinação da atividade antioxidante tanto de compostos hidrofílicos como lipofílicos (Prakash, 2001; Kedare & Singh, 2011). Contudo, depois de se obterem os resultados, considerou-se que a sua interpretação pode ser dificultada quando os compostos testados, particularmente os carotenóides, possuem espectros que sobrepõem a absorvância de DPPH, a 515nm. Sabe-se que este radical também pode ser aniquilado por agentes redutores contribuindo também para interpretações imprecisas da avaliação da atividade antioxidante que podem ser problemáticas para a análise quantitativa (Arnao, 2000; Prior *et al.*, 2005; Kedare & Singh, 2011). Deste modo, o uso deste método para a avaliação da capacidade antioxidante tem alguns inconvenientes (Prior *et al.*, 2005).

Tendo em conta os resultados obtidos pelos dois ensaios é possível uma comparação entre os extratos etanólicos das células móveis de *H. pluvialis* com os valores da atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos alimentos utilizados como referência. Através dos valores do ensaio de ABTS, constata-se que os valores expressos em mg/L equivalente a ácido ascórbico das células móveis de *H. pluvialis* possuem uma atividade antioxidante idêntica à da cenoura (5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico) e os quistos idêntica à do tomate (0,44mg/L equivalente a ácido ascórbico). Analisando os valores obtidos pelo ensaio DPPH, conclui-se que o valor de EC₅₀ do extrato etanólico das células móveis também é próximo do valor de EC₅₀ apresentado pela cenoura. Dado que entre os quistos que cresceram com e sem ácido salicílico e o DPPH ocorreu uma interferência entre absorvâncias, resultando em valores não viáveis, não se pode fazer uma comparação direta com os valores de atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos alimentos utilizados como referência. Contudo, esperava-se uma maior atividade antioxidante proveniente desta microalga, uma vez que é descrita na literatura por possuir elevada atividade antioxidante devido à presença de astaxantina.

Deste modo, e comparando os dois métodos, assume-se que o ensaio de ABTS foi o mais adequado para a determinação da atividade antioxidante em *H. pluvialis*, uma vez que o seu funcionamento não sofre de interferências.

4.6. Pigmentos carotenóides

Os pigmentos existentes em *H. pluvialis* foram apenas identificados e quantificados na fase de quistos vermelhos, dado que, segundo a literatura, é nesta fase

que existe uma maior quantidade de pigmentos carotenóides (Kobayashi *et al.*, 1997a; Boussiba & Vonshak, 1991; Boussiba *et al.*, 1999; Tripathi *et al.*, 2002; Céron *et al.*, 2007). Os pigmentos identificados no presente estudo, β -caroteno, astaxantina e clorofila a estão de acordo com a literatura consultada. O pigmento mais abundante foi o β -caroteno, com 2,21g por 1000g de biomassa, seguido da astaxantina, com 1,60g por 1000g de biomassa e finalmente a clorofila a, com 1,27g por 1000g de biomassa.

Contudo, segundo a literatura, a astaxantina é descrita como o pigmento que surge em maior quantidade quando as células de *H. pluvialis* se encontram em condições de cultivo desfavoráveis. A idade da cultura poderá ter influenciado, dado que ao fim de 22 dias de cultivo, verificou-se, através da observação dos quistos ao microscópio ótico, a presença de quistos verdes, com o centro laranja-acastanhado, podendo o β -caroteno estar presente nestes em maior quantidade. É de notar que no primeiro ensaio a quantidade de β -caroteno apresentada é muito inferior à registada nos outros dois ensaios, podendo se dever a uma possível oxidação do pigmento. Verifica-se que em 22 dias de cultivo as células acumularam astaxantina, mas não a suficiente para ser considerada o pigmento maioritário, considerando-se serem necessários mais dias para uma maior acumulação. Não é possível uma comparação direta entre os valores quantitativos resultantes e os obtidos por outros autores, uma vez que as unidades de expressão diferem. No entanto, Chaumont & Thépenier, em 1995, ao analisarem o conteúdo de carotenóides presente em células de *H. pluvialis* sujeitas a um crescimento contínuo durante o ciclo solar, verificaram que a acumulação de carotenóides secundários aumentou em poucas horas com a intensidade da luz, sendo maioritariamente compostos por astaxantina e seus ésteres.

Os pigmentos carotenóides resultantes no presente estudo estão de acordo com os obtidos por Torzillo *et al.* (2005), contudo também não se pode fazer uma comparação direta com o estudo destes autores, uma vez que as condições de cultivo foram diferentes. Torzillo *et al.* (2005) ao variarem a intensidade luminosa de 50 até $600\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificaram que o conteúdo de clorofila nas células de *H. pluvialis* diminuiu, de 2,3 para 1,8% do peso seco, com o aumento da luminosidade, enquanto o conteúdo de pigmentos carotenóides aumentou de 0,6 para 0,9% de peso seco, sendo identificadas xantofilas como a neoxantina, a violaxantina, a anteraxantina, a luteína, a zeaxantina, a cantaxantina, a astaxantina na sua forma monoéster e diéster e dois carotenos, o α -caroteno e o β -caroteno. Ao analisarem a percentagem de carotenóides primários e secundários presentes durante o crescimento de *H. pluvialis* nas diferentes

intensidades luminosas, concluíram que entre 50 e 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ os carotenóides primários predominaram enquanto se verificou um aumento significativo dos carotenóides secundários entre 400 e 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo a astaxantina na forma monoéster o carotenóide secundário predominante.

Diversos autores têm realizado trabalhos para conseguirem obter grandes quantidades de carotenóides secundários nas células de *H. pluvialis*, variando os fatores das condições de cultivo, obtendo também resultados quantitativos diferentes (Boussiba, 2000; Hagen *et al.*, 2001; Sarada *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Bhosale, 2004; Céron *et al.*, 2007).

O método utilizado, cromatografia em coluna, foi o método adotado por ser um método fácil e de baixo consumo de solventes para as fases móveis e estacionárias (Ishii & Takeuchi, 1990; Matsuda *et al.*, 1993).

5. Conclusões

No presente trabalho, com base numa abordagem multidisciplinar, foi possível estudar as potencialidades da estirpe ACOI 38 de *Haematococcus pluvialis* Flotow existente na Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI), concretamente avaliar o seu crescimento, conhecer o perfil de ácidos gordos e principais pigmentos e determinar a sua atividade antioxidante.

Para obter células móveis foi essencial estabelecer condições favoráveis à divisão celular, impedindo a ocorrência de enquistamento, nomeadamente meio de cultura M7, baixa intensidade luminosa de aproximadamente $5,68\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 23°C e fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro. Para o desenvolvimento de quistos submeteu-se a cultura a condições desfavoráveis, alterando a intensidade luminosa para $43,24\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e introduzindo borbulhamento de ar.

Verificou-se uma maior produção de quistos quando não houve adição de ácido salicílico, uma vez que em 20 dias foi obtido uma biomassa de 0,450g/L comparada com 0,167g/L obtida pelos quistos que cresceram em meio com ácido salicílico. As células móveis apresentaram apenas 0,083g/L em 15 dias de crescimento.

Analisando o perfil de ácidos gordos combinados tanto das células móveis como dos quistos, identificaram-se os principais ácidos gordos, sendo o ácido palmítico o mais abundante nos quistos com e sem ácido salicílico, enquanto nas células móveis o ácido esteárico foi o que apareceu em maior quantidade. Perante estes valores, pode-se considerar que esta estirpe de *Haematococcus pluvialis* tem um perfil de ácidos gordos com possível potencial em várias áreas, uma vez que tanto nas células móveis como nos quistos foram identificados ácidos gordos de interesse tanto na produção de biodiesel, como o ácido palmítico e o ácido esteárico, como na indústria alimentar, devido aos ácidos monoinsaturados (ácido oleico e elaídico) e polinsaturados (ácidos linoleico, linolénico).

Quer pelo ensaio de ABTS como pelo ensaio de DPPH, as células móveis de *H. pluvialis* apresentaram uma atividade semelhante à da cenoura, que foi maior que a atividade antioxidante exibida pelos quistos com e sem ácido salicílico. Através do ensaio de ABTS, ambos os tipos de quistos apresentaram valores próximos da atividade antioxidante demonstrada pelo tomate, enquanto pelo ensaio de DPPH não foi possível medir a atividade antioxidante devido a interferência com a absorção máxima do DPPH, a 515nm.

Os pigmentos identificados e quantificados em quistos de *H. pluvialis*, com 22 dias de crescimento, foram clorofila a, β -caroteno e astaxantina, sendo estes dois

últimos os mais abundantes, com 2,21 e 1,60g/1000g de biomassa, respectivamente, o que demonstra que esta estirpe também poderá ser cultivada para produção dos carotenóides astaxantina e β -caroteno, que têm potenciais aplicações nas indústrias alimentar, química, farmacêutica, entre outras.

No entanto, esta estirpe demonstrou um crescimento lento e baixo, pelo que estudos mais detalhados de cultivo para a otimização do crescimento e da produção dos compostos com interessantes aplicações em diversas áreas deverão ser prioritários antes de um eventual uso comercial.

6. Referências bibliográficas

1. Algaebase (1996). www.algaebase.org/ [Consultado em 26 Abril 2013].

2. Algaebase (1996).
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=36266&-session=abv4:025340A107be22D024XVvqC271D3. [Consultado em 17 Março 2014].

3. Allinger, N. L. (1976). *Organic Chemistry*. Organic Chemistry (2^a ed.). Worth Publisher, Inc., New York.

4. Armenta, R. E. & Guerrero-Legarreta, I. (2009a). Amino acid profile ad enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry*, 112, 310-315.

5. Armenta, R. E. & Guerrero-Legarreta, I. (2009b). Stability studies on astaxanthin extracted from fermented shrimp byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6095-6100.

6. Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practice case. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 419-421.

7. Berteau, O. & Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharides. *Glycobiology*, 13, 29-40.

8. Bhosale, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 351–361.

9. Bidigare, R. R., Obdrusek, M. E., Kennicutt, M. G., Iturriaga, R., Harvey, H. R., Holam, R. W. & Macko, S. A. (1993). Evidence for a photo protective function for secondary carotenoids of snow algae. *Journal of Phycology*, 29, 427–434.

10. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1994). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
11. Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14, 557–577.
12. Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.*
13. Boussiba, S. & Vonshak, A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology*, 32, 1077-1082.
14. Boussiba S., Bing, W., Zarka, A., Yuan, J. P. & Chen, F. (1999). Changes in pigment profiles of *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 21, 601–604.
15. Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108, 111-117.
16. Burchardt, L., Balcerkiewicz, S., Kokocinski, M., Samardakiewicz, S. & Adamski, Z. (2006). Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the Collegium Biologicum in Poznan (Poland). *Biodiversity Research and Conservation*, 1-2, 163-166.
17. Burczyk, J. (1987). Cell wall carotenoids in green algae that form sporopollenin. *Phytochemistry*, 26, 121-128.

18. Cavalheiro, R., Rörig, L., Fontana, J. D. & Pessatti, M. (1999). Testes preliminares de crescimento com uma cepa da microalga produtora de astaxantina *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Notas Técnicas da FACIMAR*, 3, 73-77.
19. Cerón, M. C., Garcia-Malea, M. C., Rivas, J., Acien, F. G., Fernandez, J.M., Del Rio, E., Guerrero, M. G. & Molina, E., (2007). Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbiology and Cell Physiology*, 74, 1112–1119.
20. Chacón-Lee, T. L. & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9.
21. Chaumont, D. & Thépenier, C. (1995). Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *Journal of Applied Phycology*, 7, 529-537.
22. Chen, Y. F. (2011). *Production of Biodiesel from Algal Biomass: Current Perspectives and Future*; Academic Press: Waltham, MA, USA, 399.
23. Ching-Piao, L. & Liang-Ping, L. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin – Academia Sinica*, 42, 207-214.
24. Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnology*, 26, 126-131.
25. Chu, W. (2011). Potential applications of antioxidant compounds derived from algae. *Current topics in nutraceutical research*, 9, 83-98.
26. Cifuentes, A. S., González, M. A., Vargas, S., Hoeneisen, M. & González, N. (2003). Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 36, 343-357.

27. Collins, A. M., Jones, H. D. T., Han, D., Hu, Q., Beechem T. E. & Timlin, J. A. (2011). Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). PLOS ONE, 6.
28. Conquer, J. A., Tierney, M. C., Zecevic, J., Bettger, W. J. & Fisher, R. H. (2000). Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia and cognitive impairment. Lipids, 35, 1305-1312.
29. Czerpak, R., Bajguz, A., Gromek, M., Kozłowska, G. & Nowak, I. (2002). Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Acta Physiologiae Plantarum, 24, 45-52.
30. Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D. & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as biodiesel feedstock. Bioresource Technology, 101, 3801–3807.
31. Demirbas, A. (2009). Production of biodiesel from algae oils. Energy Sources, Part A, 31, 163–168.
32. Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M. & Fett, R. (2006). Microalgae, products and applications. Ciência Rural, 36, 1959-1967.
33. Domínguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., Jeronimo, F. M. & Campocosio, A. T. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 92, 209-214.
34. Dong, S., Huang, Y., Wang, S. & Liu, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. The Scientific World Journal, 2014.
35. Droop, M. R. (1955). Some factors governing encystment in *Haematococcus pluvialis*. Arch Mikrobiol, 21, 267-272.

36. Durrett, T., Benning, C. & Ohlrogge, J. (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *The Plant Journal*, 54, 593-607.
37. Fábregas, J., Otero, A., Maseda, A., Domínguez, A. (2001). Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 89, 65-71.
38. Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166, 105-116.
39. Fukuda, H., Kondo, A. & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405–416.
40. Gao, Z., Meng, C., Zhang, X., Dong, X., Miao, X., Wang, Y., Yang, L., Lv, H., Chen, L. & Ye, N. (2012). Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 51, 225– 230.
41. García-Malea, M. C., Brindley, C., Del Río, E., Acién, F. G., Fernández, J. M. & Molina, E. (2005). Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochemical Engineering Journal*, 26, 107-114.
42. Goh, S-H., Yusoff, F. M. & Loh, S-P. (2010). A comparison of the antioxidant properties and total phenolic content in a diatom, *Chaetoceros* sp. and a green microalga, *Nannochloropsis* sp.. *Journal of Agricultural Science*, 2, 123–130.
43. Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., Brabanter, J. D. & Cooman, L. D. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1477-1486.

44. Goksan, T., Ak, I. & Kiliç, C. (2011). Growth Characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 377-383.
45. Goodwin. T. W. & M. Jamikorn. (1954). Studies in carotenogenesis. II. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochemical Journal*, 57, 376-381.
46. Gordillo, F. J., Goutx, M., Figueroa, F. L. & Niell, F. X. (1998). Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *Journal of Applied Phycology*, 10, 135-144.
47. Griffiths, M. J., Garcian, C., van Hille, R. P. & Harrison, S. T. L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 119-123.
48. Guedes, A. C., Amaro, H. M., Gião, M. S. & Malcata, F. X. (2013). Optimizations of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, 138, 638-643.
49. Guerin, M., Huntley, M. E. & Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21, No.5.
50. Guschina, I. A. & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45, 160–186.
51. Guzman, S., Gato, A. & Galleja, J. M. (2001). Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 15, 224–230.
52. Hagen, C., Siegmund, S. & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37, 217-226.

53. Harker, M., Tsavalos, A. J. & Young, A. J. (1996). Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 113–118.
54. Herrero, M., Jaime, L., Martín-Alvarez, P. J., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2006). Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 5597–5603.
55. Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: a Review of its Chemistry and Applications. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 46, 185-196.
56. Hoek, C. V. D., Mann, D. G. & Jahns, H. M. (1995). *Algae - An introduction to phycology*, Cambridge, Cambridge University Press.
57. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, 621–639.
58. Huntley, M. E. & Redalje, D. G. (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaption Strategies for Global Change*, 12, 573-608.
59. Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K. & Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 69, 443-449.
60. Illman, A. M., Scragg, A. H. & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microbiology Technology*, 27, 631-635.
61. Ishii, D. & Takeuchi, T. (1990). *Trends in Analytical Chemistry*, 9, 152-157.

62. Jahnkle, L. (1999). Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48, 68-74.
63. Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F. J., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *Journal of Separation Science*, 28, 2111–2119.
64. Jaime, L., Rodriguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibáñez, E. & Señorans, F., J. (2010). Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Food Science and Technology*, 43, 105-112.
65. Johnson, E. A. & An, G-H. (1991). Astaxanthin from Microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11 (4), 297-326.
66. Kedare, S. B. & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
67. Kelsey, N. A., Wilkins, H. M. & Linesman, D. A. (2010). Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules*, 15, 7792-7814.
68. Kim, S. M. & Zayas, J. F. (1989). Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound. *Journal of food science*, 54, 700-703.
69. Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Šnóbllová, M. & Štěrbová, D. (2010). Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7956-7965.
70. Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y. & Tsuji, Y. (1997a). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 351-356.

71. Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. & Tsuji, Y. (1997b). Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 94-97.
72. Lee, Y. K. & Zhang, D. H. (1999). Production of astaxanthin by *Haematococcus*. In Cohen, Z. [Ed.] *Chemicals from Microalgae*. Taylor & Francis, London, UK, 95-173.
73. Lee, J-Y., Yoo, C., Jun, S-Y, Ahn, C-Y. & Oh, H-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, 575-577.
74. Li, H., Cheng, K., Wong, C., Fan, K., Chen, F. & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776.
75. Lim, D. K. Y., Garg, S., Timmins, M., Zhang, E. S. B., Thomas-Hall, S. R., Schuhmann, H., Li, Y. & Schenk, P. M. (2012). Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *PLOS ONE*, 7 (7).
76. Liu, Z. Y., Wang, G. C. & Zhou, B. C., (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99, 4717-4722.
77. Lorenz, T. (1999). A Technical Review of *Haematococcus* Algae. *NatuRoscTH Technica Bdlain#60*.
78. Macedo, R. V. T. & Alegre, R. M. (2001). Influence of Nitrogen Content in the Cultivation of *Spirulina maxima* in two temperature levels - Part II, Produção de Lipídios *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 183-186.
79. Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., Souza, N. E. & Visentainer, J. V. (2006). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição*, 19, 761-770.

80. Mata, T. M., Almeida, R. & Caetano, N. S. (2013). Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 973-978.
81. Matsuda, R., Hayashi, Y., Suzuki, T. & Saito, Y. (1993). Information theory of miniaturization advantages of column liquid chromatography for quantitative analysis. *Journal Analytical Chemistry*, 347, 225-229.
82. McGinn, P., Dickinson, K., Bhatti, S., Frigon, J.-C., Guiot, S. & O'Leary, S. (2011). Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: Opportunities and limitations. *Photosynthesis Research*, 109, 231-247.
83. Mendes-Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J. & Morais, R. (2001). Evaluation of diferente cell disruption processes on encysted dells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*, 13, 19-24.
84. Mendiola, J., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A. & Ibanez, E. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 102, 1357-1367.
85. Mendoza, H., Martel, A., Jiménez del Río, M. & García-Reina, G. (1999). Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 11, 15-19.
86. Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63, 141-146.
87. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 240-242

88. Miranda, M. S., Cintra, R.G., Barros, S.B. & Mancini Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 1075–1079.
89. Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
90. Mostafa, S. S. M. (2012). *Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications*. *Plant Science*, 12, 276-314.
91. Moulton, K. J. & Wang, L. C. (1982). A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. *Journal of Food Science*, 47, 1127-1129.
92. Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129, 139-148.
93. Murillo, E. (1992). Efecto hipercolesterole´mico de la cantaxantina y la astaxantina en ratas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 42, 409–413.
94. Natarajan, R., Ang, W. M. R., Chen, X., Voigtman, M. & Lau, R. (2014). Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication. *Bioresource Technology*, 158, 7-11.
95. Olaizola, M. (2000). Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12, 499–506.
96. Ozório, R. A. (2007). *Elaboração e caracterização de micropartículas de astaxantina com quitosana*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.

97. Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1429–1441.
98. Peled, E., Leu, S., Zarka, A., Weiss, M., Pick, U., Khozin-Goldberg, I. & Boussiba, S. (2011). Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Springer AOCS*, 46, 851–861.
99. Pereira, H. (2009). *Desenvolvimento e otimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala*. Tese de Mestrado, Universidade do Algarve.
100. Prabakaran, P. & Ravindran, A. D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Applied Microbiology*, 53, 150-154.
101. Prakash, A. (2001). Antioxidant activity. *Medicinal Laboratory Anal Prog.*, 19(2), 1–6.
102. Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, A. K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
103. Pulz, O. & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, 65, 635–648.
104. Rao, A. R., Sarada, R., Baskaran, V. & Ravishankar, G. A. (2006). Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4593–459.
105. Raman, V. & Ravi, S. (2011). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1043-1049.

106. Raposo, M. F. J., Morais, A. M. M. B., Morais & R. M. S. C. (2012). Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1253–1257.
107. Riccioni, G. (2009). Carotenoids and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 11, 434-439.
108. Richmond, A. (2003). Biological principles of mass cultivation, in: A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Cultures*, Blackwell Science Ltd.
109. Roberts, K. (1974). Crystalline glycoproteins of algae: their structure, composition and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 268: 129–146.
110. Rocha, J. M. S., Garcia, J. E. C. & Henriques, M. H. F. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20, 237-242.
111. Rodriguez-Amaya, D. B. & Kimura, M. (2004). *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
112. Roessler, P. G. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology*, 26, 393–399.
113. Roy, S., Llewellyn, C., Egeland, E. S., Johnsen, G. (2011). *Phytoplankton Pigments*, Cambridge University Press, New York.
114. Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A. & Millington, K. J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition Dietetics*, 17, 449-459.
115. Rushton, A., Ward, A. S. & Holdich R. G. (2000). *Solli-liquid filtration and separation technology* (2nd Ed.), Federal Republic of Germany.

116. Safer, A. M. & Al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity Induced by the Antioxidant Food Additive Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats: an Electron Microscopical Study. *Histology and Histopathology*, 14, 391–406.
117. Sander, K. & Murthy, G. S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 15, 704–714.
118. Santos, M. F. & Mesquita, J. F. (1984a). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia*, 49, 215-228.
119. Santos, M. F. & Mesquita, J. F. (1984b). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) II. Mitosis and cytokinesis. *Cytologia*, 49, 229-241.
120. Sarada, R., Tripathi, U. & Ravishankar, G.A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*. 37, 623–627.
121. Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D. & Ravishankar, A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7585-7588.
122. Schlösser, U. G. (1994). SAG - Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. *Catalogue of Strains* 1994.
123. Schoefs, B., Rmiki, N. E., Rachadi, J. & Lemoine, Y. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters*, 500, 125–128.
124. Schuhmann, H., Lim, D.K.Y. & Schenk, P.M. (2011). Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. *Biofuels*, 3, 71–86.

125. Sendra, J. M., Sentandreu, E. & Navarro, J. L. (2006). Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*, 223, 615–624.
126. Sharma, K. K., Schuhmann, H. & Schenk P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5, 1532-1553.
127. Singh, J. & Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable energy reviews*, 14, 2596-2610.
128. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87-96.
129. Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G. & Costa, J. N. (2012). Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(4), 263-269.
130. Surette, M. E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids. *Canadian Medical Association or its licensors*, 2, 177-180.
131. Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9, 1101-1118.
132. Tarakhovskaya, E. R., Maslov, Y. I. & Shishova, M. F. (2007). Phytohormones in Algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 163-170.
133. Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Tereda, Y., Nishio, N. & Nagai, S. (1994). Hyper accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotech. Lett.*, 16, 133-138.
134. Tripathi, U. Sarada, R., Ravishankar, G. A. (2002). Effect of culture conditions on growth of green alga – *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24, 323-329.

135. Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302, 17–45.
136. Torzillo, G., Goksan, T., Isik O. & Gokpinar, S. (2005). Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *European Journal Phycology*, 40(2), 233–240.
137. Vasudevan, P. T. & Briggs, M. (2008). Biodiesel production current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 35, 421–430.
138. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
139. Xu, H., Miao, X. & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499–507.
140. Yu, S., Hubbard, J. S., Holzer, G. & Tornabene, T. G. (1987). Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes. *Journal of Phycology*, 23, 289-296.
141. Yuan, J-P., Chen, F., Liu, X. & Li, X-Z. (2002). Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. *Food Chemistry*, 76, 319-325.
142. Zhang, X-W., Gong, X. D. & Chen, F. (1999). Dynamics and stability analysis of the growth and astaxanthin production system of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, 133–137.
143. Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A. & Cohen, Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 38, 325 – 331.

144. Zou, T-B., Jia, Q., Li, H-W., Wang, C-X. & Wu, H-F. (2013). Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Marine Drugs*, 11, 1644-1655.
145. Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M. & Close, T. J. (2007). Large scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant, Cell & Environment*, 30, 410-421.
146. Wang, J., Sommerfeld, M. R., Lu, C. & Hu, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28, 193-202.
147. Wang, B., Zarka, A., Trebst, A. & Boussiba, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Phycology*, 39, 1116–1124.
148. Woessner, J. P. & Goenough, U. W. (1994). Volvocine cell walls and their constituent glycoproteins: an evolutionary perspective. *Protoplasma*, 181, 245–258.
149. Wu, L-C., Ho, J-A. A., Shieh, M-C. & Lu, I-W. (2005). Antioxidant and anti-proliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 4207–4212.

7. Anexos

Anexo 1 – Composição do extrato de solo e do extrato de *Sphagnum* utilizados no meio M7

1.2. Extrato de solo

200 g de terra virgem : 1 L de água destilada

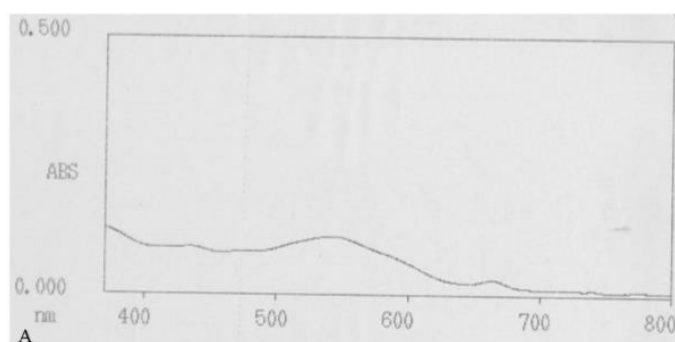
1. Colocar 1,600 Kg de terra numa panela e juntar lentamente 8 litros água destilada. Mexer.
2. Deixar ferver durante 1 hora, desligar e deixar arrefecer.
3. Filtrar o sobrenadante usando um balão de 3 L, funil de vidro, algodão e filtro de papel. Descartar a lama.
4. Distribuir o filtrado por balões até 200 ml cada.
5. Centrifugar o filtrado, a 4 000 rpm, durante 15 minutos. Colocar o sobrenadante em balões de 200 ml esterilizados (encher só 150 ml).
6. Autoclavar durante 1 hora, em 3 dias seguidos.
7. Conservar no frigorífico.

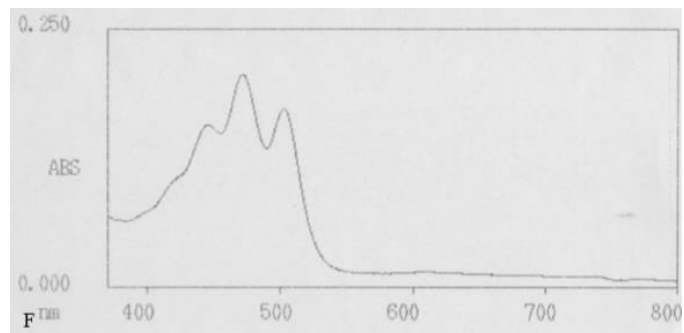
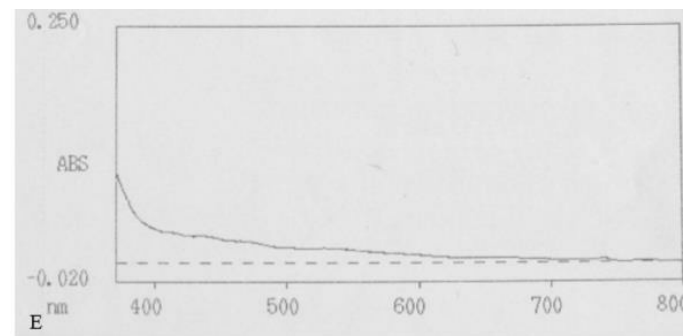
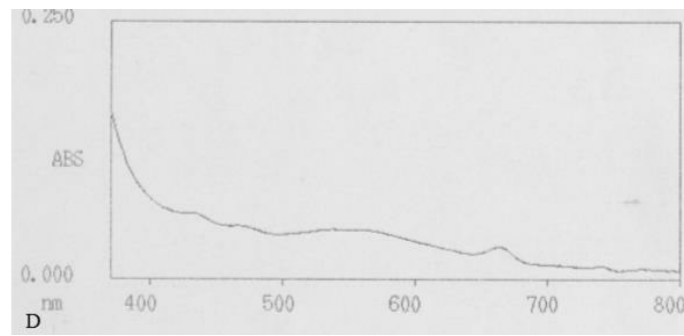
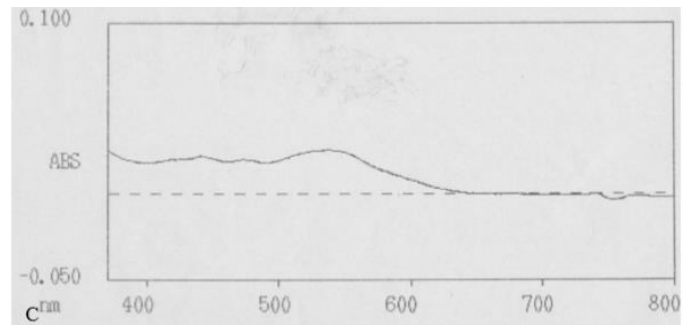
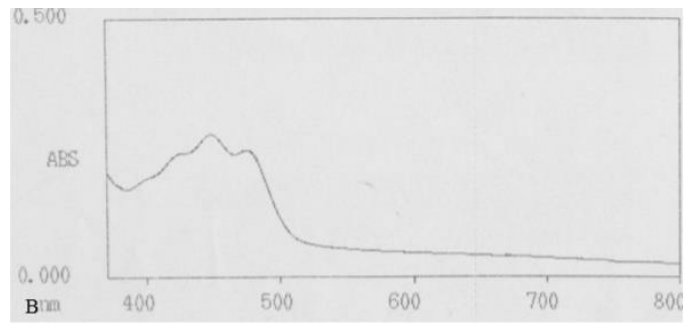
1.3. Extrato de *Sphagnum*

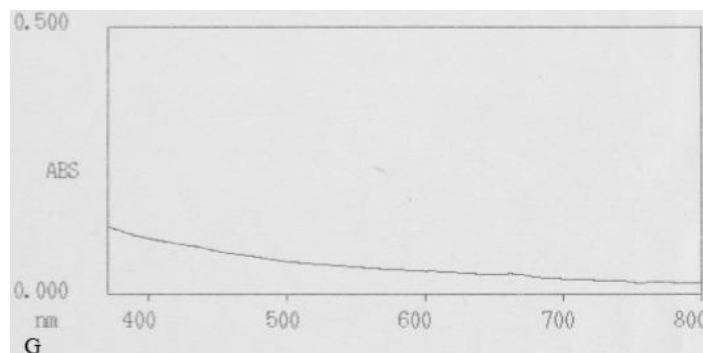
500g de *Sphagnum* : 15L de água destilada

1. Colocar 250g de *Sphagnum* numa panela e juntar lentamente 7,5L de água destilada. Deixar durante a noite.
2. Colocar a ferver durante 1 hora, desligar e deixar arrefecer.
3. Filtrar o sobrenadante usando um balão de 3L, funil de vidro, algodão e filtro de papel. Descartar os restos sólidos.
4. Distribuir o filtrado por balões de 200ml esterilizados (encher só 150ml).
5. Autoclavar durante 1 hora, 3 dias seguidos.
6. Colocar no frigorífico.

Anexo 2 - Espectros de absorção no visível dos extratos etanólicos dos alimentos utilizados como referência. A, amora; B, cenoura; C, framboesa; D, mirtilo; E, morango; F, tomate; G, uva.



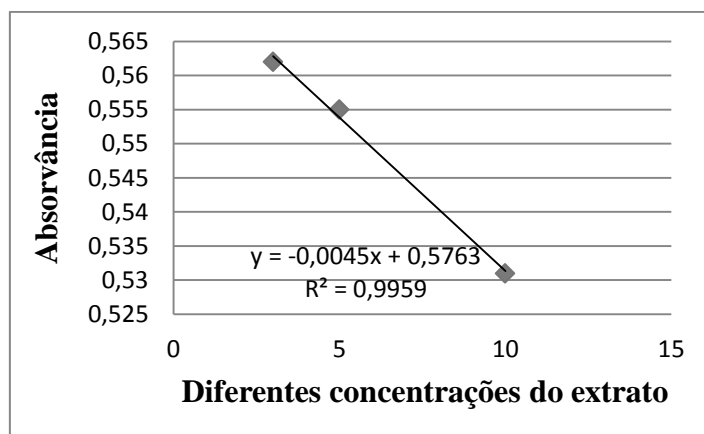




Anexo 3. Determinação do Ec_{50}

Exemplo da determinação do Ec_{50} do extrato de etanol das células móveis de *H. pluvialis*.

Diluição (mg/mL)	Absorvância a 515nm
10	0,551
7	0,556
5	-
3	0,563



Controlo (1,8 DPPH + 0,2mL extrato etanólico) = 0,561

Equação da reta de absorvância do extrato etanólico: $y = mx + b$

$$y = 0,561/2 \Leftrightarrow y = 0,281$$

$$x = (y-b)/m \Leftrightarrow x = (0,281-0,576)/(-0,0045) \Leftrightarrow x = 65,73\text{mg/mL}$$

