



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O CICLO DE VIDA E PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA EM *Haematococcus pluvialis***

**Yllana Ferreira Marinho**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Doutora.

**Prof. Dr. ALFREDO OLIVERA GÁLVEZ**  
Orientador

**Prof. Dr. RANILSON DE SOUZA  
BEZERRA**  
Coorientador

**Recife,**  
**Fevereiro/**  
**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M338i    Marinho, Yllana Ferreira  
          Influência de diferentes meios de cultura sobre o ciclo de vida e  
          produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* / Yllana  
          Ferreira Marinho. – 2018.  
          75 f. : il.

          Orientador: Alfredo Olivera Gálvez.  
          Coorientador: Ranilson de Sousa Bezerra.  
          Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
          Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e  
          Aquicultura, Recife, BR-PE, 2018.  
          Inclui referências.

          1. Cultivo 2. Microalgas 3. Carotenóides I. Gálvez, Alfredo  
          Oliveira, orient. II. Bezerra, Ranilson de Sousa, coorient. III. Título

CDD 639

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O CICLO DE VIDA E PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA EM *Haematococcus pluvialis***

**Yllana Ferreira Marinho**

Tese julgada adequada para obtenção do título de doutora em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 26/02/2018 pela seguinte Banca Examinadora.

---

**Prof. Dr. Ranilson de Sousa Bezerra**

(Coorientador)

Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão**

Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Profa. Dra. Juliana Ferreira dos Santos**

Unidade Acadêmica de Serra Talhada  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr. Paulo Roberto Campagnoli de Oliveira Filho**

Departamento de Pesca e Aquicultura  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha amada irmã Hanna Laís Ferreira Lopes (*in memoriam*) que nos deixou precocemente e que mesmo perante tanto sofrimento, nos ensinava a nunca perder o brilho nos olhos, nem o doce sorriso no rosto e que sempre nos dizia: “A cada amanhecer uma nova expectativa”. A você Lalou, nosso eterno amor e saudades!

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e nunca me fazer perder a fé e a esperança!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura pela grandiosa contribuição na minha formação profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Estudos de Doutorado sanduíche.

A minha amada família, minha mãe Maria das Graças, minha avó-mãe Maria do Socorro, minhas irmãs Letícia e Laís e ao meu avô-pai Rivaldo Alcindo (in memoriam) pelos conselhos, apoio, torcida e carinhos dedicados, preocupações e acima de tudo, pelo amor incondicional! E ao mais novo integrante da família, meu sobrinho Enzo, que veio com a missão de nos trazer novamente momentos de alegria e felicidade perante uma dor imensurável. Eu amo vocês!

Ao meu esposo Igor dos Santos, pela paciência, companheirismo, amor, apoio e por conseguir me fazer feliz, mesmo nos momentos mais difíceis. Amo você!

Ao meu grande orientador Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez, sem o teu amparo nestes dez anos de orientação, nada disso teria sido possível. Obrigada por todo ensinamento e confiança. Serei eternamente grata por tudo!

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, pela coorientação e por estar representando o meu orientador neste período de afastamento. Obrigada pelas valiosas sugestões e por disponibilizar materiais e equipamentos do LABENZ/UFPE.

Aos profs. Drs. Paulo R. Campagnoli, Thiago Napoleão, Juliana Ferreira e Patrícia Paiva por terem aceitado fazer parte da banca e contribuído para a finalização deste trabalho.

A todos os integrantes e ex-integrantes do laboratório LAPAVI, por toda ajuda durante todos esses anos. E aos Drs. Thiago Cahú e Ana Patrícia de Oliveira por tanto contribuírem com meus experimentos. Meus sinceros agradecimentos!

À maravilhosa equipe da Central analítica e Laboratório de biologia (LABIO) do Centro de Tecnologias do Nordeste (CETENE), Isaque, Nayara, Joselma, Katarina, Kelvin, Priscila, Rayane por toda a ajuda e momentos compartilhados. Em especial a Carolina Malafaia e Túlio Diego por sempre se mostrarem disponíveis a ajudar e por todos os ensinamentos compartilhados nestes últimos anos do doutorado.

Aos amigos que levarei para vida inteira, Izabel Funo, Enaide Queiroz, Marinalva Praxedes, Roberta Nery, Ana Paula Filipe, Débora Louise, Laenne Morais e a Emeline Gusmão que tanto me ajudaram e me apoiaram.

Aos meus queridos amigos da UFMA, Campus Pinheiro, Rickley Leandro, Alexandre Vitor, Getúlio Rincon, André Guimarães, Rodrigo Sávio pelo grande apoio no momento de afastamento.

Aos meus amados amigos que também estão comigo na UFMA Danilo Lopes e Mikele Sant'Anna por serem seres humanos incríveis e por sempre me darem forças. Vocês são presentes de Deus em minha vida!

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes meios de cultura sobre o ciclo de vida e produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*, a fim de viabilizar sua aplicabilidade biotecnológica. Para cumprir com o objetivo proposto, esta tese foi realizada em dois capítulos. O primeiro capítulo avalia a influência dos meios de cultura com diferentes composições de nutrientes sobre o crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina pela microalga *H. pluvialis*. Cinco tratamentos foram realizados e os diferentes meios foram avaliados: BBM, Provasoli, Provasoli modificado, KM1 e MM2, em triplicata. As unidades experimentais foram condicionadas em erlenmeyers com volume útil de 2 litros, água doce tratada e enriquecida com  $1 \text{ mL L}^{-1}$  dos respectivos meios. As microalgas foram inoculadas com concentração inicial de  $10 \times 10^4 \text{ cél mL}^{-1}$  e mantidas a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  com aeração constante e fotoperíodo integral. Para avaliação do crescimento e ciclo de vida, amostras das culturas foram retiradas e contagens diárias foram realizadas em microscópio óptico, obtendo assim valores de densidade celular máxima e biomassa seca. A análise bioquímica foi realizada concomitantemente com o ciclo de vida. As amostras foram coletadas no início do experimento e a cada três dias para a avaliação das clorofilas (a e b) e astaxantina, e no início e final do experimento para análises de proteína bruta e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). O segundo capítulo avaliou os diferentes flocculantes para promover uma melhor colheita, obter a astaxantina sem deteriorá-la e permitir o reuso do meio flocculado para um novo cultivo sem comprometer a composição bioquímica das microalgas. Para isso, o estudo considerou as duas fases de crescimento da microalga: cistos e a de crescimento vegetativo. Para as duas fases o delineamento experimental foi do tipo fatorial, testando cinco diferentes flocculantes (fator 1) e quatro diferentes concentrações (fator 2), compondo-se de uma unidade controle (sem flocculante), em triplicata. Os flocculantes foram: policloreto de alumínio (PA); cloreto férrico (CF); hidróxido de sódio (HS); extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera* (ESM) e quitosana (QUI), e as concentrações testadas foram 50, 100, 150 e 200 ppm. Após a adição dos flocculantes nas unidades experimentais, foram analisados a eficiência de flocculação, o pH e o efeito dos flocculantes na obtenção de astaxantina. Para a fase vegetativa após a flocculação, o sobrenadante da flocculação realizada a 100 ppm foi utilizado para investigar o reuso do meio flocculado sobre o crescimento e composição bioquímica da microalga. Os resultados obtidos indicaram que os meios de cultura influenciaram no crescimento, ciclo de vida, biomassa seca, clorofilas, astaxantina, proteínas e ésteres metílicos de ácidos graxos. O meio Provasoli modificado se mostrou o mais adequado para o cultivo e produção de astaxantina por apresentar os melhores parâmetros de crescimento e de biomassa para a microalga *H. pluvialis*. Os flocculantes e suas concentrações influenciaram na colheita de biomassa e obtenção de astaxantina. O flocculante extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera* foi considerado o melhor flocculante por apresentar eficiências de flocculação acima de 90% sem deteriorar o carotenoide astaxantina. Os sobrenadantes provenientes da flocculação com policloreto de alumínio, cloreto férrico, extrato salino da torta da semente de *M. oleifera* e quitosana podem ser reutilizados para um novo cultivo sem interferência no crescimento da microalga *H. pluvialis*.

**Palavras-chave:** Cultivo, Microalgas, Biomassa, Carotenoide, Flocculantes

## Abstract

The aim of this work was to evaluate the influence of different culture media on the life cycle and production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* in order to facilitate its biotechnological applicability. In order to comply with the proposed objective, this thesis was carried out and divided in two chapters. The first chapter evaluates the influence of different culture media on the growth, life cycle, biochemical composition and astaxanthin production in the microalga *H. pluvialis*. Five treatments were performed, and the different media were evaluated: BBM, Provasoli, modified Provasoli, KM1 and MM2, in triplicate. The experimental units were conditioned in erlenmeyers with a useful volume of 2 liters of fresh water treated and enriched with 1 mL L<sup>-1</sup> of the respective media. The microalgae were inoculated with an initial concentration of 10 x 10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup> and maintained at 24 ± 1 °C with constant aeration and 24-hour photoperiod. To evaluate the growth and life cycle, samples were taken from the cultures and daily counts were performed under optical microscope, obtaining values of maximum cell density and dry biomass. The biochemical analysis was performed concomitantly with the life cycle. The samples were collected at the beginning of the experiment and every three days for the evaluation of chlorophylls (a and b) and astaxanthin, and at the beginning and end of the experiment to analyze crude protein and fatty acid methyl esters (FAMES). The second chapter evaluates the different flocculants in order to promote a better harvest, obtain astaxanthin without deterioration and allow the reuse of the flocculated medium for a new cultivation without compromising the biochemical composition of the microalgae. In this regard, the study considered the two phases of microalga growth: cysts and vegetative growth. The experimental design was a factorial type in both experiments, testing five different flocculants (factor 1) and four different concentrations (factor 2), composed of a control unit (without flocculant), in triplicate. The flocculants were polyaluminium chloride (PA); ferric chloride (FC); sodium hydroxide (SH); *Moringa oleifera* seed cake extract (MSE) and chitosan (CHI); the concentrations tested were 50, 100, 150 and 200 ppm. After adding flocculants to the experimental units, the flocculation efficiency, pH and effect of the flocculants in obtaining astaxanthin were analysed. For the vegetative phase, the supernatant of flocculation carried out at 100 ppm was used to investigate the reuse of the flocculated medium on the growth and biochemical composition of the microalgae. The results indicate that the culture medium influenced the growth, life cycle, dry biomass, astaxanthin, proteins and FAMES production. The modified Provasoli medium presented the best results for the cultivation and production of astaxanthin with the microalga *H. pluvialis*. The flocculants and their concentrations influenced the flocculation efficiency in the biomass harvest and obtaining astaxanthin. The *Moringa oleifera* saline seed cake extract was considered the best flocculant showing efficiency of 90% without deterioration of the carotenoid. The supernatant from the flocculation with polyaluminium chloride, ferric chloride, *M. oleifera* saline seed cake extract and chitosan can be reused in a new culture without interfering with the microalgae growth.

**Keywords:** Cultivation, Microalgae, Biomass, Carotenoid, Flocculant

## Lista de figuras

	Página
<b>Diferentes meios de cultura influenciaram no crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i></b>	
Figura 1. Ciclo de vida da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> . Zoosporos (A); Palmela (B); Palmela em transição para aplanosporos (C); Aplanosporos (D); Células em estágio intermediário (E) e Células vermelhas com flagelo (F).	27
Figura 2. Ciclo de vida da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> nos diferentes meios de cultura.	31
Figura 3. Curvas logísticas do crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> para os diferentes meios de cultura.	32
Figura 4. Parâmetros de qualidade de água durante o cultivo da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> nos diferentes meios de cultura.	34
Figura 5. Análise multivariada de componentes principais para as variáveis respostas nos diferentes meios de cultura e em relação ao primeiro e ao último dia de cultivo da microalga <i>H. pluvialis</i> .	40
<b>Avaliação de diferentes floculantes sobre a colheita, obtenção de astaxantina, reuso do meio e composição bioquímica em <i>Haematococcus pluvialis</i></b>	
Figura 1. Correlação entre a eficiência de floclulação e o pH para os fatores floculantes e concentrações na colheita de biomassa nas fases de cistos e vegetativa da microalga <i>H. pluvialis</i> .	61
Figura 2. Concentrações obtidas de astaxantina para os diferentes floculantes a 100 ppm nas fases de cistos e vegetativa da microalga <i>H. pluvialis</i> .	62
Figura 3. Curvas logísticas do crescimento da <i>Haematococcus pluvialis</i> para os diferentes meios reutilizados da floclulação.	63

## Lista de tabelas

	Página
<b>Diferentes meios de cultura influenciaram no crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i></b>	
Tabela 1. Composição de nutrientes dos meios de cultura (g L <sup>-1</sup> )	26
Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> nos diferentes meios de cultura.	33
Tabela 3. Valores médios das concentrações das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e do carotenoide astaxantina durante o cultivo da microalga <i>H. pluvialis</i> nos diferentes meios de cultura	36
Tabela 4. Valores médios da concentração das proteínas (% biomassa seca) da microalga <i>H. pluvialis</i> para o primeiro e último dia de cultivo nos diferentes meios de cultura	37
Tabela 5. Valores médios da concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) da microalga <i>H. pluvialis</i> para o primeiro e último dia de cultivo nos diferentes meios de cultura.	38
<b>Avaliação de diferentes flocculantes sobre a colheita, obtenção de astaxantina, reuso do meio e composição bioquímica em <i>Haematococcus pluvialis</i></b>	
Tabela 1. Valores médios dos parâmetros de flocculação entre os diferentes flocculantes e suas concentrações na colheita de biomassa da microalga <i>H. pluvialis</i>	60
Tabela 2. Densidade celular máxima (DCM) e composição bioquímica da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> cultivada durante 5 dias com o reuso do meio flocculado provenientes da flocculação a 100 ppm.	64

## Sumário

	Página
Dedicatória	04
Agradecimento	05
Resumo	06
Abstract	07
Lista de figuras	08
Lista de tabelas	09
1- Introdução	11
2- Referências	16
3- Diferentes meios de cultura influenciaram no crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	22
3.1 Introdução	24
3.2 Metodologia	25
3.3 Resultados	30
3.4 Discussão	40
3.5 Referências	45
4- Avaliação de diferentes flocculantes sobre a colheita, obtenção de astaxantina, reuso do meio e composição bioquímica em <i>Haematococcus pluvialis</i>	52
4.1- Introdução	54
4.2 Metodologia	55
4.3 Resultados	59
4.4 Discussão	65
4.5 Referências	69
6- Consideração finais	75

## 1- Introdução

As microalgas, pertencentes ao Reino Protista (RICHMOND, 2004), são seres microscópicos, eucarióticos e fotossintetizantes, que utilizam a energia produzida na fotossíntese para a reprodução, completando o ciclo de crescimento em poucos dias. Além disso, podem crescer praticamente em qualquer ambiente, exigindo unicamente luz solar e nutrientes (ASLAN et al., 2006). O número de espécies de microalgas ainda é desconhecido, podendo existir de duzentos mil até alguns milhões de representantes (RATHA et al., 2012). Tal diversidade se reflete na composição bioquímica, sendo conhecidas como uma fonte natural e ilimitada de compostos biologicamente ativos, como carotenoides, ficobilinas, vitaminas, aminoácidos essenciais, polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos graxos. Tal característica favorece a utilização das microalgas na aquicultura, nas áreas química, farmacêutica e nutracêutica, na produção de bioenergia e no tratamento de efluentes (TIBBETTS et al., 2015; CHEW et al., 2017).

A microalga *Haematococcus pluvialis* possui grande potencial para aplicações biotecnológicas e por sintetizar e acumular astaxantina. A astaxantina ( $C_{40}H_{52}O_4$  – 3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-diona) é um carotenoide de coloração vermelho-alaranjada do grupo xantofila (HERRERA-ANDRADE et al., 2011; RAO et al., 2014), com grande importância biotecnológica por ser um poderoso antioxidante e imunomodulador, ajudando a prevenir ou reduzir o risco de várias doenças em seres humanos e animais, apresentando maior atividade em relação a outros antioxidantes como o retinol (vitamina A), alfa-tocoferol (vitamina E) e o  $\beta$ -caroteno (AMBATI et al., 2014; KOMATSU et al., 2017; MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2017). Park et al. (2010) relataram que a astaxantina reduziu a inflamação do biomarcador de dano oxidativo do DNA, aumentando, assim, a resposta imunológica em indivíduos humanos do sexo feminino. Em um estudo realizado por Hussein et al. (2005) relataram os efeitos anti-hipertensivos da astaxantina em ratos hipertensos, constatando que a administração oral de astaxantina por 14 dias levou a uma diminuição da pressão arterial e que sua administração por mais tempo, além de reduzir a pressão arterial, adiou a ocorrência de ataques cardíacos nestes ratos. Diferentemente do grupo controle, que 60% dos ratos apresentaram sinais de enfarte do miocárdio. Vários estudos relataram que a astaxantina tem efeitos anticâncer significativos em certos tipos de câncer (TANAKA et al., 1994; JYONOUCHI et al., 2000; KURIHARA et al., 2002), como também, previne os efeitos da irradiação UVA na pele (KOMATSU et al., 2017).

Na aquicultura, a astaxantina é bastante utilizada por produzir efeitos benéficos sobre o crescimento, sobrevivência, maturação, resistência ao estresse e coloração, especialmente dos animais em cultivo intensivo (NIU et al., 2009). Por exemplo, Wen et al. (2011), ao testarem o efeito de diferentes concentrações de astaxantina em rações para

*Penaeus monodon*, observaram que as taxas de sobrevivência e a atividade da fenoloxidase (sistema de defesa em crustáceos) aumentaram significativamente quando comparadas aos camarões alimentados com rações sem astaxantina. Yi et al. (2014), observaram que a corvina amarela *Larimichthys croceus* apresentou melhora no crescimento e na cor da pele ao receber astaxantina na dieta, o mesmo observado no linguado japonês *Paralichthys olivaceus*, que também tiveram melhora na atividade antioxidante (PHAM et al., 2014). Recentemente, Wang et al. (2018) ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de astaxantina na dieta em juvenis do camarão kuruma *Marsupenaeus japonicus*, mostraram que os camarões alimentados com dietas suplementadas com o carotenóide, apresentaram melhor desempenho de crescimento, peso corporal final, ganho de peso, taxa de crescimento específico, resposta imune e coloração, comparados ao grupo controle, sem suplementação na dieta com astaxantina. Cheng et al. (2018) ao investigarem os efeitos da astaxantina sobre o crescimento e sistema imunológico do baiacu (*Takifugu obscurus*) submetido a altas temperaturas, mostraram que os peixes alimentados com dietas suplementadas com 80, 160 e 320 mg Kg<sup>-1</sup> de astaxantina, melhoraram significativamente o ganho de peso, taxa de crescimento específico, as respostas imunes específicas e o sistema de defesa antioxidante, resultando no aumento da resistência ao estresse sob altas temperaturas.

A astaxantina também é sintetizada por algumas outras espécies de microalgas, plantas, bactérias e fungos. A levedura *Phaffia rhodozyma* tem sido relatada como uma espécie capaz de acumular e produzir 0,05%-0,4% de astaxantina por peso seco (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; NI et al., 2008), assim como um certo número de microalgas, tais como *Botryococcus braunii* (0,01%) (GRUNG et al., 1994), *Chlorella zofingiensis* (0,7%) (OROSA et al., 2000) e *Scenedesmus obliquus* (0,3%) (QIN et al., 2008). Entretanto, a microalga verde de água doce *Haematococcus pluvialis* é reconhecida como a fonte produtora de astaxantina mais promissora ocorrida na natureza, já que pode atingir entre 3-4% deste carotenoide em relação ao peso seco da sua biomassa (LEMOINE e SCHOEFS, 2010).

A síntese de astaxantina em *H. pluvialis* está relacionada a mudanças morfológicas e bioquímicas nas células. Além disso, o complexo ciclo de vida da espécie, os fatores ambientais e as condições de cultivo influenciam diretamente no acúmulo do carotenoide (GARCÍA-MALEA et al. 2009). O cultivo é dividido em duas etapas distintas: uma de crescimento vegetativo para a produção de biomassa e outra quando é exposta a condições de estresse, o que diminui o seu crescimento e leva à produção de astaxantina (ZHANG et al., 2009). Durante o crescimento vegetativo, as células são verdes e biflageladas (zoosporos), estão em contínua divisão celular e contêm mais clorofilas (*a* e *b*), carotenoides primários como o  $\beta$ -caroteno, aminoácidos essenciais e proteínas de 25 a 45% (GARCÍA-

MALEA et al., 2009; PELED et al., 2011; SHAH et al., 2016). Mas, quando as microalgas são expostas a condições estressantes como alta intensidade luminosa (LI et al., 2010; PARK et al., 2014), aumento de salinidade (GAO et al. 2015), temperatura (WAN et al., 2014) ou estresse nutricional (diferentes tipos de nutrientes e/ou diminuição destes no meio de cultura) (KANG et al., 2006; CHEKANOV et al., 2014), elas perdem os flagelos, cessam a divisão celular e se transformam em células chamadas de palmela. Posteriormente, as células aumentam a produção de carboidratos e triacilgliceróis, os carotenoides primários são substituídos por carotenoides secundários, e a coloração muda para laranja-esverdeada, sendo chamadas de células intermediárias (WAYAMA et al., 2013). Por fim, as células entram na fase de aplanósporos, que são os cistos vermelhos, caracterizados por baixa síntese de proteínas e clorofilas e grande produção de carotenoides secundários, principalmente astaxantina (RECHT et al., 2012).

Uma vez que a microalga cultivada atinge alta densidade celular correlacionada com o alto conteúdo e produtividade de astaxantina, é necessária uma colheita ou desidratação antes do uso da biomassa como matéria-prima para suplementos de saúde, aditivos alimentares e produtos farmacêuticos (NOH et al., 2018). Porém, um dos principais fatores que limita a produção das microalgas em grande escala é a colheita da biomassa a baixo custo (UDUMAN et al., 2010; VANDAMME et al., 2013). Como as microalgas são cultivadas em suspensão em meio líquido a uma concentração de cerca de 0,5 g L<sup>-1</sup> ou 0,05%, a colheita de biomassa requer tecnologias/métodos eficientes para a separação sólido-líquido das células, removendo mais de 90% de água neste processo (SHOW et al., 2013; VANDAMME et al., 2013). Alguns dos métodos mais investigados para separação da biomassa algal são: filtração (ZHANG et al., 2010), eletrocoagulação (GAO et al., 2010), centrifugação (DASSEY e THEEGALA, 2013), separação magnética (WANG et al., 2015) e floculação (VANDAMME et al., 2013). Entre esses, a centrifugação é mais comumente utilizada em produções de microalgas e principalmente para a *H. pluvialis* (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2014), mas requer um consumo intensivo de energia devido aos grandes volumes de cultura que precisam ser processados. Diante disso, a floculação poderia reduzir os custos e os insumos de energia através de uma pré-concentração da biomassa por simples sedimentação por gravidade; consequentemente, a remoção da água seria significativamente reduzida para uma segunda desidratação, por exemplo, através da centrifugação (SCHLESINGER et al., 2012; MILLEDGE e HEAVEN, 2012).

O processo de floculação ocorre com uso de agentes flocculantes, que podem ser sais catiônicos (cloreto férrico, sulfato e policloreto de alumínio), polímeros catiônicos (quitosana, sementes de *Moringa oleifera*) e bases fortes (NaOH). Os flocculantes formam hidróxidos metálicos de carga positiva que provocam a neutralização de carga ou floculação

de varredura, dependendo do pH do meio ou da concentração utilizada (MOLINA GRIMA, 2003). As células em suspensão se agregam em partículas maiores por meio da interação entre o floculante e a carga da superfície das células e estes agregados se juntam formando grandes flocos, provocando, assim, a separação sólido-líquido da biomassa (KNUCKEY et al., 2006; WAN et al., 2015). Os sais metálicos, como o sulfato de alumínio, policloreto de alumínio e o cloreto férrico, são floculantes amplamente utilizados no tratamento de águas residuais (DUAN e GREGORY, 2003). Contudo, a biomassa recuperada por floculação com estes sais pode conter uma certa quantidade de floculante irreversivelmente ligado a ela, o que pode ser uma limitação dependendo da aplicação da biomassa (CHATSUNGNOEN e CHISTI, 2016). Estudos que relacionam a influência dos floculantes em relação à qualidade da biomassa de *H. pluvialis* e do carotenoide astaxantina não existem.

A produção da astaxantina pode ser sintética (química) ou natural, através do cultivo da microalga *H. pluvialis*. A maior parte da produção mundial é realizada sinteticamente, porém este tipo é mais caro e pode gerar astaxantina com estrutura diferente do método natural (BOUSSIBA, 2000). A astaxantina sintética típica contém uma mistura de isômeros de 3S, 3'S; 3R, 3'S; e 3R, 3'R. Em contraste, o isômero predominante na astaxantina natural é o 3S, 3'S, preferível como aditivo na aquicultura, conferindo, por exemplo, uma maior extensão da pigmentação na truta arco-íris (BARBOSA et al., 1999) e no peixe dourado *Carassius auratus* (GOUVEIA et al., 2003). A eficácia da astaxantina natural e a sintética tem recebido atenção crescente e está atualmente em debate. Algumas evidências sugerem que a astaxantina natural tem um maior valor de capacidade de absorção de radicais de oxigênio do que a produzida sinteticamente (GRIMMIG et al., 2017). Régnier et al. (2015) compararam a atividade antioxidante de astaxantina natural de *H. pluvialis* e astaxantina sintética usando células endoteliais humanas. Em seu teste de capacidade antioxidante de radicais de oxigênio e atividade de eliminação de espécies reativas de oxigênio, a capacidade antioxidante total da astaxantina natural foi significativamente maior que à astaxantina sintética. Segundo Capelli et al. (2013), é preciso aumentar a dosagem da astaxantina sintética em 20 a 30 vezes mais, para obter um nível similar de poder antioxidante que se apresenta na astaxantina natural. Apesar disso, mais de 95% do mercado de aquicultura consome derivados sintéticos da astaxantina e a astaxantina produzida a partir da microalga representa < 1% do mercado global, uma vez que a alternativa sintética a partir de produtos petroquímicos envolve custos de produção mais baixos (PANIS e CARREON, 2016). O aumento da demanda do consumo de produtos naturais e as crescentes preocupações sobre a segurança do uso da astaxantina sintética para a aquicultura ou consumo humano proporciona uma grande oportunidade para a produção de astaxantina natural (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; LI et al., 2011). A astaxantina é um produto altamente valioso,

possuindo um valor de mercado de US\$ 2500-7000/Kg (PÉREZ-LOPES et al., 2014). Por isso, é necessária uma investigação mais abrangente para aproveitar todo o seu potencial biotecnológico.

Neste sentido, o estudo sobre a produção de astaxantina pela microalga *H. pluvialis* em cultivo, principalmente em relação aos nutrientes utilizados nos meios de cultura, é importante para aumentar o conhecimento sobre esta espécie, favorecendo sua produção e aplicação nas diversas áreas biotecnológicas.

## 2- Referências

- AMBATI, R. R.; PHANG, S. M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications - A Review. **Mar Drugs**, v.12, p.128-152, 2014.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v.28, p.64–70, 2006.
- BARBOSA 1999: BARBOSA, M. J.; MORAIS, R.; CHOUBERT, G. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.176, p.331-341, 1999.
- BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. **Physiol Plant.**, v.108, p. 111–117, 2000.
- CAPELLI, B.; BAGCHI, D.; CYSEWSKI, G.R. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. **Nutrafoods**, v.12, p.145-152, 2013.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Oil production by six microalgae: impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. **J. Appl. Phycol.**, 2016.
- CHEKANOV, K.; LOBAKOVA, E.; SELYAKH, I.; SEMENOVA, L.; SIDOROV, R.; SOLOVCHENKO, A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). **Mar. Drugs.**, v.12, p.4504–4520, 2014.
- CHENG, C.H.; GUO, Z.X.; YE, C.X.; WANG, A.L. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, p.209-218, 2018.
- CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D-J.; CHANG, J-S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v.229, p.53-62, 2017.
- DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresour. Technol.**, v.128, p.241–245, 2013.
- DUAN, J.; GREGORY, J. Coagulation by hydrolysing metal salts. **Adv. Coll. Interface. Sci.**, v.100–102, p. 475-502, 2003.
- GAO, S.; YANG, J.; TIAN, J.; MA, F.; TU, G.; DU, M. Electro-coagulation–flotation process for algae removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177 (1–3), p. 336-343, 2010.
- GARCÍA-MALEA, M. C.; GABRIEL ACIÉN, F.; DEL RÍO, E.; FERNÁNDEZ, J. M.;

CERÓN, M. C.; GUERRERO, M. G.; MOLINA-GRIMA, E. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. **Biotechnol Bioeng**, v. 102(2), p.651-657, 2009.

GOUVEIA, L.; REMA, P.; PEREIRA, O.; EMPIS, J. Colouring ornamental fish fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquaculture nutrition**, v.9, p.123-129, 2003.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. F. A.; ROBLES, A. M.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol. Adv.**, v.20, p. 491-515, 2003.

GRIMMIG, B.; KIM, S.H.; NASH, K.; BICKFORD, P.C.; SHYTLER, R.D. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. **GeroScience**, v.39, p.19-32, 2017.

GRUNG, M.; METZGER, P.; LIAAEN-JENSEN, S. Algal carotenoids 53: secondary carotenoids of algae 4. Secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, race L, new strain. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 22, p.25-29, 1994.

HERRERA-ANDRADE, M. H.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; NÚÑEZ- GASTÉLUM, J. A.; MORENO-RAMOS, O. H. Extracción de la astaxantina y su estabilidad. **Revista Latinoamericana de Recursos Naturales**, v.7(1), p. 21–27, 2011.

HUSSEIN, G.; NAKAMURA, M.; ZHAO, Q.; IGUCHI, T.; GOTO, H.; SANKAWA, U.; WATANABE, H. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 47–52, 2005.

KANG, C. D.; AN, J. Y.; PARK, T. H.; SIM, S. J. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v.31, p.234-238, 2006.

KNUCKEY, R.; BROWN, M.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35(3), p.300-313, 2006.

KOMATSU, T.; SASAKI, S.; MANABE, Y.; HIRATA, T.; SUGAWARA, T. Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice. **PLoS ONE**, v. 12(2), 0171178, 2017.

KURIHARA, H.; KODA, H.; ASAMI, S.; KISO, Y.; TANAKA, T. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. **Life Sciences**, v.70, p.2509-2520, 2002.

LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid Astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. **Photosynthesis Research**, v.106, p. 155–177, 2010.

LI, Y.; SOMMERFELD, M.; CHEN, F.; HU, Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 253-263, 2010.

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

MARTÍNEZ-DELGADO, A. A.; KHANDUAL, S.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. J. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. **Food Chem.**, v. 225, p.23-30, 2017.

MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.**, v.12, p. 165-178, 2012.

MINH, A. P.; HEE-GUK, B.; KYOUNG-DUCK, K.; SANG-MIN, L. Effects of dietary carotenoid source and level on growth, skin pigmentation, antioxidant activity and chemical composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 431, p. 65-72, 2014.

NI, H.; CHEN, Q. H.; HE, G. Q.; WU, G. B.; YANG, Y. F. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v.9, p.51–59, 2008.

NIU, J.; TIAN, L.X.; LIU, Y.J. Effect of dietary astaxanthin on growth, survival and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, p.795–802, 2009.

PANIS, G.; CARREON, J.R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. **Algal Research**, v.18, p.175-190.

PARK, J. C.; CHOI, S. P.; HONG, M. E.; SIM, S. J. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 37(10), p. 2039-2047, 2014.

PELED, E.; LEU, S.; ZARKA, A.; WEISS, M.; PICK, U.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S. Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Lipids**, v. 46, p.851-861, 2011.

PÉREZ-LÓPEZ, P.; GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; JEFFRYES, C.; AGATHOS, S. N.; MCHUGH, E.; WALSH, D.; MURRAY, S. M.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T. Life-cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. **J. Clea. Prod.**, v. 64, p.332–344, 2014. doi: 10.1016/j.jclepro.2013.07.011.

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **J. Appl. Phycol**, v.12, p.553-556, 2000.

QIN, S.; LIU, G.; HU, Z. Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochem**, v.43, p.795-802, 2008.

RAO, A. R.; PHANG, S. M.; RAVI, S.; RAVISHANKAR, G. A. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. **Marine Drugs**, v. 12(1), p.128–152, 2014.

RATHA, S.; PRASANNA, R. Bioprospecting microalgae as potential sources of “Green Energy” challenges and perspectives (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2012, Vol.48(2), pp.109-125

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94(6), p.1495-1503, 2012.

REGNIER, P.; BASTIAS, J.; RODRIGUEZ-RUIZ, V.; CABALLERO-CASERO, N.; CABALLO, C.; SICILIA, D.; FUENTES, A.; MAIRE, M.; CREPIM, M.; LETOURNEUR, D.; GUEGUEN, V.; RUBIO, S.; PAVON-DJAVID, G.; Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. **Marine Drugs**, v. 13, p.2857-2874, 2015.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltda, 2004.

SCHLESINGER, A.; EISENSTADT, D.; BAR-GIL, A.; CARMELY, H.; EINBINDER, S.; GRESSEL, J. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. **Biotechnol. Adv.**, v.30, p. 1023-1030, 2012.

SHAH, M. M. R.; LIANG, Y.; CHENG, J. J.; DAROCH, M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 531, 2016.

SHOW, K-Y.; LEE, D-J.; Chang, J-S. Algal biomass dehydration. **Biores. Technol.**, v.135, p. 720-729, 2013.

TANAKA, T.; MORISHITA, Y.; SUZUI, M.; KOJIMA, T.; OKUMURA, A.; MORI, H. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. **Carcinogenesis**, v.15, p.15-19, 1994.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.27(3), p.1109-1119, 2015.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. **J. Renew. Sustain. Energy**, v. 2, 012701, 2010.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends Biotechnol.**, v.31, p.233–239, 2013.

WANG, S-K.; STILES, A. R.; GUO, C.; LIU, C-Z. Harvesting microalgae by magnetic separation: A review. **Algal Research**, v. 9, p. 178-185, 2015.

WANG, W.; ISHIKAWA, M.; KOSHIO, S.; YOKOYAMA, S.; SAKHAWAT, H.; MOSS, A.S. Effects of dietary astaxanthin supplementation on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture**, v.491, p.197-204, 2018.

WAN, M.; ZHANG, J.; HOU, D.; FAN, J.; LI, Y.; HUANG, J.; WANG, J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. **Bioresour Technol**, v. 167, p.276-283, 2014.

WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X. Q.; ZHANG, X. Y.; GUO, S. L.; HO, S. H.; CHANG, J. S.; BAI, F. W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresour Technol.**, v.184, p.251-257, 2015.

WAYAMA, M.; OTA, S.; MATSUURA, H.; NANGO, N.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS ONE**, 8:e53618, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0053618.

WEN, W.; LIN, H.; WU, K.; YANG, Q.; HUANG, J.; JIANG, S. Effects of Dietary with Astaxanthin on Growth and Immunological Parameters of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. **Acta Scientiarum Naturalium**, v.3, 2011.

WON, N. O. H.; JUNGMIN, K. I. M.; SANG-JUN, L. E. E.; BYUNG-GON, R. Y. U.; CHANG-MIN, K. A. N. G. Harvesting and contamination control of microalgae *Chlorella ellipsoidea* using the bio-polymeric flocculant  $\alpha$ -poly-L-lysine. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 206-211, 2018.

YI, X.; XU, W.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; LUO, Y.; ZHANG, W.; MAI, K. Effects of dietary astaxanthin and xanthophylls on the growth and skinpigmentation of large yellow croaker *Larimichthys croceus*. **Aquaculture**, v.433, p.377-38, 2014.

ZHANG, B. Y.; GENG, Y. H.; LI, Z. K.; HU, H. J.; LI, Y. G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v.295(3), p.275-281, 2009.

ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; PURUHITO, E.; CHEN, Y. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. **Bioresour. Technol.** v.101, p.529 7–5304, 2010.

ZHENGQUAN, G.; CHUNXIAO, M.; YI, C. C.; FARUQ, A.; ARNOLD, M.; PEER, M. S.; YAN, LI. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of

three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 27 (5), p. 1853–1860, 2015.

3- Título do Artigo Científico 1

**Diferentes meios de cultura influenciam no crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina da microalga *Haematococcus pluvialis***

## **Diferentes meios de cultura influenciam no crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina da microalga *Haematococcus pluvialis***

### **Resumo**

A microalga *Haematococcus pluvialis* é a fonte mais rica em astaxantina natural conhecida na natureza e a síntese deste carotenoide está relacionada a mudanças morfológicas e bioquímicas nas células, devido ao complexo ciclo de vida da espécie além dos nutrientes e suas concentrações presentes nos meios de cultura. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina na microalga *H. pluvialis*. Cinco tratamentos foram realizados em triplicata com os diferentes meios: BBM, Provasoli, Provasoli modificado, KM1 e MM2. As unidades experimentais foram acondicionadas em erlenmeyers com volume útil de 2 litros, água doce tratada e enriquecida com 1 mL L<sup>-1</sup> dos respectivos meios. As microalgas foram inoculadas com concentração inicial de 10 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup> e mantidas a 24 ± 1°C com aeração constante e fotoperíodo integral. Para avaliação do crescimento e ciclo de vida, foram retiradas amostras das culturas e realizadas contagens diárias em microscópio óptico, obtendo valores de densidade celular máxima e biomassa seca. A análise bioquímica foi realizada concomitantemente com o ciclo de vida. As amostras foram coletadas no início do experimento e a cada três dias para a avaliação das clorofilas (a e b) e astaxantina, e no início e final do experimento para análises de proteína bruta e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de um e dois fatores seguida do teste de Tukey (P < 0,05) e análise multivariada para os fatores meios de cultura e dias de cultivo em relação as variáveis respostas. Diferenças significativas (P < 0,05) foram observadas para a densidade celular máxima, ciclo de vida, biomassa seca, astaxantina e composição bioquímica para a microalga entre os meios de cultura e dias de cultivo da microalga. O meio Provasoli modificado apresentou as maiores densidades celulares, biomassa seca e produção de astaxantina na microalga *H. pluvialis*.

**Palavras chave:** biomassa, Clorofila, Carotenoide, Ácidos graxos, Cultivo.

### 3. 1 Introdução

Microalgas são seres microscópicos, fotossintetizantes, que produzem biocompostos como proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos poliinsaturados, carotenoides, o que favorece a sua aplicação na área biotecnológica, como aquicultura; nas áreas química, farmacêutica e nutracêutica; e na produção de bioenergia (KATIYAR et al., 2017). Contudo, a produção de biocompostos a partir das microalgas está estritamente ligada às condições de cultivo a que elas são submetidas (FAGIRI et al., 2013). Diversos estudos têm avaliado fatores como luz, intensidade luminosa, fotoperíodo, salinidade, temperatura, pH, composição, e quantidade e qualidade dos nutrientes do meio de cultura, os quais podem alterar significativamente a produção de um determinado biocomposto de interesse (WAHIDIN et al., 2013; SINGH e SINGH, 2015; MANDOTRA et al., 2016; SHEN et al., 2016).

Os meios de cultura podem ser diferenciados pela presença ou ausência de determinados nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio e carbono) e/ou suas diferentes concentrações, variando relações carbono/nitrogênio, por exemplo, levando a alguma modificação no conteúdo celular ou no crescimento de algumas espécies de microalgas. Ao cultivar *Scenedesmus* sp. em diferentes concentrações de nitrogênio e acetato de sódio, Pirastru et al. (2012) observaram que o conteúdo de clorofila e fotossíntese diminuíram e a produção de carotenoides aumentou nas culturas com limitadas concentrações de nitrogênio e adição de acetato. Chu et al. (2013) mostraram que o fósforo aumentou a produtividade de lipídios em *Chlorella vulgaris* cultivada sob baixas concentrações de nitrogênio. Pang e Chen (2017), ao suplementar o meio BG-11 com diferentes fontes de carbono ribose, manose, frutose, xilose, glicose, acetato de sódio, glicerol, lactose e sacarose, verificaram o aumento do crescimento e da produtividade de biomassa nos cultivos de *H. pluvialis* suplementados com ribose.

A microalga *Haematococcus pluvialis* é a fonte mais rica em astaxantina natural conhecida na natureza. Por possuir propriedades antiinflamatórias e anti-tumorais, além de uma capacidade antioxidante significativamente maior do que a astaxantina sintética, a astaxantina é um dos biocompostos extraídos de microalgas de maior importância biotecnológica atualmente (SHAH et al., 2016; YOSHIHISA et al., 2017; JIANG et al., 2018). A síntese de astaxantina em *H. pluvialis* está relacionada a mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas células, devido ao complexo ciclo de vida da espécie e fatores ambientais, além dos nutrientes e suas concentrações presentes nos meios de cultura (GARCÍA-MALEA et al., 2006; SAHA et al., 2013; SHAH et al., 2016).

Em comparação com outras espécies de microalgas cultivadas comercialmente (*Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*), a *H. pluvialis* possui algumas

características desfavoráveis: baixa velocidade de crescimento, baixa produtividade de biomassa, complexo ciclo de vida e pouco conhecimento sobre as condições ótimas de crescimento e indução de astaxantina nas células (WAYAMA et al., 2013; CHENG et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Por conta disso, pesquisas direcionadas a melhorar e buscar mais conhecimento sobre esses fatores são necessárias. O presente trabalho avalia a influência dos meios de cultura com diferentes nutrientes sobre o crescimento, ciclo de vida, composição bioquímica e produção de astaxantina na microalga *H. pluvialis*.

### **3.2 Metodologia**

As microalgas *H. pluvialis* foram provenientes do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), localizado no Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As microalgas foram mantidas no meio de cultura Bold's Basal BBM (BOLD, 1949), nas seguintes condições: temperatura  $24 \pm 1$  °C, pH 7, fotoperíodo integral, aeração constante e intensidade luminosa de 5000 lux (fornecida a partir de iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo "daylight"). Para acompanhar o crescimento das microalgas, a densidade celular foi monitorada diariamente através da contagem das células em microscópio óptico (40x de aumento) com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As microalgas foram transferidas na fase exponencial de crescimento para as unidades experimentais.

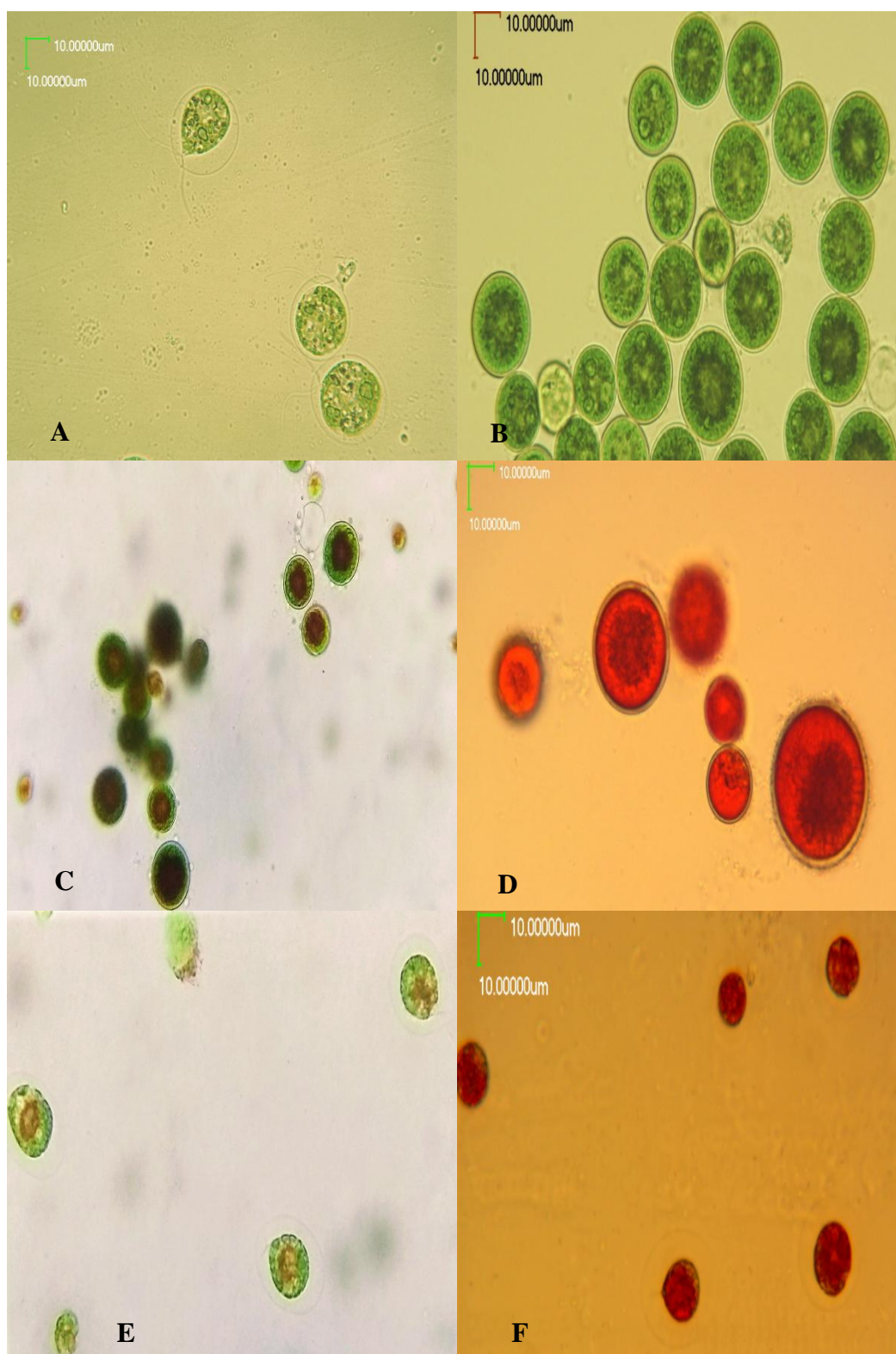
O experimento foi desenvolvido em escala laboratorial no LAPAVI, através de um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições, perfazendo quinze unidades experimentais. Os tratamentos foram os diferentes meios de cultura: KM1 (KOBAYASHI et al., 1997); MM2 (TRIPATHI et al., 1999); Provasoli (PROVASOLI, 1968), Provasoli modificado e o meio Bold's Basal BBM (BOLD, 1949), utilizado como controle. As composições de cada meio de cultura encontram-se resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição de nutrientes dos meios de cultura (g L<sup>-1</sup>)

Nutrientes	BBM	MM2	KM1	Provasoli	Provasoli modificado
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5	0,02	0,02	-	-
Glicerofosfato de sódio	-	-	-	15,0	15,0
L-asparagina	-	0,405	0,405	-	-
Acetato de sódio	-	1,98	1,98	-	1,98
Extrato de levedura	-	-	2,0	-	2,0
NaNO <sub>3</sub>	25,0	-	-	105,0	105,0
NaCl	2,5	-	-	-	-
KOH	12,4	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	0,074	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	0,175	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98	0,01	0,01	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5	0,000001	0,000001	-	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	14,1	0,000001	0,000001	-	-
ZnCl <sub>2</sub>	-	-	-	0,075	0,075
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,52	0,000005	0,000005	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,19	0,000005	0,000005	-	-
CoCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,000005	0,000005	0,0015	0,0015
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,57	-	-	3,0	3,0
EDTA Na.2H <sub>2</sub> O	50,0	0,045	0,045	24,9	24,9
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,15	0,15
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	-	-	-	10,6	10,6
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,32	-	-	0,6	0,6
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,80	-	-	-	-

As unidades experimentais foram acondicionadas em erlenmeyers com 2 litros de água doce previamente autoclavadas e enriquecidas com os meios de cultura, mantidas nas mesmas condições citadas anteriormente. As microalgas foram inoculadas com a densidade celular inicial de  $10 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>.

Para a avaliação do crescimento de *H. pluvialis*, amostras das culturas foram retiradas a cada 24 horas após o início do experimento e as contagens foram realizadas em microscópio óptico com 40x de aumento com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As células foram contadas de acordo com o ciclo de vida em que se encontravam, segundo as características mencionadas por Brinda et al. (2004) e Shah et al. (2016): zoosporos, que são células vegetativas esféricas, elipsoidais ou em forma de pêra, com dois flagelos (Fig. 1A); palmela, células vegetativas em repouso e sem flagelos (Fig. 1B); palmela em transição para aplanosporos (Fig. 1C); aplanosporos, células em cistos vermelhos (Fig. 1D); células em estágio intermediário, com flagelos e iniciando a produção de astaxantina caracterizada pelo citoplasma vermelho (Fig. 1E); e células vermelhas com flagelo, sem formar aplanosporos (Fig. 1F).



**Figura 1.** Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis*. Zoosporos (A); Palmela (B); Palmela em transição para aplanosporos (C); Aplanosporos (D); Células em estágio intermediário (E) e Células vermelhas com flagelo (F).

Para cada tratamento do experimento, uma curva de crescimento foi desenvolvida com a densidade celular diária da média das três repetições e, com o auxílio do programa CurveExpert versão 1.4, foram ajustadas pela aproximação à curva logística seguindo a fórmula elaborada por Pindich e Rubinfeld (1981):

$$Y = \frac{P_1}{\left[1 + \left(\frac{P_2 - N_0}{N_0}\right) \times \exp^{-kt}\right]}$$

Onde: Y = densidade celular; P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub> = primeiro e segundo parâmetros da curva logística; N<sub>0</sub> = densidade celular inicial; k = velocidade de crescimento; t = tempo de cultivo.

Além da elaboração das curvas de crescimento, foram avaliados: a densidade celular máxima (DCM), considerando o dia de cultivo no qual a população algal alcançou a máxima densidade celular; a biomassa seca, que é o rendimento ou produtividade da cultura para os diferentes meios, expressa em mg de biomassa seca por mL de cultura (mg mL<sup>-1</sup>); o tempo de cultivo que foi determinado pelo número de dias passados desde o início do experimento até o dia em que a população alcançou a fase estacionária de crescimento; o tempo de duplicação (Td), que representa o tempo que a população leva para duplicar; e a velocidade de crescimento (k), sendo o número de divisões celulares da população por dia determinado através da equação citada por Stein (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \text{Log} \frac{N_2}{N_1}$$

Onde: k = velocidade de crescimento 3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10; (T<sub>2</sub> - T<sub>1</sub>) = intervalo de tempo em dias; N<sub>1</sub> = densidade celular inicial; N<sub>2</sub> = densidade celular final; Log = logaritmo em base 10.

Para a obtenção de biomassa seca, amostras de 1 mL foram centrifugadas (Q222HM) a 5000 rpm por 2 minutos. Este procedimento foi repetido mais duas vezes empregando uma solução de formiato de amônio 0,5M (3%) para a retirada dos sais do meio de cultura e posterior lavagem com 1 mL de água destilada. A biomassa úmida obtida foi congelada a -20°C e transferida para um liofilizador (Enterprise II Terroni®). Após a secagem, as amostras foram pesadas para determinação da biomassa seca.

A análise bioquímica das microalgas foi realizada concomitantemente com o ciclo de vida. As amostras foram coletadas após 24h do início do experimento e a cada três dias para a avaliação da biomassa seca, clorofilas *a* e *b* e astaxantina. Para as análises de proteína bruta e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), as amostras foram coletadas no 1º dia de cultivo (após 24h) e no final do experimento.

Para a determinação das clorofilas *a* e *b*, amostras de 15 mL foram centrifugadas e submetidas a uma extração com 3 mL de acetona a 90% em banho ultrassônico em gelo por 5 minutos. As amostras foram mantidas a 4 °C por 12h para completa extração das clorofilas

e todo o procedimento ocorreu com a devida proteção contra a luz. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas ( $2200 \times g$ ; 10 min), e os extratos obtidos foram colocados em cubetas de quartzo. Antes das leituras nas absorvâncias de 664 e 647 nm para as clorofilas *a* e *b*, respectivamente, o espectrofotômetro (U.V vis. sp-220) foi previamente calibrado com acetona a 90%. Em seguida, as concentrações das clorofilas foram calculadas seguindo as equações definidas por Humphrey (1979):

$$Ca = 11.97 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$Cb = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

Para determinar a quantidade de proteínas totais através do método de Lowry et al. (1951), 5 mg de amostras liofilizadas foram pesados e submetidos à hidrólise alcalina com 2 mL de NaOH 1N, a 100 °C em banho maria durante uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas ( $3000 \times g$ ; 10 min) e o extrato alcalino obtido foi transferido em triplicata (amostra de 10 µL) a um tubo onde foram adicionados 190 µL de água destilada. Nesta solução, foram acrescentados 1 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2% (p:v) em NaOH 1N e 20 µL de uma solução 1:1 de CuSO<sub>4</sub> a 5% (p:v) em tartato de potássio a 1% (p:v). As amostras, depois de misturadas em vortex, ficaram em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Logo, 100 µL do reativo de Folin (Merck) foram acrescentados diluídos em água destilada (1:1), repousando por 30 minutos para leitura em espectrofotômetro (750 nm).

As técnicas propostas por Bligh e Dyer (1959) foram utilizadas para o teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), utilizando cromatografia gasosa (GC-FID Agilent Technology 7890) em padrão comercial (FAME Sigma-Aldrich® 18919-1AMP).

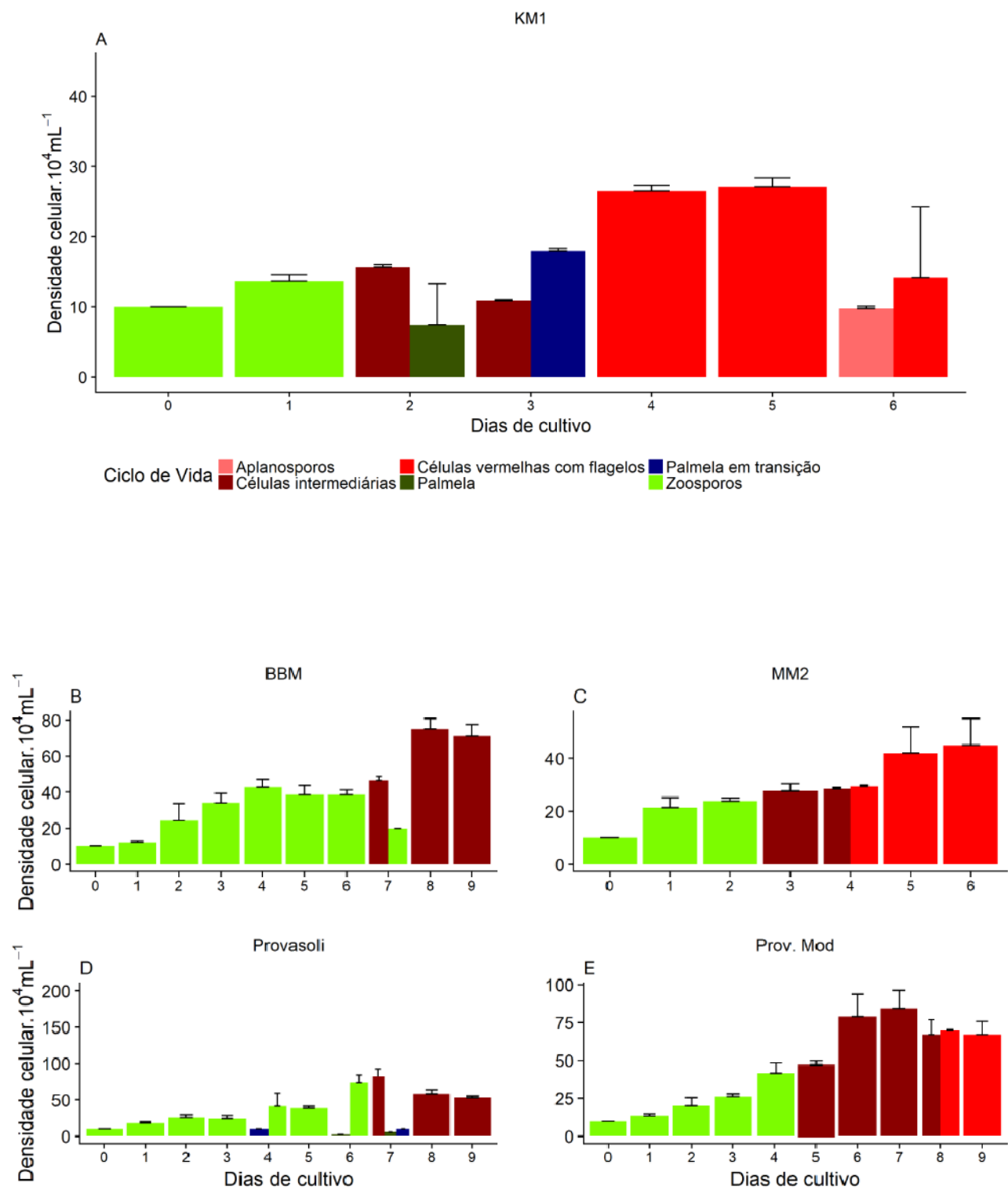
A determinação de astaxantina seguiu o método de Dong et al. (2014), em que 5 mg da amostra liofilizada foram tratados com 1 mL de HCl (4M) e colocados em estufa a 70°C por 2 minutos. Em seguida, a amostra foi arrefecida e centrifugada ( $5.000 \times g$ ; 5 min). A amostra tratada com HCl foi lavada duas vezes com água destilada, centrifugada ( $5.000 \times g$ ; 5 min), ressuspensa em 1 mL de acetona a 90% e submetidas a banho ultrassônico em gelo por 10 min. Posteriormente, a amostra foi novamente centrifugada ( $3500 \times g$ ; 5 min), e o extrato obtido foi quantificado por cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC (modelo HSS T3 C18 LC-MS UPLC H-Class) comparando o tempo de retenção com padrão comercial de astaxantina com pureza de 97% (SML0982 Sigma, St. Louis, MS, USA). Todo o procedimento foi realizado em triplicata e com a devida proteção contra a luz.

A cada três dias durante o cultivo da microalga, os parâmetros de qualidade da água como temperatura, pH (modelo Q400AS) e nitrato (ALFAKIT Spectro kit nitrato), foram mensurados.

As variáveis respostas dos tratamentos foram submetidas ao teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett ( $P < 0,05$ ) e também ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ( $P < 0,05$ ). Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados por  $\text{sen}(x)$ . Para cada tratamento, foram determinados a densidade celular, a velocidade de crescimento e o tempo de duplicação, os quais foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA;  $P < 0,05$ ). Os fatores meios e dias de cultivo foram submetidos a ANOVA fatorial ( $P < 0,05$ ). Para os dados em que a ANOVA denotou diferença significativa, foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey ( $P < 0,05$ ) para estabelecer as diferenças entre as combinações e/ou as interações (ANOVA fatorial) e tratamentos (ANOVA um fator). Os dados que não obtiveram distribuição normal mesmo após as transformações, foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) e/ou ao teste de Friedman ( $P < 0,05$ ) seguido do teste de Conover, para ANOVA de um e dois fatores, respectivamente. A fim de elucidar a relação entre todas as variáveis respostas em relação aos diferentes meios de cultura e aos dias de cultivo, foi aplicada uma análise multivariada de componentes principais. Todas as análises foram realizadas no programa R Statistical software versão 3.4.2 (R Core Team, 2017).

### 3.3 Resultados

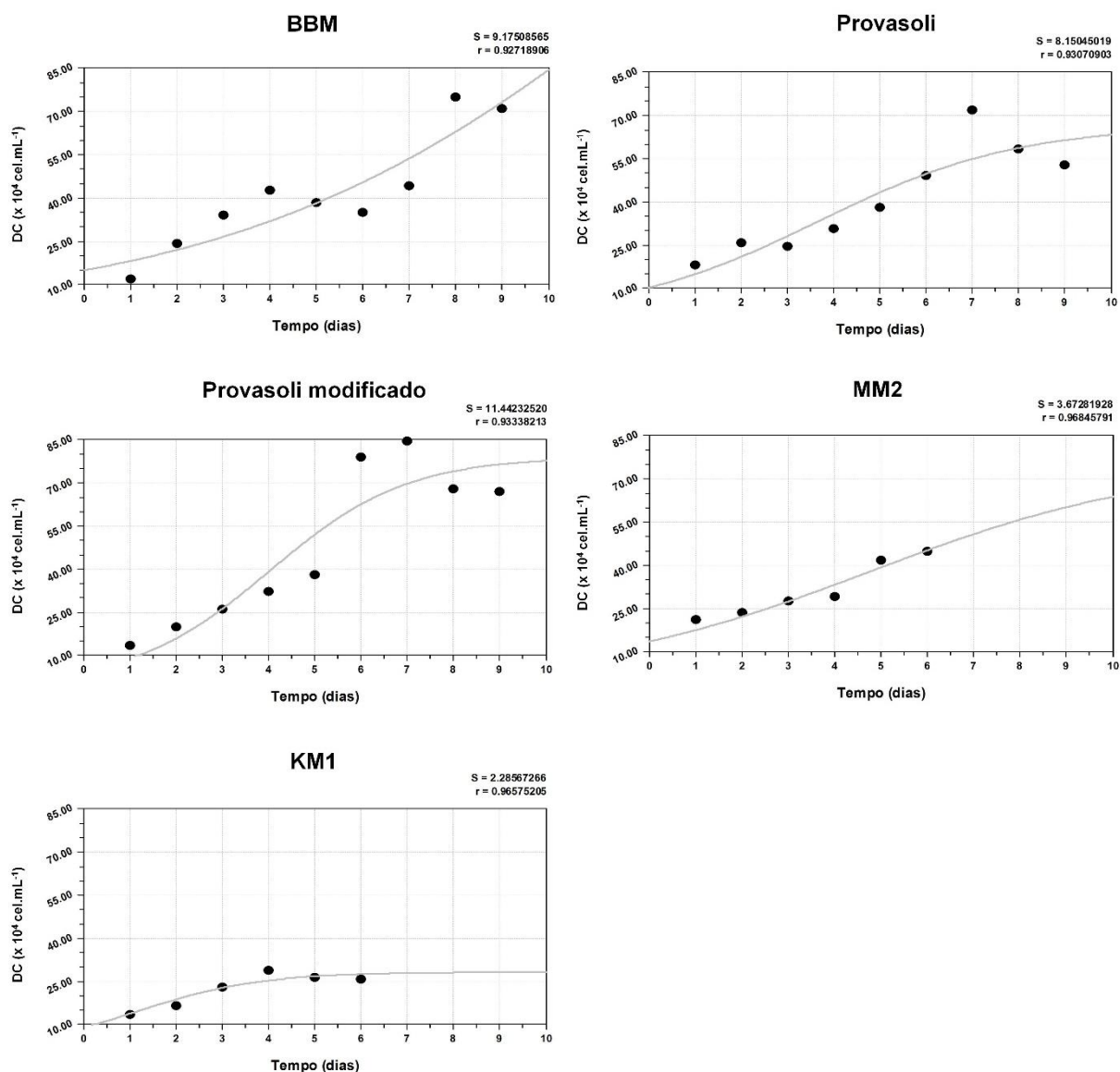
O ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis* nos diferentes meios de cultura estudados pode ser visualizado na Figura 2. Em cada meio de cultura, a microalga apresentou um ciclo de vida diferente. O meio BBM apresentou as células em fase zoosporos por mais dias de cultivo, seguido dos meios Provasoli e Provasoli modificado, respectivamente, diferentemente dos meios MM2 e KM1 que apresentaram esta fase só no início do cultivo (Figs. 2a e 2c). Somente os meios Provasoli e KM1 apresentaram as fases palmela e palmela em transição, sendo que KM1 continha maior número de células nestas fases (Fig. 2a). Todos os meios apresentaram a fase de células intermediária, contudo os meios BBM e Provasoli começaram a apresentar esta fase no dia 7 e nela permaneceram até o 9º e último dia de cultivo. O meio KM1 foi o único que apresentou as células na fase de aplanosporos. Os meios KM1, MM2 e Provasoli modificado foram os únicos que apresentaram as células vermelhas com flagelos, nos últimos dias até o final do cultivo. Em relação ao ciclo de vida, os fatores meio e dia, assim como a interação entre eles, apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis* nos diferentes meios de cultura.

As curvas de crescimento de *H. pluvialis* estão apresentadas na Figura 3, referindo-se à densidade celular diária com os diferentes meios de cultura. Para cada meio, observa-se que as curvas corresponderam ao modelo proposto e que os coeficientes apresentaram alta correlação ( $r^2 > 0.93$ ).

As curvas dos tratamentos BBM, Provasoli e Provasoli modificado foram similares, com o crescimento mais acentuado desde o primeiro dia e com cultivo de 9 dias, atingindo a fase estacionária ao redor do oitavo dia. No entanto, algumas diferenças foram perceptíveis, como as microalgas submetidas aos meios KM1 e MM2, por exemplo, que expressaram fase exponencial sutil com duração de cultivo de apenas 6 dias, entrando na fase estacionária no quarto dia de cultivo (Fig. 3).



**Figura 3.** Curvas logísticas do crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* para os diferentes meios de cultura. Os pontos indicam os valores obtidos e a linha contínua representa a curva ajustada aplicando o modelo logístico. Cada curva representa a média de três repetições em número de células por mL. Eixo y = densidade celular (x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup>), eixo x = tempo (dias).

A análise estatística mostra que, ao se comparar os parâmetros de crescimento da microalga, diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram encontradas para a velocidade de

crescimento, tempo de duplicação, densidade celular máxima e biomassa seca (Tabela 2). Com relação ao tempo de duplicação, o meio KM1 apresentou um intervalo de tempo maior para a população duplicar, de 4,37 dias  $\text{div}^{-1}$ , assim, como a velocidade de crescimento que foi menor, 0,23  $\text{div dia}^{-1}$ , diferenciando-se estatisticamente dos demais meios estudados.

O meio Provasoli modificado apresentou a maior DCM ( $84,50 \pm 11,69 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) no sétimo dia de cultivo, seguido dos meios BBM ( $75,58 \pm 5,71 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) no oitavo dia e Provasoli ( $72,08 \pm 24,32 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) no sétimo dia de cultivo, respectivamente. Os meios MM2 e KM1 apresentaram as menores densidades celulares registradas no quinto dia de cultivo, com o meio KM1 apresentando a menor DCM ( $28,75 \pm 0,75 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) entre todos os meios estudados (Tabela 2).

**Tabela 2** – Valores médios dos parâmetros de crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* nos diferentes meios de cultura.

Tratamentos	Parâmetros de crescimento			
	K (Div.dia <sup>-1</sup> )	TD (Dias.div <sup>-1</sup> )	DCM (x 10 <sup>4</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )	Biomassa seca (mg.mL <sup>-1</sup> )
BBM (Controle)	0,31 ± 0,01 <sup>bc</sup>	3,19 ± 0,15 <sup>bc</sup>	75,58 ± 5,71 <sup>ab</sup>	3,4 ± 0,0003 <sup>b</sup>
Provasoli	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,75 ± 0,11 <sup>b</sup>	72,08 ± 24,3 <sup>ab</sup>	4,0 ± 0,0002 <sup>b</sup>
KM1	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,16 <sup>a</sup>	28,75 ± 0,75 <sup>c</sup>	1,2 ± 0,0002 <sup>d</sup>
MM2	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,48 <sup>c</sup>	45,33 ± 9,98 <sup>bc</sup>	2,2 ± 0,0004 <sup>c</sup>
Provasoli modificado	0,30 ± 0,02 <sup>bc</sup>	3,29 ± 0,24 <sup>bc</sup>	84,50 ± 11,7 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,0004 <sup>a</sup>

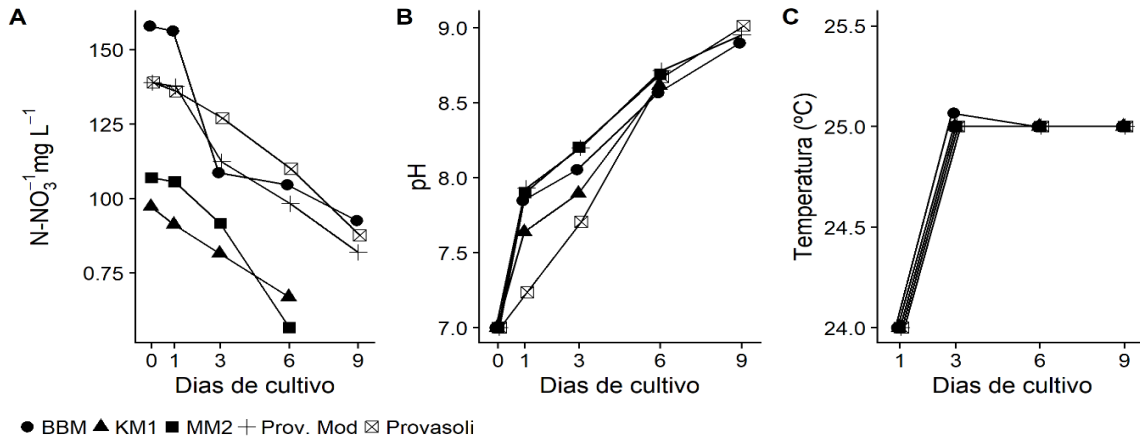
Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) por ANOVA e teste de Tukey. Velocidade de crescimento (K); tempo de duplicação (TD); Densidade celular máxima (DCM).

A biomassa seca final foi significativamente diferente entre todos os meios estudados (Tabela 2). O meio Provasoli modificado apresentou a maior biomassa seca por mL de cultura ( $4,9 \pm 0,0004$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ), sendo significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que nos meios Provasoli ( $4,0 \pm 0,0002$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ), BBM ( $3,4 \pm 0,0003$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ), MM2 ( $2,2 \pm 0,0004$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e KM1 ( $1,2 \pm 0,0002$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ).

Com relação aos parâmetros de qualidade de água, a temperatura apresentou um pequeno aumento a partir do primeiro dia do experimento, mas não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (Fig. 4c). Contudo, diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas para o nitrato ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) e para o pH (Figura 4).

A concentração média de  $\text{NO}_3\text{-N}$  para todos os tratamentos apresentou diferenças significativas desde o início do experimento e foram influenciados significativamente pelos fatores meios de cultura e dias. O meio BBM apresentou o valor inicial mais alto entre os meios ( $158$  mg  $\text{L}^{-1}$ ), seguidos dos meios Provasoli e Provasoli modificado, ambos com ( $139$

mg L<sup>-1</sup>) e o meios MM2 (107 mg L<sup>-1</sup>) e KM1 (0,97 mg L<sup>-1</sup>). Na Figura 4a pode-se observar que, em todos os tratamentos, suas concentrações tendem a declinar já no primeiro dia de cultivo, e este declínio aparece de maneira mais acentuada a partir do terceiro dia. Ao final verifica-se uma diferença significativa na concentração de NO<sub>3</sub>-N para todos os tratamentos, com os meios KM1 e MM2 apresentando os valores mais reduzidos (Fig. 4a).



**Figura 4.** Parâmetros de qualidade de água durante o cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* nos diferentes meios de cultura.

O pH aumentou continuamente no decorrer do experimento em todos os tratamentos. Porém seus valores foram influenciados significativamente pelo fator dia e não entre os meios de cultura. A diferença dos valores de pH no final do cultivo chega a ser significativamente maior ( $P < 0,05$ ) comparado aos valores de pH no primeiro dia de cultivo entre todos os tratamentos (Fig 4b).

As clorofilas *a* e *b* e o carotenoide astaxantina foram influenciados pelos fatores meios de cultura e dias, como observados na Tabela 3. O meio BBM apresentou a maior concentração de clorofila *a* ( $48 \pm 8,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no primeiro dia de cultivo, seguido dos meios Provasoli modificado ( $42 \pm 2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Provasoli ( $38 \pm 5,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ). Diferentemente dos meios KM1 ( $21 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e MM2 ( $27 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que apresentaram as menores concentrações deste pigmento ( $P < 0,05$ ). Durante o cultivo, as concentrações de clorofila *a* foram diminuindo em todos os tratamentos. No último dia, todos os meios foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ), com o meio BBM apresentando o maior valor ( $33 \pm 4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os meios KM1 ( $7 \pm 0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e MM2 ( $9 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) os menores valores (Tabela 3). Da mesma forma, a clorofila *b* foi maior no meio BBM durante todo o experimento e menor nos meios KM1 e MM2 (Tabela 3). Com relação ao carotenoide astaxantina, suas concentrações aumentaram durante todo o experimento nos diferentes meios estudados. No primeiro dia de cultivo, o meio Provasoli modificado obteve a maior concentração ( $46 \pm 3,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) diferenciando-se

estatisticamente dos demais tratamentos. Contudo, a partir do terceiro dia de cultivo, o meio KM1 apresentou a maior concentração de astaxantina ( $78 \pm 3,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) até o último dia de cultivo, no dia 6 ( $85 \pm 6,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O meio Provasoli modificado somente atingiu as mesmas concentrações de KM1 no dia 9, com os menores valores registrados nos meios BBM e Provasoli (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios das concentrações das clorofilas *a* e *b* e do carotenoide astaxantina durante o cultivo da microalga *H. pluvialis* nos diferentes meios de cultura.

Tratamentos	Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				Clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				Astaxantina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	Dias de cultivo				Dias de cultivo				Dias de cultivo			
	1	3	6	9	1	3	6	9	1	3	6	9
BBM	48 ± 8,1 <sup>a</sup>	43 ± 0,6 <sup>a</sup>	41 ± 0,7 <sup>a</sup>	33 ± 4,0 <sup>a</sup>	27 ± 4,7 <sup>a</sup>	21 ± 2,0 <sup>a</sup>	22 ± 0,6 <sup>a</sup>	18 ± 1,6 <sup>a</sup>	17 ± 5,8 <sup>c</sup>	24 ± 3,5 <sup>c</sup>	55 ± 3,2 <sup>c</sup>	60 ± 3,2 <sup>b</sup>
Provasoli	38 ± 5,4 <sup>a</sup>	23 ± 2,8 <sup>b</sup>	19 ± 1,2 <sup>c</sup>	12 ± 1,4 <sup>b</sup>	15 ± 3,5 <sup>b</sup>	10 ± 0,9 <sup>b</sup>	9 ± 0,6 <sup>c</sup>	5 ± 0,2 <sup>b</sup>	23 ± 1,8 <sup>c</sup>	33 ± 1,5 <sup>c</sup>	51 ± 1,7 <sup>c</sup>	67 ± 6,6 <sup>b</sup>
KM1	21 ± 0,8 <sup>b</sup>	9 ± 0,4 <sup>d</sup>	7 ± 0,3 <sup>d</sup>	-	10 ± 0,5 <sup>c</sup>	4 ± 0,3 <sup>d</sup>	3 ± 0,2 <sup>d</sup>	-	29 ± 4,8 <sup>b</sup>	78 ± 0,7 <sup>a</sup>	85 ± 6,1 <sup>a</sup>	-
MM2	27 ± 0,4 <sup>b</sup>	13 ± 0,4 <sup>c</sup>	9 ± 0,8 <sup>d</sup>	-	14 ± 0,8 <sup>b</sup>	6 ± 0,1 <sup>c</sup>	4 ± 0,3 <sup>d</sup>	-	27 ± 2,2 <sup>b</sup>	50 ± 6,0 <sup>b</sup>	56 ± 6,0 <sup>c</sup>	-
Prov. Mod	42 ± 2,6 <sup>a</sup>	28 ± 0,4 <sup>b</sup>	26 ± 1,2 <sup>b</sup>	13 ± 0,2 <sup>b</sup>	22 ± 3,1 <sup>a</sup>	15 ± 0,1 <sup>a</sup>	13 ± 1,3 <sup>b</sup>	6 ± 0,2 <sup>b</sup>	46 ± 3,1 <sup>a</sup>	51 ± 1,3 <sup>b</sup>	64 ± 1,6 <sup>b</sup>	85 ± 7,4 <sup>a</sup>
M		*				*				*		
D		*				*				*		
MxD		*				*				*		

Média de 3 repetições ± desvio padrão. Os valores médios entre os tratamentos em mesma coluna com letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $P < 0.05$ ) por ANOVA fatorial e teste de Tukey. M = fator 1 (meios de cultura); D = fator 2 (dias de cultivo); MxD = interação entre os meios e dias de cultivo; n.s = não significativo ( $P > 0,05$ ); \* ( $P < 0,05$ ); (-) sem valores.

O conteúdo protéico das microalgas foi influenciado tanto pelo meio de cultura utilizado quanto pelo dia de cultivo, havendo também diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na interação entre os dois fatores (Tabela 4). No primeiro dia, os meios BBM, Provasoli e Provasoli modificado propiciaram maior quantidade de proteína, sendo significativamente iguais ( $P > 0,05$ ). No último dia de cultivo, a maior quantidade de proteína foi obtida com o meio BBM, diferenciando-se estatisticamente dos demais ( $P < 0,05$ ), seguido dos meios Provasoli, Provasoli modificado e MM2. O meio KM1 apresentou os menores valores de proteínas desde o primeiro até o último dia de cultivo, (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores médios da concentração das proteínas (% biomassa seca) da microalga *H. pluvialis* para o primeiro e último dia de cultivo nos diferentes meios de cultura.

Tratamentos	Proteínas (% b.s)				
	Primeiro dia	Último dia	M	D	MxD
BBM	84,2 ± 2,47 <sup>a</sup>	62,7 ± 3,38 <sup>a</sup>	*	*	*
Provasoli	82,8 ± 2,51 <sup>ab</sup>	46,7 ± 7,39 <sup>b</sup>	*	*	*
KM1	68,5 ± 3,40 <sup>c</sup>	26,2 ± 0,58 <sup>c</sup>	*	*	*
MM2	72,5 ± 1,60 <sup>bc</sup>	31,1 ± 1,60 <sup>bc</sup>	*	*	*
Prov. Mod	88,4 ± 4,70 <sup>a</sup>	40,2 ± 0,46 <sup>b</sup>	*	*	*

Média de 3 repetições ± desvio padrão. Os valores médios entre os tratamentos em mesma coluna com letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) por ANOVA fatorial e teste de Tukey. M = fator 1 (meios de cultura); D = fator 2 (dias de cultivo); MxD = interação entre os meios e dias de cultivo; n.s = não significativo ( $P > 0,05$ ); \* ( $P < 0,05$ ).

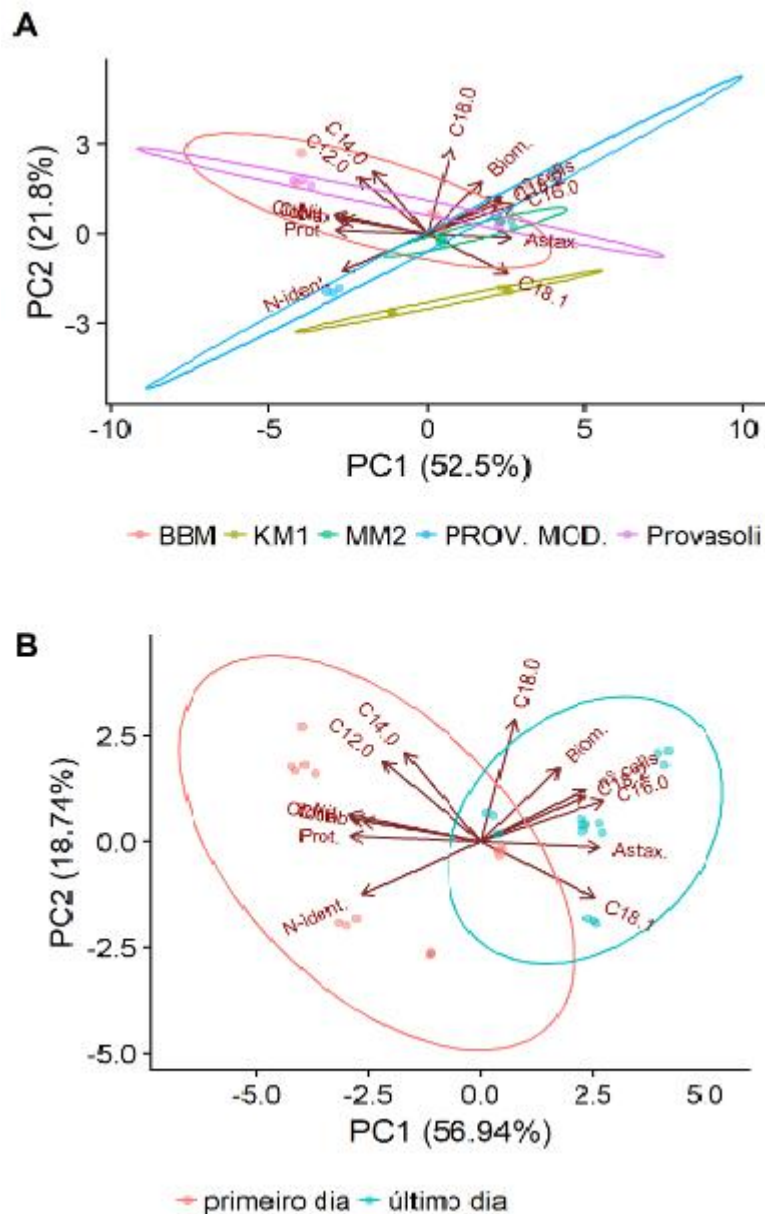
Na Tabela 5 são apresentados os valores médios obtidos para cada meio de cultura estudado quanto à concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) da biomassa de *H. pluvialis*. As concentrações dos FAMES, em sua maioria, foram influenciadas tanto pelo fator meio de cultura quanto pela duração do experimento, havendo diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os fatores. Foram identificados 6 ácidos graxos, tanto saturados como poliinsaturados na biomassa das microalgas. Os ácidos graxos de maiores expressividades foram o ácido palmítico (16:0) com 16,5 a 25,3%, o ácido oleico (18:1) com 20 a 29,8%, e o ácido linoléico (18:2) com 8,28 a 24,2%, apresentando as maiores concentrações em relação ao último dia de cultivo para todos os meios estudados (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores médios da concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) da microalga *H. pluvialis* para o primeiro e último dia de cultivo nos diferentes meios de cultura.

	Ésteres metílicos de ácidos graxos (% mg)													
	C14:0		C16:0		C18:0		C18:1		C18:2		C18:3		Σ FAMES n.i	
	1º dia	último dia	1º dia	último dia	1º dia	último dia	1º dia	último dia	1º dia	último dia	1º dia	último dia	1º dia	Último dia
BBM	1,97 ± 1,31	1,12 ± 0,38	16,6 ± 0,04	20,2 ± 0,03	1,32 ± 0,03	1,02 ± 0,02	22,3 ± 0,40	25,7 ± 0,07	13,0 ± 1,29	14,3 ± 0,05	-	5,52 ± 0,35	38,4 ± 1,53	30,5 ± 0,57
Provasoli	2,75 ± 0,02	0,74 ± 0,01	16,7 ± 0,01	22,4 ± 0,25	1,34 ± 0,01	1,20 ± 0,07	20,0 ± 0,14	25,1 ± 0,41	9,97 ± 0,06	17,8 ± 0,35	4,68 ± 0,17	6,04 ± 0,06	39,7 ± 0,46	28,2 ± 2,40
KM1	0,43 ± 0,02	0,52 ± 0,03	17,1 ± 0,05	19,4 ± 0,03	0,72 ± 0,01	0,92 ± 0,01	26,4 ± 0,04	29,8 ± 0,19	8,28 ± 0,03	16,5 ± 0,03	5,72 ± 0,15	-	40,5 ± 0,47	30,9 ± 0,12
MM2	0,55 ± 0,06	0,87 ± 0,24	23,9 ± 0,12	24,0 ± 0,07	0,62 ± 0,05	1,49 ± 0,02	26,1 ± 0,06	26,1 ± 0,21	24,2 ± 0,01	17,5 ± 0,20	26,0 ± 0,03	-	22,1 ± 0,03	27,5 ± 0,49
Prov.Mod.	0,38 ± 0,06	0,69 ± 0,10	16,5 ± 0,06	25,3 ± 0,20	1,34 ± 0,01	1,10 ± 0,02	22,0 ± 0,15	26,2 ± 0,69	11,8 ± 0,19	25,4 ± 0,20	3,73 ± 0,51	4,45 ± 0,10	44,1 ± 0,92	16,7 ± 0,31
M	*		*		*		*		*		NS		*	
D	*		*		*		*		*		*		*	
M x D	*		*		*		*		*		*		*	

Média de 3 repetições ± desvio padrão. Os valores médios mesma coluna são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) por Friedman (ANOVA fatorial) seguido do teste de Conover. M = fator 1 (meios de cultura); D = fator 2 (dias de cultivo); MxD = interação entre os meios e dias de cultivo; n.s = não significativo ( $P > 0,05$ ); \* ( $P < 0,05$ ). Σ FAMES n.i = somatório de ésteres metílicos de ácidos graxos não identificados; C14:0 = ácido mirístico; C16:0 = ácido palmítico; C18:0 = esteárico; C18:1 = oleico; C18:2 = linoléico; C18:3 = alfa-linolênico; (-) não encontrado.

Na Figura 5, a análise de componente principais explica um acumulado de 75,68% da variabilidade dos dados, onde a componente 1 explicou 56,94% e a componente 2 explicou 18,74%. As variáveis nitrato, C16:0, C18:1, C18:2, ácidos graxos não identificados, astaxantina, clorofilas *a* e *b*, número de células e proteínas foram melhor correlacionadas com a componente 1, enquanto que C12:0, C14:0, C18:0 e biomassa, foram melhor correlacionadas com a componente 2. O gráfico de componentes principais relata a distribuição dessas variáveis de acordo com os meios de cultura (Fig. 5a) e com os dias de cultivo, primeiro e último dia (Fig. 5b), na qual as elipses delimitam um perímetro com 95% de confiança. Assim, maiores valores de nitrato, ácidos graxos não identificados, proteínas, clorofilas *a* e *b*, e C14:0 foram encontrados no primeiro dia e principalmente para os meios BBM, Provasoli e Provasoli modificado. Em contrapartida, os maiores valores de C18:1, C16:0, astaxantina, biomassa seca e número de células foram detectados no último dia de cultivo, principalmente para os meios KM1, MM2 e Provasoli modificado para os valores de C18:1, C16:0 e astaxantina. No gráfico, é possível observar que os valores de astaxantina são inversamente correlacionados com os valores de proteínas ( $r = -0,75$ ), clorofila *a* ( $-0,70$ ), nitrato ( $-0,72$ ) e clorofila *b* ( $-0,67$ ), assim como ácidos graxos não identificados com os valores de C16:0 ( $-0,92$ ), C18:2 ( $-0,91$ ) e número de células ( $-0,62$ ). As variáveis nitrato, proteína e clorofilas (*a* e *b*) são altamente correlacionadas diretamente, com valores de  $r > 0,86$ , semelhantemente às variáveis C18:2 e C16:0 ( $r = 0,88$ ). Isso indica que o aumento da produção de astaxantina nas células de *Haematococcus pluvialis*, com maiores índices no último dia de cultivo, proporcionam a diminuição nas concentrações de nitrato da água, de proteínas e clorofilas (*a* e *b*) nas células (Fig. 5).



**Figura 5.** Análise multivariada de componentes principais para as variáveis respostas nos diferentes meios de cultura e em relação ao primeiro e ao último dia de cultivo da microalga *H. pluvialis*.

### 3.4 Discussão

Para Pan-Utai et al. (2017), o que determina o ciclo de vida das microalgas são as condições de cultivo a que são submetidas, principalmente os fatores nutricionais, como os nutrientes orgânicos variados, a adição de acetato de sódio, e a restrição de nitrogênio e fósforo. No presente estudo, as células na fase de zoosporos foram observadas principalmente nos meios BBM e Provasoli e no início do cultivo no meio Provasoli modificado. Por outro lado, células características de indução à biossíntese do carotenoide astaxantina (palmela, células intermediárias, aplanosporos e vermelhas com flagelos) foram mais observadas no meio KM1 e células intermediárias e vermelhas com flagelos nos meios MM2 e Provasoli modificado. Nossos resultados corroboram com Aflalo et al. (2007) que

observaram o crescimento das células vegetativas verdes (zoosporos) nos cultivos de *H. pluvialis* em meios repletos de nutrientes, principalmente nitrato e fosfato. Este resultado é análogo ao estudo de Issarapayup et al. (2009), no qual não foram evidentes alterações morfológicas no cultivo das microalgas em meio F1: as células vegetativas foram predominantes, poucas células na fase palmela foram observadas no final do cultivo (13º dia) e não houve formação de células císticas. Jeon et al. (2006) verificaram que a morfologia celular mudou do estágio vegetativo para cistos quando o acetato foi fornecido na cultura das microalgas.

Os nossos resultados mostraram que a microalga *H. pluvialis* teve melhor crescimento nos meios BBM, Provasoli e Provasoli modificado que nos meios KM1 e MM2. O nitrogênio e o fósforo são nutrientes importantes para o cultivo das microalgas e, em alguns meios de cultura, a disponibilidade destes e/ou de suas fontes pode se tornar um fator limitante, como o observado para os meios KM1 e MM2. O nitrogênio é um dos elementos essenciais para o crescimento das microalgas e um componente fundamental de substâncias estruturais das células, como as proteínas, aminoácidos, materiais genéticos (DNA, RNA) e pigmentos fotossintetizantes, como as clorofilas (BERMAN-FRANK et al., 2001). Assim, o nitrogênio é de extrema importância por ser componente de diversas substâncias do metabolismo primário das microalgas. Os sais de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{KNO}_3$ ) e os sais de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) são as principais fontes de nitrogênio inorgânico empregadas nos meios de cultura. Fontes orgânicas, como ureia, ácidos aminados, extrato de levedura e L-asparagina, também podem ser aplicadas, porém com menos relevância para as microalgas do que as formas inorgânicas de nitrogênio (LOURENÇO, 2006; CHIRANJEEVI e MOHAN, 2016). Assim como o nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes às microalgas porque regulam o crescimento e o metabolismo em todos os processos que envolvem trocas energéticas e formam as moléculas estruturais das células, como ATP, açúcares fosfatados e ácidos nucleicos. Nos cultivos, o fósforo pode ser adicionado aos meios de cultura como  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , glicerofosfato de sódio dentre outros (LOURENÇO, 2006; ROOPNARAIN et al., 2014).

Alguns estudos evidenciam a importância das fontes de nitrogênio e do fósforo sobre o crescimento das microalgas. Concentrações de 0 a  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) foram testadas em *Chlorella pyrenoidosa* e os piores resultados de crescimento foram observados com 0 a  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  (NIGAM et al., 2011). Pancha et al. (2014), usando  $\text{NaNO}_3$  (0; 15,4; 30,8; 61,7; 123;  $247 \text{ mg L}^{-1}$ ) para *Scenedesmus* sp., alcançaram maiores taxas de crescimento e produtividade de biomassa nas concentrações a partir de  $30,8 \text{ mg L}^{-1}$  e ainda observaram que as baixas concentrações de nitrato diminuiriam significativamente a atividade fotossintética e afetaram a morfologia celular da microalga. Resultados

semelhantes também foram encontrados para *Chlorella* sp. (ILLMAN et al., 2000) e *Botryococcus braunii* (DAYANANDA et al., 2007). Orosa et al. (2005), ao testarem diferentes concentrações de nitrato de sódio (0; 0,15; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 g L<sup>-1</sup>) no cultivo de *H. pluvialis*, observaram que as microalgas não cresceram apenas nas culturas sem este nutriente, sem diferenças significativas nas demais concentrações. Kamalanathan et al. (2015) observaram menor número de células, taxa de crescimento e produtividade de biomassa em cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* na ausência de, semelhantemente aos nossos resultados, em que o meio KM1 apresentou a mais baixa velocidade de crescimento, o maior tempo de duplicação e as menores DCM e biomassa seca.

Li et al. (2008), ao investigarem o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, uréia e bicarbonato de amônio) sobre o crescimento e produtividade de biomassa em *Neochloris oleoabundans*, observaram os melhores resultados com nitrato de sódio. No entanto, Kim et al. (2016) ao estudarem fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio sobre o crescimento celular de *Tetraselmis* sp., mostraram que todas as fontes de amônia (inorgânicas) inibiram o crescimento celular, e que as maiores concentrações celulares e de biomassa foram obtidas sob fontes orgânicas de nitrogênio, extrato de levedura e glicina. Nosso estudo corrobora os dados de Sarada et al. (2002), que verificaram que a fonte de nitrogênio ideal para o crescimento de *H. pluvialis* é o nitrato de sódio. Mesmo os meios MM2 e KM1, que possuem em sua composição fontes orgânicas de nitrogênio, apresentaram os menores parâmetros de crescimento em comparação ao BBM, Provasoli e Provasoli modificado, os quais tinham o nitrato de sódio como sua principal fonte de nitrogênio. As maiores densidades celulares e produção de biomassa foram observadas no meio Provasoli modificado, que além de glicerofosfato de sódio e nitrato de sódio, possui adição de extrato de levedura e de carbono orgânico (acetato de sódio). Liang et al. (2009) afirmam que as microalgas cultivadas apresentam maior DCM em meios de cultura que possuam as mesmas condições. Outros estudos que também compararam meios suplementados com fontes de carbono além das fontes de nitrogênio já existentes apresentaram melhor produção de *H. pluvialis* (OROSA et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2009).

Nossos resultados são notavelmente diferentes de alguns outros trabalhos com crescimento do gênero *Haematococcus* com o meio BBM 75,58 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup>, Provasoli 72,08 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup> e Provasoli modificado 84,50 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup> que obtiveram densidades máximas de 1,5 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup> (TRIPATHI et al., 1999), 1,2 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup> (FÁBREGAS et al., 2000) e 3,5 x 10<sup>5</sup> cél mL<sup>-1</sup> (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004) e como meio alternativo com fertilizante NPK atingindo 5,4 x 10<sup>5</sup> cél mL<sup>-1</sup> (SIPAÚBA-TAVARES et al.,

2015). Já para os meios KM1 e MM2, os resultados da densidade celular máxima foram bem semelhantes aos encontrados por Tripathi et al. (1999).

A temperatura manteve-se dentro da faixa recomendada (20 a 27°C) para o crescimento de *H. pluvialis* (GIANELLI et al., 2015). A fotossíntese realizada pelas microalgas durante seu crescimento em cultivo envolve o consumo de moléculas inorgânicas de carbono como CO<sub>2</sub>, por exemplo, e produzem hidroxila como metabólito, consequentemente aumentando o pH do meio (KIM et al., 2013). Isto pode ter ocasionado o aumento do pH nos tratamentos, com pH inicial de 7 a 9 no final do cultivo. O pH ideal para o crescimento de *H. pluvialis* está na faixa de 7-8; acima destes valores, o crescimento celular e produção de biomassa podem ser significativamente alterados (SARADA et al., 2002; CHENG et al., 2016).

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes pela *H. pluvialis* e afeta diretamente seu ciclo de vida (WANG et al., 2017). Neste estudo, a concentração de nitrato diminuiu, considerando que essa é uma das fontes de nitrogênio preferível para a espécie (GÖKSAN et al., 2011). Quando as concentrações de nitrato chegaram a valores muito baixos, as microalgas alcançaram sua fase estacionária e começaram a acumular mais astaxantina, diminuindo a quantidade de clorofilas, assim como observado por Pan-utai et al. (2017). A limitação do nitrogênio leva à diminuição do crescimento das microalgas (HU e GAO, 2005; MANDAL e MALLICK, 2009; NIGAM, 2011; YEESANG e CHEIRSILP, 2011) e com o decréscimo de clorofila, componente essencial da fotossíntese (PENG et al., 2016; NAHIDIAN et al., 2018). Por outro lado, a escassez de nitrogênio é um dos fatores que estimula a produção de astaxantina em *H. pluvialis* (KANG et al., 2005; SCIBILIA et al., 2015; WAN et al., 2015). Os meios KM1 e MM2 apresentaram os menores valores de nitrato comparativamente aos outros meios estudados, o que pode ser explicado por estes meios não possuírem nenhuma fonte de nitrato em sua composição. O nitrato inicial nos meios KM1 e MM2 encontrado neste estudo pode ter sido proveniente do inóculo inicial das microalgas, mantidas no meio BBM.

As concentrações do carotenoide astaxantina foram maiores no último dia de cultivo, indicando que o aumento da produção de astaxantina ocorreu com a diminuição das concentrações de nitrato na água e foi inversamente correlacionado com os valores de proteínas e clorofilas. A depleção de nitrogênio resultou em uma degradação de clorofilas e carotenoides primários e acumulação de carotenoides secundários ( $\beta$ -caroteno, ceto luteína, cantaxantina e astaxantina) em *Chlorella zofingiensis* (MUDERS et al., 2015). A proporção astaxantina/clorofilas aumentou com o tempo de cultivo; a diminuição das concentrações de clorofila durante a acumulação de astaxantina é relatada em diversos estudos com cultura de *H. pluvialis* sob depleção de nitrogênio (BOUSSIBA et al., 1999; SARADA et al., 2002; DRAGOS et al., 2010; ZHANG et al., 2016; LV et al., 2017; PAN-UTAI et al., 2017;

BUTLER et al., 2018). Estudos anteriores sobre o cultivo de *H. pluvialis* mostraram que o acetato é uma importante fonte de carbono por aumentar a biossíntese de astaxantina (OROSA et al., 2005; JEON et al., 2006; GÖKSAN et al., 2010; PAN-UTAI et al., 2017; BUTLER et al., 2018), confirmando os nossos resultados, em que as maiores concentrações do carotenoide foram obtidas nos meios KM1 no 6º dia de cultivo ( $85 \pm 6,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Provasoli modificado no 9º dia de cultivo ( $85 \pm 7,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Contudo, dependendo da concentração que o acetato for utilizado, pode inibir o crescimento das microalgas. Pan-utai et al. (2017) estudaram o acetato de sódio como agente indutor para acumulação de astaxantina em *H. pluvialis*, nas concentrações 10 mM ( $0,82 \text{ g L}^{-1}$ ), 50 mM ( $4,10 \text{ g L}^{-1}$ ) e 100 mM ( $4,20 \text{ g L}^{-1}$ ), e observaram que as concentrações de 10mM e de 50 mM proporcionaram a mesma concentração de astaxantina ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) em *H. pluvialis*. Contudo, a concentração de 50 mM foi considerada prejudicial às culturas, pois houve redução no número de células, e as concentrações de 100 mM foram letais para as microalgas. A condição ideal de crescimento e de biossíntese de astaxantina foi obtida a uma concentração de acetato de sódio de  $0,98 \text{ g L}^{-1}$  (CIFUENTES et al., 2003; GÖKSAN et al., 2010) e  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  (OROSA et al., 2005), semelhantes à concentração de acetato de sódio utilizada em nosso estudo.

Para o conteúdo celular de proteína, o meio BBM apresentou o melhor resultado, com mais de 60% no final do cultivo. Este resultado é comumente observado em clorofíceas cultivadas com altas concentrações de nitrogênio no meio (LOURENÇO et al., 2004). Segundo estes autores, a fonte de nitrogênio não exerce efeito sobre o conteúdo de proteínas, mas sim sobre a quantidade deste nutriente, razão pela qual pode-se explicar os maiores valores de proteínas (>80%) encontrados no primeiro dia de cultivo e os maiores valores médios para os meios BBM, Provasoli e Provasoli modificado.

Os ácidos graxos de maiores expressividades foram os ácidos oleico (18:1), palmítico (16:0) e linoleico (18:2), semelhante aos resultados de Zhekisheva et al. (2002), que também observaram uma correlação linear entre a acumulação do ácido oleico e da astaxantina, corroborando com o presente estudo. Cerón et al. (2007) também constataram que o ácido oleico é o que se apresenta em maior quantidade na fase de aplanosporos em *H. pluvialis*. Damiani et al. (2010) observaram perfis de ácidos graxos semelhantes tanto sob condições controle quanto sob estresse (alta luminosidade e privação de nitrogênio), sendo os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico e linoleáldico os principais componentes. Bilbao et al. (2016) e Liang et al. (2015) também obtiveram concentrações dos ácidos palmítico, linoleico e linolênico maiores sob estresse, semelhante ao presente estudo. Entretanto, Damiani et al. (2010) constataram declínio do conteúdo de ácido palmítico e aumento dos ácidos esteárico e linolênico sob escassez de nitrogênio.

### 3.5 Conclusão

Os parâmetros avaliados para crescimento, ciclo de vida, biomassa seca, clorofilas, astaxantina, proteínas e ésteres metílicos de ácidos graxos foram diretamente influenciados pelos meios de cultura. O meio BBM produziu mais clorofilas e proteínas. Apesar de, no final do cultivo, os meios KM1 e Provasoli modificado apresentarem as mesmas concentrações do carotenoide astaxantina, o meio Provasoli modificado se mostrou o mais adequado para o cultivo e produção de astaxantina por apresentar os melhores parâmetros de crescimento e de biomassa para a microalga *H. pluvialis*.

### 3.6 Agradecimento

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fornecido e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor. Agradecemos também ao Laboratório de Biologia (LABIO) e à Central analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelas análises bioquímicas realizadas. Os últimos autores são bolsistas CNPq.

### 3.7 Referências

- AFLALO, C.; MESHULAM, Y.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 300–305, 2007.
- BERMAN-FRANK; I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.; KUPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Thricodesmium*. **Science**, v. 294, p. 1534-1537, 2001.
- BILBAO, P. G. S.; DAMIANI, C.; SALVADOR, G. A.; LEONARDI, P. *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 6, p. 3283-3294, 2016.
- BLIGH, E.; DYER W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p.911-917, 1959.
- BOLD, H.C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 76, p.101-108, 1949.
- BOUSSIBA, S.; BING, W.; YUAN, J. P.; ZARKA, A.; CHEN, F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. **Biotech. Lett.**, v.21, p. 601-604, 1999.
- BRINDA, B. R.; SARADA, R.; KAMATH, B. S.; RAVISHANKAR G. A. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* - cultural and regulatory aspects.

**Current Science**, v. 87, p. 1290-1294, 2004.

BUTLER, T. O.; MCDUGALL, J. G.; CAMPBELL, R.; STANLEY, M. S.; DAY, J. G. Media Screening for Obtaining *Haematococcus pluvialis* Red Motile Macrozooids Rich in Astaxanthin and Fatty Acids. **Biology**, v. 7, p. 2-15, 2018.

CERÓN, M.C.; GARCIA-MALEA, M.C.; RIVAS, J.; ACIEN, F.G.; FERNANDEZ, J.M.; DEL RIO, E.; GUERRERO, M.G.; MOLINA, E. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. **Appl. Microb. Cell Physiol.** v. 74, p. 1112–1119, 2007.

CHENG, J.; LI, K.; YANG, Z.; ZHOU, J.; CEN, K. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. **Bioresource Technology**, v. 204, p.49-54, 2016.

CHIRANJEEVI, P.; VENKATA MOHAN, S. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity, **Renewable Energy**, v. 98, p. 64-71, 2016.

CHU, F. F.; CHU, P. N.; CAI, P. J.; LI, W. W.; LAM, P. K.; ZENG, R. J. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource technology**, v. 134, p. 341-346, 2013.

CHENG, J.; LI, K.; YANG, Z.; ZHOU, J.; CEN, K. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. **Bioresource technology**, v.204, p.49-54, 2016.

CIFUENTES, A. S.; GONZALEZ, M. A.; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZALEZ, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory, 2003.

DAMIANI, M. C.; POPOVICH, C. A.; CONSTENLA, D.; LEONARDI, P. I. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource technology**, v. 101 (11), p. 3801-3807, 2010.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; USHA RANI, M.; SHAMALA, T. R.; RAVISHANKAR, G. A. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass Bioenergy**, v.31, p. 87-93, 2007.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; PONCE-NOYOLA, T.; TORRES-MUNOZ, J. A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p.783-791, 2007.

DONG, S.; HUANG, Y.; ZHANG, R.; WANG, S.; LIU, Y. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **Scientific World Journal**, v. 2014, p.694305, 2014.

DRAGOS, N., BERCEA, V., BICA, A., DRUGA, B., NICOARA, A., AND COMAN, C. Astaxanthin production from a new strain of *Haematococcus pluvialis* grown in batch culture. **Ann. Roman. Soc. Cell Biol.**, v.15, p.353–361, 2010.

FÁBREGAS, J.; DOMÍNGUEZ, A.; REGUEIRO, M.; MASEDA, A.; OTERO, A.

Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53(5), p.530-535, 2000.

FAGIRI, Y.; SALLEH, A.; EL-NAGERABI, S. Influence of chemical and environmental factors on the growth performance of *Spirulina platensis* strain SZ100. **J Algal Biomass Utilization**, v.4, p.7–15, 2013.

GARCÍA-MALEA, M. C.; FERNANDEZ, J. M.; CERON, M. C.; MOLINA, E. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.981-989, 2006.

GIANNELLI, L.; YAMADA, H.; KATSUDA, T.; HIDEKI YAMAJI. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.119 (3), p. 345-350, 2015.

GÖKSAN, T.; AK, I.; GOKPINAR, S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). **J. Microbiol. Biotechnol.** v.20, p.1276–1282, 2010.

GÖKSAN, T.; AK, İ.; KILIÇ, C. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 11, n. 3, 2011.

GONZÁLEZ, M. A.; CIFUENTES, A. S.; GÓMEZ, P. I. Growth and total carotenoid content four chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. **Gayana Botánica**, v. 66, p.58-70, 2009.

HEXIN, L.; XIANGGAN, C.; ZHILEI, T.; SHIRU, J. Analysis of metabolic responses of *Dunaliella salina* to phosphorus deprivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 29(3), p.1251-1260, 2017.

HU, H.; K. GAO. Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO<sub>2</sub> Concentration. **Biotechnol Lett.**, v.28, p.987-992, 2005.

HUMPHREY, G. F. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light dark regimes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 40, p. 63-70, 1979.

JEON, Y-C.; CHO, C-W.; YUN, Y-S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*, **Enzym. Microb. Technol.**, v.39, p. 490-495, 2006.

JIANG, X.; YAN, Q.; LIU, F.; JING, C.; DING, L.; ZHANG, L.; PANG, C. Chronic trans-astaxanthin treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects co-morbid depressive like behaviors in mice with chronic pain. **Neuroscience letters**, v.662, p.36-43, 2018.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microb. Technol.**, v.27, p. 631-635, 2000.

ISSARAPAYUP, K.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Flat panel airlift

photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 142 (3–4), p. 227-232, 2009.

KAMALANATHAN, M.; GLEADOW, R.; BEARDALL, J. Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii*. **Algal Research**, v. 12, p. 191-196, 2015.

KANG, C. D.; LEE, J. S.; PARK, T. H.; SIM, S. J. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.68, p.237–241, 2005.

KATIYAR, R.; GURJAR, B. R.; BISWAS, S.; PRUTHI, V.; KUMAR, N.; KUMAR, P. Microalgae: an emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 1083-1093, 2017.

KIM, S.; PARK, J-E.; CHO, Y-B.; HWANG, S-J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 8–13, 2013.

KIM, G.; MUJTABA, G.; LEE, K. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. **Algae**, v. 31(3), p. 257-266, 2016.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p.351-356, 1997.

LIANG, C.; ZHAI, Y.; XU, D.; YE, N.; ZHANG, X.; WANG, Y.; YU, J. Correlation between lipid and carotenoid synthesis and photosynthetic capacity in *Haematococcus pluvialis* grown under high light and nitrogen deprivation stress. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 2, p. 077, 2015.

LOWRY O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LOURENCO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVIN, P.; MARQUEZ, L. U. M.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v.39(1), p.17-32, 2004.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, **Microbiology and Biotechnology**, v.81(4), p.629-636, 2008.

LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnol Lett**, v. 31, p.1043–1049, 2009.

MANDAL, S.; N. MALLICK. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for

biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.84, p.281-291, 2009.

MANDOTRA, S. K.; KUMAR, P.; SUSEELA, M. R.; NAYAKA, S.; RAMTEKE, P. W. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. **Bioresource technology**, v. 201, p. 222-229, 2016.

MULDERS, K. J. M.; WEESEPOEL, Y.; BODENES, P.; LAMERS, P. P.; VINCKEN, J-P.; MARTENS, D. E.; GRUPPEN, H.; WIJFFELS, R. H. Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: a carotenoid metabolism study. **J. Appl. Phycol.**, v.27, p.125–140, 2015.

NAHIDIAN, B.; GHANATI, F.; SHAHBAZI, M.; SOLTANI, N. Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. **Bioresource Technology**, v.255, p.229-237, 2018.

NIGAM, S.; RAI, M. P.; SHARMA, R. Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 7 (3), p. 124-129, 2011.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresour Technol**, v. 96, p.373–378, 2005.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v.156, p.146-154, 2014.

PANG, N.; CHEN, S. Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. **Algal Research**, v.21, p.227-235, 2017.

PAN-UTAI, W.; PARAKULSUKSATID, P.; PHOMKAIVON, N. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.12, p.152-158, 2017.

PENG, G.; FAN, Z.; WANG, X.; CHEN, C. Photosynthetic response to nitrogen source and different ratios of nitrogen and phosphorous in toxic cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* FACHB-905. **J. Limnol.**, v.75, p.560–570, 2016.

PINDICH, R.; RUBENFELD, D. Econometric models and economic forecasts. New York 2nd ed.:Mc Graw-Hill, 1981. 475-492 p.

PIRASTRU, L.; DARWISH, M.; CHU, F. L.; PERREAULT, F.; SIROIS, L.; SLENO, L.; POPOVIC, R. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 1, p. 117-124, 2012.

PROVASOLI, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Cultures and Collections of Algae. Proceedings of the U.S. – Japan Conference (Watanabe, A. & Hattori, A., eds.). Japanese Society of Plant Physiology, Hakone, 1968. p.63-75.

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for

Statistical Computing. Version 2.3. Vienna, 2017. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: junho 2017.

ROOPNARAIN, A.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production, **Bioresour. Technol.**, v.156, p. 408-411, 2014.

SAHA, S. K.; MCHUGH, E.; HAYES, J.; MOANE, S.; WALSH, D.; MURRAY, P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource technology**, v.128, p.118-124, 2013.

SARADA, R.; BHATTACHARYA, S.; RAVISHANKAR, G. A. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p.517–521, 2002.

SCIBILIA, L.; GIROLOMONI, L.; BERTEOTTI, S.; ALBORESI, A.; BALLOTTARI, M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. **Algal Research**, v. 12, p. 170-181, 2015.

SHAH, M. M. R.; LIANG, Y.; CHENG, J. J.; DAROCH, M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 531, 2016.

SHEN, X. F., LIU, J. J., CHAUHAN, A. S., HU, H., MA, L. L., LAM, P. K.; ZENG, R. J. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. **Algal Research**, v. 17, p. 261-267, 2016.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 431-444, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES; L. H.; BERCHIELLI-MORAIS, F. A.; SCARDOELI-TRUZZIA, B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. **Braz. J. Biol.**, v. 75 (4), p. 796-803, 2015.

STEIN, J. R. Culture methods and growth measurements. In: J.R. Stein (ed.). Handbook of physiological methods. Cambridge University, Cambridge, 1973. p.448.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v. 68, p.197-199, 1999.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource technology**, v. 129, p. 7-11, 2013.

WAN, M.; ZHANG, Z.; WANG, J.; HUANG, J.; FAN, J.; YU, A.; LI, Y. Sequential Heterotrophy–Dilution–Photoinduction Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin. **Bioresource technology**, v. 198, p.557-563, 2015.

WANG, N.; GUAN, B.; KONG, Q.; DUAN, L. A semi-continuous cultivation method for *Haematococcus pluvialis* from non-motile cells to motile cells. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-9, 2017.

WAYAMA, M.; OTA, S.; MATSUURA, H.; NANGO, N.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS one**, v.8, p.e53618, 2013.

YEESANG, C.; B. CHEIRSILP. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technol.**, v.102, p.3034-3040, 2011.

YOSHIHISA, Y.; ANDOH, T.; MATSUNAGA, K.; REHMAN, M.; MAOKA, T.; SHIMIZU, T. Efficacy of astaxanthin for the treatment of atopic dermatitis in a murine model. **PLoS one**, v.11, n 3, p. e0152288, 2016.

ZHANG, Z.; BAOBEI, W.; QIANG, H.; SOMMERFELD, M.; LI, Y.; HAN, D. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.113 (10), p.2088-2099, 2016.

ZHANG, C.; LIU, J.; ZHANG, L. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.35, p.1205-1211, 2017.

ZHEKISHEVA, M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN- GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters1. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 325-331, 2002.

#### 4- Título do Artigo Científico 2

**Avaliação de diferentes floclantes sobre a colheita, obtenção  
de astaxantina, reuso do meio e composição bioquímica em  
*Haematococcus pluvialis***

## **Avaliação de diferentes flocculantes sobre a colheita, obtenção de astaxantina, reuso do meio e composição bioquímica em *Haematococcus pluvialis***

### **Resumo**

A astaxantina é um carotenoide do grupo das xantofilas com interessantes propriedades bioativas e com aplicações em produtos farmacêuticos e nutracêuticos. É uma das formas de produção de astaxantina é através da microalga *Haematococcus pluvialis*. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes flocculantes sobre a colheita, obtenção de astaxantina, reuso do meio flocculado e composição bioquímica de *H. pluvialis*. Para isso, o estudo considerou as duas fases de crescimento da microalga: cistos e vegetativo. Nos dois experimentos o delineamento experimental foi do tipo fatorial, testando 5 diferentes flocculantes (fator 1) e 4 diferentes concentrações (fator 2), compondo-se de uma unidade controle (sem flocculante), em triplicata. Os flocculantes foram: policloreto de alumínio (PA); cloreto férrico (CF); hidróxido de sódio (HS); extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera* (ESM) e quitosana (QUI) e as concentrações foram 50, 100, 150 e 200 ppm. Após a adição dos flocculantes, foram analisados a eficiência de flocculação, o pH e a produção de astaxantina. Para a fase vegetativa após a flocculação, o sobrenadante da flocculação a 100 ppm foi utilizado para investigar o reuso do meio flocculado sobre o crescimento e composição bioquímica da microalga. Diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) foram observadas para a eficiência de flocculação, o pH e obtenção de astaxantina entre os flocculantes e concentrações para as duas fases da microalga. Para o reuso do meio flocculado, houve diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) para o crescimento e composição bioquímica. Em conclusão, os flocculantes PA, CF, ESM e QUI foram os mais eficientes para a colheita da biomassa da microalga, com a melhor produção de astaxantina ocorridas para o flocculante ESM. O reuso destes meios não comprometeu o crescimento e a composição bioquímica de *H. pluvialis*.

**Palavras-chave:** microalga, eficiência de flocculação, quitosana, *Moringa oleifera*.

## 4.1 Introdução

As microalgas são um grupo taxonomicamente amplo e heterogêneo de microrganismos, os quais convertem energia luminosa, CO<sub>2</sub> e nutrientes em biomassa. Tal biomassa contém uma vasta gama de compostos de interesse biotecnológico, tais como proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, lipídios, ácidos graxos e carotenóides (VALVERDE et al., 2016). A *Haematococcus pluvialis* é uma microalga conhecida por sintetizar e acumular o carotenóide astaxantina. O acúmulo de astaxantina na microalga está relacionado a mudanças morfológicas e bioquímicas nas células, e é modificado em função das condições do cultivo, ambientais ou do próprio ciclo de vida da espécie (GARCÍA-MALEA et al., 2009). Sendo assim, a produção da microalga pode ser dividida em duas fases, uma de crescimento vegetativo e a outra quando é submetida a condições de estresse no cultivo, acumulando astaxantina. Em condições de crescimento vegetativo, as células são verdes e biflageladas, estão em contínua divisão celular e contêm mais clorofilas (a e b), carotenóides primários e proteínas (GARCÍA-MALEA et al., 2009; PELED et al., 2011). Porém, quando expostas a condições estressantes podendo estar relacionados à alta intensidade luminosa (PARK et al., 2014), aumento de salinidade (GAO et al., 2015), temperatura (WAN et al., 2014; GIANELLI et al., 2015) e ainda como resposta a diminuição dos nutrientes do meio de cultura durante o cultivo (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004), a microalga perde os flagelos, aumenta a produção de carboidratos e triacilgliceróis, e os carotenóides primários são substituídos por carotenóides secundários, principalmente astaxantina (80-99% dos carotenóides totais), resultando na formação dos cistos vermelhos (RECHT et al., 2012).

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\beta$  caroteno-4,4'-diona) é um carotenóide do grupo xantofila, de coloração vermelho-alaranjada (Herrera-Andrade et al., 2011). Vários estudos demonstraram as propriedades antioxidantes e imunomoduladores deste pigmento (YOSHIHISA et al., 2016; KOMATSU et al., 2017; MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2017), fazendo emergir sua importância tecnológica nas áreas de alimentos, produtos nutracêuticos e farmacêuticos. Este carotenóide pode ser encontrado naturalmente em numerosos organismos que variam de bactérias a algas, plantas, leveduras, peixes e crustáceos. Destes, a microalga *Haematococcus pluvialis* é considerada como a fonte mais rica em astaxantina na natureza, atingindo cerca de 3-4% do peso seco de sua biomassa (WAYAMA et al., 2013). Estima-se que o valor de 1 kg de astaxantina natural é de mais de US\$ 7150 e países como Estados Unidos, Índia e Israel estão entre os maiores produtores de biomassa de *Haematococcus* destinado para este fim (BRENNAN and OWENDE, 2010; KIM et al., 2016).

Para a utilização da microalga, a biomassa deve ser coletada através da separação das células do seu meio de crescimento, o que se torna difícil devido ao tamanho de células de 2-50 µm, densidade semelhante à da água e formação de suspensões estáveis no meio de crescimento devido a sua carga de superfície ser negativa (SHARMA et al., 2013). Este é um dos maiores entraves enfrentados nos sistemas de produção em larga escala, representando cerca de 20-30% do custo total da produção (LEE et al., 2015). A centrifugação é o método de colheita geralmente utilizado em produções de microalgas, mas sua utilização é associada ao consumo intensivo de energia devido aos grandes volumes de cultura que precisam ser processados. Todavia, uma possibilidade de reduzir os custos relacionados à centrifugação é a pré-concentração da biomassa por floculação (VANDAMME et al., 2012).

O processo de floculação ocorre pelo uso de agentes floculantes que podem ser inorgânicos ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ;  $\text{FeCl}_3$ ;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ;  $\text{NaOH}$ ; policloreto de alumínio) ou orgânicos (quitosana, ácido  $\gamma$ -poliglutâmico e sementes de *Moringa oleifera*) (WAN et al., 2015). Barros et al. (2015) afirmam que os floculantes diminuem a carga negativa das microalgas, permitindo a agregação das células; logo, os agregados se juntam formando grandes flocos, mais densos que a água, permitindo a separação sólido-líquido através da sedimentação da biomassa. Idealmente o agente floculante deve ser atóxico e eficiente em baixas concentrações, para que permita a reciclagem do meio de cultivo e não comprometa a qualidade do produto final proveniente da biomassa algal (UDUMAN et al., 2010). Neste sentido, o presente trabalho avaliou o efeito de diferentes floculantes sobre a colheita da biomassa, obtenção de astaxantina, reuso do meio floculado e composição bioquímica da microalga *Haematococcus pluvialis*, a fim de viabilizar sua aplicabilidade biotecnológica.

## **4.2. Metodologia**

### **4.2.1 Delineamento experimental**

Dois experimentos foram realizados. O experimento 1 avaliou a microalga na fase de crescimento em cistos, e o experimento 2 na fase de crescimento vegetativo. Os dois experimentos foram do tipo fatorial, testando cinco diferentes floculantes (fator 1) e quatro diferentes concentrações (fator 2), em triplicata (5x4x3), incluindo uma unidade controle (sem floculante) também com 3 repetições, totalizando 63 unidades experimentais. Os floculantes utilizados foram policloreto de alumínio (PA), cloreto férrico (CF), hidróxido de sódio (HS), extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera* (ESM) e quitosana (QUI), nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 ppm.

### **4.2.2 Condições de crescimento algal**

A microalga *H. pluvialis* foi proveniente do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), localizado no Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Nos dois experimentos, a microalga foi cultivada de forma semicontínua em recipientes cilíndricos de plástico com volume útil de 20L. Os recipientes continham água doce previamente tratada com hipoclorito de sódio (5 ppm) e enriquecida com o meio de cultura KM1 (KOBAYASHI et al., 1997) para crescimento em cistos para indução de astaxantina no experimento 1 e com o meio de cultura Bold's Basal BBM (Bold 1949) para crescimento vegetativo da microalga no experimento 2. A densidade inicial da cultura foi de  $1 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>, mantida à temperatura de  $27 \pm 1$  °C, pH 7.0, fotoperíodo integral, aeração constante e intensidade luminosa de 4000 lux (fornecida a partir de iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo "daylight"). Para acompanhar o crescimento da microalga, a densidade celular foi monitorada diariamente, através da medição da absorbância de suspensão celular na densidade óptica a 750 nm (D.O<sub>750nm</sub>) com um espectrofotômetro (U.V vis. sp-220), e através da contagem das células em câmara de Neubauer com microscópio óptico (40x de aumento). Após o crescimento da microalga, 300 mL da cultura foram transferidos para recipientes de acrílico na fase estacionária (7 dias de cultivo), na densidade de  $17.5 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>, D.O<sub>750nm</sub> de 1.06 e pH de 7.9 para o experimento na fase de cistos. E na densidade de  $30 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>, D.O<sub>750nm</sub> de 1.3 e pH de 8.3 para o experimento na fase de crescimento vegetativo.

#### 4.2.3 Preparação dos flocculantes

Para cada flocculante inorgânico (cloreto férrico, hidróxido de sódio e policloreto e alumínio), foi preparada uma solução com molaridade de 0.1 M. Para isso, os sais foram dissolvidos em água destilada.

Os flocculantes orgânicos utilizados foram a quitosana e o extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera*. A quitosana foi preparada no Laboratório de Enzimologia (LABENZ), localizado no departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e produzidas de acordo com a metodologia descrita por Cahú et al. (2012) a partir de quitina de camarão e então purificada de acordo com o método descrito pelos autores. O grau de desacetilação foi determinado como sendo 81% e a massa molecular viscosimétrica  $M_v=1.2 \times 10^3$  kDa. Em seguida, a solução foi preparada na molaridade de 0.1M e a quitosana foi dissolvida utilizando água destilada e ácido acético a 1%.

Para o extrato salino da torta da semente de *M. oleifera*, sementes foram coletadas no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. A espécie foi identificada (número 73.345) e arquivada no herbário Dárdano de Andrade Lima (Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brazil). O flocculante foi preparado no Laboratório de Bioquímica de Proteínas da

Universidade Federal de Pernambuco. As sementes da planta foram trituradas e o pó foi estocado (-20°C). Posteriormente, a torta foi obtida por extração do óleo do pó das sementes com solvente n-hexano, utilizando extrator do tipo Soxhlet. Para o extrato salino, foi preparada uma solução de NaCl (0.15 M) e a torta da semente (10%, w/v) foi homogeneizada nesta solução por 16 h a 25 °C. Após filtração e centrifugação (9.000 × g; 15 min), o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato salino da torta da semente de *M. oleifera*.

Durante a adição dos flocculantes nas unidades experimentais nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 ppm, as culturas foram agitadas a 100 rpm em um agitador magnético durante 2 minutos para assegurar a homogeneização dos flocculantes nas unidades experimentais. Depois disso, as culturas foram deixadas em repouso para sedimentar durante 2h.

#### 4.2.4 Parâmetros de floculação

Para verificar a floculação, foram analisados a eficiência de floculação e o pH utilizando um espectrofotômetro (modelo SP220) e um pHmetro de bancada (modelo Q400AS), respectivamente após a sedimentação das células na coluna d'água com os flocculantes, através da densidade óptica  $D.O_{750nm}$  do sobrenadante.

A eficiência de floculação foi calculada de acordo com a fórmula de Kim et al. (2017):

$$Ef (\%) = \left( \frac{DOi - DOf}{DOi} \right) * 100$$

onde: *Ef* é a eficiência de floculação; *DOi* é a densidade óptica inicial da cultura da microalga antes da floculação e *DOf* é a densidade óptica do sobrenadante após 2h da adição dos flocculantes.

#### 4.2.5 Efeito dos flocculantes na obtenção de astaxantina

Nos experimentos nas fases de cistos e vegetativa, a obtenção de astaxantina de *H. pluvialis* ocorreu com os flocculantes que apresentaram as melhores eficiências de floculação. Para isso, o sobrenadante foi retirado e a biomassa decantada foi centrifugada (4.500 × g; 10 min) e liofilizada. No tratamento controle, a biomassa foi obtida por centrifugação e liofilização.

A extração da astaxantina seguiu o método de Dong et al. (2014), em que 5 mg da amostra liofilizada foram tratados com 1 mL de HCl (4M) e colocados em estufa a 70°C por 5 min. Em seguida, a amostra foi arrefecida e centrifugada (5.000 × g; 5 min). A amostra tratada com HCl foi lavada duas vezes com água destilada, centrifugada (5.000 × g; 5 min),

ressuspensa em 1 mL de acetona a 90% e submetidas a banho ultrassônico em gelo por 10 min. Posteriormente, a amostra foi novamente centrifugada (3500 × g; 5 min), e o extrato obtido foi quantificado por cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC (modelo HSS T3 C18 LC-MS UPLC H-Class) comparando o tempo de retenção com padrão comercial de astaxantina com pureza de 97% (SML0982 Sigma, St. Louis, MS, USA). Todo o procedimento foi realizado em triplicata e com a devida proteção contra a luz.

#### 4.2.6 Reuso do meio floculado

Para investigar o reuso do meio floculado no crescimento e composição bioquímica de *H. pluvialis*, os sobrenadantes da floculação a 100 ppm foram recolhidos do experimento na fase de crescimento vegetativo. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7.0 com ácido clorídrico do tratamento que utilizou hidróxido de sódio como floculante e com bicarbonato de sódio para os demais floculantes. O sobrenadante foi filtrado (3 µm), autoclavado a 121°C por 20 minutos e enriquecido 1mL.L<sup>-1</sup> com meio de cultura BBM. A microalga foi inoculada na densidade inicial de 2 x 10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup> em erlenmeyers de 250 mL e cultivada com fotoperíodo integral, intensidade luminosa de 4.000 lux e aeração constante.

Para a avaliação do crescimento da microalga com os meios reutilizados da floculação, um meio fresco, sem floculante foi utilizado como controle. A cada 24 horas após o início do cultivo, amostras foram retiradas das culturas para contagem das células. Para cada meio reutilizado, foram obtidos os valores da densidade celular máxima (DCM), considerando o dia de cultivo no qual a população algal alcançou a máxima densidade celular, e desenvolvida uma curva de crescimento com a densidade celular diária da média das três repetições. Com o auxílio do programa CurveExpert 1.4, foram ajustadas pela aproximação à curva logística, seguindo a fórmula elaborada por Pindich e Rubinfeld (1981):

$$Y = \frac{P_1}{\left[1 + \left(\frac{P_2 - N_0}{N_0}\right) \times \exp^{-kt}\right]}$$

onde: Y = densidade celular; P1 e P2 = primeiro e segundo parâmetros da curva logística; N0 = densidade celular inicial; k = velocidade de crescimento; t = tempo de cultivo.

Após 5 dias de cultivo, a biomassa foi centrifugada, seca em liofilizador e mantida a -20°C até o início das análises bioquímicas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Para a determinação de proteínas totais seguiu o método proposto por Lowry et al. (1951). Para o teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), seguiu-se as técnicas propostas por Bligh and Dyer (1959), a quantificação se deu por cromatografia gasosa (GC-FID Agilent Technology 7890) utilizando padrão comercial (FAME Sigma-Aldrich® 18919-1AMP). A astaxantina e o β-caroteno basearam-se na metodologia descrita

por Dong et al. (2014). Para a quantificação do  $\beta$ -caroteno foi utilizado padrão comercial com pureza de 95% (C4582 Sigma, St. Louis, MS, USA).

#### **4.2.7 Análise estatística**

A homogeneidade das variâncias (Bartlett  $P < 0.05$ ) e a normalidade dos dados (Shapiro-Wilk  $P < 0.05$ ) foram verificados previamente. Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados por  $\text{sen}(x)$ . Para os experimentos na fase de cistos e de crescimento vegetativo, os dados foram submetidos a análise de variância fatorial (ANOVA  $P < 0.05$ ). Os demais dados foram submetidos a análise de variância de um fator (ANOVA  $P < 0.05$ ) e posteriormente ao teste de comparação de médias de Tukey ( $P < 0.05$ ). Todas as análises foram realizadas no programa R Statistical software Version 3.4.2 (R Core Team, 2017).

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Parâmetros de floculação**

Os resultados referentes aos flocculantes e suas concentrações utilizadas para obter a biomassa da microalga *H. pluvialis* estão apresentados na Tabela 1. Diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) foram encontradas para a eficiência de floculação entre os flocculantes e concentrações nas fases de cistos e vegetativa (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros de floculação entre os diferentes floculantes e suas concentrações na colheita de biomassa da microalga *H. pluvialis*

Tratamentos		Fase cistos		Fase vegetativa	
Floculantes	Concentrações	Variáveis		Variáveis	
		Eficiência de floculação (%)	pH	Eficiência de floculação (%)	pH
Controle	0	48.8 ± 1.10 <sup>bc</sup>	7.76 ± 0.22 <sup>aA</sup>	22.1 ± 15.5 <sup>c</sup>	8.03 ± 0.27 <sup>cC</sup>
PA	50	97.0 ± 0.09 <sup>aA</sup>	7.69 ± 0.27 <sup>aA</sup>	95.2 ± 0.72 <sup>aA</sup>	7.75 ± 0.56 <sup>aA</sup>
	100	98.4 ± 0.55 <sup>aA</sup>	7.65 ± 0.31 <sup>aA</sup>	98.3 ± 0.26 <sup>aA</sup>	7.73 ± 0.58 <sup>aA</sup>
	150	99.2 ± 0.39 <sup>aA</sup>	7.61 ± 0.36 <sup>aA</sup>	98.9 ± 0.25 <sup>aA</sup>	7.67 ± 0.66 <sup>aA</sup>
	200	99.8 ± 0.17 <sup>aA</sup>	7.53 ± 0.45 <sup>aA</sup>	99.4 ± 0.53 <sup>aA</sup>	7.62 ± 0.71 <sup>aA</sup>
CF	50	95.8 ± 1.08 <sup>aA</sup>	7.59 ± 0.37 <sup>aA</sup>	93.5 ± 1.36 <sup>aA</sup>	7.86 ± 0.45 <sup>aA</sup>
	100	98.3 ± 0.65 <sup>aA</sup>	7.56 ± 0.41 <sup>aA</sup>	97.1 ± 0.60 <sup>aA</sup>	7.71 ± 0.61 <sup>aA</sup>
	150	99.8 ± 0.58 <sup>aA</sup>	7.47 ± 0.51 <sup>aA</sup>	98.3 ± 0.26 <sup>aA</sup>	7.56 ± 0.77 <sup>aA</sup>
	200	99.3 ± 0.58 <sup>aA</sup>	7.34 ± 0.66 <sup>aA</sup>	98.5 ± 0.50 <sup>aA</sup>	7.44 ± 0.91 <sup>aA</sup>
HS	50	58.6 ± 1.60 <sup>abc</sup>	8.41 ± 0.53 <sup>ba</sup>	62.7 ± 0.65 <sup>bb</sup>	9.07 ± 0.88 <sup>bb</sup>
	100	74.8 ± 1.04 <sup>ab</sup>	8.50 ± 0.62 <sup>ba</sup>	65.9 ± 0.06 <sup>bb</sup>	9.38 ± 1.22 <sup>bb</sup>
	150	77.1 ± 1.15 <sup>ab</sup>	8.96 ± 1.12 <sup>ba</sup>	85.9 ± 2.44 <sup>bb</sup>	9.48 ± 1.34 <sup>bb</sup>
	200	83.6 ± 2.37 <sup>ab</sup>	9.08 ± 1.27 <sup>ba</sup>	95.5 ± 1.95 <sup>ba</sup>	9.80 ± 1.69 <sup>bb</sup>
ESM	50	94.3 ± 1.64 <sup>aA</sup>	7.75 ± 0.21 <sup>aA</sup>	89.7 ± 4.28 <sup>bb</sup>	7.76 ± 0.55 <sup>aA</sup>
	100	98.1 ± 0.06 <sup>aA</sup>	7.69 ± 0.26 <sup>aA</sup>	94.5 ± 0.55 <sup>aA</sup>	7.75 ± 0.56 <sup>aA</sup>
	150	99.1 ± 0.17 <sup>aA</sup>	7.63 ± 0.33 <sup>aA</sup>	97.2 ± 1.08 <sup>aA</sup>	7.73 ± 0.58 <sup>aA</sup>
	200	99.3 ± 0.35 <sup>aA</sup>	7.52 ± 0.46 <sup>aA</sup>	98.1 ± 0.14 <sup>aA</sup>	7.68 ± 0.64 <sup>aA</sup>
QUI	50	98.5 ± 0.47 <sup>aA</sup>	7.76 ± 0.20 <sup>aA</sup>	93.4 ± 0.88 <sup>aA</sup>	7.84 ± 0.47 <sup>aA</sup>
	100	98.9 ± 0.17 <sup>aA</sup>	7.72 ± 0.24 <sup>aA</sup>	98.2 ± 0.43 <sup>aA</sup>	7.81 ± 0.50 <sup>aA</sup>
	150	99.0 ± 0.05 <sup>aA</sup>	7.58 ± 0.39 <sup>aA</sup>	98.5 ± 0.85 <sup>aA</sup>	7.74 ± 0.57 <sup>aA</sup>
	200	99.5 ± 0.47 <sup>aA</sup>	7.34 ± 0.66 <sup>aA</sup>	99.1 ± 0.13 <sup>aA</sup>	7.60 ± 0.73 <sup>aA</sup>
F		ns	*	*	*
C		*	ns	*	*
F x C		*	ns	*	ns

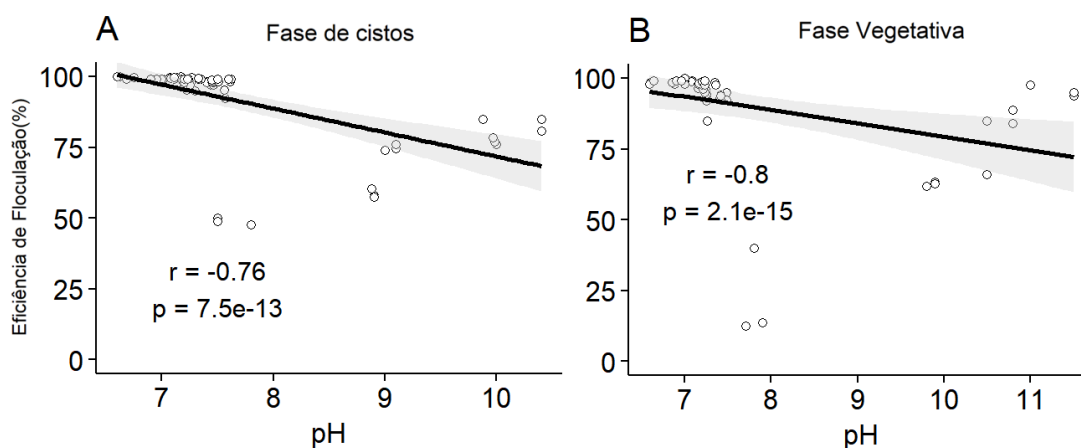
Os dados correspondem à média de três repetições ± desvio padrão. Os valores médios em mesma coluna com letras sobrescritas minúsculas diferem significativamente ( $P < 0.05$ ) para o fator floculantes por ANOVA fatorial e teste de Tukey. Os valores médios em mesma coluna com letras sobrescritas maiúsculas diferem significativamente ( $P < 0.05$ ) para o fator concentrações por ANOVA fatorial e teste de Tukey. F = fator 1 (floculantes); C = fator 2 (concentrações); F x C = interação entre os floculantes e concentrações; ns = não significativo ( $P > 0.05$ ); \* ( $P < 0.05$ ); sem floculante (Controle); Cloreto férrico (CF); Hidróxido de sódio (HS); Policloreto de alumínio (PA); Quitosana (QUI) e Extrato salino de *Moringa oleifera* (ESM).

Na fase de cistos, os floculantes cloreto férrico (CF), policloreto de alumínio (PA), extrato salino da torta da semente de *M. oleifera* (ESM) e quitosana (QUI) apresentaram eficiências de floculação acima de 95% e não foram observadas diferenças significativas entre eles e nem entre suas concentrações. Os menores valores de eficiência de floculação (< 90%) foram observados para o floculante hidróxido de sódio (HS) nas concentrações de 50 até 200 ppm, diferenciando-se significativamente dos demais (Tabela 1).

Na fase vegetativa, eficiências de floculação acima de 93% foram observadas para CF, PA e QUI em todas as concentrações, para ESM (100 a 200 ppm) e HS a 200 ppm (Tabela 1). Contudo, eficiências de floculação abaixo de 90% foram observadas para o floculante HS

nas concentrações de 50 ( $62.7\% \pm 0.65$ ), 100 ( $65.9\% \pm 0.06$ ) e 150 ppm ( $85.9\% \pm 2.44$ ), e para o floculante ESM a 50 ppm ( $89.7\% \pm 4.28$ ), diferenciando-se dos demais (Tabela 1).

Quanto ao pH, houve diferença significativa para o fator floculante ( $P < 0.05$ ) em ambas as fases (Tabela 1). Por outro lado, para a interação entre os fatores floculante e concentração, não houve diferença significativa ( $P > 0.05$ ) (Tabela 1). Os índices de correlação mostraram que as maiores eficiências de floculação ( $P < 0.05$ ) foram encontrados para o pH próximo à neutralidade (Fig. 1), evidenciando que os floculantes CF, PA, ESM e QUI favoreceram na melhor eficiência de floculação nas duas fases de crescimento da microalga *H. pluvialis*.

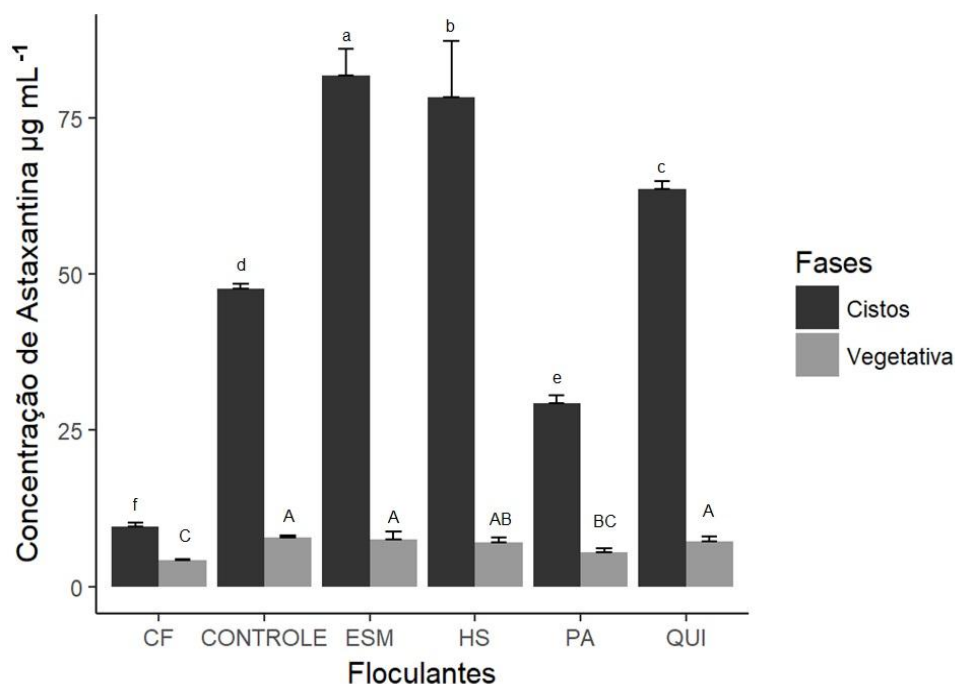


**Figura 1.** Correlação entre a eficiência de floculação e o pH para os fatores floculantes e concentrações na colheita de biomassa nas fases de cistos e vegetativa da microalga *H. pluvialis*

#### 4.3.2 Efeito dos floculantes na obtenção de astaxantina

Foram observados efeitos significativos ( $P < 0.05$ ) dos floculantes sobre a obtenção de astaxantina presente na biomassa de *H. pluvialis* nas duas fases (Fig. 2). Os valores de astaxantina obtidos no experimento 1 foram significativamente maiores com os floculantes ESM ( $81.8 \pm 4.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguidos de HS ( $78.3 \pm 8.89 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e QUI ( $63.6 \pm 1.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em comparação ao tratamento controle ( $47.7 \pm 0.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os valores para os floculantes PA ( $29.4 \pm 1.21 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CF ( $9.67 \pm 0.63 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram consideravelmente menores que nos demais tratamentos (Fig. 2).

Na fase vegetativa, os menores valores de astaxantina também foram encontrados com os floculantes CF ( $4.17 \pm 0.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e PA ( $5.50 \pm 0.62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), apresentando diferenças significativas em relação aos demais (Fig. 2).

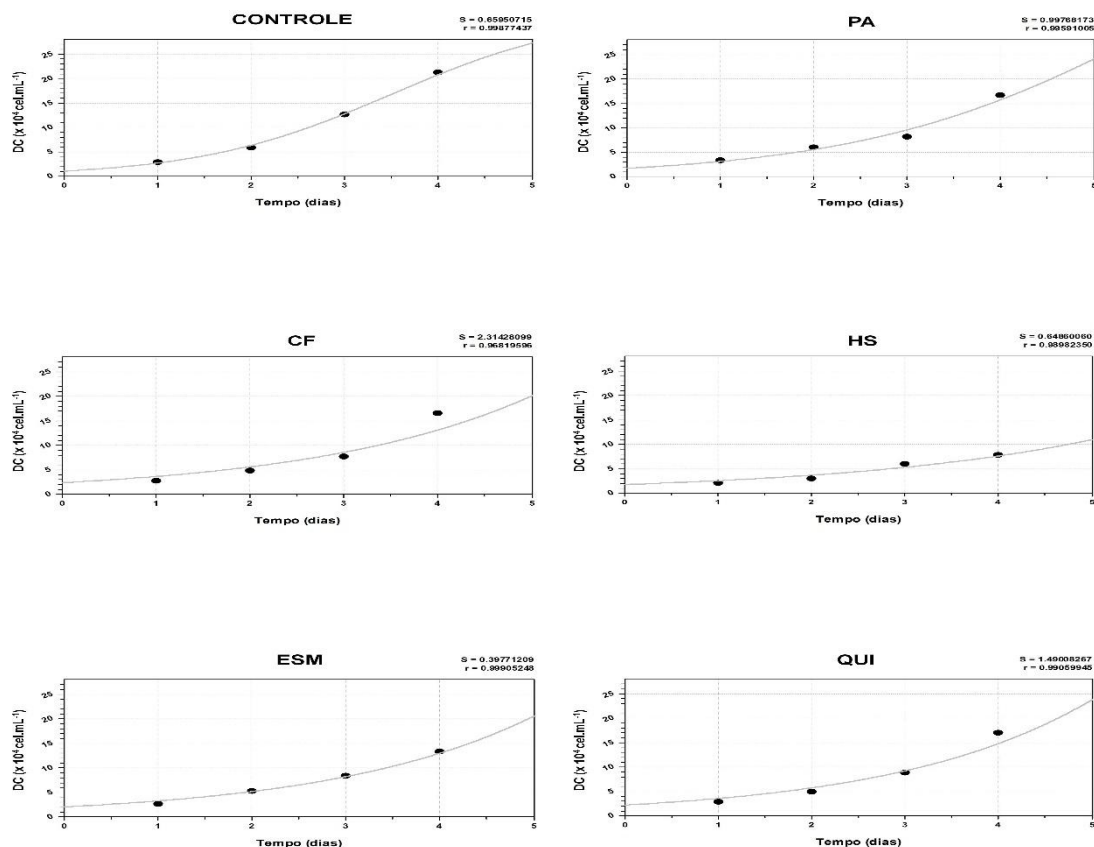


**Figura 2.** Concentrações obtidas de astaxantina para os diferentes floculantes a 100 ppm nas fases de cistos e vegetativa da microalga *H. pluvialis*. Letras minúsculas sobrescritas apresentam diferença significativa ( $P < 0.05$ ) por ANOVA e teste de Tukey entre os floculantes na fase de cistos. Letras sobrescritas maiúsculas apresentam diferença significativa ( $P < 0.05$ ) entre os floculantes na fase vegetativa. Sem floculante (Controle); Cloreto férrico (CF); Hidróxido de sódio (HS); Policloreto de alumínio (PA); Quitosana (QUI) e Extrato salino da torta da semente de *M. oleifera* (ESM).

#### 4.3.3 Reuso do meio floculado

As curvas de crescimento de *H. pluvialis* estão apresentadas na Fig. 3, referindo-se à densidade celular diária com o reuso de cada meio floculado proveniente das floculações com 100 ppm do experimento na fase vegetativa. Os pontos indicam os valores obtidos e a linha contínua representa a curva ajustada aplicando o modelo logístico. Para cada meio, observa-se que as curvas corresponderam ao modelo proposto e que os coeficientes apresentaram alta correlação ( $r^2 > 0.96$ ).

A curva do tratamento controle apresentou crescimento mais acentuado desde o primeiro dia. As curvas do reuso para os floculantes PA, CF, QUI e ESM foram semelhantes, ao contrário do hidróxido de sódio, que apresentou crescimento ínfimo (Fig. 3). A diferença da densidade celular máxima foi significativa ( $P < 0.05$ ) entre os meios reutilizados da floculação, com o meio HS apresentando os menores valores (Tabela 2).



**Figura 3.** Curvas logísticas do crescimento da *Haematococcus pluvialis* para os diferentes meios reutilizados da floculação. Eixo y = densidade celular ( $\times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>), eixo x = tempo (dias). Sem flocculante (Controle); Cloreto férrico (CF); Hidróxido de sódio (HS); Policloreto de alumínio (PA); Quitosana (QUI) e Extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera* (ESM).

Com relação as proteínas, o meio resultante da floculação com quitosana e extrato salino de *M. oleifera* foram significativamente iguais ( $P > 0.05$ ) ao tratamento controle, com o meio HS apresentando o menor valor (Tabela 2). Para o  $\beta$ -caroteno, os tratamentos com CF, PA e QUI foram estatisticamente iguais ao controle, porém os maiores valores foram encontrados para ESM, diferenciando-se dos demais. Os resultados relativos a astaxantina mostram que houve diferenças significativas entre os meios ( $P < 0.05$ ), com o tratamento CF apresentando o menor valor (Tabela 2). Em geral, todos os valores observados para os ésteres metílicos de ácidos graxos apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ). A biomassa foi composta de uma maior quantidade de ácidos graxos totais quando empregada a reutilização dos meios floculados em comparação com o controle (Tabela 2).

**Tabela 2.** Densidade celular máxima (DCM) e composição bioquímica da microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada durante 5 dias com o reuso do meio flocculado provenientes da flocculação a 100 ppm.

DCM/ composição bioquímica	Meios de cultura					
	Controle	PA	CF	HS	QUI	ESM
DCM ( $\times 10^4$ cél.mL <sup>-1</sup> )	27.1 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	23.9 $\pm$ 1.59 <sup>ab</sup>	18.6 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	10.7 $\pm$ 2.41 <sup>c</sup>	22.9 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	20.4 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>
Proteínas (% b.s)	49.6 $\pm$ 7.54 <sup>a</sup>	32.5 $\pm$ 4.21 <sup>b</sup>	34.1 $\pm$ 4.69 <sup>b</sup>	13.0 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	53.9 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	48.1 $\pm$ 6.20 <sup>a</sup>
$\beta$ -caroteno ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	56.9 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	59.7 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>	59.2 $\pm$ 3.71 <sup>a</sup>	41.1 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	54.1 $\pm$ 3.68 <sup>a</sup>	74.8 $\pm$ 3.32 <sup>c</sup>
Astaxantina ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	32.0 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	15.2 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	12.6 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>	34.0 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	25.2 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>	29.1 $\pm$ 0.51 <sup>ab</sup>
$\Sigma$ FAMES n.i (mg mL <sup>-1</sup> )	172.04 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	189.86 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	186.05 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	203.33 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	204.66 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	209.69 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
$\Sigma$ FAMES (mg mL <sup>-1</sup> )	440.99 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	443.59 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	439.08 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	464.55 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	456.73 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	464.06 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>
C16:0 (mg mL <sup>-1</sup> )	1.83 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	4.88 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.41 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	2.74 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	2.87 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	3.88 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
C14:0 (mg mL <sup>-1</sup> )	-	2.21 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.94 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	3.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	2.19 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
C15:0 (mg mL <sup>-1</sup> )	-	2.12 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	2.62 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	3.76 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.02 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.61 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
C16:1 (mg mL <sup>-1</sup> )	8.04 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	4.35 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	8.02 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	8.35 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	6.25 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	5.43 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
C18:0 (mg mL <sup>-1</sup> )	9.41 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	3.42 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	5.96 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	7.65 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	3.39 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	3.80 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
C18:2 (mg mL <sup>-1</sup> )	61.12 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	72.10 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	71.84 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	94.46 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	48.97 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	55.02 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
C18:3 (mg mL <sup>-1</sup> )	55.67 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	38.98 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	57.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	54.92 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	44.37 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	44.86 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>

Média de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão. Os valores médios na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) por ANOVA e teste de Tukey. Meios reutilizados: centrifugação, Sem flocculante (Controle); Cloreto férrico (CF); Hidróxido de sódio (HS); Policloreto de alumínio (PA); Quitosana (QUI) e Extrato salino da torta da semente de *Moringa oleifera* (ESM). Proteínas % b.s = valores expressos em % de proteína por biomassa seca.  $\Sigma$  FAMES n.i = somatório de ésteres metílicos de ácidos graxos não identificados; C16:0 = ácido palmítico; C14:0 = mirístico; C15:0 = pentadecanóico; C16:1 = palmitoléico; C18:0 = esteárico; C18:2 = linoleico; C18:3 = alfa-linolênico; (-) não encontrado.

#### 4.4 Discussão

No presente estudo, todos os floculantes promoveram a colheita da biomassa de *Haematococcus pluvialis* pela separação das células do meio de cultura através da sedimentação da biomassa. Os floculantes inorgânicos de sais metálicos (policloreto de alumínio e cloreto férrico) e alcalinos (hidróxido de sódio) carregam cargas positivas, enquanto as células microalgais carregam uma carga superficial negativa. Como tal, as cargas dos floculantes e a das algas se interagem causando a floculação por neutralização da carga (VANDAMME et al., 2013). Os polímeros (quitosana e extrato salino de *M. oleifera*) causam a floculação através dos mesmos mecanismos dos floculantes inorgânicos, além da floculação por pontes, que é quando possuem a mesma carga superficial das microalgas e a floculação acontece porque o tamanho da molécula do polímero aumenta sua capacidade de agregar nas células, produzindo flocos grandes e pesados que sedimentam com facilidade (VANDAMME et al., 2013). Já foram realizadas aplicações bem-sucedidas dos floculantes aqui estudados na colheita de várias espécies de microalgas (TEIXEIRA et al., 2012; XU et al., 2013; SIRIN et al., 2012; WU et al., 2016).

Os nossos resultados mostraram que as melhores eficiências de floculação foram alcançadas nas concentrações acima de 50 ppm para extrato salino de *M. oleifera* (ESM) no experimento 1 e maiores que 150 ppm para hidróxido de sódio (HS) nos dois experimentos. Alguns estudos revelam que a concentração em que o floculante é administrado afeta a eficiência de floculação das microalgas. Wu et al. (2016) testaram diferentes concentrações de cloreto férrico e policloreto de alumínio variando de 100 a 900 mg L<sup>-1</sup> para a floculação de *Isochrysis galbana* e encontraram eficiências de floculação maiores que 90% para concentrações acima de 300 mg L<sup>-1</sup>. O efeito de várias concentrações (30 a 120 mg L<sup>-1</sup>) de quitosana sobre a eficiência de floculação de *C. vulgaris* foi investigado por Rashid et al. (2013) e a melhor eficiência foi encontrada com 120 mg L<sup>-1</sup>. Concentrações de 40 a 80 mg L<sup>-1</sup> de quitosana foram testadas para *Scenedesmus* sp. com melhores eficiências obtidas em 70 e 80 mg L<sup>-1</sup> (GUPTA et al., 2014). Yang et al. (2016), usando NaOH (1, 3, 5 e 7 mM) para *Chlorella* sp., alcançaram 90% de eficiência para as duas maiores concentrações. TEIXEIRA et al., (2012), empregando concentrações de 0.2 a 1.0 g L<sup>-1</sup> do floculante *M. oleifera*, tiveram eficiências de 88% para concentrações superiores a 0.6 g L<sup>-1</sup>. Baharuddin et al. (2016) avaliaram a eficiência de floculação de *Nannochloropsis oculata* usando *M. oleifera* em concentrações na faixa de 1000-5000 mg L<sup>-1</sup> e conseguiram eficiências de 80% para 4000 e 5000 mg L<sup>-1</sup>.

Essas diferenças de concentrações para os autores citados encontradas para os floculantes com os aqui observados, podem ser devido à diferença das condições de crescimento da microalga, ao meio de cultura utilizado, a morfologia e tamanho das células, as quantidades

de matéria orgânica que são excretadas durante o cultivo mudando a composição do meio, podem influenciar na colheita da biomassa (HENDERSON et al., 2008; VANDAMME et al., 2016). Como resultado, as condições de floculação podem não ser universais para cada flocculante, podendo ser necessário ajustar as estratégias de colheita para cada espécie de microalga produzida. Apesar disso, ressalta-se que as menores concentrações possíveis de agentes flocculantes devem ser empregadas, pois além dos custos, tais agentes podem ser tóxicos, modificar o meio de crescimento e danificar a biomassa das microalgas, fazendo que percam biocompostos de interesse biotecnológico (MOLINA GRIMA, 2003; PAPAZZI et al., 2010; VANDAMME et al., 2013).

O pH pode ser utilizado para promover a floculação de microalgas por aumento induzido ou como auxiliar de floculação para outros agentes flocculantes por ajuste do pH do meio. Pérez et al. (2017) estudando a floculação induzida com pH ácido (2-6) utilizando ácido clorídrico e com pH básico (8-12) com hidróxido de sódio, conseguiram eficiências de floculação acima de 90% em pH superiores a 10 para as microalgas *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros gracilis*. Xu et al. (2013) flocculando *Chlorella sorokiniana* com vários valores de pH (5-9) e de concentrações de quitosana (1-20 mg L<sup>-1</sup>), observaram que quando o pH do meio se encontrava em 7 seria necessário o dobro da quantidade de quitosana (10 mg L<sup>-1</sup>) para induzir a floculação em comparação a pH 5 e 6 que foi de 5 mg L<sup>-1</sup>. No presente estudo, os tratamentos não foram conduzidos utilizando diferentes pH no meio. O pH, neste estudo, modificou com a adição dos flocculantes, demonstrando que para cloreto férrico, policloreto de alumínio, extrato salino de *M. oleifera* e quitosana que tornaram o pH mais ácido, foram encontradas as maiores eficiências de floculação. Sirin et al. (2012) notaram que, à medida que se adicionava policloreto e sulfato de alumínio nas culturas de *Phaeodactylum tricornutum*, o pH do meio diminuiu tornando-se mais ácido. O mesmo foi observado por Wyatt et al. (2012) com o cloreto férrico na floculação de *C. zoofingensis*. Neste estudo, embora tenha ocorrido o aumento do pH para os tratamentos utilizando hidróxido de sódio, as eficiências de floculação foram menores comparando-se aos outros flocculantes nos dois experimentos. Wu et al. (2012) observaram que as células das microalgas de água doce (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp.) começaram a aglomerar-se quando o pH do meio foi ajustado com NaOH (1M) para 8.6 e ainda quando houve o aumento do pH para 10.6 a eficiência da floculação aumentou para mais de 90%. Resultados similares também foram encontrados por Rakesh et al. (2014), com pH acima de 10 para as microalgas *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum* e *Botryococcus*. Talvez a baixa molaridade empregada no presente estudo, tenha influenciado para menores eficiências de floculação utilizando o hidróxido de sódio como flocculante e ao não aumento do pH acima de 10 já que não ultrapassou valor médio de 9.8.

Comparando os dados obtidos nos experimentos 1 e 2, observou-se que os flocculantes policloreto de alumínio e cloreto férrico apresentaram os menores valores, indicando que o uso destes flocculantes influencia negativamente na obtenção do carotenoide astaxantina presente na biomassa de *H. pluvialis*. Corroborando com os resultados do presente estudo, Anthony et al. (2013) relataram que os rendimentos de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram mais baixos para a biomassa de *S. obliquus* colhida por alumínio em objeção a colheita por centrifugação e por amidos catiônicos de batata e milho. O perfil de ácidos graxos da biomassa de *Chlorococcum* sp. flocculada por quitosana e por aumento de pH com hidróxido de sódio não sofreram alterações significativas, enquanto que a flocculação por cloreto férrico e sulfato de alumínio apresentaram diferenças no perfil de ácidos graxos (UMMALYMA et al., 2016). Papazzi et al. (2010) alegaram que, ao usar sais de ferro ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) na flocculação de *Chlorella vulgaris*, houve influência nos pigmentos da microalga, especialmente as clorofilas, mudando a cor das células de verde para marrom/amarelado.

No presente estudo, os valores de astaxantina para os flocculantes extrato salino de *M. oleifera*, seguidos de hidróxido de sódio e quitosana foram significativamente maiores comparando-se ao tratamento controle. Até o momento, pouco se sabe da influência destes flocculantes sobre a astaxantina, o que precisa ser melhor investigado. Presumivelmente, estes flocculantes ajudaram na extração e/ou evitaram a oxidação da astaxantina quando foi extraída das células. Haque et al. (2016) investigaram a extração de astaxantina por ultrassom com pré-tratamento de lise (ruptura) celular com produtos químicos (ácido acético, ácido cítrico, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio) e conseguiram os melhores rendimentos de extração de 80.6% para o hidróxido de sódio. Este, segundo os autores, foi o mais eficaz para promover a lise celular sem degradar a astaxantina. Através do estudo de compostos fenólicos nas sementes de *M. oleifera*, Singh et al. (2013) encontraram 10 compostos com propriedades antioxidantes (ácido gálico, ácido p-cumarico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido protocatecuico, ácido cinâmico, catequina, epicatequina, vanilina e quercetina). Esta planta também vem sendo estudada para manter a estabilidade oxidativa de lipídios para a produção de biodiesel (NASCIMENTO et al., 2013; FRANÇA et al., 2017). Alguns trabalhos demonstram o uso do polímero quitosana para a proteção de carotenoides. A astaxantina microencapsulada com quitosana não sofre estresse oxidativo, garantindo a estabilidade a longo prazo do carotenoide e da biomassa da microalga (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004; KITTIKAIWAN et al., 2007; WANG et al., 2017).

O nosso estudo demonstrou que os sobrenadantes provenientes da flocculação com policloreto de alumínio, cloreto férrico, extrato salino da torta da semente de *M. oleifera* e quitosana podem ser reutilizados sem interferência no crescimento da microalga *H.*

*pluvialis*. No entanto, a água reciclada obtida após a colheita de microalgas requer neutralização do pH e suplementação de nutrientes essenciais que foram consumidos durante o cultivo, a fim de sustentar o crescimento das microalgas no cultivo subsequente (FAROOQ et al., 2015). A possibilidade de se reutilizar o sobrenadante da floculação para o crescimento de microalgas também foi demonstrada usando quitosana para colheita de *Nannochloropsis* sp. (FARID et al., 2013), hidróxido de sódio para *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp., e *P. tricornutum* (WU et al. 2012), sais de alumínio para *N. salina* (RWEHUMBIZA et al., 2012) e cloreto férrico para *C. vulgaris* (FAROOQ et al., 2015). Assim, o reuso do meio floculado pode reduzir o custo com nutrientes e diminuir a utilização de água doce em produções de microalgas (MA et al., 2016).

Apesar de ter diferenças significativas entre os tratamentos, a reutilização dos meios floculados não teve impacto negativo na qualidade da biomassa, visto que a quantidade de proteínas, astaxantina,  $\beta$ -caroteno e ácidos graxos totais em alguns tratamentos foram semelhantes aos do meio controle, o que também foi observado em outros estudos (CASTRILLO et al., 2013; MA et al., 2016; WU et al., 2016).

Os resultados do estudo mostraram que os flocculantes policloreto de alumínio, cloreto férrico, Extrato salino de *Moringa oleifera* e quitosana promoveram a melhor colheita de biomassa nas duas fases de crescimento da microalga por apresentar eficiências de floculação acima de 90%. Porém, quando é levado em consideração a colheita da biomassa como o efeito dos flocculantes na obtenção do carotenoide astaxantina, o extrato salino de *M. oleifera* foi considerado o melhor flocculante. O reuso do meio obtido pela floculação com policloreto de alumínio, cloreto férrico, extrato salino de *Moringa oleifera* e quitosana não comprometeram o crescimento e a composição bioquímica da microalga *H. pluvialis*.

#### **4.5 Agradecimentos**

Agradecemos ao apoio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa sanduíche concedida ao primeiro autor no processo 99999.006386/2015-06. Ao Laboratório de Biologia (LABIO) e à Central analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelas análises bioquímicas realizadas. Os últimos autores são bolsistas CNPq.

## 4.6 Referências

- ANTHONY, R. J.; ELLIS, J. T.; SATHISH, A.; RAHMAN, A.; MILLER, C. D.; SIMS, R. C. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. **Bioresour Technol.**, v. 149, p.65-70, 2013.
- BAHARUDDIN, N. N. D. E.; AZIZ, N. S.; SOHIF, H. N.; KARIM, W. A. A.; MOHD, N. B.; Marine microalgae flocculation using plant: the case of *Nannochloropsis oculata* and *Moringa oleifera*. **Pak J Bot.**, v.48(2), p.831-840, 2016.
- BARROS, A. I.; GONÇALVES, A. L.; SIMÕES, M.; PIRES, J. C. M. Harvesting techniques applied to microalgae: a review. **Renew Sust. Energ. Rev.**, v. 41, p. 1489-1500, 2015.
- BLIGH, E.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v.37(8), p. 911-917, 1959.
- BOLD, H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bull. Torrey Bot. Club**, v. 76, p. 101-108, 1949.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Energy**, v. 14, p. 557–577, 2010.
- CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO, L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochem.**, v. 47, p. 570-577, 2012.
- CASTRILLO, M.; LUCAS-SALAS, L. M.; RODRÍGUEZ-GIL, C.; MARTÍNEZ, D. High pH-induced flocculation–sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Bioresour Technol.**, v. 128, p.324-329, 2013.
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; GUERRERO, L. I.; MARTINEZ, J. F.; TOMASINI, C. A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresour Technol.**, v. 92, p.209-214, 2004.
- DONG, S.; HUANG, Y.; ZHANG, R.; WANG, S.; LIU, Y. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **Sci World J.**, v. 2014.
- FRANÇA, F. R. M.; FREITAS, L. S.; RAMOS, A. L. D.; SILVA, G. F.; BRANDÃO, S. T. Storage and oxidation stability of commercial biodiesel using *Moringa oleifera* Lam as an antioxidant additive. **Fuel**, v. 203, p.627-632, 2017.
- FARID, M. S.; SHARIATI, A.; BADA KHSHAN, A.; ANVARIPOUR, B. Using nano-

chitosan for harvesting microalga *Nannochloropsis* sp. **Bioresour Technol.**, v. 131, p.555-559, 2013.

FAROOQ, W.; SUH, W. I.; PARK, M. S.; YANG, J. W. Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. **Bioresour Technol.**, v. 184; p.73-81, 2015.

GAO, Z.; MENG, C.; CHEN, Y.; AHMED, F.; MANGOTT, A.; SCHENK, P.; LI, Y. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. **J. Appl. Phycol.**, v.27(5), p.1853-1860, 2015.

GARCÍA-MALEA MC, GABRIEL ACIÉN F, DEL RÍO E, FERNÁNDEZ JM, CERÓN MC, GUERRERO MG, MOLINA-GRIMA E. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. **Biotechnol Bioeng**, v. 102(2), p.651-657, 2009.

GIANNELLI, L.; YAMADA, H.; KATSUDA, T.; YAMAJI, H. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **J. Biosc. Bioeng**, v. 119(3), p. 345-350, 2015.

GUPTA, S. K.; KUMAR, M.; GULDHE, A.; ANSARI, F. A.; RAWAT, I.; KANNEY, K.; BUX, F. Design and development of polyamine polymer for harvesting microalgae for biofuels production. **Energ. Convers. Manag.**, v. 85, p.537-544, 2014.

HAQUE, F.; DUTTA, A.; THIMMANAGARI, M.; CHIANG, Y. W. Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food Bioprod Process**, v. 99, p.1-11, 2016.

HENDERSON, R. K.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. **Water Res.**, v. 42, p.1827-1845, 2008.

HERRERA-ANDRADE, M. H.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; NÚÑEZ-GASTÉLUM, J. A.; MORENO-RAMOS, O. H. Extracción de la astaxantina y su estabilidad. **Rev. Latin Rec. Natur.**, v.7, p.21-27, 2011.

HIGUERA-CIAPARA, L.; FELIX-VALENZUELA, F. M.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 56(1), p.41- 45, 2004.

KIM, D. Y.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J. I.; LEE, K.; PARK, J. Y.; CHANG, W. S.; LEE, J. S.; OH, Y. K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresour Technol.**, v. 199, p.300-310, 2016.

KIM, D. Y.; LEE, K.; LEE, J.; LEE, Y. H.; HAN, J. I.; PARK, J. Y.; OH, Y. K. Acidified-flocculation process for harvesting of microalgae: Coagulant reutilization and metal-free-microalgae recovery. **Bioresour Technol.**, v. 239, p.190-196, 2017.

KITTIKAIWAN, P.; POWTHONGSOOK, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. **Carbohydr Polym.**, v. 70(4), p.378-385, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI, Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 48, p.351-356, 1997.

KOMATSU, T.; SASAKI, S.; MANABE, Y.; HIRATA, T.; SUGAWARA, T. Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice. **PLoS ONE** 12(2): 0171178, 2017.

LEE, Y. C.; LEE, K.; OH, Y. K. Recent nanoparticle engineering advances in microalgal cultivation and harvesting processes of biodiesel production: a review. **Bioresour Technol**, v.184, p.63-72, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

MA, X.; ZHENG, H.; ZHOU, W.; LIU, Y.; CHEN, P.; RUAN, R. Enhanced Harvesting of *Chlorella vulgaris* Using Combined Flocculants. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.180, p.791–804, 2016.

MARTÍNEZ-DELGADO, A. A.; KHANDUAL, S.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. J. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. **Food Chem.**, v. 225, p. 23-30, 2017.

MOLINA, G. E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol. Adv.**, v. 20(7-8), p. 491-515, 2003.

NASCIMENTO, J. A.; ARAÚJO, K. L. G. V.; EPAMINONDAS, P. S.; SOUZA, A.; MAGNANI, M.; SOUZA, A. L.; SOLEDADE, L. E. B.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam. Evaluation of its potential as an antioxidant additive for fish oil. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 114, p.833-838, 2013.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **J. Appl. Phycol.**, v. 22(3), p. 349-355, 2010.

PARK, J. C.; CHOI, S. P.; HONG, M. E.; SIM, S. J. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 37(10), p. 2039-2047, 2014.

PELED, E.; LEU, S.; ZARKA, A.; WEISS, M.; PICK, U.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S. Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Lipids** v. 46, p. 851-861, 2011.

PÉREZ, L.; SALGUEIRO, J. L.; MACEIRAS, R.; CANCELA, A.; SÁNCHEZ, A. An

effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. **Biomass Bioenergy**, v. 97, p.20-26, 2017.

PINDICH, R.; RUBENFELD, D. **Econometric models and economic forecasts**. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill., 1981, p. 475-492.

RAKESH, S.; SAXENA, S.; DHAR, D.; PRASANNA, R.; SAXENA, A. Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. **J. Appl. Phycol.**, v. 26(1), p. 399-406, 2014.

RASHID, N.; REHMAN, S. U.; HAN, J. I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. **Process. Biochem.**, v. 48(7), p. 1107-1110, 2013.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 94(6), p.1495-1503, 2012.

RWEHUMBIZA, V. M.; HARRISON, R.; THOMSEN, L. Alum-induced flocculation of pre-concentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. **Chemic. Eng. J.**, v.200-202, p.168-175, 2012.

SHARMA, K. K.; GARG, S.; LI, Y.; MALEKIZADEH, A.; SCHENK, P. M. Critical analysis of current microalgae dewatering techniques. **Biofuels**, v. 4, p.397-407, 2013.

SINGH, R. S. G.; NEGI, P. S.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **J. Funct Foods**, v. 5, p.1883-1891, 2013.

SIRIN, S.; TROBAJO, R.; IBANEZ, C.; SALVADÓ, J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **J. Appl. Phycol.**, v. 24(5), p.1067-1080, 2012.

TEIXEIRA, C. M. L. L.; KIRSTEN, F. V.; TEIXEIRA, P. C. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. **J. Appl. Phycol.**, v. 24, p.557-563, 2012.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **J. Ren. Sustain. Energy**, v. 2, p.012701-12716, 2010.

UMMALYMA, S. B.; MATHEW, A. K.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. **Bioresour Technol.**, v.213, p.216-221, 2016.

VALVERDE, F.; ROMERO-CAMPERO, F. J.; LEÓN, R.; GUERRERO, M. G.; SERRANO, A. New challenges in microalgae biotechnology. **Eur. J. Protistol.**, v.55, p. 95-101, 2016.

VANDAMME, D.; IMOGEN, F.; ILSE, F.; BOUDEWIJN, M.; KOENRAAD, M. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresour Technol.**, v.105, p.114-119, 2012.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends Biotechnol.**, v.31, p.233-239, 2013.

VANDAMME, D.; BEUCKELS, A.; VADELIUS, E.; DEPRAETERE, O.; NOPPE, W.; DUTTA, A.; FOUBERT, I.; LAURENS, L.; MUYLAERT, K. Inhibition of alkaline flocculation by algal organic matter for *Chlorella vulgaris*. **Water Res.**, v. 88, p.301-307, 2016.

XU, Y.; PURTON, S.; BAGANZ, F. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. **Bioresour Technol**, v. 129, p.296–301, 2013.

WAN, M.; ZHANG, J.; HOU, D.; FAN, J.; LI, Y.; HUANG, J.; WANG, J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. **Bioresour Technol**, v. 167, p.276-283, 2014.

WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X. Q.; ZHANG, X. Y.; GUO, S. L.; HO, S. H.; CHANG J. S.; BAI, F. W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresour Technol**, v.184, p.251-257, 2015.

WANG, Q.; ZHAO, Y.; GUAN, L.; ZHANG, Y.; DANG, Q.; DONG, P.; LI, J.; LIANG, X. Preparation of astaxanthin-loaded DNA/chitosan nanoparticles for improved cellular uptake and antioxidation capability. **Food Chem.**, v. 227, p.9-15, 2017.

WAYAMA, M.; OTA, S.; MATSUURA, H.; NANGO, N.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Threedimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS One** 8:e53618, 2013.

WU, S.; XIE, X.; HUAN, L.; ZHENG, Z.; ZHAO, P.; KUANG, J.; LIU, X.; WANG, G. Selection of optimal flocculant for effective harvesting of the fucoxanthin-rich marine microalga *Isochrysis galbana*. **J. Appl. Phycol.**, v. 28(3), p.1579-1588, 2016.

WUZ.; ZHU, Y.; HUANG, W.; ZHANG, C.; LI, T.; ZHANG, Y.; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresour Technol**, v. 110, p.496-502, 2012.

WYATT, N. B.; GLOE, L. M.; BRADY, P. V.; HEWSON, J. C.; GRILLET, A. M.; HANKINS, M. G.; POHL, P. I. Critical Conditions for Ferric Chloride-Induced Flocculation of Freshwater Algae. **Biotechnol Bioengineering**, v.109(2), p.1-9, 2012.

YANG, F.; XIANG, W.; FAN, J.; WU, H.; LI, T.; LONG, L. High pH-induced flocculation of marine *Chlorella* sp. for biofuel production. **J. Appl. Phycol**, v. 28(2), p.747-756, 2016.

YOSHIHISA, Y.; ANDOH, T.; MATSUNAGA, K.; REHMAN, M. U.; MAOKA, T.;

SHIMIZU, T Efficacy of astaxanthin for the treatment of atopic dermatitis in a murine model. PLoS ONE 11:0152288, 2016.

## 5- Considerações finais

Nesta pesquisa, foi possível obter maior conhecimento sobre a produção de astaxantina pela microalga *Haematococcus pluvialis* e qual a influência dos meios de cultivo e dos floclulantes sobre a mesma. Como as microalgas são grandes fontes de biocompostos utilizados em diversas áreas como aquicultura, indústria química, farmacêutica e nutracêutica, produção de bioenergia, tratamento de efluentes, entre outros, é necessário que o conhecimento sobre estes microrganismos e seus biocompostos seja aprofundado, de maneira a beneficiar e aplicar este conhecimento na biotecnologia e com sustentabilidade no setor produtivo de microalgas.

Ao avaliarmos os parâmetros de crescimento, o ciclo de vida, a produção de astaxantina, clorofilas e ácidos graxos e o efeito de floclulantes sobre a colheita de biomassa, a produção de astaxantina e a possibilidade de reuso do meio, concluímos que o meio Provasoli modificado foi o mais adequado para o cultivo e produção de astaxantina pela microalga *H. pluvialis*, bem como o extrato salino de *Moringa oleifera* foi o melhor floclulante para a colheita da biomassa e para obtenção de astaxantina. Estes resultados possibilitam otimizar a produção de astaxantina e o cultivo da microalga *H. pluvialis* para este fim, sendo necessárias futuras pesquisas para definir os melhores métodos para produção em larga escala da astaxantina, com menores custos durante a colheita da biomassa, além de quais as melhores maneiras de aplicação biotecnológica do cultivo da microalga e dos seus compostos.

A floclulação como método de colheita da biomassa, ao permitir a reutilização do meio de cultivo após o uso do floclulante para a obtenção de astaxantina, e diminuir em até 90% dos custos da produção da microalga *H. pluvialis* para este fim, abre caminhos para a produção em larga escala, uma vez que o reuso do meio floclulado pode reduzir o custo com nutrientes e principalmente, diminuir a utilização de água doce em produções de microalgas. Na aquicultura, a astaxantina é utilizada como suplemento no alimento inerte oferecido aos animais em cultivo intensivo, melhorando a nutrição e as defesas imunológicas destes animais, bem como a coloração da pele e da carne, características valorizadas pelo consumidor. Conhecer as melhores técnicas de produção deste composto pode diminuir os custos de produção de alimento inerte, tornando assim mais acessível ao produtor um alimento de qualidade para os animais cultivados, diminuindo os custos da produção e também os prejuízos causados por doenças, já que a astaxantina atua como imunomodulador, melhorando a resistência a patógenos potencialmente presentes no ambiente de cultivo, principalmente para os animais que são produzidos em cultivos intensivos.