

ANA PAULA FELIPE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE PIGMENTOS E CRESCIMENTO DA MICROALGA
Haematococcus pluvialis (Flotow 1844) CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA**

**RECIFE,
2016**



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

AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE PIGMENTOS E CRESCIMENTO DA MICROALGA
***Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE**
CULTURA

Ana Paula Felipe dos Santos

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

Prof. Dr. ALFREDO OLIVERA GÁLVEZ
Orientador

Recife,
Junho/2016

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

AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE PIGMENTOS E CRESCIMENTO DA MICROALGA
***Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE**
CULTURA

Ana Paula Felipe dos Santos

Dissertação julgada aprovada para obtenção do título de mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 07/06/2016 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. ALFREDO OLIVERA GÁLVEZ

(Orientador)

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr^a. ISABELA BACALHAU

(Membro externo)

Instituto Federal de Sergipe

Prof. Dr. LUIS OTAVIO BRITO DA SILVA

(Membro externo)

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. SUZIANNY MARIA BEZERRA CABRAL DA SILVA

(Membro externo - Suplente)

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. PAULO ROBERTO CAMPAGNOLI

(Membro Suplente)

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, por estar sempre ao meu lado me ajudando em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus pais, irmã e esposo pelo apoio e compreensão durante mais esta fase da minha vida.

As minhas amigas Yllana Marinho e Laenne Bárbara pelo apoio incondicional.

Ao Professor Alfredo Olivera Gálvez pela orientação.

Aos professores que se dispuseram a participar como membros da banca examinadora.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq/UFRPE), em especial aos membros do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, com os quais tive a oportunidade de estudar e que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. William Severi e a Tereza Cristina dos Santos, do Laboratório de Limnologia; a Professora Dra. Maria Raquel Coimbra e a equipe do Lab. de Genética Aplicada. Ambos laboratórios do DEPAq- UFRPE, que disponibilizaram seus equipamentos para realização das análises dos pigmentos.

A equipe do Laboratório de Produção de Alimento Vivo e Laboratório de Maricultura Sustentável pelo comprometimento na execução dos experimentos.

Resumo

A espécie *Haematococcus pluvialis* é uma microalga capaz de acumular pigmentos (clorofilas *a* e *b*, carotenoides –astaxantina, β -caroteno e luteína) com alto valor e uso comercial, quando submetida a condições de estresse, tal como, tipos de meios de cultura. O trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de *H. pluvialis* e identificar clorofilas e carotenoides presentes nas células, a partir da utilização de diferentes meios de cultura. Seis tratamentos foram realizados e os diferentes meios foram avaliados: Provasoli, Provasoli modificado I, Provasoli modificado II, KM1, MM2 e Guillard, todos com três repetições. As unidades experimentais foram condicionadas em erlenmeyers com volume útil de 2 litros, água doce tratada e enriquecida com os respectivos meios de cultura. A microalga foi inoculada com a concentração inicial de 1×10^5 cél.mL⁻¹ e os tratamentos mantidos a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo integral e intensidade luminosa de 4000 lux. Para avaliação do crescimento, foram retiradas amostras das culturas e realizadas contagens diárias em microscópio óptico. Foram elaboradas curvas de crescimento para cada tratamento e obtidos os valores da densidade celular máxima, tempo de cultivo e a velocidade de crescimento. Para quantificação dos pigmentos, amostras de 2mL foram coletadas dos tratamentos diariamente, tratadas com acetona a 80%, para em seguida ser realizada a leitura das absorvâncias através de espectrofotômetro. A partir dos resultados das absorvâncias foram calculadas as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais. Para análise dos dados utilizou-se Cochran, Shapiro-Wilk, ANOVA e teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados estatísticos mostraram que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos para a densidade celular máxima, que foi mais alta ($21,42 \pm 7,84 \times 10^5$ cél.mL⁻¹) quando utilizado o meio Provasoli modificado I, seguido dos meios Provasoli e Provasoli modificado II. Com relação aos pigmentos, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para a concentração de clorofilas *b* e total, carotenoides totais, que foram maiores nos tratamentos utilizado os meios Provasoli modificado I, Provasoli modificado II e Provasoli. Contudo, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para concentração de clorofila *a*. Para estas condições experimentais sugere-se o uso do meio Provasoli modificado I, para assim obter uma maior densidade celular e concentração de pigmentos da microalga *H. pluvialis*.

Palavras-chave: microalgas, clorofilas, curva de crescimento, carotenoides totais.

Abstract

The *Haematococcus pluvialis* microalgae species is able to accumulate pigments (chlorophylls *a* and *b*, carotenoids –astaxanthin, β -carotene and lutein) with high value and commercial use when subjected to stress conditions, such as types of culture medium. The work aimed to study the growth of *H. pluvialis* and identify chlorophylls and carotenoids present in the cells, from the use of different culture medium. Six treatments were performed and different means were evaluated: Provasoli, Provasoli I modified, Provasoli II modified, KM1, MM2 and Guillard, all with three replications. The experimental units were conditioned in flasks with a volume of 2 liters, treated fresh water and enriched their culture medium. The microalgae were inoculated with an initial concentration of 1×10^5 cél.mL⁻¹ and the treatments maintained at a temperature of 24 ± 1 ° C, photoperiod and light intensity integral 4000 lux. The assessment of growth, crop samples were taken and held daily counts by light microscopy. Growth curves were prepared for each treatment and the obtained values of the maximum cell density, culture time and the growth rate. For quantification of the pigments, samples of 2 ml were collected daily treatments, treated with 80% acetone in order to then be performed by reading the absorbance spectrophotometer. From the results of absorbances were calculated concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll and total carotenoids. For data analysis was used Cochran, Shapiro-Wilk, ANOVA and Tukey test ($P < 0,05$). The statistical results showed that there was significant difference ($P < 0,05$) between treatments for maximum cell density, which was higher ($21,42 \pm 7,84 \times 10^5$ cél.mL⁻¹) when using the medium Provasoli I modified, followed by Provasoli and Provasoli II modified means. Regarding pigments, significant differences ($P < 0,05$) were observed for the concentration of chlorophyll *b*, total chlorophyll and total carotenoids, which were higher in the treatments used the Provasoli I modified, means Provasoli II modified and Provasoli. However, no significant differences were observed ($P > 0,05$) for chlorophyll *a*. For these experimental conditions suggest the use of the medium Provasoli I modified, so as to obtain a higher cell density and concentration of pigments of microalgae *H. pluvialis*.

Keywords: microalgae, chlorophyll, growth curve, total carotenoids.

Sumário

	Página
Dedicatória.....	4
Agradecimento.....	5
Resumo	6
Abstract.....	7
1- Introdução.....	9
2- Revisão de literatura.....	10
2.1- Microalgas	10
2.2- Meios de cultura	13
2.3- Pigmentos fotossintéticos.....	15
2.3.1- Clorofila	15
2.3.2- Carotenoides	16
2.4- <i>Haematococcus pluvialis</i>	18
3- Referência bibliográfica	21
4- Artigo científico	31
4.1- Normas da Revista Química Nova	49

1- Introdução

As microalgas são seres microscópicos, fotossintetizantes, pertencentes ao Reino Protista (RICHMOND, 2004). Filogeneticamente podem ser procarióticas, com representantes nas Divisões Cyanophyta e Prochlorophyta, como também, eucarióticas, com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta, (OLAIZOLA, 2003). São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004).

O número exato de espécies de algas é desconhecido entretanto existe relatos que possam existir entre 200.000 até alguns milhões de espécies (PULZ e GROSS, 2004). Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica, onde sua biomassa é conhecida como uma fonte natural e ilimitada de compostos (carotenoides, ficobilinas, vitaminas, aminoácidos, proteínas, lipídios, ácidos graxos) o que favorece a sua aplicação na aquicultura e nas áreas químicas, farmacêuticas, cosméticas, nutracêuticas e na produção de energia (KIM et al., 2008; HO et al., 2011; SIVAKUMAR et al., 2012).

A *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) é uma microalga verde de água doce, pertencente à Classe Chlorophyceae e família Haematococcaceae, conhecida por sintetizar e acumular o carotenóide astaxantina sob condições de estresse. Nesta microalga, o acúmulo de astaxantina está relacionado a mudanças morfológicas (alteração no tamanho e formato das células) e bioquímicas nas células (síntese de pigmentos), ao qual é modificada em função das condições do cultivo (diferentes

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

nutrientes utilizados no cultivo), ambientais (mudança de temperatura, intensidade luminosa) ou do próprio ciclo de vida da espécie (GARCÍA-MALEA et al., 2006).

Desde 1930 a microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyceae) tem sido amplamente reconhecida na sua habilidade de acumular grandes quantidades de astaxantina, mas o interesse nesta alga tem sido renovado recentemente devido ao aumento na demanda de pigmentos naturais (clorofilas e carotenoides) de origem vegetal para ser usado como substituto de componentes sintéticos (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; HUI et al., 2005).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando diferentes meios de cultura e quantificar os pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) presentes.

2- Revisão de literatura

2.1. Microalgas

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes, que variam de uni a pluricelulares. Podem ser encontradas em diferentes ambientes, sejam eles salinos, de água doce e até mesmo no solo (HUANG et al., 2009). Possuem a capacidade de converter luz, água e dióxido de carbono em biomassa, liberando oxigênio, fato extremamente importante para o meio ambiente (KUHL et al., 2007; HARUN et al., 2010) e somado a isso, se reproduzem rapidamente (CHISTI, 2007).

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas, existindo uma grande variedade de espécies que vivem numa ampla gama de condições ambientais (NIGAM e SINGH, 2011). Embora, se estime que existam aproximadamente 200.000 espécies de

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

microalgas, aproximadamente 30.000, foram estudadas e analisadas (MATA et al., 2010). Esta diversidade de espécies, também reflete na composição bioquímica das mesmas e desta forma, as microalgas são uma fonte ilimitada de compostos químicos (aminoácidos, proteínas, ácidos graxos, pigmentos), com potencial de aplicação em indústrias químicas, farmacêuticas, alimentícias e na produção de bioenergia (OLAIZOLA, 2003; PULZ e GROSS, 2004). Contudo, apenas um número muito limitado de 10 espécies, são atualmente estudadas e comercializadas. As primeiras experiências em relação ao cultivo de algas, em condições controladas de monoculturas, foram espécies de água doce (*Chlorella* e *Spirulina*) e começou nos Estados Unidos na década de 1950, seguida por Israel, Japão, Alemanha e Checoslováquia (IWAMOTO, 2004). Atenção dada principalmente, a elevada taxas de crescimento, alto teor de componentes de interesse biotecnológico e resistência a condições de crescimento (DOUCHA, 1998). Desde então, nos últimos 50 anos têm-se assistido a um interesse crescente pelas microalgas, dado o seu potencial como fonte de proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos graxos, vitaminas, pigmentos, dentre outros (PRIYADARSHANI e RATH, 2012).

Cada espécie de microalga possui um potencial para produção de determinado metabólito. A exemplo de algumas espécies, podemos citar a *Chlorella* sp. e *Spirulina* cujo estudos vêm sendo direcionados para a produção de proteínas, aminoácidos e vitaminas para aplicação de fins nutracêuticos (BECKER, 2007; VOLKMANN et al., 2008; KHAIRY et al., 2011). Segundo Nobre et al. (2013), a microalga *Nannochloropsis* sp. vêm sendo utilizada para a extração de óleos (destinados para biodiesel) e extração de pigmentos carotenóides (para a indústria alimentar); *Dunaliella* sp., também possui grande potencial quando se refere a extração de compostos, pois é

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

rica em β -caroteno, pigmento precursor da vitamina A com valor estimado entre US\$ 300 – 1500 Kg⁻¹ com aplicabilidade em corantes alimentares, aditivos para rações e em cosméticos (BOROWITZKA, 2013); *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum*, *Pavlova* e *Cryptocodinium* são fontes de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (ARAO et al., 1994; QI et al., 2002; ZHOU et al., 2007; WYNN et al., 2010) com alto valor de mercado nas indústrias farmacêuticas e nutraceuticas. Apesar das infinidades de aplicações em diversas áreas biotecnológicas, o cultivo de microalgas é mais difundido e comumente realizado para aplicação na aquicultura, para alimentação de moluscos (LAGREZE et al., 2015), camarões (GADELHA, 2013), larvas de peixes (MULLER-FEUGA, 2003; MOREIRA et al., 2011), artêmias (MOREIRA et al. 2010; SOUZA e OLIVEIRA, 2015), copépodos (BROWN et al., 1997; GOUVEIA et al., 2008).

As taxas de crescimento das células das microalgas são diretamente influenciadas por uma combinação de parâmetros bióticos e abióticos. Entre os parâmetros bióticos podemos destacar as bactérias, fungos, vírus, e a competição com outras espécies de microalgas. Já em relação aos fatores abióticos destacam-se a intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura, pH, fluxo de aeração e composição de nutrientes no meio de cultura (MATA et al., 2010).

Segundo Karam e Soccol (2007) testando diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35°C) e valores de pH (7,0; 8,0; 9,0 e 10,0) do meio de cultivo, mostraram que estes valores influenciaram a adaptação e desenvolvimento das células de *Spirulina major* e conseguiram melhorar os índices de crescimento, obtendo o melhor resultado em temperatura 30°C e pH 8,0. A luz e o fotoperíodo, dependendo da espécie também pode influenciar na produtividade. Em pesquisa realizada por Nunes et al., (2013) testando o estresse luminoso e nutricional em *H. pluvialis* foi possível observar que com a adição

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

de CO² e o incremento da iluminação, houve um aumento da concentração de carotenóides/clorofila e da biomassa celular.

2.2. Meios de cultura

Diferentes meios de cultura vêm sendo utilizados e desenvolvidos para isolamento e cultivo de algas, sendo os principais Conway (WALNE, 1966), Guillard (GUILLARD, 1973), Provasoli (PROVASOLI et al., 1957) e Chu (CHU, 1947). Segundo Lourenço (2006), os meios de cultura são formulações contendo nutrientes, e estes, se dividem em macronutrientes e micronutrientes. Os macronutrientes apresentam a função de constituir as estruturas do meio intracelular, participando do processo de troca de energia e regulando atividades metabólicas, enquanto os micronutrientes participam da estrutura e atividade enzimática. Já as vitaminas, como a tiamina e biotina agem, respectivamente, como coenzima e transportadora de dióxido de carbono.

A quantidade de cada nutriente depende da exigência dos processos metabólitos de cada espécie de microalga. Os principais macronutrientes necessários para o desenvolvimento das microalgas são carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, sódio, sulfato, enquanto os micronutrientes são ferro, zinco, cobre, manganês, molibdênio. Além de macro e micronutrientes, ainda é possível adicionar componentes orgânicos (heterotrófico e mixotrófico) nas formulações (BECKER, 1994; LOURENÇO, 2006).

As microalgas podem ser cultivadas de forma autotrófica, heterotrófica e mixotrófica. Nos cultivos autotróficos as células utilizam os nutrientes presentes no meio de cultura (nitrogênio, fósforo, potássio), luz e dióxido de carbono para o seu

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

crescimento. No sistema heterotrófico, compostos orgânicos e fonte de carbono são adicionados no seu meio de cultivo e fontes de nitrogênio e de luz são reduzidas, ou ainda, podem ser cultivadas em sistema mixotrófico, onde usa simultaneamente a fonte luminosa, a fonte de nitrogênio e o composto orgânico (como fonte de carbono) no seu meio de cultura (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004; MULITERNO et al., 2005). Nestas formas de cultivo, a composição dos meios de cultura podem ser realizadas alterando o tipo de fonte de carbono, vitaminas e nutrientes. Este aprimoramento é importante para atingir um maior rendimento celular no cultivo e induzir metabólitos que podem ser extraídos das microalgas para diversas aplicações (MATA et al., 2010).

Syrett (1992) testando diferentes concentrações de nitrogênio no cultivo de *Chlorella* sp. observou que houve redução do teor de clorofila e consequente diminuição da taxa fotossintética da microalga, com as baixas concentrações deste nutriente. Contudo, a redução na quantidade de nitrogênio no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente (RIGANO et al., 1998; PANCHA et al., 2014). Pancha et al. (2014) observaram que quando houve a remoção total de nitrato (0 mg/L) do meio de crescimento de *Scenedesmus* sp., resultou em maior quantidade de lipídios (27,93%) e de carboidratos (45,74%), enquanto que na maior concentração testada (247 mg/L) a quantidade de lipídios e carboidratos não chegaram a 20%. Esta diminuição da concentração de nitrato (247-0 mg/L) no meio de crescimento, também resultou em uma diminuição no teor de proteína bruta 47,75% para 16,87% e no teor de clorofila de 7,03 µg/mL para 1,89 µg/mL na microalga.

2.3. Pigmentos fotossintéticos

Os três principais grupos de pigmentos encontrados nas microalgas são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (este somente encontrado nas cianobactérias) (DERNER et al., 2006).

2.3.1. Clorofila

A presença e abundância dos pigmentos fotossintéticos varia de acordo com cada espécie de microalga. A clorofila *a* (Chl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese. A clorofila realiza a fotoquímica, que é o primeiro estágio do processo fotossintético, enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. As clorofilas *b*; *c* e *d* são pigmentos acessórios (TAIZ e ZIEGER, 2004). A clorofila é o principal pigmento fotossintético dentre os metabólitos microalgais. Clorofilas “*a*” e “*b*”, são os únicos pigmentos naturais de coloração verde em abundância, mas sua instabilidade ao isolamento tem restringido a sua utilização como corante natural na indústria de alimentos (TAYLOR, 1984; HENDRY, 1996).

Além da clorofila, as microalgas contêm pigmentos fotossintéticos que auxiliam no melhoramento do uso de energia luminosa (ficobiliproteínas) e proteção contra a radiação solar (carotenoides) (COHEN, 1986; PULZ e GROSS, 2004; DEL CAMPO et al., 2007). Naturalmente, todos os pigmentos são produzidas sob condições de crescimento autotróficos, mas surpreendentemente alguns são produzidos, e em grandes quantidades, sob condições heterotróficas.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

A clorofila é um pigmento natural e a partir dela é possível se obter pigmentos derivados, como a clorofilina cúprica que pode ser comercializada para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos e suplementos alimentares (GOLDBERG, 1994). Porém estes pigmentos são quimicamente instáveis, sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio, e a degradação química, podendo ser alterados ou destruídos facilmente (STREIT, 2005). Estudos científicos mostram que as clorofilas causam efeitos benéficos à saúde humana por apresentar propriedades antimutagênicas, antigenotóxicas (LILA, 2004) e antioxidantes (LANFER-MARQUEZ, 2003).

2.3.2. Carotenoides

Os carotenoides funcionam como pigmentos acessórios, pois possuem a capacidade de transferir energia para moléculas de clorofila, aumentando assim a eficiência da fotossíntese. Também atuam como defensores contra o dano oxidativo durante a fotossíntese (STEIGER et al., 1999). Sendo assim, todos os organismos fotossintetizantes (plantas, algas, cianobactérias e também espécies de bactérias não fotossintéticas) produzem os carotenóides (YUEHUI et al., 2010).

Já foram descritos mais de 750 tipos diferentes de carotenoides (TAKAICHI, 2011). Os produzidos a partir de microalgas estão divididos em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Carotenos contêm hidrocarbonetos (não oxigenado) com estruturas cíclicas em ambas as extremidades da molécula. As xantofilas contêm moléculas de oxigênio, tais como hidroxí, ceto ou epóxi, o que facilita a solubilização em água. Diferentemente dos carotenos, que só se concentram em solução quando associados a proteínas (SOZER, 2011).

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

Dentre os carotenos encontra-se, como exemplo, o β -caroteno e o licopeno (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006), e entre as xantofilas encontram-se a zeaxantina, violaxantina, neoxantina (THERIAULT, 1965; COHEN, 1986), luteína e astaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004). Entre os carotenos, o β -caroteno pode ser utilizado como pigmentos e aditivos alimentares (em produtos lácteos, bebidas, etc.), em produtos cosméticos e farmacêuticos (CHRISTAKI et al., 2013) e também utilizado na aquicultura como suplemento alimentar na ração de camarão (SUPAMATTAYA et al., 2016) e peixe (ALISHAHI et al., 2015), melhorando o crescimento, coloração do tecido, função imune e resistência do animal. Já entre as xantofilas, a luteína, possui um elevado valor nutricional, baixa toxicidade e também é usado como pigmento para tecidos animais (pele de frango e gemas de ovo), alimentos, cosméticos e farmacêuticos, tal como um agente eficaz para a prevenção e tratamento de uma variedade de doenças degenerativas (SHI et al., 1997; PULZ e GROSS, 2004). A luteína é um produto intracelular de *Chlorella*, sendo que a *Dunaliella* sp. é a mais rica fonte de luteína. Ela contém até 14% deste pigmento em seu peso seco, e é utilizado como um suplemento alimentar (THERIAULT, 1965).

Ainda entre as xantofilas, tem-se a astaxantina, caracterizada por seu forte caráter antioxidante, pode melhorar a resposta imunológica em pessoas com câncer (PARK et al., 2010) e também prevenir a formação de células cancerígenas (NAGARAJ et al., 2012). É um corante vermelho usado em cosméticos, terapêuticos e indústrias de alimentos (HAGEN et al., 1993). Na aquicultura, tem sido utilizada para aumentar o crescimento e sobrevivência de animais aquáticos e como corante de tecidos (salmão de viveiro, camarão, lagosta, truta, peixe e ovos) para proporcionar uma cor avermelhada, atraente para os consumidores (DEL RIO et al., 2005; IP e CHEN, 2005). A utilização

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

deste carotenoide específico na aquicultura se dá principalmente porque os organismos cultivados não são capazes de sintetizar carotenoides e a deposição da astaxantina em seus tecidos é muito mais eficiente quando comparado a outros carotenoides; a maioria dos criadores utiliza astaxantina sintética. Contudo, o custo deste insumo sintético é elevado, aliado ao fato de que suas formulações podem conter configurações isoméricas indesejadas, diminuindo sua eficiência na pigmentação (LATSCHA, 1990).

Os carotenoides podem ser sintéticos, quando obtidos por via química, ou naturais, quando obtidos de plantas ou algas. A maioria dos sintéticos é produzido na Europa e nos EUA, sendo que os naturais continuam tendo seu lugar no mercado internacional (MULLER et al., 2003). Com a problemática referente ao uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse pelos carotenóides obtidos naturalmente, pois pigmentos naturais podem ser obtidos em curto prazo, com possibilidade de utilização de diferentes meios, utilização de diferentes estruturas de produção, além de possibilitarem maior controle das condições de cultivo (VALDUGA et al., 2009).

Por fim, a composição deste pigmento depende das condições de desenvolvimento, tais como estágio de crescimento, intensidade luminosa, fonte e concentração de nitrogênio na cultura, assim como a espécie e os tipos de cepa (TAKAICHI e MOCHIMARU, 2007).

2.4. *Haematococcus pluvialis*

O *H. pluvialis* é uma microalga verde (Chlorophyta), móvel, unicelular e fotossintética (DONG e ZHAO, 2004; LEE, 2008). Apresenta uma ampla distribuição, encontrando-se em pequenas piscinas naturais costeiras e continentais, furos de água e

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

outros habitats de águas naturais e mesmo artificiais (BURCHARDT et al., 2006). Possui a capacidade de desenvolver-se em água doce, sendo pouco tolerante a altas salinidades (CANTER-LUND e LUND, 1995).

Em geral, a composição da microalga *H. pluvialis* consiste em carotenoides, ácidos graxos, proteínas, carboidratos e minerais (MIAO e WU, 2004; IMAMOGLU et al., 2009);

O ciclo de vida desta espécie pode ser dividido em quatro diferentes fases (FIEDLER et al., 2007): microzoóides flagelados, macrozoóides flagelados, células palmelóides imóveis e hematocistos ou aplanósporos, os quais são grandes células vermelhas com uma parede celular altamente resistente (AFLALO et al., 2007). Os aplanósporos caracterizam-se por ser a principal forma celular de acumulação de grandes concentrações de astaxantina, e surgem como formas de repouso (cistos) ou resistência da espécie a condições desfavoráveis, tais como excesso ou falta de luz (BOUSSIBA, 2000; ZHEKISHEVA et al., 2005, deficiência de nutrientes (DEL CAMPO et al., 2004; OROSA et al., 2001), temperaturas inadequadas (35-45°C) e presença de substâncias (sal, carbono) que interferem no metabolismo (FABREGAS et al., 2001).

As maiores biomassas e taxas de crescimento da espécie são geralmente atingidos na fase de macrozoóides flagelados. As células vegetativas possuem mais clorofila (*a* e *b*) e menos carotenoides, no entanto, quando exposta a condições de stress, o organismo acumula carotenoide no citoplasma e simultaneamente o conteúdo de clorofila total diminui drasticamente (KAMATH et al., 2005).

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

No cultivo desta espécie, uma das maiores preocupações é relacionada a sua lenta velocidade de crescimento (JEON et al., 2006; GARCÍA-MALEA et al., 2006) e ao pouco entendimento das condições ótimas para crescimento e produção de astaxantina (CIFUENTES et al., 2003). Por isso, muitas pesquisas têm sido direcionadas buscando melhorar a baixa velocidade de crescimento das células vegetativas móveis: 0,5 – 0,7div/dia (FAN et al., 1994; GONG e CHEN, 1998; OROSA et al., 2005), excepcionalmente 0,9 divisões/dia (HAGEN et al., 1993).

Alterações nos componentes presentes nos meios de cultura também buscam acelerar a velocidade de crescimento das células. Segundo estudo realizado por Goksan e Kiliç (2011), quando se realiza modificações na fonte de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio e ureia), vitaminas e luz no cultivo de *H. pluvialis*, ocorre mudança no crescimento das células. O melhor crescimento ocorreu quando a concentração de nitrato de sódio foi de 1,0g/L e a de nitrato de potássio de 0,5g/L, com luminosidades entre 75 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

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

A *H. pluvialis* possui capacidade antioxidante e a partir disto, estudos têm sido realizados para comparar esta capacidade nas células vegetativas móveis e em cistos. Céron et al. (2007) mostraram que a fração do extrato de células de *H. pluvialis* que

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

apresentava menor atividade antioxidante era constituída principalmente por carotenóides livres (violaxantina, luteína, clorofila b, astaxantina e neoxantina), enquanto na fração com maior atividade antioxidante predominavam diésteres e monoésteres de astaxantina esterificados principalmente com ácido oleico e palmítico.

3- Referência bibliográfica

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.

ALISHAHI, M.; KARAMIFAR, M.; MESBAH, M. Effects of astaxanthin and *Dunaliella salina* on skin carotenoids, growth performance and immune response of *Astronotus ocellatus*. **Aquaculture International**, v.23, n.5, p.1239-1248, 2015.

ARAO, T.; SAKAKI, T.; YAMADA, M. Biosynthesis of polyunsaturated lipids in the diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry**, v.36, p.629-635, 1994.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v.25, p.207–10, 2007.

BECKER, E.W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. New York: Cambridge University Press. 1994. 293p.

BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae—their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v.25, p.743-756, 2013.

BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. **Journal of Plant Physiology**, v.108, p.111–117, 2000.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J. K. DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p.315-331, 1997.

BURCHARDT, L.; BALCERKIEWICZ, S.; KOKOCINSKI, M.; AMARDAKIEWICZ, S.; ADAMSKI, Z. Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the Collegium Biologicum in Poznan (Poland). **Biodiversity Research and Conservation**, v.1-2, p.163-166, 2006.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

CANTER-LUND, H.; LUND, J.W.G. **Freshwater Algae: Their Microscopic World Explored**. Hong Kong: Bio press Limited, 1995.

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. **Applied Microbiology and Cell Physiology**, v.74, p. 1112–1119, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p.294–306, 2007.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.1, n.3, p.21-34, 2004.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.1, p.5-11, 2013.

CHU, S.P. Note on the technique of making bacteria-free cultures of marine diatoms. *Journal of the Marine Biological Association*, v.26, p. 296-302, 1947.

CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZÁLEZ, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. **Biological Research**, v. 36, p. 343-357, 2003.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook for Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, 1986. pp. 421 e 454.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook for Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, 1986. p.421-454.

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

DEL RÍO E.; ACIÉN F.G.; GARCÍA-MALEA M.C.; RIVAS J.; MOLINA-GRIMA E.; GUERRERO M.G. Efficient One-Step Production of Astaxanthin by the Microalga

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

Haematococcus pluvialis in Continuous Culture. **Journal Biotechnology**, v.91, p.808-815, 2005.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v.36, p.1959-1967, 2006.

DONG, Q.; ZHAO, X.M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaf a rhodozyma*. **Catalysis Today**, Estados Unidos, v. 98, n.4, p. 537–544, 2004.

DOUCHA, J. The Chlorella Programme in the Czech Republic. Institute of Microbiology Academy of Sciences of the Czech Republic, Trebon, p.16, 1998.

FABREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMÍNGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v.89, n.1, p.65-71, 2001.

FAN L.; VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S. Effect of the temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, p. 829-833, 1994.

FIEDLER, D.; HAGER, U.; FRANKE, H.; SOLTMANN, U.; BÖTTCHER, H. Algae biocers: astaxanthin formation in sol-gel immobilized living microalgae. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, n.3, p.261-266, 2007.

FLOTOW, J.V. Beobachtungen über *Haematococcus pluvialis*. Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Deutschen Akademie der Naturforscher v.12, p. 413-606, 1844.

GADELHA, R.G.F. Eficiência da microalga *Spirulina platensis* na alimentação do camarão *Litopenaeus vannamei*. 2013. 108p. **Tese (Doutorado em Química e Bioquímica de Alimentos)** - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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.

GOKSAN, T.; AK, I.; 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, p.377-383, 2011.

GOLDBERG, I. **Functional foods**: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. New York: Chapman & Hall, 1994. 406p.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium componets on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 385- 391, 1998.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N.M. Microalgae in Novel Food Products. **Food Chemistry Reserch Developments**, v.2, p.1-37, 2008.

GUILLARD, R. R. L. Methods for microflagellates and nannoplanktono In: Stein, J. R., ed.- Handbook of phycological methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge, University Press, 69-85, 1973.

HAGEN C.; BRAUNE W.; GREULICH. F. Funtional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris*. Protection from photodynamic damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 20, p. 153-160, 1993.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.1037-1047, 2010.

HENDRY, G.A.F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. Natural Food Colorants. 2.ed. London: Blackil Academic Professional, 1996. p.131-155.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: a Review of its Chemistry and Applications. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v.46, p.185-196, 2006.

HO, S. H.; CHEN, C.-Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – a review. **Biotechnology Advances**, v.29, p.189-198, 2011.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 06, 2009.

HUI, N.; HE, G-Q; RUAN, H.; CHEN, Q-H; CHEN, F. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. **Journal of Zhejiang University Science**, p.514-522, 2005.

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

IP, P-F; CHEN, F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 733-738, February 2005.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

IWAMOTO, H. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species *Chlorella*. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal mass cultures, 2004. p. 255–263.

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*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

KAMATH, S. B.; CHIDAMBAR, S.; BRINDA, B.R.; KUMAR, M.A.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Digital image processing—an alternate tool for monitoring of pigment levels in cultured cells with special reference to green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 768–773, 2005.

KARAM, L.M.; SOCCOL, C.R. Efeito da temperatura e pH no cultivo de *Spirulina major*. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, v.10, n.1, p.5-7, 2007.

KHAIRY, B.H.M.; ALI, E.M.; DOWIDAR, S.M. Comparative effects of autotrophic and heterotrophic growth on some vitamins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, amino acids and protein profile of *Chlorella vulgaris*, **African Journal of Biotechnology**, v.10 (62), p. 13514-13519, 2011.

KIM, S.; RAVICHANDRAN, Y.D.; KHAN, S.B.; KIM, Y.T. Prospective of the Cosmeceuticals derived from marine organisms. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.13, p.511-523, 2008.

KUHL, M.; CHEN, M.; LARKUM, A.W.D. **Biology of the Chlorophyll D-containing *Cyanobacterium acarychlois marina***. Seckbach, J. (Ed.) Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments, 1st ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007. 150p.

LAGREZE, F.J.; ALBUQUERQUE, M.C.P.; ARAUJO, J.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. Sobrevivência e crescimento de larvas do molusco de areia *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) em laboratório. **Boletim Instituto de Pesca**, v.41, p.133-143, 2015.

LANFER-MARQUEZ, U.M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.3, p. 227-242, 2003.

LATSCHA, T. Carotenoids – their nature and significance in animal feeds. **Basel: Hoffman-La Roche Ltd.**, p.110, 1990.

LEE, R.E. **Phycology**. Ed. Cambridge University Press, New York, US, 4th edition, 2008. p.547.

LILA, M. A. Plant pigments and human health. In: DAVIS, S. Plant pigments and their manipulation. Oxford, 2004. p.248-274.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

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

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Rima, São Carlos, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232, 2010.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85- 93, 2004.

MOREIRA, R.L.; DA COSTA, J.M.; MOURA, P.S.; FARIAS, W.R.L. Salinidade da água e suplementação alimentar com microalga marinha no crescimento e masculinização de tilápia do Nilo. **Bioscience Journal**, v.27, n.1, 2011.

MOREIRA, R.L.; DA COSTA, J.M.; QUEIROZ, R.V.; MOURA, P.S.; FARIAS, W.R.L. Utilização de *Spirulina platensis* como suplemento alimentar durante a reversão sexual de tilápia do Nilo. **Revista Caatinga**, v.23, n.2, p.134-141, 2010

MULITERNO, A.; MOSELE, P.C.; COSTA, J.A.V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1132-1138, 2005.

MULLER, M.C.; AMAYA, D.B.R.; LOURENÇO, S.O. Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida condições normais e sob limitação de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.4, 2003.

MULLER-FEUGA, A.; MOAL, J.; KAAS, R. **The Microalgae of Aquaculture**, Støttrup, J. G. & McEvoy, L. A. (Eds.). Live Feeds in Marine Aquaculture, 1st ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom. 2003. 206-253p.

NAGARAJ, S.; RAJARAM, M.G.; ARULMURUGAN P.; BASKARABOOPATHY, A.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K.R.; SUNDARARAJ, R.; RENGASAMY, R.; Antiproliferative potential of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* Flotow on human hepatic cancer (HepG2) cell line. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v.2, n.3, p.149-153, 2012.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.37, p.52-68, 2011.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

NOBRE, B. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga: extraction of oils and pigments: production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology Special Issue: Biorefinery, Essex**, v. 135, p. 128-136, 2013.

NUNES, M.; VIEIRA, A.A.H.; PINTO, E.; CARNEIRO, R.L.; MONTEIRO, A.C. Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v.48, n.8, 2013.

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

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, Estados Unidos, v. 96, n. 3, p. 373–378, 2005.

OROSA, M.; VALERO, J.F.; HERRERO, C.; ABALDE, J. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under Nstarvation and high light conditions. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1079-1085, 2001.

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.

PARK, J.S.; CHYUN, J.H.; KIM, Y.K.; LINE, L.L.; CHEW, B.P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. **Nutrition & metabolism**, v.7, n.1, p.1, 2010.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae – a review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v.3, p.89–100, 2012.

PROVASOLI, L.; McLAUGHLIN, J.J.A.; DROOP, M.R. The development of artificial media for marine algae. *Archives of Microbiology*, v.25, p.392-425, 1957.

PULZ, O., GROSS, W. Valuable products from biotechnology microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.635-648, 2004.

QI, B.; BEAUDOIN, F.; FRASER, T.; STOBART, A.K.; NAPIER, J.A.; LAZARUS C.M. Identification of a cDNA encoding a novel C18-D9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. **FEBS Lett**, v.510, p.159-165, 2002.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. M. B., MORAIS R. M. S. C. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.28, p.1253–1257, 2012.

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

RIGANO, V.D.M.; VONA, V.; ESPORITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiologican significance of light and dark NH₄⁺ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Phytochemistry**, v.47, p.177-181, 1998.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis, Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT). 2004.

SHI, X.-M.; CHEN, F.; YUAN, J.-P.; CHEN, H. Heterotrophicproduction of lutein by selected Chlorella strains. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.445-450, 1997.

SIVAKUMAR, G.; XU, J.; THOMPSON, R.W.; YANG, Y.; RANDOL-SMITH, P.; WEATHERS, P.J. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. **Bioresource Technology**, v.107, p.1-9, 2012.

SOUZA, I.S.; OLIVEIRA, P.H.C. Utilização da cianobactéria *Spirulina maxima* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como dietas complementares no cultivo de *Artemia franciscana* use the cyanobacterium *Spirulina maxima* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* as further in diets for cultivation of *Artemia franciscana*. **HOLOS**, v.31, n.3, p.54, 2015.

SOZER, O. Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria. 2011. 1-90p. **Ph.D. Thesis**. University of Szeged. Biological Research Centre. Hungarian Academy of Sciences Szeged.

STEIGER, S.; SCHAFER, L.; SANDMANN, G. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 52, p. 14-18, 1999.

STREIT, N.M.; CANTERLE L.P.; CANTO M.W.; HECKTHEUERI, L.H.H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

SUPAMATTAYA, K.; KIRIRATNIKOM, S.; BOONYARATPALIN, M.; BOROWITZKA L. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 248, n. 1, p. 207-216, 2016.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In: SYRETT, P.J. Physiology and biochemistry of algae. New York: Academic Press, 1992. p. 171-183.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.693.

TAKAICHI, S. **Carotenoids in Algae**: Distributions, biosyntheses and functions. Marine Drugs, 2011. 1101-1118p.

TAKAICHI, S.; MOCHIMARU, M. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2607-2619, 2007.

TAYLOR, A.J. Natural colours in food. In: WALFORD, J. Developments in food colours. Manchester: Elsevier Applied Science, 1984. v.2, p.159-206.

THERIAULT, R.J. Heterotrophic growth and production of xanthophylls by *Chlorella pyrenoidosa*. **Applied Microbiology**, v. 13, p.402-416, 1965.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2429-2436, 2009.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J.L.B.; SANT'ANNA, E.S. Cultivation of *Arthrospira (spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and aminoacid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.98-101, 2008.

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v.25, n.4, p.1-53, 1966.

WYNN, J.; BEHRENS, P.; SUNDARARAJAN, A.; HANSEN, J.; APT, K. Production of single cell oils from dinoflagellates. In: COHEN, Z.; RATLEDGE, C. (eds) Single cell oils. Microbial and algal oils, 2010. p.115-129.

YUEHUI, Z.; GRAHAM, J.E.; LUDWIG, M.; XIONG, W.; ALVEY, R.M.; SHEN, G.; BRYANT, D.A. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.504, p. 86-99, 2010.

ZHEKISHEVA, M.; ZARKA, A.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v.41, p.819-826, 2005.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

ZHOU, X.R.; ROBERT, S.S.; PETRIE, J.R.; FRAMPTON, D.M.; MANSOUR, M.P.; BLACKBURN, S.I.; NICHOLS, P.D.; GREEN, A.G.; SINGH, S.P. Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. **Phytochemistry**, v.68, p.785-796, 2007.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

4- Artigo científico

Artigo científico a ser encaminhado a Revista **Química Nova**.

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

1 **AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE PIGMENTOS E CRESCIMENTO DA**
2 **MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS (FLOTOW 1844)**
3 **CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

4

5 **Ana Paula Felipe dos Santos^{a,*}, Laenne Barbara Silva de Moraes^a, Rildo**
6 **Vasconcelos de Andrade^a, Willian Severi^a, Yllana Ferreira Marinho^a, Alfredo**
7 **Olivera Gálvez^a**

8

9 ^aDepartamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
10 52171-900 Recife – PE, Brasil

11

12 -----

13 () [Manuscrito com material suplementar](#)

14 (x) [Manuscrito sem material suplementar](#)

15 -----

16 *e-mail: aninafsantos@hotmail.com

17

18 PIGMENT LEVELS AND GROWTH OF EVALUATION OF THE MICROALGAE
19 HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS (FLOTOW 1844) CULTIVATED IN DIFFERENT
20 CULTURE MEDIUMS

21

22 The *Haematococcus pluvialis* microalgae species is able to accumulate pigments
23 (chlorophylls *a* and *b*, carotenoids - astaxanthin, β -carotene and lutein) with high value
24 and commercial use. In this sense the work aimed to study the growth of *H. pluvialis*
25 and identify the pigments (chlorophyll and carotenoids) in cells present from the use of
26 different culture media. Different means were evaluated: Provasoli, Provasoli I modified
27 Provasoli II modified, KM1, MM2 and Guillard, all with three replications. The values
28 of the maximum cell density, culture time and the growth rate were obtained. For
29 quantification of the pigments, the concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total
30 and total carotenoids were calculated. Results showed a significant difference ($P < 0,05$)
31 between treatments for maximum cell density, which was higher ($21,42 \pm 7,84 \times 10^5$
32 cél.mL^{-1}) when using the medium Provasoli I modified. With respect to the pigments
33 total carotenoids, chlorophyll *b*, and total significant differences were also observed (P
34 $< 0,05$), when used culture medium Provasoli I modified.

35

36 Keywords: microalgae, chlorophyll, growth curve, total carotenoids.

37

38 INTRODUÇÃO

39

40 Vários estudos afirmam que pigmentos como clorofilas *a* e *b*, além dos carotenoides
41 (astaxantina, β -caroteno e luteína) afetam benéficamente a saúde humana ^{1,2} e de
42 animais cultivados, como os da aquicultura ³⁻⁶ devido a sua atividade antioxidante.

43 Além disso, existe uma demanda pelo consumo de produtos naturais, favorecendo o
44 desenvolvimento de pigmentos a partir de fontes biológicas, e por conta disso, as
45 microalgas, vêm ganhando significativa atenção, devido possuir uma diversidade de
46 pigmentos e de compostos químicos (proteínas, carboidratos, vitaminas, ácidos graxos
47 poli-insaturados) com potencial aplicação em diversas áreas biotecnológicas, que pode
48 ser produzido em concentrações superiores aos verificados em plantas superiores. ⁷ No
49 entanto, a produção destes pigmentos e compostos, para que se torne economicamente
50 viável, está estreitamente ligado às condições de crescimento (luz, salinidade, pH e
51 nutrientes) em que a microalga é submetida. ⁸

52 Nas microalgas a clorofila *a* é o pigmento mais importante para a fotossíntese porque
53 apresenta papel central no arranjo dos fotossistemas para a captação da energia
54 luminosa. Já a clorofila *b* e os carotenoides, são considerados pigmentos acessórios da
55 fotossíntese e tem como função, aumentar a captação de luz do fotossistema, como
56 também, a de proteger o fotossistema quando há um excesso de luz. ^{9,10} Sob condições
57 adversas de crescimento, as clorofilas são geralmente degradadas, e em certas algas
58 verdes, os carotenoides são produzidos em quantidades significativamente maiores que
59 as clorofilas. ¹⁰

60 A *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) ¹¹ é uma microalga verde de água doce,
61 pertencente à Classe Chlorophyceae e família Haematococcaceae, conhecida por
62 sintetizar e acumular carotenoides, quando submetida a em condições de estresse, tais
63 como, diminuição de nutrientes no cultivo; ¹² composição dos nutrientes e tipos dos
64 meios de cultura (autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico); ^{13,14,15} alta intensidade
65 luminosa; ¹⁶ variação de temperatura. ¹⁷ Tripathi *et al.*, ¹⁴ observaram que meios de
66 cultura contendo uma maior relação nitrogênio:carbono (autotrófico), promoveram o
67 maior crescimento das células de *H. pluvialis*, produção de biomassa e menos indução a
68 carotenoides. Contudo, os meios que continham maior a relação carbono:nitrogênio

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

69 (heterotrófico) não promoveram um bom crescimento da microalga, porém induziu
70 melhor a produção de carotenoides.

71 García-malea *et al.*,¹⁸ observaram que fatores indutores do aumento da síntese de
72 astaxantina pelas células de *H. pluvialis* podem ser acompanhados por alterações
73 morfológicas e bioquímicas. Sob condições normais de crescimento as células
74 vegetativas são verdes, possuem flagelos, clorofila (*a* e *b*), proteínas e estão em contínua
75 divisão celular. Porém, quando expostas a condições de estresse, as células não
76 produzem clorofila, cessam a divisão celular, formam cistos vermelhos imóveis (perda
77 do flagelo), contendo 80% de astaxantina e 20% composto por outros carotenoides.

78 Apesar de existirem estudos relacionados aos fatores indutores da síntese de carotenoide
79 em *H. pluvialis*, as pesquisas sobre os nutrientes utilizados no cultivo e a influência
80 destes no crescimento e indução de pigmentos sintetizados por esta espécie ainda são
81 escassos. Este trabalho teve como objetivo quantificar os pigmentos clorofilas e
82 carotenoides totais e avaliar o crescimento da microalga *H. pluvialis* cultivada em
83 diferentes meios de cultura.

84

85 **PARTE EXPERIMENTAL**

86

87 A microalga *H. pluvialis* foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Produção de
88 Alimento Vivo (LAPAVI), localizado no Departamento de Pesca e Aquicultura
89 (DEPAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

90 O experimento foi desenvolvido durante 8 dias em escala laboratorial no LAPAVI,
91 através de um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e três
92 repetições, perfazendo dezoito unidades experimentais. Os tratamentos foram os
93 diferentes meios de cultura: autotróficos “Provasoli,¹⁹ Provasoli modificado I²⁰ e
94 Guillard²¹”; heterotróficos “KM1²² e MM2¹³”; e mixotrófico “Provasoli modificado II
95²⁰”. As composições de cada meio de cultura encontram-se resumidos na tabela 1.

96

97

98

99

100

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

101 **Tabela 1.** Composição dos meios de cultura (g/L de meio)

Nutrientes	P	P-I	P-II	K	M	G
C ₂ H ₃ NaO ₂			1.986	1.986	1.986	
C ₃ H ₅ (OH) ₂ PO ₄ Na ₂ .H ₂ O	15	15	15			
CaCl ₂ .2H ₂ O				0.020	0.020	
CoCl ₂ .2H ₂ O	0.0015					10
CuSO ₄ .5H ₂ O						9.8
EDTA Na.2H ₂ O	25	25	25	0.045	0.045	4.36
Extrato de levedura			2	2.0		
F ₂ Cl ₃ .6H ₂ O		0.15	0.15			
F ₂ SO ₄					0.010	
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	10.6	10.5	10.5			
FeCl ₃ .6H ₂ O	2.60					3.15
FeSO ₄ .7H ₂ O				0.010		
H ₃ BO ₃	3	3	3			
K ₂ HPO ₄					0.740	
KH ₂ PO ₄					0.175	
L-asparagina			0.40	0.405	0.405	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.6					180
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O						6.3
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O						5
NaNO ₃	105	105	105			75
ZnCl ₂	0.075					
ZnSO ₄						22

102 Provasoli (P), Provasoli modificado I (P-I), Provasoli modificado II (P-II), KM1 (K),
103 MM2(M) e Guillard (G).

104

105 As unidades experimentais foram condicionadas em erlenmeyers de 2 litros com água
106 doce previamente autoclavadas e enriquecidas com 1 ml. L⁻¹ dos respectivos meios de
107 cultura e mantidas com aeração constante. As microalgas foram inoculadas com a
108 concentração inicial de 1 x 10⁵ cél.mL⁻¹, mantidas a temperatura de 24 ± 1°C, pH 7,8,

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

109 fotoperíodo integral e intensidade luminosa de 4000 lux (lâmpadas fluorescentes de 40
110 W tipo “Daylight”).

111 Para a avaliação do crescimento de *H. pluvialis* a cada 24 horas após o início do
112 experimento, foram retiradas amostras das culturas e realizadas contagens em
113 microscópio óptico com 40x de aumento com o auxílio de uma câmara de Neubauer.
114 Para cada tratamento do experimento, uma curva de crescimento foi desenvolvida com a
115 densidade celular diária da média das três repetições e com o auxílio do programa
116 CurveExpert versão 1.4, onde foram ajustadas pela aproximação à curva logística
117 seguindo a fórmula elaborada por Pindich e Rubenfeld ²³:

$$118 \quad Y = \frac{P_1}{\left[1 + \left(\frac{P_2 - N_0}{N_0} \right) \times \exp^{-kt} \right]}$$

119

120 Onde:

121 Y = densidade celular

122 P₁ e P₂ = primeiro e segundo parâmetros da curva logística

123 N₀ = densidade celular inicial

124 k = velocidade de crescimento

125 t = tempo de cultivo

126 Além da elaboração das curvas de crescimento, foram obtidos os valores da densidade
127 celular máxima (DCM) considerando o dia de cultivo no qual a população algal
128 alcançou a máxima densidade celular; o tempo de cultivo que foi determinado pelo
129 número de dias passados desde o início do experimento até o dia em que foi alcançada a
130 densidade celular máxima e a velocidade de crescimento (K) que representa o número
131 de divisões celulares da população num intervalo de tempo (dias), que foi determinada
132 através da equação citada em Stein: ²⁴

$$133 \quad k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \text{Log} \frac{N_2}{N_1}$$

134 Onde:

135 k = velocidade de crescimento

136 3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10

137 (T₂ - T₁) = intervalo de tempo em dias

138 N₁ = densidade celular inicial

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

139 N_2 = densidade celular final

140 Log = logaritmo em base 10

141

142 Todos os dias o oxigênio dissolvido, temperatura e o pH foram mensurados (modelo
143 YSI 55), uma vez ao dia. Para a quantificação de pigmentos foram coletadas amostras
144 com volume de 2 mL cada em ependorfs de plástico, em ambos os tratamentos e suas
145 respectivas repetições, durante todos os dias do cultivo, totalizando 126 amostras. As
146 amostras coletadas foram cobertas com papel alumínio para evitar oxidação e
147 congeladas a -20°C até análise.

148 Para a preparação das amostras, as mesmas foram descongeladas e centrifugadas
149 (Thermo Scientific Megafuge 16) a 3000 rpm, a uma temperatura de 10°C , durante 10
150 minutos. Com auxílio de uma pipeta, foram retirados das amostras os sobrenadantes de
151 forma que ficou somente o sedimento (biomassa concentrada de microalga) no fundo do
152 ependorf. Em cada amostra, foi adicionado 0,5 ml de acetona a 80% e foram
153 homogeneizadas por 5 minutos, através de vortex (Vortex Mixer KMC-1300V),
154 desfazendo o sedimento. Depois foi adicionado mais 1,5 ml de acetona a 80%. As
155 amostras foram cobertas com papel alumínio e levadas ao congelador a -20°C por 30
156 minutos.

157 Posteriormente foram retiradas do congelador e novamente centrifugadas a 10 minutos.
158 Então o sobrenadante foi passado para cubetas de vidro.²⁵ As leituras das absorvâncias
159 foram realizadas imediatamente após preparação do extrato. Foi utilizado o
160 espectrofotômetro (HACH DR/2000). Para calibração do equipamento foi utilizada uma
161 Solução Branco (acetona a 80%). As absorvância foram 664 e 647 nm para a
162 “clorofila *a*” e “clorofila *b*”, respectivamente, e de 453 para carotenóides totais.

163 Todo o procedimento que envolveu as amostras de pigmentos foi realizado na ausência
164 de luz, para evitar oxidação e perda dos pigmentos.

165 Posteriormente, a quantidade de pigmentos foi calculada usando as seguintes fórmulas:

166 ²⁶

$$167 Ca = 11,75 A_{664} - 2,350 A_{647}$$

$$168 Cb = 18,61 A_{647} - 3,960 A_{664}$$

$$169 C_{total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

$$170 Car = 1000 A_{453} - 2,270 \text{ Chl } a - 81,4 \text{ Chl } b/227$$

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

171 onde Ca é a clorofila *a*, Cb é a clorofila *b*, Ctotal é a clorofila total, e Car são os
172 carotenóides totais (mg/L⁻¹).

173 O teste paramétrico one-way ANOVA foi utilizada para analisar os parâmetros de
174 qualidade de água, crescimento e pigmentos, após a confirmação da homocedasticidade
175 (Cochran P<0,05) e normalidade (Shapiro-Wilk P<0,05). O teste de Tukey (P<0,05) foi
176 realizado para comparação e classificação significativa a partir dos seis tratamentos. Os
177 dados foram analisados utilizando o programa estatístico R 2.15.3.

178

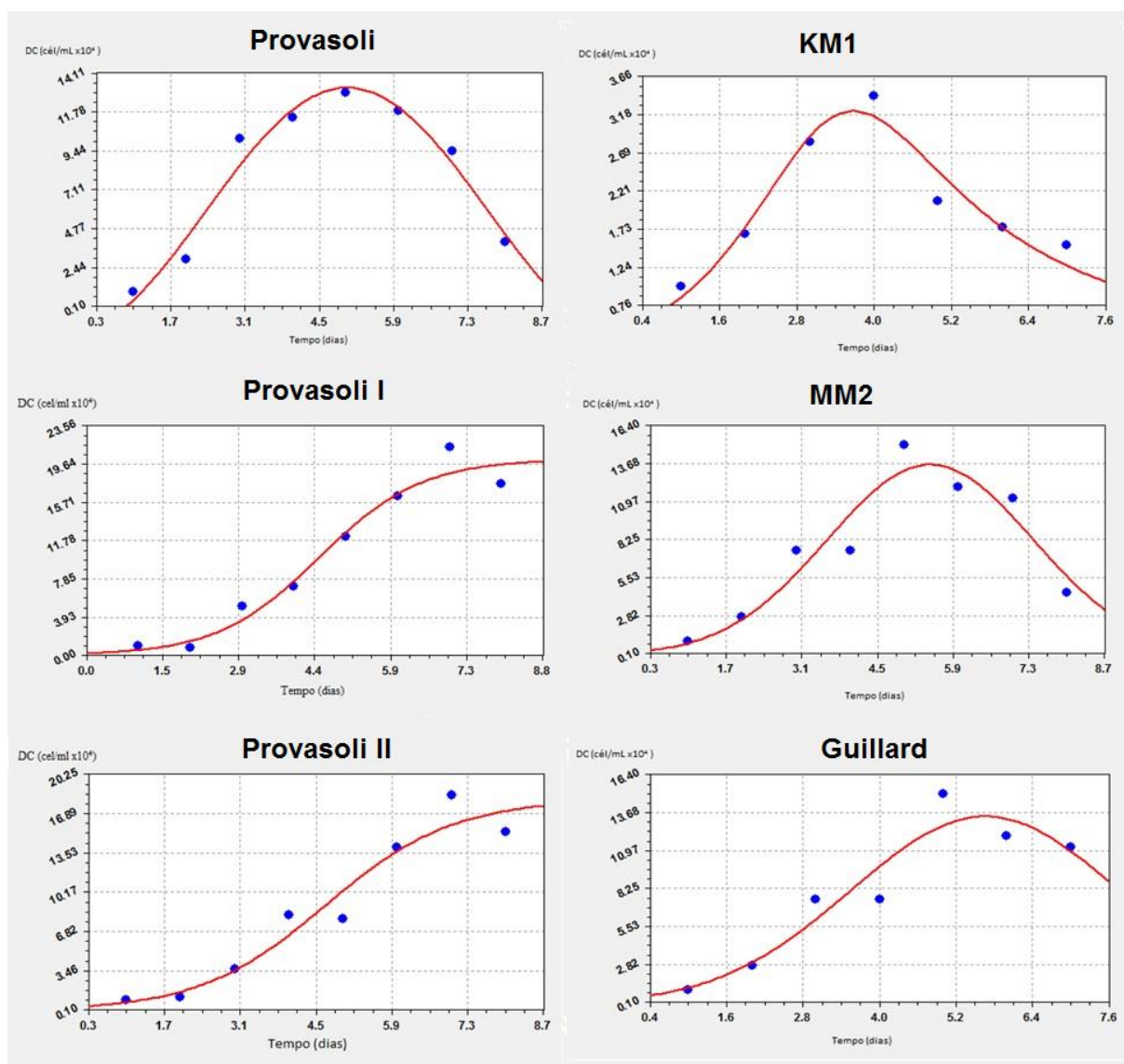
179 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

180

181 Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de crescimento que se refere a densidade
182 celular diária para cada meio de cultura avaliado. Os pontos indicam os valores obtidos
183 e a linha contínua representa a curva ajustada aplicando o modelo logístico. Em cada
184 tratamento pode ser observado que as curvas corresponderam ao modelo proposto e que
185 os coeficientes de determinação variaram entre 0,94 a 0,98, indicando que existe
186 correspondência entre os dados obtidos e aqueles da curva ajustada.

187

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.



188

189 **Figura 1.** Curvas logística do crescimento da *Haematococcus pluvialis* nos diferentes
190 meios de cultura, $y = \text{densidade celular (cél.mL} \times 10^5)$, $x = \text{tempo (dias)}$

191

192 Os desenhos das curvas foram similares, contudo, algumas diferenças foram
193 perceptíveis, para a microalga submetida ao meio KM1 e Provasoli, por exemplo, que
194 expressaram fase exponencial bastante acentuada, entrando na fase estacionária no 4° e
195 5° dia, respectivamente (Figura 1). Para os meios Provasoli modificado I e II, MM2 e
196 Guillard, a microalga apresentou fase exponencial mais tênue, levando mais tempo,
197 aproximadamente 6 dias, para entrar na fase estacionária.

198 Os valores médios do tempo de cultivo, densidade celular máxima (DCM) e velocidade
199 de crescimento (K) estão sumarizados na Tabela 2.

200

201 **Tabela 2.** Parâmetros de crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada
202 durante 8 dias em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Dados		
	K	TD	DCM
Provasoli	0,29 ± 0,12 ^a	3,49 ± 4,42 ^a	12,92 ± 4,60 ^{ab}
Provasoli modificado I	0,59 ± 0,05 ^a	1,69 ± 0,16 ^a	21,42 ± 7,84 ^a
Provasoli modificado II	0,61 ± 0,57 ^a	1,63 ± 1,81 ^a	18,5 ± 6,67 ^{ab}
KM1	0,1 ± 0,36 ^a	9,72 ± 5,68 ^a	3,42 ± 1,05 ^b
MM2	0,05 ± 0,19 ^a	21,74 ± 10,5 ^a	4,75 ± 1,42 ^b
Guillard	0,1 ± 0,1 ^a	10,25 ± 4,37 ^a	8,0 ± 3,39 ^{ab}

203 ^a Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma coluna são estatisticamente
204 diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05). Velocidade de crescimento (K),
205 tempo de cultivo (TD) e densidade celular máxima (DCM).

206

207 Diferenças significativas (P<0,05) foram observadas para a densidade celular máxima,
208 não observando diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos para o tempo de
209 cultivo e velocidade de crescimento. A densidade celular foi mais alta, quando utilizado
210 o meio de cultura Provasoli modificado I (21,42 x 10⁵ cél.mL⁻¹), seguido dos meios
211 Provasoli modificado II (18,50 x 10⁵ cél.mL⁻¹) e Provasoli (12,92 x 10⁵ cél.mL⁻¹). No
212 entanto, observou-se uma DCM inferior para os tratamentos utilizando os meios KM1,
213 MM2 e Guillard, com o meio KM1 apresentando a menor DCM (3,42 x 10⁵ cél.mL⁻¹).
214 Os resultados de DCM da microalga *H. pluvialis* em meio Provasoli modificado I
215 apresentados neste estudo foram superiores aos meios autotróficos apresentados por
216 Tripathi *et al.*,¹³ em meio Bold's Basal (BBM)²⁷ (1,5 x 10⁵ cél.mL⁻¹), Imamoglo *et al.*,²⁸
217 em meio Rudic (RM)²⁹ (9,5 x 10⁵ cél.mL⁻¹), Kaewpintong *et al.*,³⁰ em meio F1³¹ (5,44 x
218 10⁴ cél.mL⁻¹) e por Sipaúba-tavares *et al.*,¹⁵ em meio WC³² (2,1 x 10⁴ cél.mL⁻¹) e em
219 fertilizante NPK (5,4 x 10⁵ cél.mL⁻¹). Resultados de DCM também foram superiores
220 para o meio mixotrófico Provasoli modificado II, quando comparado aos resultados
221 apresentados por González *et al.*,³³ em meio Bristol's²⁷ (8,9 x10⁵ cél.mL⁻¹). Contudo,
222 para o meio heterotrófico KM1 estudado, os resultados foram semelhantes aos

223 apresentados por Tripathi *et al.*,¹³ e Tripathi *et al.*,¹⁴. Com relação a velocidade de
 224 crescimento, todos os tratamentos apresentaram o intervalo considerado normal
 225 encontrado na literatura para a espécie (0,5 – 0,9 div.dia⁻¹).^{33,34,35}

226 Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos com relação a
 227 qualidade da água para temperatura, pH e oxigênio dissolvido (Tabela 3).

228

229 **Tabela 3.** Parâmetros de qualidade da água durante o cultivo (8 dias) de
 230 *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Parâmetros		
	Temperatura (°C)	pH	OD (mg L ⁻¹)
Provasoli	26.6 ± 0.14 ^a	10.4 ± 0.20 ^a	5.7 ± 0.31 ^a
Provasoli modificado I	26.8 ± 0.33 ^a	9.5 ± 0.45 ^a	5.6 ± 0.35 ^a
Provasoli modificado II	26.7 ± 0.16 ^a	9.5 ± 0.53 ^a	5.6 ± 0.65 ^a
KM1	26.8 ± 0.39 ^a	8.5 ± 0.08 ^a	5.8 ± 0.64 ^a
MM2	27.0 ± 0.29 ^a	8.2 ± 0.21 ^a	5.5 ± 0.40 ^a
Guillard	27.2 ± 0.10 ^a	10.1 ± 0.10 ^a	5.6 ± 0.34 ^a

231 ^a Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma coluna são estatisticamente
 232 diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Oxigênio dissolvido (OD).

233

234 A temperatura entre 25 a 28 °C é considerada ideal para o crescimento da microalga *H.*
 235 *pluvialis*, acima deste, pode afetar o crescimento da espécie.^{36,37} As concentrações de
 236 oxigênio dissolvido mantiveram-se acima de 5,5 mg L⁻¹, estando dentro da faixa
 237 recomendada para o cultivo de *H. pluvialis*.¹⁵

238 Valores de pH favoráveis para a maioria dos cultivos de *H. pluvialis* estão na faixa entre
 239 6,5 e 9.³⁸ A realização de fotossíntese pelas microalgas durante o seu crescimento
 240 fotoautotrófico, causa o aumento o pH do meio, pois o aparato fotossintético transporta
 241 íons OH⁻ para o exterior da célula e os íons H⁺ para o interior. O próprio aumento da
 242 densidade celular em cultivos pode fazer com que a velocidade de utilização de carbono
 243 pelas células exceda a velocidade em que o CO₂ é fornecido para o meio, causando a
 244 diminuição do CO₂ dissolvido aumentando conseqüentemente o pH do meio.³⁹ Já em
 245 condições heterotróficas e mixotróficas, onde há uma suplementação de fontes de
 246 carbono no meio de crescimento, este pH pode ser estabilizado ou pelo menos levado a

247 um nível de pH não inibitória para o crescimento da microalga.^{40,41} Isto pode explicar a
248 variação de pH ocorrida (8,2 – 10,4) para os diferentes meios estudados.

249 Os valores médios de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides totais estão na
250 tabela 4. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para Clorofila *b*,
251 clorofila total e carotenoides totais; não observando diferença significativa ($P > 0,05$)
252 entre os tratamentos para a Clorofila *a*.

253

254 **Tabela 4.** Pigmentos fotossintéticos presentes na *Haematococcus pluvialis* cultivada em
255 diferentes meios de cultura

Pig	P	P- I	P- II	K	M	G
Cl <i>a</i>	0.16 ± 0.11 ^a	0.17 ± 0.16 ^a	0.17 ± 0.13 ^a	0.01 ± 0.03 ^a	0.33±0.75 ^a	0.09±0.08 ^a
Cl <i>b</i>	0.36 ± 0.14 ^{ab}	0.44 ± 0.15 ^a	0.40 ± 0.09 ^{ab}	0.18 ± 0.18 ^{bc}	0.24±0.40 ^c	0.13±0.11 ^c
Cl t	0.52 ± 0.17 ^a	0.62 ± 0.21 ^a	0.57 ± 0.15 ^a	0.20±0.15 ^b	0.27 ± 0.33 ^b	0.22±0.19 ^b
Car t	131.7 ± 70.7 ^a	132.1± 85.6 ^a	133.4 ± 87.8 ^a	48.74±17.6 ^b	78.69±32.4 ^{ab}	66.45±43.2 ^b

256 ^a Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma linha são estatisticamente
257 diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores dos pigmentos estão
258 expressos em mg/L⁻¹. Pigmentos fotossintéticos (Pig), clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl
259 *b*), clorofila total (Cl t) e carotenoides totais (Car t). Provasoli (P), Provasoli modificado
260 I (P-I), Provasoli modificado II (P-II), KM1 (K), MM2(M) e Guillard (G).

261

262 A concentração de clorofila *b* foi mais alta, quanto utilizados os meios de cultura
263 Provasoli modificado I (0,44 mg.L⁻¹), seguido dos meios Provasoli modificado II (0,40
264 mg.L⁻¹) e Provasoli (0,36 mg.L⁻¹). No entanto observou-se uma concentração de
265 clorofila *b* inferior para os tratamentos utilizando os meios KM1, MM2 e Guillard, com
266 o meio Guillard apresentando a menor concentração de clorofila *b* (0,13 mg.L⁻¹).

267 A concentração de clorofila total foi mais alta, quanto utilizados os meios de cultura
268 Provasoli modificado I (0,62 mg.L⁻¹), seguido dos meios Provasoli modificado II (0,57
269 mg.L⁻¹) e Provasoli (0,52 mg.L⁻¹). No entanto observou-se uma concentração de
270 clorofila total inferior para os tratamentos utilizando os meios KM1, MM2 e Guillard,
271 com o meio KM1 apresentando a menor concentração de Clorofila total (0,20 mg.L⁻¹).

272 A concentração de carotenoides totais foi mais alta quanto utilizados os meios de
273 cultura Provasoli modificado II (133,4 mg.L⁻¹), seguido dos meios Provasoli modificado
274 I (132,1 mg.L⁻¹) e Provasoli (131,7 mg.L⁻¹). No entanto observou-se uma concentração
275 de carotenoides totais inferior para os tratamentos utilizando os meios MM2, Guillard e
276 KM1, com o meio KM1 apresentando a menor concentração de carotenoides totais
277 (48,74 mg.L⁻¹).

278 Segundo Hayman *et al.*,⁴² e Olaizola,⁴³ diferentes condições do meio de cultura,
279 temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade podem causar variação nos tipos de
280 carotenóides e suas concentrações. A diferença entre as concentrações de clorofilas e de
281 carotenoides totais diferiram entre os tratamentos. Quando o meio de cultura é
282 autotrófico (Provasoli, Provasoli modificado I e Guillard) pode se observar que os
283 carotenoides aumentam, o que é explicado pelo consumo do carbono, induzido a síntese
284 de carotenoides que acontece como uma forma de estresse pela falta do nutriente.

285 Esse comportamento também foi relatado por Orosa *et al.*,³⁵ que demonstraram que as
286 células apresentaram rápido aumento da razão carotenoide/clorofila no momento em
287 que houve deficiência de nitrato no meio de cultivo. Kobayashi *et al.*,²² e Jeon *et al.*,⁴⁴
288 comprovaram que a manipulação da relação carbono/nitrogênio, para produção de
289 carotenoides, somente é eficaz na presença de luz. Portanto, intensidade luminosa é
290 primordial para produção destes pigmentos.⁴⁵

291 Tripathi *et al.*,¹³ demonstraram que a adição de acetato de sódio, L-asparagina,
292 elementos traço e vitamina B nos meios autotróficos e heterotróficos podem aumentar a
293 biomassa e a produção total de carotenoides em um menor período, reduzindo o custo
294 do processo para a produção comercial.

295

296 **CONCLUSÃO**

297

298 O meio de cultura Provasoli modificado I favoreceu a obtenção da maior densidade
299 celular e concentração de clorofilas e carotenoides da microalga *H. pluvialis*. No
300 entanto, novos experimentos devem ser conduzidos visando avaliar a quantificação de
301 pigmentos específicos (como por exemplo a astaxantina e o β -caroteno).

302

303 **REFERÊNCIAS**

304

- 305 1. Chew, B.P.; Park, J.S. Carotenoid action on the immune response. The Journal
306 of Nutrition, **2004**, 134.
- 307 2. Park, J.S.; Chyun, J.H.; Kim, Y.K.; Line, L.L.; Chew, B.P. Astaxanthin
308 decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in
309 humans. Nutrition and Metabolism, **2010**, 7.
- 310 3. Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N.; Watanabe, T. Effects of
311 dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus*
312 *mykiss*. Fisheries Science, **2000**, 66, 1068–1075.
- 313 4. Supamattaya, K.; Kiriratnikom, S.; Boonyaratpalin, M.; Borowitzka L. Effect of
314 a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response
315 and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture,
316 **2005**, 248, 207-216.
- 317 5. Pacheco, R.; Ascencio, F.; Zarain, M.; Gómez, G.; Campa, A. Enhancement of
318 superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp,
319 *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β -1.3 glucan vitamin E, and
320 β -carotene and infected with white spot syndrome virus. Latin American Journal
321 of Aquatic Research, **2011**, 39, 534.
- 322 6. Chuchird, N.; Rorkwiree, P.; Rairat, T. Effect of dietary formic acid
323 and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus*
324 *vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. SpringerPlus, **2015**,
325 4,440.
- 326 7. Rasmussen, R. S.; Morrissey, M. T.; Steve L. T. Marine biotechnology for
327 production of food ingredients. Advances in Food and Nutrition Research,
328 **2007**, 237–292.
- 329 8. Wichuk, K.; Brynjolfsson, S.; Fu, W. Biotechnological production of value-
330 added carotenoids from microalgae: Emerging technology and prospects.
331 Bioengineered, **2014**, 5, 204–208.
- 332 9. Lourenço, S.O. Em *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*.
333 Rima, 2006, 606.

- 334 10. Lamers, P.P.; Rch, J.M.V.; Bino, R.J.; Wijffels, R.H. Exploring and exploiting
335 carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications.
336 Trends Biotechnol, **2008**, 26, 631–638.
- 337 11. Flotow, J.V. Beobachtungen über *Haematococcus pluvialis*. Verhandlungen der
338 Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Deutschen Akademie der
339 Naturforscher, **1844**, 12, 413-606.
- 340 12. Kang, C.D.; An, J.Y.; Park, T.H.; Sim, S.J. Astaxanthin biosynthesis from
341 simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in
342 primary-treated wastewater. Biochemical Engineering Journal, **2006**, 31, 234-
343 238.
- 344 13. Tripathi, U.; Sarada, R.; Rao, S. R.; Ravishankar, G.A. Production of astaxanthin
345 in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. Bioresource Technology,
346 **1998**, 68, 197-199.
- 347 14. Tripathi, U.; Sarada, R.; Ravishankar, G.A. Effect of culture conditions on
348 growth of green alga - *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production.
349 Acta Physiologiae Plantarum, **2002**, 24, 323-329.
- 350 15. Sipaúba-Tavares, L.H.; Millan, R.N.; Berchielli-Morais, F.A. Effects of some
351 parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. Braz. J. Biol.,
352 **2013**, 73, 585-591.
- 353 16. Kim, Z.H.; Kim, S.H.; Lee, H.S.; Lee, C.G. Enhanced production of astaxanthin
354 by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial
355 Technology, **2006**, 39, 414-419.
- 356 17. Tjahjono, A.E.; Hayama, Y.; Kakizono, T.; Terada, Y.; Nishio, N.
357 Hyperaccumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at
358 elevated temperatures. Biotechnology Letters, **1994**, 16, 133–138.
- 359 18. García-Malea, M.C.; Fernandez, J.M.; Ceron, M.C.; Molina, E. Continuous
360 production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the
361 irradiance effect. Enzyme and Microbial Technology, **2006**, 38, 981-989.
- 362 19. Provasoli, L.; Mclaughlin, J.J.A.; Droop, M.R. The development of artificial
363 media for marine algae. Archives of Microbiology, **1957**, 25, 392-425.
- 364 20. Marinho, Y.; Moraes, L.B.; Santos, E.; Andrade, R.; Abreu, J.; Santos, A.P.F.;
365 Oliveira, A.; Gálvez, A.O. Avaliação de diferentes meios de cultura sob o ciclo

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

- 366 de vida de *Hematococcus pluvialis*. IV Congresso Latino- Americano de Algas e
367 IV Workshop da Redealgas, Florianópolis, Brasil, 2013.
- 368 21. Guillard, R. R. L. *Methods for microflagellates and nanoplankton* In: Stein, J.
369 R., ed.- Handbook of phycological methods. Culture Methods and Growth
370 Measurements. Cambridge, University Press, 69-85, 1973.
- 371 22. Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Nishio, N.; Nagai, S.; Kurimura, Y.; Tsuji, V.
372 Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*.
373 Applied Microbiology and Biotechnology, **1997**, 48, 351-356.
- 374 23. Pindich, R.; Rubinfeld, D. *Econometric models and economic forecasts*. 2nd ed.
375 Mc Graw-Hill, New York, USA, 1981, 475-492.
- 376 24. STEIN, J. Handbook of phycological methods; Culture methods and growth
377 measurements, Cambridge: University Press 1973.
- 378 25. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic
379 biomembranes. In: Lester Packer RD, editor. Methods in Enzymology:
380 Academic Press, **1987**, 350–382.
- 381 26. Wellburn, A.R. The Spectral Determination of Chlorophylls A and B, as Well as
382 Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of
383 Different Resolution. *Journal of Plant Physics* (1994) 144, 307-313,
384 doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- 385 27. Bischoff, H.W.; Bold, H.C. Phycological studies: IV. Some soil algae from
386 Enchanted Rock and related algal species. - University of Texas Publications,
387 **1963**, 6318, 1-95.
- 388 28. Imamoglu, E.; Vardar Sukan, F.; Conk Dalay, M. Effect of Different Culture
389 Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*.
390 International Journal of Natural and Engineering Sciences, **2007**, 1, 05-09.
- 391 29. Rudic, V.; Dudnićenco T. Process for cultivation of green alga *Haematococcus*
392 *pluvialis* (Flotow). MD Patent Nr. A 2000 0154, **2000**.
- 393 30. Kaewpintong, K.; Shotipruka, A.; Powtongsookb, S.; Pavasanta, P.
394 Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus*
395 *pluvialis* in airlift bioreactor. Bioresource Technology, **2007**, 98, 288–295.

- 396 31. Fabregas, J.; Dominguez, A.; Garcia-Alvarez, D.; Lamela, T.; Otero, A.
397 Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies
398 in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, **1998**, 20, 623–626.
- 399 32. Guillard, R.R.; Lorenzen, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidae. *Journal*
400 *of Phycology*, **1972**, 8, 10-14.
- 401 33. González, M.A.; Cifuentes, A.S.; Gómez, P.I. Growth and total carotenoid
402 content in four chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under
403 laboratory conditions. *Gayana Bot*, **2009**, 66, 58-70.
- 404 34. Hagen, C.W.B.; Greulich, F. Functional aspects of secondary carotenoids
405 in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). IV. Protection
406 from photodynamic damage. *Journal of Photochemical and Photobiology*, **1993**,
407 20, 153-160.
- 408 35. Orosa, M.; Franqueira, D.; Cid, A.; Abalde, J. Analysis and enhancement of
409 astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*,
410 **2005**, 96, 373-378.
- 411 36. Fan, L.; Vonshak, A.; Boussiba, S. Effect of temperature and irradiance on
412 growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **1994**, 30, 829–
413 833.
- 414 37. Wana, M.; Zhanga, J.; Houa, D.; Fana, J.; Lia, Y.; Huanga, J.; Wang, J. The
415 effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of
416 *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource*
417 *Technology*, **2014**, 167, 276–283.
- 418 38. Sarada, R.; Tripathi, U.; Ravishankar, G.A. Influence of stress on astaxanthin
419 production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions.
420 *Process Biochemistry*, **2002**, 37, 623–627.
- 421 39. Andersen, R. A. (Ed.). *Algal culturing techniques*. Amsterdam: Elsevier
422 Academic Press, 2005.
- 423 40. Wood, B.J.B.; Grimson, P.H.K.; German, J.B.; Turner, M. Photoheterotrophy in
424 the production of phytoplankton organisms. *J. Biotechnol.*, **1999**, 70, 175–183.
- 425 41. Perez-Garciaa, O.; Escalantea, F.M.E.; De-Bashana, L.E.; Bashana, Y.
426 Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water*
427 *Research*, **2011**, 45, 11–36.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

- 428 42. Hayman, E. P.; Yokoyama, H.; Chichester, C. O.; Simpson K. L. Carotenoid
429 biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. Journal of Bacteriology, **1974**, 120, 1339-
430 1343.
- 431 43. Olaizola, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus*
432 *pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. Journal of Applied
433 Phycology, **2000**, 12, 499-506.
- 434 44. Jeon, Y.C.; Cho, C.W.; Yun, Y.S. Combined effects of light intensity and acetate
435 concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*.
436 Enzyme and Microbial Technology, **2006**, 39, 490-495.
- 437 45. Li, Y.; Sommerfeld, M.; Chen, F.; Hu, Q. Effect of photon flux densities on
438 regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis*
439 (Chlorophyceae). Journal of Applied Phycology, **2010**, 22, 253-263.

440

441 **4. 1- Normas da Revista Química Nova**

442

443 **1. GERAL**

444 Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em
445 Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como
446 artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de
447 artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico (clique [aqui](#) para
448 acessar as normas de restrição). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das
449 modalidades abaixo:

450 **Artigos Originais:** refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma
451 usual de apresentação, contendo as seções *Introdução*, *Parte Experimental*, *Resultados*
452 *e Discussão*, *Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada
453 trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e
454 outros elementos.

455 **Artigos sobre Educação:** trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de graduação
456 em Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-
457 graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e
458 outros elementos.

459 **Notas Técnicas:** trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou
460 acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que
461 apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação,
462 contendo as seções *Introdução*, *Parte Experimental*, *Resultados e Discussão*, *Conclusão*
463 *e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no
464 máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

465 **Assuntos Gerais:** abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como
466 política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc.
467 Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros
468 elementos.

469 **Artigos de Revisão:** destinados à apresentação do progresso em uma área específica de
470 Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do
471 especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas,
472 incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

473 *Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações*
474 *que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do*
475 *manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, para quimicanova@sbq.org.br, um*
476 *resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência*
477 *do trabalho e lista de publicações do autor na área em que pretende publicar. O*
478 *material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o*
479 *envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início*
480 *ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a*
481 *publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente*
482 *ao das outras modalidades.*

483

484 **2. ANTES DA SUBMISSÃO**

485 **2.1 Direitos autorais**

486 Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi
487 publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que
488 não será publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo
489 formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o
490 autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os
491 autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos
492 para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para
493 publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

494 **2.2 Organização do manuscrito**

495 Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá
496 identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do
497 problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas
498 da literatura não serão aceitas.

499 A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*,
500 mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá
501 brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção
502 *Resultados e Discussão*.

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

503 A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira
504 suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau
505 de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades
506 utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A
507 instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a
508 instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

509 Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados
510 espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão
511 substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da
512 pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos
513 sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas,
514 sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico
515 for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos
516 cromatogramas e/ou espectros devem ser inclusas no Material Suplementar (ver seção
517 *Material Suplementar*).

518 Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas
519 em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é
520 suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os
521 métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando
522 brevemente as modificações realizadas pelo autor.

523 É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos
524 e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser
525 enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito.
526 A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

527 Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do
528 processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um
529 certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido
530 pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do
531 manuscrito.

532 **2.3 Preparo dos manuscritos**

533 *Geral*

534 Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O
535 espaçamento entre linhas deve ser de 1,5×. As páginas devem ser numeradas
536 consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções
537 não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa
538 alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

539 O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter
540 informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver
541 seção Material Suplementar).

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

542 **Detalhes**

543 A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*),
544 título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o
545 endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um
546 dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo
547 autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados
548 utilizando-se letras sequenciais.

549 **Um exemplo:**

550 **José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}**

551 ^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá -
552 PR, Brasil

553 ^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São
554 Paulo, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

555 *e-mail: jalmeida@dq.uem.br

556 Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com
557 asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do
558 endereço deve ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a
559 faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios,
560 programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda
561 página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo
562 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em
563 inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.
564 Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

565 • Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em
566 itálico.

567 • Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do
568 nome em caixa alta.

569 **Alguns exemplos:**

570 ... os experimentos foram realizados *in situ*;

571 A bactéria *Escherichia coli*...;

572 O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

573 • Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive
574 o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

575

576 **Alguns exemplos:**

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

577 10 °C;

578 15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

579 10 m s⁻² (evitar m/s²);

580 **Atenção:** Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com
581 as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of*
582 *Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical*
583 *Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC.
584 Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

585 *Normas para elementos gráficos e tabelas*

586 **Gráficos e Figuras:** textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que
587 acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho
588 em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos
589 gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

590 **Fórmulas estruturais e equações químicas:** todas as estruturas químicas ou equações
591 devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

592 **Equações:** as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações
593 (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo
594 do manuscrito.

595 **Fotografias:** As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens.
596 Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não
597 abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

598 **Tabelas:** as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao
599 leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve
600 vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim
601 por diante.

602 **Graphical abstract (em inglês):** O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do
603 trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor
604 deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma
605 reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades.
606 Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas
607 fotos de equipamentos comerciais.

608 **Atenção:** a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro
609 de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de
610 largura [**os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões**]. Junto com o
611 *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo
612 .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

613 *Normas para citações e lista de referências*

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

614 Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-
615 se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

616 Alguns exemplos:

617 ... como pode ser verificado na Tabela 1.

618 A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

619 (*Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser*
620 *utilizadas*)

621 As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica
622 sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver.
623 Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três
624 ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não
625 utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está
626 posicionada.

627 A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser
628 inclusas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações,
629 mantendo inclusive a sequência numérica.

630 Alguns exemplos:

631 Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

632 Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades
633 dos materiais empregados.¹³

634 salicilato de sódio,¹⁻³

635 Nishide *et al.*,⁴

636 ... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

637 (*Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen*)

638 Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo
639 com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>).
640 Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

641 As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de
642 literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser
643 verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão
644 reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

645 1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

646 2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu
647 número de Chemical Abstract, como segue:

648 Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh.*
649 *Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

650 3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar DOI da seguinte
651 maneira:

652 Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.;

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

653 *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.
 654 4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de
 655 uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:
 656 Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.;
 657 Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem.*
 658 *Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.;
 659 *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

660 Patentes:

661 Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do
 662 Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).
 663 5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai*
 664 *Tokkyo Koho* *79 73,771 1979*.(CA *91:P193174v*)
 665 6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988*. (CA *110:P23729y*)
 666 7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI 9.604.468-3,1999*.

667 Livros:

668 *com editor(es):*

669 8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*;
 670 Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

671 *sem editor(es):*

672 9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New
 673 York, 1988.

674 Programas de computação (Softwares):

675 10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*;
 676 Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

677 Teses:

678 11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
 679 Brasil, 1997.

680 Material apresentado em Congressos:

681 12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira*
 682 *de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

683 Páginas Internet:

684 <http://www.sbg.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

685 Material não publicado:

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

686 Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.
687 Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*,
688 submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.;
689 trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não
690 publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na
691 sua obtenção.

692 ***Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.***

693 Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido
694 previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros)
695 como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da
696 submissão do manuscrito.

697 ***Material Suplementar***

698 Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número
699 estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

700 O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho,
701 após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção
702 MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de
703 seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da
704 revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

705 Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas
706 sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

707 Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento
708 completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS
709 e numeradas na forma 1S, 2S, ...

710 Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação
711 de Material Suplementar.

712

713 **3. DURANTE A SUBMISSÃO**

714 A QN oferece aos autores apenas submissão on line.

715 Todos os autores devem ter seus nomes introduzidos na plataforma, portanto, durante a
716 submissão, preencha os campos necessários informando o endereço de e-mails dos
717 coautores.

718 Na plataforma ScholarOne-QN é necessário fazer o *upload*, SEPARADAMENTE, dos
719 seguintes materiais:

SANTOS, A Paula Felipe. Avaliação de níveis de pigmentos e crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) cultivada em diferentes meios de cultura.

- 720 1. *Main document* (full.doc), incluindo todas as figuras, tabelas e respectivas
721 legendas, as quais devem ser inseridas após a primeira citação. Esse arquivo
722 deve ser feito utilizando, necessariamente, o modelodisponível para *download*.
723 No caso do manuscrito conter Material Suplementar, esse deve ser adicionado
724 no final do *main document*.
725 2. Todos os arquivos originais de figuras, incluindo o *graphical abstract*, em jpg,
726 tiff, opj, xls, cdx, etc. Por exemplo, se o manuscrito contiver 6 figuras, é
727 necessário fazer o upload dos 6 arquivos originais (opj, xls, tiff, etc.) e também o
728 *main document* com as figuras inclusas.

729 Observação:

- 730 - No caso da figura ser um arquivo de imagem, esse precisa ter alta resolução
731 (mínimo de 300 dpi);
732 - Por favor, não envie as figuras inseridas num arquivo .doc, envie todos os
733 arquivos originais (opj, xls, tiff, etc.). Isso irá acelerar a avaliação de seu
734 manuscrito e o processo de publicação, no caso de o manuscrito ser aceito.

735 Atenção: apesar de a versão online da revista ser colorida, as impressões são
736 feitas em preto e branco (exceto pelos *graphical abstracts*). Ao produzir as
737 figuras, os autores devem ter em mente que estas serão convertidas no momento
738 da impressão, evitando assim possível perda de informações baseadas
739 unicamente nas cores.

- 740 3. Um único arquivo .doc ou .docx contendo todas as tabelas;
741 4. Arquivos originais das figuras do Material Suplementar.

742 A *Editoria de QN* reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas
743 alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu
744 estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que
745 seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de
746 metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho poderá
747 ser atestada por consultor(es) *ad hoc*, indicados pela *Editoria*.

748
749
750
751
752
753
754