

**ALEXSANDRO CLAUDINO DOS SANTOS**

**ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *Haematococcus pluvialis***

**Tese apresentada ao Curso de ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.**

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi

**SÃO CARLOS**

**2015**



**ALEXSANDRO CLAUDINO DOS SANTOS**

**ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *Haematococcus pluvialis***

**Tese apresentada ao Curso de ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.**

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi

**SÃO CARLOS**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S237ee Santos, Alexsandro Claudino dos.  
Estudo ecofisiológico de *Haematococcus pluvialis* /  
Alexsandro Claudino dos Santos. -- São Carlos : UFSCar,  
2015.  
125 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2015.

1. Microalga. 2. Cultura e meios de cultura - biologia. 3.  
pH. 4. Fotossíntese. 5. Composição bioquímica. I. Título.

CDD: 589.3 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Alexandro Claudino dos Santos, realizada em 30/03/2015:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

Profa. Dra. Moira Nunes  
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
UFSCar

Profa. Dra. Suzelei Rodigher  
UNESP

Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi  
Unifesp

*À minha querida Família...*

*...meus pais Dorgival Silva Santos (in memorian) e Ivonete Claudino Santos...*

*...meus irmãos Allan Claudino e Rosa Correia...*

*...meus tios Elizete Silva Santos, Elinete Silva Santos, Helenita Silva Santos, Eliete Silva Santos, Edna Maria Silva Santos e Evandro Daniel Silva Santos...*

*...minha cunhada Maria Elias...*

*...meus irmãos do Instituto Espírita Manoel Batista - IEMB (Maceió - AL)...*

*...meus irmãos da Sociedade Espírita Obreiros do Bem - SEOB (São Carlos-SP)...*

*...que sempre acreditaram em mim, me apoiando e incentivando  
através de gestos de amor e carinho que fizeram parte  
dessa importante etapa de minha vida...*

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de crescimento e valorização da vida.

À Universidade Federal de São Carlos, que me permitiu dar mais um passo na jornada do conhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão das bolsas de estudos.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi, pelo exemplo de comprometimento, responsabilidade, justiça e competência no trabalho e pela dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado.

Aos professores Dr. Clóvis Wesley, Dr.<sup>a</sup> Odete Rocha e Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça G. Melão pelas contribuições para a melhoria do trabalho de qualificação.

Ao técnico Carlos Aparecido Casali pelo apoio, ajuda e aprendizagem.

Aos amigos biólogos Adriano Evandir Marchello, Andréa Cristina Morales, Jaqueline Carmo e Pedro Echeveste pelo companheirismo e apoio em todos os momentos do Doutorado.

Aos meus colegas de laboratório e de pós-graduação, Camila Cândido, Daniela Mariano, Dalva Aparecida Sousa, Sílvia Brondi, Leonardo de Faria, Moira Nunes, Letícia Andrade, Raquel Rossi, Graziela Montanhim, Renata Natsumi Haneda, Eduardo C. Camargo, Mônica Bonini, Thaís F. Massocato, que tornaram um período de longa dedicação em algo divertido.

Aos amigos inestimáveis Carlos Alessandro Posca e Diôgo Silva de Oliveira pelo convívio harmônico, companheirismo, momentos de alegria e descontração que tornam a vida mais feliz.

À família Dezena Cabrelon, especificamente ao amigo Marcelo Dezena pelo apoio suporte e generosidade no período de adaptação e estabelecimento em São Carlos.

À família Pereira Novo, representados nos amigos Eurídice e Djalma, pelo amor, acolhimento e amizade.

Aos meus primeiros amigos em São Carlos, Bia de Oliveira, Léo Queiroz, Camila Attuy, Lourival Neto, Ricardo Sundermann, Rodrigo Paschoalino e Letícia Carnaz, pelo ambiente saudável e amigo.

A todas as formas de vida, que sempre me instigaram e incentivaram a continuar buscando respostas.

*“Vive de tal forma que deixes pegadas luminosas no caminho percorrido, como estrelas apontando o rumo da felicidade e não deixes ninguém afastar-se de ti sem que leve um traço de bondade, ou um sinal de paz da tua vida.”*

**Joanna de Ângelis.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROALGAS .....	18
<b>2 DESAFIOS E OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 DESAFIOS .....	22
2.2 OBJETIVOS.....	22
2.2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
3.1 O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS .....	26
3.2 CAROTENOIDES E BIOSÍNTESE DE ASTAXANTINA EM <i>Haematococcus</i> <i>pluvialis</i> .....	27
3.3 A MICROALGA <i>Haematococcus pluvialis</i> , CICLO DE VIDA E FISILOGIA .....	34
3.4 FATORES DE CRESCIMENTO.....	39
3.5 SISTEMAS DE CULTIVOS.....	42
3.6 FLUORESCÊNCIA <i>IN VIVO</i> EM CULTURAS DE MICROALGAS .....	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	52
4.2 CULTURAS.....	53
4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	53
4.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO .....	58
4.5 PARÂMETROS DA CINÉTICA DE INDUÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA.....	59
4.6 CURVAS DE SATURAÇÃO DA FOTOSÍNTESE EM RESPOSTA À RADIÇÃO LUMINOSA (CURVAS DE LUZ).....	60
4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA DA BIOMASSA .....	61
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO .....	65

5.2	CRESCIMENTO, FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>H. pluvialis</i> EM DIFERENTES pHs.....	68
5.3	CRESCIMENTO, FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>H. pluvialis</i> , EM CULTURAS CONTÍNUAS E ESTANQUES. ....	82
5.4	CURVAS DE SATURAÇÃO DE LUZ DE <i>H. pluvialis</i> EM CULTURAS CONTÍNUAS E ESTANQUES. ....	93
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Sistema microalgal para a produção combinada de biocombustíveis, biomitigação de CO<sub>2</sub>, e remoção N/P de águas residuais. *Entradas*: fonte de carbono, CO<sub>2</sub>; fontes de nitrogênio e fósforo, esgoto rico N/P; fonte de energia, a energia solar. *Saídas*: efluentes pobres N/P, bioprodutos de valor agregado, e os biocombustíveis. Fonte: Wang et al. (2008). .....27
- Figura 2 – Valor de Mercado Global de Carotenoides. Fonte: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>.....28
- Figura 3 – Estruturas químicas de carotenos e xantofilas. O segmento linear destacado na estrutura do β-caroteno corresponde ao esqueleto central de 22 carbonos comum a todos os carotenos e xantofilas. Fonte: La Fuente et al., (2006). .....30
- Figura 4 – Vias de biossíntese de astaxantina primária em *Haematococcus pluvialis* (Rota metabólica 1) e *Chlorella zofingiensis* (Rota metabólica 2). BKT = β-caroteno cetolase; CrtR-b = β-caroteno hidroxilase. Fonte: Han et al. (2013). .....34
- Figura 5 – **Ciclo de vida do *Haematococcus pluvialis***. **A.** Imagens de microscopia de fluorescência, mostrando as fases de 1 a 32 células, e a fase flagelada. DIC: microscopia de contraste de interferência diferencial; SYBR: SYBR Green® I – corante celular (verde); CHL: autofluorescência da clorofila (vermelho); e Revestimento: imagens de SYBR e CHL sobrepostas. **B.** Ilustração do ciclo de vida de *H. pluvialis*. **Regeneração**: quando as culturas antigas são transplantadas em meio fresco, as células cocoides sofrem divisão celular para formar células flageladas dentro da parede da célula-mãe. **Germinação**: células flageladas se estabilizam e se tornam células cocoides. Luz forte e/ou contínua aceleram o acúmulo de astaxantina durante encistamento (setas vermelhas). Fonte: Wayama et al. (2013). .....35
- Figura 6 – Figuras de *Haematococcus pluvialis*. **A.** Forma vegetativa, biflagelada (3 dias); **(B)** Forma palmeloide (8 dias); **(C)** aplanósporo (14 dias) e **(D)** hematocisto maduro (32 dias). Fotos obtidas de culturas do autor. ....37
- Figura 7 – O pH no sistema CO<sub>2</sub> – carbonato em águas naturais. As quantidades relativas dos 3 componentes, CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, determinam o pH da água, como mostrado na figura. Alterações na concentração de um componente desloca o equilíbrio. Retirada fotossintética de CO<sub>2</sub> podem elevar o pH até o ponto onde CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> é precipitado como um sal de cálcio. ....42
- Figura 8 – Sistemas abertos para produção de microalgas. **A.** Produção de *Dunaliella salina* em lagoas abertas na Austrália. **B.** Sistema *raceway*, cultivo de *Spirulina* nos EUA. **C.** Lagoa circular para produção de *Chlorella* em Taiwan. **D.** Produção de *Nannochloropsis* para aquicultura. Fonte: Borowitzka (2005), Chisti (2007) e Benemann (2008). ....43
- Figura 9 – Geometrias comuns na construção de fotobiorreatores. **A.** Plana. **B.** Tubular. **C.** Cilíndrica. Fonte: Adaptado de Jacobi et al. (2010). ....44
- Figura 10 – Representação esquemática do desenvolvimento de *H. pluvialis* em um cultivo estanque (Meio Oligo modif. suplementado com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), exibindo cinco fases distintas de crescimento. Fonte: Resultados desta pesquisa. ....45
- Figura 11 – Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em cultivo semicontínuo, com as características de variações de densidade de células em decorrência das remoções dos cultivos. Fonte: Chia et al. (2013). ....46
- Figura 12 – Representação esquemática simplificada do processo fotossintético. Fonte: Campostrini (1998). ....48
- Figura 13 – Esquema genérico de construção de fluorímetro (sistema modulado) LA: fonte luminosa (luz actínica branca; LM: luz modulada; D: detector; am: amplificador sincronizado com o pulso da fonte luminosa; F: filtro de banda longa (690, 710 e 730 nm). Fonte: (BOLHÄR-NORDENKAMPF et al., 1989). ....49

Figura 14 – Definição dos coeficientes de extinção e terminologia característica dos parâmetros da fluorescência medida com fluorímetros modulados. Note-se que com luz actínica desprezível, $F_0$ é facilmente discernível. $F_{max}$ é a fluorescência máxima obtida de amostra adaptada ao escuro e posteriormente submetida a pulso saturante de luz. $(F_v)_{max}$ , emitindo a fluorescência máxima variável. A dissipação fotoquímica ( $qP$ ) e não-fotoquímica ( $qN$ ) são, respectivamente, determinadas por aplicação de um breve pulso de saturação em qualquer momento através da curva de indução, tal como indicado na Figura. $(F_v)_{sat}$ é a fluorescência variável obtida com a adição do pulso de saturação. Figura obtida de um fluorímetro modelo Mini-PAM (Walz, Alemanha) e adaptada partir de Schreiber et al. (1986).....	50
Figura 15 – Fase vegetativa da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> . Foto obtida de culturas do autor. ....	52
Figura 16 – Fluxograma do planeamento experimental.....	54
Figura 18 – Frascos de cultura de <i>Haematococcus pluvialis</i> suplementados com CO <sub>2</sub> empregados nos experimentos.....	57
Figura 19 – Fotobiorreatores cilíndricos empregados nos experimentos. Cultivo contínuo de <i>Haematococcus pluvialis</i> suplementados com CO <sub>2</sub> .....	58
Figura 20 – Curva típica Fotossíntese versus Irradiância, indicando os parâmetros obtidos. Fonte: Adaptado de Harding et al., (1987).....	60
Figura 21 – Curvas de crescimento de <i>H. pluvialis</i> em diferentes meios de cultivos (25 °C e 65 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). <b>Símbolos:</b> ■ <b>Meio 1:</b> Oligo; ■ <b>Meio 2:</b> Oligo [NaHCO <sub>3</sub> (2×)]; ■ <b>Meio 3:</b> Oligo [NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)]; ■ <b>Meio 4:</b> Oligo [NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (2×)]; ■ <b>Meio 5:</b> Oligo [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2×)]; ■ <b>Meio 6:</b> Oligo (2×) [NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)]; ■ <b>Meio 7:</b> Oligo [NH <sub>4</sub> Cl + vitaminas]. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.....	66
Figura 22 – Taxas de crescimento específicas (médias $\pm$ SD) e teste de comparação de suas médias para os cultivos de <i>H. pluvialis</i> . <b>Tratamentos:</b> (1) Meio Oligo; (2) Meio Oligo [NaHCO <sub>3</sub> (2×)]; (3) Meio Oligo [NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)]; (4) Meio Oligo [NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (2×)]; (5) Meio Oligo [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2×)]; (6) Meio Oligo (2×) [NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)]; (7) Meio Oligo [NH <sub>4</sub> Cl + vitaminas]. Valores seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....	67
Figura 23 – Variação do pH em culturas tamponadas de <i>H. pluvialis</i> em função do tempo experimental. <b>Símbolos:</b> ■ Controle; ◇ pH 6.0; ▼ pH 6.3; Δ pH 6.7; ● pH 7.2. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....	68
Figura 24 – Valores médios, desvio padrão e teste de comparação de médias das taxas de crescimento nos cultivos de <i>H. pluvialis</i> sob diferentes pHs. As médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ....	70
Figura 25 – Densidade populacional em logaritmo natural (Ln) e $F_v/F_m$ de culturas de <i>H. pluvialis</i> tamponadas em pH em função do tempo experimental. <b>Símbolos:</b> ■ Controle (a); ◇ pH 6.0 (b); ▼ pH 6.3 (c); Δ pH 6.7 (d); ● pH 7.2 (e). Barra de erro representa o desvio padrão. Amostragem para $F_v/F_m$ e densidade celular realizada no 5º dia de cultivo, garantia de fase exponencial de crescimento.....	72
Figura 26 – Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ – barra preta; eixo y esquerdo), fluorescência máxima ( $F_m$ – barra cinza; eixo y direito) e fluorescência inicial ( $F_0$ – barra branca; eixo y direito), das culturas de <i>H. pluvialis</i> no crescimento exponencial. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ....	73
Figura 27 – Valores médios de dissipação fotoquímica ( $qP$ – barra cinza) e dissipação não-fotoquímica relacionado à perda de calor (NPQ – barra branca). Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ....	73
Figura 28 – Concentração de proteínas totais (barra preta), carboidratos totais (barra cinza) e lipídios totais (barra branca) em culturas de <i>H. pluvialis</i> em fase exponencial de crescimento em	

- função do pH. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....76
- Figura 29 – Razão proteína:carboidrato (P:C) no crescimento exponencial de culturas de *H. pluvialis* tamponadas em diferentes pH. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....76
- Figura 30 – Composição relativa de classes lipídicas durante crescimento exponencial em culturas de *H. pluvialis* tamponadas em diferentes pH. **Síglas:** HC – hidrocarbonetos alifáticos, WE – éster de cera, TG – triacilgliceróis, FFA – ácidos graxos livres, ALC –álcool alifático livre, ST –esteróis livres, AMPL –lipídio polar móvel em acetona e PL – fosfolipídios. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....79
- Figura 31 – Curva de crescimento de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....83
- Figura 32 – Variação do pH em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo) de *H. pluvialis* em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▼ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; Δ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ◇ **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....84
- Figura 33 – Taxas de crescimento específicas para culturas estanques e contínuas de *H. pluvialis*. **Tratamentos:** (1) **Estanque:** Controle; (2) **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; (3) **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; (4) **Contínuo:** Controle; (5) **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; (6) **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Os valores representam a média ±SD. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ....85
- Figura 34 – Densidade populacional em logaritmo natural (Ln) e rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) de culturas de *H. pluvialis* em regimes de cultivo (estanque e contínuo) em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▼ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; Δ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ◇ **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....86
- Figura 35 – Fluorescência inicial –  $F_0$  (U. A.), das culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....87
- Figura 36 – Fluorescência máxima ( $F_m$ ), das culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....88
- Figura 37 – Rendimento quântico efetivo ( $F_v'/F_m'$ ), das culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.....88
- Figura 38 – Valores médios obtidos para a dissipação fotoquímica ( $qP$ ) em culturas de *H. pluvialis*, em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%;

- ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.....91
- Figura 39 – Valores médios obtidos para a dissipação não-fotoquímica relacionado à perda de calor (NPQ) em culturas de *H. pluvialis*, em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas. ....91
- Figura 40 – Concentração de proteínas (cinza escuro) e carboidratos totais (cinza claro) durante crescimento exponencial de *H. pluvialis* em modalidades de cultivo estanque e contínuo. Barra de erro representa o desvio padrão. **Tratamentos:** (1) **Estanque:** Controle; (2) **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; (3) **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; (4) **Contínuo:** Controle; (5) **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; (6) **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....92
- Figura 41 – Razão proteína:carboidrato (P:C) no crescimento exponencial de culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). Barra de erro representa o desvio padrão. **Tratamentos:** (1) **Estanque:** Controle; (2) **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; (3) **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; (4) **Contínuo:** Controle; (5) **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; (6) **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....93
- Figura 42 – Curva de Saturação de Luz (RLC): Fotossíntese (rETR) versus Irradiância (PAR) de *H. pluvialis* sob diferentes condições de cultivo. A: curva com todos os pontos; B: ampliação de parte da curva A, incluindo rETR (0 – 140) e PAR (0 – 350). **Símbolos:** ► **Estanque:** Controle; ■ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ● **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ◆ **Contínuo:** Controle; ▲ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◆ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.....97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Discriminação dos três grupos de aplicações de algas com seus requisitos de produção. ...	19
Tabela 2 – Principais microalgas produtoras de astaxantina, as respectivas concentrações produzidas por biomassa seca (% massa / massa) e referências onde foram obtidas.....	32
Tabela 3 – Concentrações finais dos componentes dos meios de cultura autotróficos usados para cultivo de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Os valores estão expressos em molar (M), indicado em g L <sup>-1</sup> .....	56
Tabela 4 – Meios de cultura testados em culturas de <i>H. pluvialis</i> . ....	65
Tabela 5 – Composição de ácidos graxos de <i>H. pluvialis</i> em diferentes pH (% p/p, n=3). Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....	81
Tabela 6 – Valores de taxa de crescimento, densidade celular máxima e eficiência quântica (Fv/Fm) para os vários tratamentos desta pesquisa.....	86
Tabela 7 – Parâmetros das curvas fotossíntese-irradiância (F-I) da população de <i>H. pluvialis</i> em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores fornecidos pelo Phyto-PAM. ....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu$	Taxa específica de crescimento
$\alpha$	Eficiência fotossintética ( $\text{mg C mg Chl } a^{-1}/\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
$\phi$ PSII	Eficiência qu\u00e2ntica fotoqu\u00edmica efetiva do PSII
ALC	\u00c1lcoois alif\u00e1ticos livres
AMPL	Lip\u00eddios polares m\u00f3veis em acetona
ANOVA-ONEWAY	An\u00e1lise de vari\u00e2ncia simples
ATP	Adenosina 5-trifosfato
BKT	$\beta$ -caroteno cetolase;
CCM	Mecanismo de concentra\u00e7\u00e3o de carbono
CHL	Autofluoresc\u00eancia de clorofila
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
CrtR-b	$\beta$ -caroteno hidroxilase
$d^{-1}$	Divis\u00f5es por dia
DIC	Microscopia de contraste de interfer\u00eancia diferencial
ETR	Taxa de transporte de el\u00e9trons
FAME	\u00c9steres met\u00edlicos de \u00e1cidos graxos
FFA	\u00c1cidos graxos livres
$F_m$	Fluoresc\u00eancia m\u00e1xima ap\u00f3s adapta\u00e7\u00e3o ao escuro (unidade relativa)
$F_m'$	Fluoresc\u00eancia m\u00e1xima na presen\u00e7a de luz (unidade relativa)
$F_o$	Fluoresc\u00eancia basal ap\u00f3s adapta\u00e7\u00e3o ao escuro (unidade relativa)
$F_v$	Fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel ap\u00f3s adapta\u00e7\u00e3o ao escuro (unidade relativa)
$F_v/F_m$	Eficiência qu\u00e2ntica m\u00e1xima do fotossistema II
$F_v'/F_m'$	Eficiência qu\u00e2ntica efetiva do fotossistema II
GC/MS	Cromatografia
HC	Hidrocarbonetos alif\u00e1ticos
HPLC	Cromatografia l\u00edquida de alta efici\u00eancia
$I_k$	Irradi\u00e2ncia de satura\u00e7\u00e3o ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
IPP	Pirofosfato de isopentila
KET	Etil cetona
LHC <sub>II</sub>	Sistema coletor de luz acoplado ao fotossistema II
min	Minuto
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleot\u00eddeo fosfato reduzido
NPQ	Coefficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmica da fluoresc\u00eancia
p/p	Rela\u00e7\u00e3o peso por peso
P:C	Raz\u00e3o prote\u00edna:carboidrato
PAR	Radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa
PGA	\u00c1cido fosfoglic\u00e9rico
PL	Fosfolip\u00eddios
$P_{\text{max}}$	Taxa m\u00e1xima da fotoss\u00edntese ( $\mu\text{mol C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
$Q_A$	Quinona A
$q_N$	Coefficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmica da fluoresc\u00eancia
$q_P$	Coefficiente de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica da fluoresc\u00eancia
$r\text{ETR}_{\text{max}}$	M\u00e1xima taxa relativa de transporte de el\u00e9trons
RFA	Radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUBISCO	Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
ST	Esteróis livres
SYBR	Corante celular SYBR Green ®
TG	Triacilgliceróis
TLC/FID	Cromatografia de camada delgada com detecção por ionização de chama
u. r.	Unidades relativa
v/v	Relação volume por volume
WE	Ésteres de cera

## RESUMO

A microalga *Haematococcus pluvialis* tem sido estudada por ser uma das principais fontes naturais do carotenoide astaxantina, potente antioxidante com aplicações na indústria de nutracêuticos e cosméticos. *H. pluvialis* é uma microalga Chlorophyceae cujo ciclo de vida inclui uma fase de encistamento onde o pigmento é acumulado. Apesar de registrar-se um aumento de processos e aplicações envolvendo *H. pluvialis*, suas culturas dificilmente atingem elevada biomassa e a espécie é considerada sensível a variações ambientais, com crescimento lento. Assim, a produção e uso do pigmento e do micro-organismo tornam-se dependentes do desenvolvimento de tecnologia relativas aos fatores biológicos, físicos e químicos, cujas interações resultem em alta produção de células verdes para que posteriormente formem cistos vermelhos repletos de astaxantina. Nesta pesquisa buscou-se otimizar o crescimento vegetativo da microalga, aumentando o rendimento de biomassa final nas culturas. Para isso investigou-se a composição de meios nutritivos, diferentes pHs (controle, 6.0, 6.3, 6.7 e 7.2) e modalidades de cultivo (estanque vs contínua). Determinações de eficiência fotossintética e dissipação de energia foram usadas para inferir sobre a saúde celular nas células flageladas verdes, avaliando-se as diferentes condições experimentais. Foram feitas análises da composição bioquímica intracelular determinando-se a concentração de proteínas, lipídios e carboidratos, além da composição de ácidos graxos. O estudo foi iniciado investigando-se diferentes meios nutritivos no crescimento e produção de biomassa e, os resultados mostraram que o meio de cultura LC Oligo modificado contendo bicarbonato de amônio 4 vezes mais concentrado e o restante dos nutrientes 2 vezes, resultou no maior rendimento de biomassa. Procedeu-se então ao estudo da influência do pH no crescimento vegetativo, eficiência fotossintética e composição bioquímica da microalga. Os resultados mostraram maior germinação de cistos e maior taxa de crescimento em culturas tamponadas em pH 6.3 com tampão MES (taxa de crescimento 0,53 d<sup>-1</sup>). Lipídios relacionados a pigmentos e parede celular dominaram nesse pH e, ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) e linoleico (C<sub>18:2n6c</sub>) foram os ácidos graxos de maior abundância. Em relação às modalidades de cultivo, os contínuos foram melhores do que os estanques, que tiveram menor conteúdo proteico e taxa de crescimento. A atividade fotossintética e seus parâmetros sofreu menor variação nas culturas contínuas. *H. pluvialis* respondeu melhor quanto aos parâmetros fotossintéticos em várias intensidades luminosas quando em cultura contínua, apesar da irradiância de saturação ter sido maior em cultivos estanques.

**Palavras chave:** microalgas, culturas, pH, fotossíntese, composição bioquímica.

## ABSTRACT

The microalgae *Haematococcus pluvialis* has been studied as one of the main natural sources of astaxanthin carotenoid, potent antioxidant with applications in the nutraceutical and cosmetic industry. *H. pluvialis* is a microalgae Chlorophyceae whose life cycle includes a phase encystment with high pigment production. In recent years there has been increased activity, processes and applications involving the use of *H. pluvialis* and its biomass, however *H. pluvialis* culture do not achieve generally high biomass and species is considered delicate, a slow-growing. Thus, the production and use of the pigment depends on the microorganism and biological, physical and chemical interactions which result in high production of green cells which subsequently form red astaxanthin filled cysts. In this study we sought to optimize the vegetative growth of microalgae, increased the final biomass yield in crops. To this end we investigated the composition of the nutrient medium different pHs and culture methods (sealed vs continuous). Determination of photosynthetic efficiency and energy dissipation were used to infer the cellular health in green flagellates, evaluating the different experimental conditions on microalgae. Intracellular biochemical composition analyzes were performed by determining the concentration of proteins, lipids and carbohydrates in addition to the fatty acid composition. The study was initiated by investigating different nutrient media the growth and biomass production and the results showed that modified Oligo LC medium containing ammonium bicarbonate four times more concentrated nutrients and the remaining 2 times, resulting in improved production of biomass. A procedure then to study the influence of pH on vegetative growth, photosynthetic efficiency and biochemical composition of *H. pluvialis*. For this purpose we used pH buffers (MES, HEPES, and PIPES), and the results showed a higher germination cysts and higher growth rate in buffered at pH 6.3 cultures (growth rate 0.45 d<sup>-1</sup>; MES buffer). These findings that the production of *H. pluvialis* can proceed in the absence of a lag phase in cultures inoculated with cysts. Pigments and lipids related to cell wall dominated at pH 6.3 and palmitic acid (C16:0) and linoleic acid (C18:2n6c) were the most abundant fatty acids. PH in the 6.7 and 7.2 crops showed the highest content of polyunsaturated fatty acids, 6% higher than the control. Regarding the methods of cultivation, continuous were better. The biomass showed higher protein content and the larger culture growth rate and biomass of the sealed. The photosynthetic activity and its parameters suffered significant variations in continuous cultures. *H. pluvialis* responded better as the photosynthetic parameters in various light intensities when in continuous culture, despite the saturation irradiance was higher in batch cultures.

**Keywords:** microalgae cultures, pH, photosynthesis, biochemical composition.



# **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROALGAS

É evidente a importância das microalgas para uma vasta gama de atividades, o que depende do cultivo de espécies, uma vez que são quase nulas as situações em que a biomassa algal esteja disponível em quantidade suficiente no ambiente natural para ser efetivamente utilizada. Nesse sentido, os cultivos algais são ferramentas que viabilizam o aproveitamento das microalgas pelo homem (LOURENÇO, 2006; SPOLAORE et al., 2006; BERTOLDI et al., 2008). Como fábricas celulares para a produção de biomoléculas de alto valor, as microalgas apresentam inúmeras vantagens, tais como i) possibilidade de cultivo em terras não aráveis; ii) possibilidade de utilização de águas residuais que forneça os nutrientes necessários para o crescimento algal e, iii) a possibilidade para modificação da composição bioquímica das células algais através da variação das condições de crescimento (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2014). Além disso, culturas de microalgas podem apresentar benefícios relacionados à fixação do CO<sub>2</sub> a partir de fluxos derivados de processos industriais (OLAIZOLA, 2003; MUNIR et al., 2012).

Dentre as várias aplicações de microalgas, pode-se citar o uso na alimentação de animais e do homem, extração de substâncias de importância farmacêutica, produção de cosméticos, uso como indicadores ambientais. Muitas dessas aplicações implicam na realização de cultivos intensos, os quais representam um sistema biológico para a produção de matéria orgânica em que podem ser abertos ou fechados (TREDICI, 2004; LOURENÇO, 2006). Podemos distinguir três tipos de aplicações microalgal (Tabela 1). A primeira relaciona-se a fatores do ambiente, tais como a capacidade das microalgas em produzir O<sub>2</sub>, fixar CO<sub>2</sub> (ZEILER et al., 1995), e ainda biorremediar compostos orgânicos e inorgânicos (WILDE; BENEMANN, 1993). Para cultivo e produção, espécies ou cepas de microalgas podem ser selecionadas pelo seu crescimento, pela sua capacidade de remover compostos tóxicos específicos, ou ainda pela robustez e produtos que sintetizam. Esta última corresponde à produção de metabólitos primários, como por exemplo carotenoides (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011b), proteínas (BECKER, 2004), e lipídios tais como ácidos graxos poli-insaturados, os PUFAs (SHARMA et al., 2012), moléculas com atividades antioxidantes (SUNDA et al., 2002; STAHL; SIES, 2003; MUNIR et al., 2013). Para este efeito, microalgas com alta plasticidade fisiológica podem ser usadas, uma vez que são capazes de se adaptarem de forma eficiente às variações ambientais (DUBINSKY; STAMBLER, 2009). A produção de metabólitos

secundários encontra aplicações na indústria farmacêutica, mas sua produção é em geral menor do que a dos primários.

Tabela 1 – Discriminação dos três grupos de aplicações de algas com seus requisitos de produção.

<b>Aplicação</b>	<b>Função</b>	<b>Requisitos</b>	<b>Algas</b>
<b><i>Produção de biomassa</i></b>	Fluxos de matéria e energia	Otimizar condições de cultivo para crescimento e maximização fotossintética	Espécies com elevado crescimento constitutivo e fotossíntese
<b><i>Metabólitos primários</i></b>	Produção de moléculas, como carotenoides, ficobiliproteínas, proteínas, lipídios, polissacarídeos e antioxidantes	Otimizar condições de cultivo para maximizar a produção de moléculas específicas e altas taxas de crescimento	Espécies com plasticidade fisiológica
<b><i>Metabólitos secundários</i></b>	Produção de toxina ou drogas	Otimizar condições, normalmente estressantes, para produzir moléculas específicas	Espécies selecionadas ou geneticamente modificadas

Fonte: Barra et al. (2014)

O aumento na demanda de produtos de origem algal deve-se, principalmente, ao fato desses organismos produzirem substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos de cadeia longa poli-insaturados, compostos virostáticos, antifúngicos, antibióticos, ficocoloides, enzimas, ésteres, vitaminas e pigmentos, como os carotenoides (COHEN, 1999; SPOLAORE et al., 2006; BERTOLDI et al., 2008; GUEDES et al., 2011). As microalgas são importantes em bioprocessos destinados à produção de compostos de alto valor agregado, tais como os que apresentam propriedades anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e antitumoral.

A literatura mostra que alguns compostos sintetizados por microalgas são antioxidantes poderosos, tais como a astaxantina, produzida por *Haematococcus pluvialis*. De acordo com Li et al. (2011), a astaxantina apresenta funções anti-inflamatórias, antienvelhecimento e antitumorais. Do ponto de vista químico, vários desses compostos são polissacarídeos ou ácidos graxos de cadeia longa, saturados ou insaturados. Além disso, as estruturas químicas dessas moléculas são frequentemente atípicas e suas concentrações podem exceder aquelas encontradas em muitas outras fontes naturais. Dados da literatura mostram que a produtividade e a composição bioquímica das microalgas dependem fortemente do modo de cultivo, composição do meio e da especiação de nutrientes (FÁBREGAS et al., 2000; IMAMOGLU et al., 2007; CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013; CHIA; LOMBARDI; MELÃO; et al., 2013b). Quando *H. pluvialis* é submetida a condições ambientais extremas observa-se mudança morfológica das células verdes, transformando-se em cistos vermelhos

ricos em astaxantina. Diversos estudos visando aumentar a eficiência do processo de obtenção de biomassa de *H. pluvialis* e, conseqüentemente, aumentar os rendimentos de astaxantina são relatados (HARKER et al., 1995; GONG; CHEN, 1997; FÁBREGAS et al., 2001; HATA et al., 2001; SARADA et al., 2002), o que é justificado por sua importância econômica.

Diante das potencialidades da microalga *H. pluvialis* quanto à síntese do carotenoide antioxidante *astaxantina* e das dificuldades em seu cultivo, que se devem principalmente ao seu complexo ciclo biológico, este trabalho apresenta um estudo da ecofisiologia da microalga Chlorophyceae na fase de células vegetativas, verdes e biflageladas, incluindo fotossíntese e cultivos em sistema estanque e contínuo, buscando compreender a fisiologia do organismo de modo a oferecer alternativas para maior produtividade das células vegetativas. Neste estudo, onde *Resultados e Discussão* é apresentado por sequência experimental, como descrito abaixo, analisamos aspectos do crescimento e fotossíntese em dois sistemas de cultivo, estanque e contínuo.

- **5.1:** *Estudos preliminares de otimização do crescimento.*
- **5.2:** *Crescimento, fotossíntese e composição bioquímica de *H. pluvialis* em diferentes pH*
- **5.3:** *Crescimento, fotossíntese e composição bioquímica de *H. pluvialis* em culturas contínuas e estanques.*
- **5.4:** *Curvas de saturação de luz de *H. pluvialis* em culturas contínuas e estanques.*

## **2 DESAFIOS E OBJETIVOS**

## 2 DESAFIOS E OBJETIVOS

### 2.1 DESAFIOS

*Haematococcus pluvialis* é uma microalga Chlorophyceae em cujo ciclo de vida há uma fase de cistos de resistência repletos do pigmento carotenoide astaxantina, que possui elevado interesse comercial. Esta alga apresenta a grande vantagem de produzir as maiores concentrações de astaxantina em relação à biomassa seca quando comparada a outras fontes naturais desse pigmento. Em culturas, é o crescimento populacional e acúmulo de biomassa em fase vegetativa que pode garantir grande quantidade do pigmento, quando do encistamento de toda a população. Entretanto, esta microalga possui baixa taxa de crescimento em ambientes artificiais como os sistemas de cultura e, conseqüentemente, baixa densidade populacional é obtida. Além disso, seu ciclo de vida é complexo (IMAMOGLU et al., 2007; EVENS et al., 2008; DEL RÍO et al., 2010; ONCEL et al., 2011) e o pouco entendimento das condições ótimas para crescimento e produção de astaxantina (CIFUENTES et al., 2003) restringe e torna a produção comercial de astaxantina um desafio (SUH et al., 2006). Isso consiste em aspecto desfavorável quando comparado a outras espécies que já são cultivadas com êxito em escala comercial, tais como *Dunaliella salina*, *Chlorella* spp., *Arthrospira* spp., e *Scenedesmus* spp. (APT; BEHRENS, 1999; BERTOLDI et al., 2008). Em função dessas características, muitas pesquisas têm buscado maneiras de aumentar a taxa de crescimento das células vegetativas móveis, de modo a contribuir para a viabilização da produção de astaxantina. Esta pesquisa adiciona novas informações à literatura existente quanto à otimização da produção de biomassa e fisiologia de *H. pluvialis*, contribuindo com informações relativas à fotossíntese, fixação de CO<sub>2</sub>, crescimento populacional e concentração de íons hidrogênio em sistemas controlados.

### 2.2 OBJETIVOS

#### 2.2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ecofisiologia de *H. pluvialis* com enfoque em aumento da produção de biomassa vegetativa e, conseqüentemente, cistos contendo carotenoides.

### 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos de diferentes meios de cultivo nos parâmetros de crescimento da microalga (densidade celular máxima, tempo de cultivo e taxa de crescimento das culturas) de modo a definir um meio nutritivo ideal (alto crescimento e rápido encistamento na etapa final) para os experimentos seguintes;
- Analisar a influência do pH (6.0, 6.3, 6.7 e 7.2) no rendimento quântico máximo do fotossistema II e na composição bioquímica de *H. pluvialis* em culturas laboratoriais estanques;
- Analisar o efeito das modalidades de cultivo estanque e contínua sobre o crescimento, fotossíntese (rendimento quântico e decaimentos) e composição bioquímica de *H. pluvialis*;
- Analisar a resposta de *H. pluvialis* em culturas estanques e culturas contínuas submetidas a várias intensidades luminosas através de curvas de saturação de luz.



### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS

As microalgas ocupam a parte inferior da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos e possuem a capacidade intrínseca de fixação do CO<sub>2</sub> com auxílio de luz solar, convertendo-o em compostos orgânicos complexos, que são subsequentemente mantidos dentro ou liberados pelas células (Figura 1). Esses micro-organismos são cosmopolitas e bem adaptados para sobreviver em grande espectro de condições ambientais, incluindo (mas não limitado a) calor, frio, seca, salinidade, foto-oxidação, anaerobiose, pressão osmótica e exposição aos raios UV (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1993). As microalgas combinam, de forma equilibrada, algumas propriedades típicas de vegetais superiores (ex.: eficiente fotossíntese aeróbica e simples exigências nutricionais) com atributos biotecnológicos adequados a micro-organismos (ex.: taxas altas de crescimento e capacidade de acumular ou secretar metabólitos primários e secundários). Esta combinação levou à seleção desses micro-organismos para processos aplicados, e representa a razão de base para a sua utilização biotecnológica. Além de serem atualmente utilizadas na alimentação de animais aquáticos e terrestres, o valor nutritivo da biomassa de microalgas vai muito além e inclui seu uso como corante e proteína ou ainda como suplemento de ácidos graxos poli-insaturados na dieta humana e também na aquacultura. Também, o mercado de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, beneficiam-se da ampla variedade de produtos derivados das microalgas (PULZ; GROSS, 2004; RICHMOND, 2004). Além disso, um grande número de espécies de microalgas existentes constitui um reservatório único de biodiversidade, que suporta a possibilidade de exploração comercial de muitos produtos novos, além de vitaminas, pigmentos e ácidos graxos poli-insaturados (LORENZ; CYSEWSKI, 2000a; LEÓN et al., 2003; IP et al., 2004). O fator-chave para a viabilidade econômica de culturas de microalgas é a possibilidade de serem operadas em grandes fotobiorreatores, capazes de produzir biomassa e metabólitos em larga escala (KIM et al., 2007; SÁNCHEZ et al., 2008).

As microalgas são consideradas como potencial matéria-prima para a produção de grande variedade de compostos, que vão desde produtos de alto valor agregado, como alimentos, e produtos químicos e farmacêuticos, até produtos com menor valor, tal qual o biodiesel, mas igualmente importante (SHEEHAN et al., 1998; OLAIZOLA, 2003; LI et al., 2007). Como fábricas celulares para a produção de biomoléculas, as microalgas apresentam inúmeras vantagens em comparação com culturas tradicionais, tais como a disponibilidade de

cultivo em terras não aráveis, a possibilidade de utilização de águas residuais que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento e, a disponibilidade para modificar a composição bioquímica das células algais através de variação das condições de crescimento (STEPHENSON et al., 2010). Submetidas a mudanças nas condições ambientais, como por exemplo, a privação de nutrientes, limitação de luz, dentre outras, as microalgas podem estressar-se, levando à produção e acúmulo de alguns compostos de interesse, como os carotenoides (AFLALO et al., 2007; GARCÍA-MALEA et al., 2009; SHAHID et al., 2013).

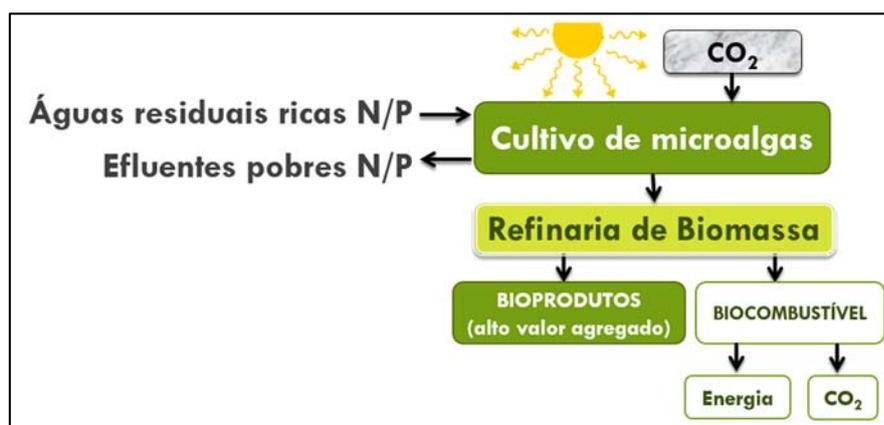


Figura 1 – Sistema microalgal para a produção combinada de biocombustíveis, biomitigação de CO<sub>2</sub>, e remoção N/P de águas residuais. *Entradas*: fonte de carbono, CO<sub>2</sub>; fontes de nitrogênio e fósforo, esgoto rico N/P; fonte de energia, a energia solar. *Saídas*: efluentes pobres N/P, bioprodutos de valor agregado, e os biocombustíveis. Fonte: Wang et al. (2008).

### 3.2 CAROTENOIDES E BIOSÍNTESE DE ASTAXANTINA EM *Haematococcus pluvialis*.

Nos últimos anos, percebe-se um rápido crescimento no interesse de carotenoides, elevando assim seu valor de mercado (Figura 2). Em geral, sob condições desfavoráveis, essas algas produzem grandes quantidades de carotenoides secundários, até 6% da massa seca no caso de *Haematococcus pluvialis* (WANG et al., 2003). Diferentemente dos carotenoides primários ou fotossintéticos associados com tilacoides e exercendo em organismos fotoautotróficos funções vitais de coleta de luz, proteção contra danos fotooxidativos e na manutenção da estrutura dos fotossistemas (LADYGIN; SHIRSHIKOVA, 2006), os carotenoides secundários não participam da fotossíntese e não estão associados com o aparato fotossintético. Suas principais funções em microalgas carotenogênicas compreendem a proteção

contra o excesso de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (BEN-AMOTZ et al., 1989; HAGEN et al., 1994; SOLOVCHENKO; MERZLYAK, 2008), o excesso de sequestro de fotoassimilados (LEMOINE; SCHOEFS, 2010), a supressão da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desintoxicação das ROS já produzidas (KOBAYASHI; SAKAMOTO, 1999; BOUSSIBA, 2000).

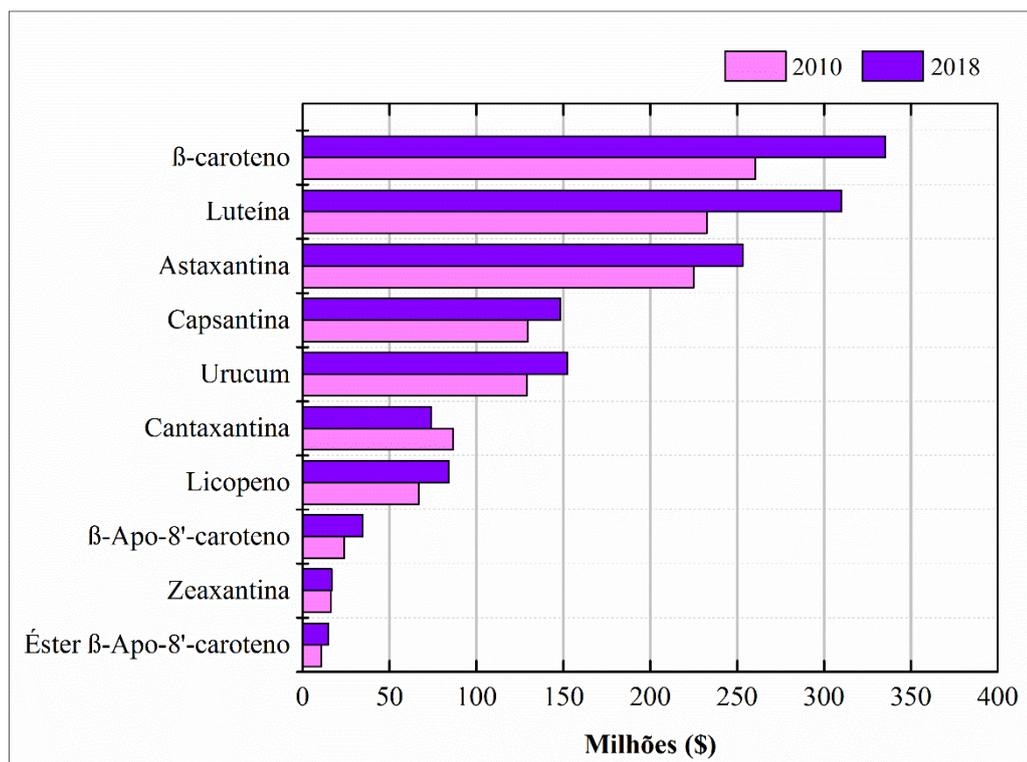


Figura 2 – Valor de Mercado Global de Carotenoides. Fonte: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>

Os carotenoides encontram-se entre as mais abundantes e importantes classes de pigmentos existentes na natureza dada à diversidade e a relevância das funções que assumem (LORENZ; CYSEWSKI, 2000a), podendo ser encontrados nas três principais linhas evolutivas *Archaeobacteria*, *Eubacteria* e *Eukarya* (ARMSTRONG; HEARST, 1996). Constituem uma classe de pigmentos naturais, de coloração amarela a vermelha, amplamente distribuídos nos reinos animal e vegetal (NI et al., 2005). Obtidos a partir de fontes naturais, são reportados e caracterizados mais de 600 variantes estruturais desta família de pigmentos, que são responsáveis por grande variedade das cores, sendo as mais notáveis o amarelo brilhante, alaranjado e vermelho das frutas, folhas e animais aquáticos (UENOJO et al., 2007).

Quimicamente, os carotenoides são compostos isoprenoídeos ( $C_{40}H_{56}$ ) constituídos por 8 unidades  $C_5$ -isopreno e têm um esqueleto central linear constituído de 22 átomos de carbono e 9 duplas ligações conjugadas com extremidades finais anelares ou quase anelares dotadas de 9 átomos de carbono em cada uma (LA FUENTE et al., 2006). Esta estrutura química (Figura 3) é responsável por sua coloração característica, dado que as duplas ligações absorvem parte do espectro luminoso que nelas incide (ARMSTRONG; HEARST, 1996; DEL CAMPO et al., 2007). O Espectro UV/VIS dos carotenoides é de grande importância para as análises, porque proporciona informação sobre sua estrutura, que é caracterizada pela presença de um longo cromóforo de duplas ligações conjugadas. Pelo menos 7 cromóforos de duplas ligações conjugadas são necessários para um carotenoide ter uma coloração perceptível. Logo, o espectro de absorção dos carotenoides depende do número de duplas ligações conjugadas em sua molécula, assim quanto mais longo o cromóforo, tanto maiores são os comprimentos de onda de absorção máxima, variando estruturalmente na faixa de 410 a 510 nm (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007). Este grupo de pigmentos compreende duas classes principais, os carotenos e as xantofilas.

Os carotenos são hidrocarbonetos poliênicos cíclicos ou lineares, enquanto as xantofilas são carotenos com pelo menos um átomo de oxigênio funcional: grupo  $-OH$  na luteína, grupo-oxi na cantaxantina, ou ainda como uma combinação de ambos, na astaxantina (GONZÁLEZ, 2000; LA FUENTE et al., 2006; DEL CAMPO et al., 2007). As xantofilas sintetizadas pelos vegetais vasculares, e.g., violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina e luteína, também podem ser sintetizadas por microalgas verdes. No entanto, estas possuem xantofilas adicionais, por exemplo, loroxantina, astaxantina e cantaxantina, enquanto as algas pardas e diatomáceas produzem ainda diatoxantina, diadinoxantina e fucoxantina (JIN et al., 2003). A distinção é feita entre carotenoides primários e secundários: os primários e.g., as xantofilas, são componentes estruturais e funcionais do aparato fotossintético celular, por isso eles são essenciais para a sobrevivência (JIN et al., 2003); considerando que os secundários englobam aqueles produzidos por microalgas em altas concentrações, mas apenas após a exposição a estímulos ambientais específicos (via carotenogênese).

Funcionalmente, as xantofilas são moléculas hidrófobas associadas com membranas celulares e/ou envolvidas em ligações não-covalentes a proteínas; localizam-se na membrana tilacóide, ao passo que os carotenoides secundários encontram-se em vesículas lipídicas, no estroma plastidial e no citosol. A literatura reporta que na maioria das microalgas verdes, os carotenos e xantofilas são sintetizados e acumulados dentro de plastídios (INOUE et al., 2006), mas em *Haematococcus* sp. as xantofilas secundárias (astaxantina) acumulam-se no citoplasma,

o que a possibilidade de um sítio extraplastídico da biossíntese de carotenoides. Alternativamente, xantofilas sintetizadas no cloroplasto podem ser exportadas e acumularem-se no citoplasma (TARDY; HAVAUX, 1996; SAID RABBANI et al., 1998; JIN et al., 2003), de modo que podem ser encontradas em diversos compartimentos celulares. Nas microalgas, os carotenoides estão envolvidos na coleta de luz, estabilização da estrutura fotossintética e seu funcionamento, além de eliminar espécies reativas de oxigênio e dissipar o excesso de energia (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2002). A atividade antioxidante intrínseca dos carotenoides constitui a base para a sua ação protetora contra o estresse oxidativo, mas nem todas as funções dos carotenoides relacionam-se com sua capacidade de inativar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (GUEDES et al., 2011).

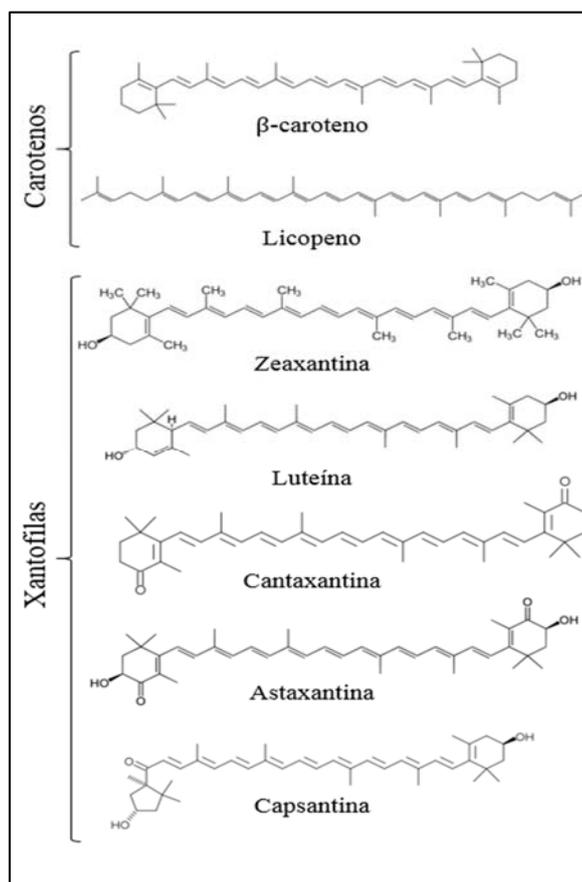


Figura 3 – Estruturas química de carotenos e xantofilas. O segmento linear destacado na estrutura do  $\beta$ -caroteno corresponde ao esqueleto central de 22 carbonos comum a todos os carotenos e xantofilas. Fonte: La Fuente et al., (2006).

A fotossíntese depende de pigmentos essenciais e acessórios e, alguns gêneros de microalgas têm alta concentração de clorofila *a*. Em adição a esses pigmentos, tais microorganismos têm um sistema intracitoplasmático complexo, indicando a fotossíntese como a via metabólica preferida. A característica de absorção espectral da luz nas microalgas é diferente em comparação com outros organismos fotossintéticos, uma vez que as taxas elevadas de atividade fotossintética são medidas, não só na região espectral de 665 a 680 nm, onde a luz é melhor absorvida pela clorofila *a*, mas também a partir de 560 a 620 nm, comprimentos de onda de absorção da ficoeritrina e ficocianina, respectivamente. Isso mostra que a luz absorvida por ficobiliproteínas é usada por estas microalgas de forma tão eficiente como a luz absorvida pela clorofila, sugerindo elevada atividade fotossintética nesses microorganismos (CAMPBELL et al., 1998).

A astaxantina pode ser produzida por síntese química ou obtida diretamente do organismo, o que é conhecido por produção biotecnológica (HU et al., 2006). Tradicionalmente, a produção de astaxantina em escala industrial tem sido realizada principalmente por síntese química (YOSHIHIRO et al., 1997; BOUSSIBA et al., 2000; OLAIZOLA, 2003), porém a forma sintética é cara e pode conter astaxantina com configuração estrutural diferente da natural (BOUSSIBA et al., 2000). Esta diferença pode aumentar a instabilidade da molécula e, eventualmente seu efeito pode ser diferente da astaxantina natural. O produto natural é esterificado, o que lhe confere uma maior estabilidade na prevenção da oxidação (SCHMIDT et al., 2011). O custo de mercado por kg de astaxantina é cerca de US \$ 2.000 para a obtida através da síntese química, US \$ 2.500 para a oriunda da fermentação de levedura, e US \$ 7.000 a astaxantina produzida por microalgas (LI et al., 2011). Os valores ORAC (valor radical capacidade de absorção de oxigênio) de astaxantina microalgal é de cerca de 3 vezes mais do que a do produto sintético e cerca de um terço superior ao de levedura (NAGUIB, 1998). Apesar de suas desvantagens, a produção sintética ainda domina o mercado de astaxantina, com a BASF e a Hoffman-La Roche, como os principais produtores, dominando 80% do mercado mundial (NGUYEN, 2013).

A produção biotecnológica de carotenóides como a astaxantina é um campo de pesquisa de grande interesse devido ao seu alto valor de mercado e o crescimento da demanda por produtos naturais (HUI et al., 2005). Apesar de mais de 95% do mercado de aquacultura consumir derivados sintéticos da astaxantina, o aumento da demanda de consumo por produtos naturais faz com que os pigmentos sintéticos sejam menos desejáveis e proporciona uma oportunidade para a produção de astaxantina natural (LORENZ; CYSEWSKI, 2000a). Além disso, nos últimos anos, o uso de compostos químicos sintéticos como aditivo alimentar tem

sido estritamente regulado (YAMANE et al., 1997) sendo a fonte natural de astaxantina preferível (KUSDIYANTINI et al., 1998).

A produção biotecnológica de carotenoides como a astaxantina é um campo de pesquisa de grande interesse devido alto valor de mercado desta molécula aliado ao crescimento da demanda por produtos naturais (OROSA et al., 2005; NI et al., 2005; VALDUGA et al., 2009). Uma grande variedade de micro-organismos é capaz de sintetizar astaxantina, destacando-se as microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e *Chlorococcum* sp., as leveduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Candida utilis* e algumas bactérias como *Agrobacterium aurantiacum*, *Halobacterium salinarum*, *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium* spp. (ANDREWES et al., 1976; JOHNSON; AN, 1991; RISE et al., 1994; YOKOYAMA; MIKI, 1995; CALO et al., 1995; MIURA et al., 1998; LIU; LEE, 2000; YUAN et al., 2002; IP; CHEN, 2005; MIAO et al., 2006; SCHMIDT et al., 2011). A Tabela 2, a seguir, lista as principais microalgas produtoras de astaxantina.

Tabela 2 – Principais microalgas produtoras de astaxantina, as respectivas concentrações produzidas por biomassa seca (% massa / massa) e referências onde foram obtidas.

Microalgas	Concentração de astaxantina	Referências bibliográficas
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	-	BIDIGARE et al., 1993; REMIAS et al., 2005
<i>Eremosphera viridis</i>	-	VECKTEL et al., 1992
<i>Trachelomonas volvocina</i>	-	GREEN, 1963
<i>Chloromonas nivalis</i>	0,004	LEYA et al., 2009; REMIAS et al., 2010
<i>Botryococcus braunii</i>	0,01	GRUNG et al., 1994
<i>Chlamydocapsa</i> spp.	0,04	LEYA et al., 2009,
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,3	OROSA et al., 2000; QIN et al., 2008
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,7	BAR et al., 1995; OROSA et al., 2000
<i>Chlorococcum</i> sp.	0,7	LIU; LEE, 2000; MA; CHEN, 2001
<i>Scotiellopsis oocystiformis</i>	1,1	OROSA et al., 2000
<i>Protosiphon botryoides</i>	1,4	OROSA et al., 2000
<i>Neochloris wimmeri</i>	1,9	OROSA et al., 2000
<i>Haematococcus pluvialis</i>	4,0	DROOP, 1954; LEE; DING, 1994

Dentre as espécies apresentadas na Tabela 2, a microalga verde *H. pluvialis* é reconhecida como um dos produtores de astaxantina mais promissores na natureza, devido à sua excepcional capacidade de acumular grandes quantidades do carotenoide sob condições de estresse (BOUSSIBA, 2000; LEMOINE; SCHOEFS, 2010). Recentemente, *Chlorella zofingiensis* atraiu alguns interesses como produtora alternativa de astaxantina, devido à sua

elevada velocidade de crescimento em condições fotoautotróficas, mixotróficas e heterotróficas (OROSA et al., 2000; CAMPO, DEL et al., 2004; IP et al., 2004; SUN et al., 2008).

A biossíntese de pirofosfato de isopentenilo precede a síntese de carotenoides e, nas microalgas verdes unicelulares *H. pluvialis* e *Chlamydomonas reinhardtii*, a síntese de pirofosfato de isopentenilo dá-se por via não-mevalônica (DISCH et al., 1998). Nesses organismos, a enzima fitoeno sintetase catalisa o primeiro passo da biossíntese de carotenoides que se dá através da formação de uma molécula de fitoeno, com 40 átomos de carbono, precursora de todos os outros carotenoides (CUNNINGHAM; GANTT, 1998). Duas classes de fitoeno sintetase foram encontradas em certas algas verdes como *Ostreococcus* e *Micromonas*, enquanto que outras algas verdes como *Chlorella reinhardtii* e *Chlorella vulgaris* só possuem uma classe de fitoeno sintetase (TRAN et al., 2009). Posteriormente, fitoeno é transformado em licopenos e finalmente nos outros pigmentos carotenoides através de uma série de reações de desidrogenação, onde duas enzimas estruturalmente semelhantes, fitoeno dessaturase  $\zeta$ -caroteno-dessaturase convertem o fitoeno incolor em licopeno vermelho. Especificamente, a fitoeno dessaturase catalisa as duas primeiras reações de desidrogenação para formar o fitoeno e o  $\zeta$ -caroteno, enquanto que a  $\zeta$ -caroteno-dessaturase catalisa as duas reações posteriores de conversão do  $\zeta$ -caroteno e licopeno em neurosporeno (CUNNINGHAM; GANTT, 1998). Alta irradiância e privação de nitrogênio podem resultar em aumento da desidrogenação do fitoeno e remoção de excesso de elétrons, auxiliando assim no controle da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese e a formação de espécies reativas de oxigênio (GRÜNEWALD et al., 2000; WANG et al., 2009; LI et al., 2010). A partir do  $\beta$ -caroteno, há dois caminhos pelos quais processa-se a síntese de astaxantina em microalgas, como mostrado na Figura 4. A oxigenação do  $\beta$ -caroteno na posição 4 pela  $\beta$ -caroteno cetolase dá origem à equinenona e cantaxantina, precursores da astaxantina. Sob estresse, a síntese de astaxantina em *H. pluvialis* dá-se através da oxigenação do  $\beta$ -caroteno (HUANG et al., 2006), sendo precedida da adição de grupos ceto, e reações de hidroxilação da cantaxantina, como mostrado na Figura 4 (FRASER et al., 1998; LINDEN, 1999; SCHOEFS et al., 2001). Segundo o apresentado em HAN et al. (2013) os genes BKT e CrtR-b são etapas limitantes da velocidade na síntese de astaxantina em *H. pluvialis*.

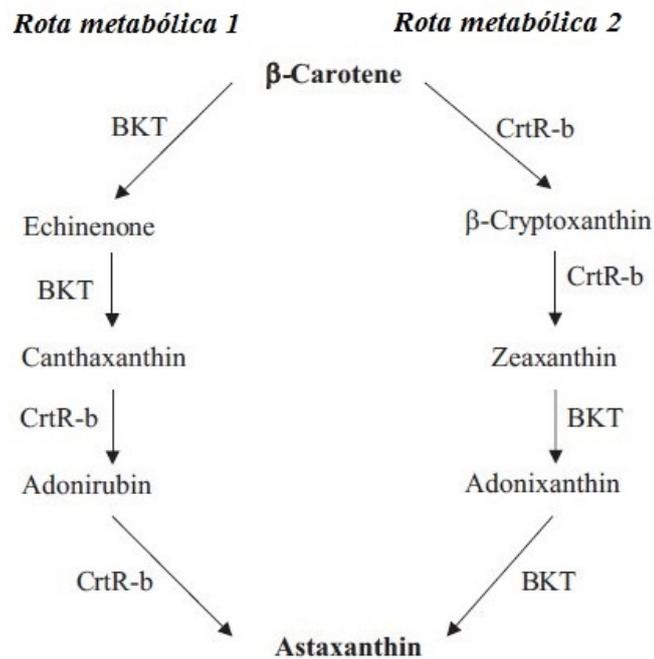


Figura 4 – Vias de biossíntese de astaxantina primária em *Haematococcus pluvialis* (Rota metabólica 1) e *Chlorella zofingiensis* (Rota metabólica 2). BKT = β-caroteno cetolase; CrtR-b = β-caroteno hidroxilase. Fonte: Han et al. (2013).

### 3.3 A MICROALGA *Haematococcus pluvialis*, CICLO DE VIDA E FISIOLOGIA

*Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde eucariótica, unicelular de água doce, pertencente à classe Chlorophyceae. Seu *habitat* natural característico é quase sempre limitado a pequenas piscinas temporárias, tais como cavidades rochosas periodicamente preenchidas com água da chuva, bacias de concreto, banhos de pássaros, e urnas ornamentais de cemitério (PROCTOR, 1957). Nestes ambientes ocorrem flutuações rápidas e extremas de luz, temperatura e concentração de sal, tornando as condições severas para qualquer forma de vida e, ocasionalmente, *H. pluvialis* aparece em grande quantidade em rios ou às margens de lagos, quando a seca expõe grandes áreas de rochas ricas em fissuras (CANTER-LUND; LUND, 1995). O ciclo de vida de *H. pluvialis* (Figura 5) apresenta polimorfismo celular, constituído por quatro tipos de células distintas, incluindo macrozoóides (ou zoósporos), microzoóides, palmela e aplanósporos (ou hematocistos) (ELLIOT, 1934). Os macrozoóides são esféricos, elipsoidais, ou células em forma de pera com dois flagelos e um cloroplasto em forma de taça.

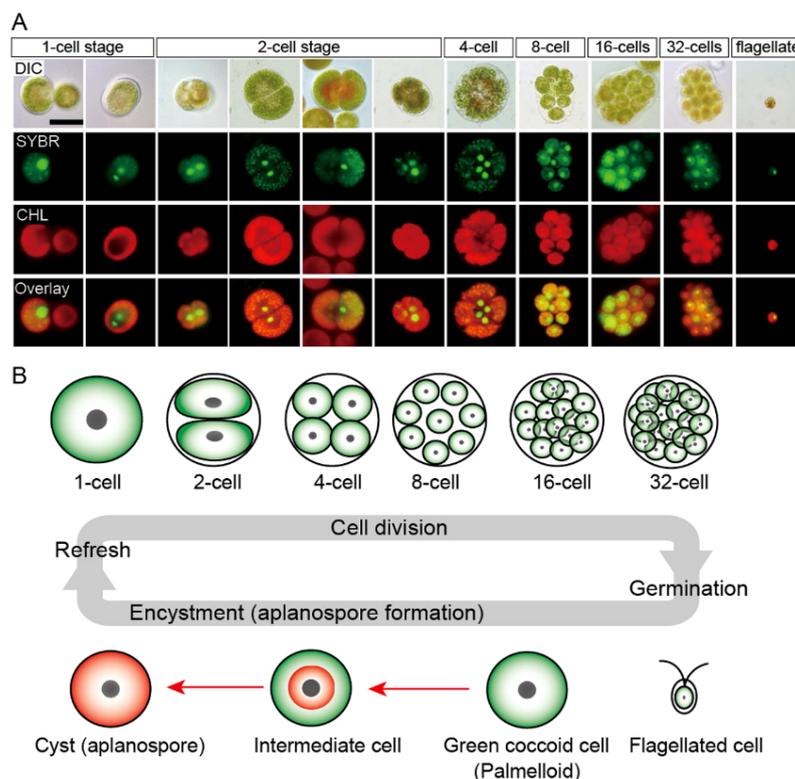


Figura 5 – **Ciclo de vida do *Haematococcus pluvialis***. **A.** Imagens de microscopia de fluorescência, mostrando as fases de 1 a 32 células, e a fase flagelada. DIC: microscopia de contraste de interferência diferencial; SYBR: SYBR Green® I – corante celular (verde); CHL: autofluorescência da clorofila (vermelho); e Revestimento: imagens de SYBR e CHL sobrepostas. **B.** Ilustração do ciclo de vida de *H. pluvialis*. **Regeneração:** quando as culturas antigas são transplantadas em meio fresco, as células coccoides sofrem divisão celular para formar células flageladas dentro da parede da célula-mãe. **Germinação:** células flageladas se estabilizam e se tornam células coccoides. Luz forte e/ou contínua aceleram o acúmulo de astaxantina durante encistamento (setas vermelhas). Fonte: Wayama et al. (2013).

Caracterizado por apresentar um rápido crescimento inicial com divisão de célula-mãe em 2 – 8 células-filhas após inoculação de cistos, os macrozoóides predominam na fase inicial de crescimento vegetativo uma cultura sob condições favoráveis de cultivo. Quando macrozoóides são submetidos a condições ambientais ou de cultura, desfavoráveis, elas se desenvolvem em uma forma *palmela*, sem mobilidade própria por perderem seus flagelos ao mesmo tempo em que expandem o tamanho da célula. Este processo é definido como encistamento. Quando o estresse persiste, a *palmela* desenvolve-se em aplanósporo assexuado (não-móveis), com paredes celulares espessas e rígidas. Durante a maturação dos aplanósporos, grandes quantidades de astaxantina são acumuladas, resultando em coloração vermelho brilhante. Destacamos que os macrozoóides de algumas cepas de *H. pluvialis* são capazes de acumular astaxantina sem formar aplanósporos (HAGEN et al., 2000; BRINDA et al., 2004).

Se as condições ambientais ou de cultura retornam ao normal, os aplanósporos germinam para formar zoósporos flagelados e iniciar um novo ciclo de crescimento vegetativo. Em alguns casos, depois da exposição a condições adversas extremas, como por exemplo, congelamento, dessecação ou falta de nutrientes, seguido por condições favoráveis de cultivo, a gametogênese pode ocorrer em aplanósporos, dando origem a um máximo de 64 gametas, conhecidos como microzoóides. Os microzoóides se apresentam como células pequenas (<10  $\mu\text{M}$ ) em comparação com os zoósporos (20 – 50  $\mu\text{m}$ ) e exibem alta motilidade após a sua libertação a partir dos gametocistos (TRIKI et al., 1997). O acúmulo de astaxantina nas células de *H. pluvialis* é acompanhado de alterações ultraestruturais, sendo uma das mais notáveis a formação de grande número de inclusões lipídicas citosólicas onde a astaxantina é armazenada. Inicialmente, as inclusões lipídicas aparecem como pequenas manchas elétron-densas espalhadas próximo às cisternas do retículo endoplasmático e, eventualmente, se aglutinam para formar volumosas inclusões lipídicas (LANG, 1968; SANTOS; MESQUITA, 1984). Os zoósporos flagelados de *H. pluvialis* (Figura 6) apresentam uma matriz extracelular volumosa, assemelhando-se à arquitetura de várias camadas, típica das Volvocales, com uma camada cristalina tripartida entre duas camadas separadas de matrizes gelatinosas. A camada cristalina tripartida está ligada à membrana plasmática por tubos flagelares e cordões citoplasmáticos dispostos radialmente, que é apenas observado no gênero de *Haematococcus*. O encistamento de zoósporos flagelados em células palmela não-móveis é caracterizado pela formação da parede celular primária dentro da matriz extracelular (HAGEN et al., 2002). A parede celular primária pode ser corada com branco de calcoflúor, indicativo da presença de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídica (HAN et al., 2013). Além disso a formação dos aplanósporos vermelhos é concomitante ao desenvolvimento da parede celular secundária, que contém 3% de materiais resistentes a acetólise. HAGEN et al. (2002) e DAMIANI et al. (2006) sugerem que a parede celular é constituída de algenano, um biopolímero resistente a solventes orgânicos. A resposta mais perceptível de *H. pluvialis* a condições adversas de cultivo é a síntese e acúmulo de grandes quantidades de astaxantina sob a forma de mono e diésteres. Enquanto a síntese de astaxantina inicial utiliza o  $\beta$ -caroteno, a produção em massa de ésteres de astaxantina depende da síntese ácidos graxos (SCHOEFS et al., 2001).

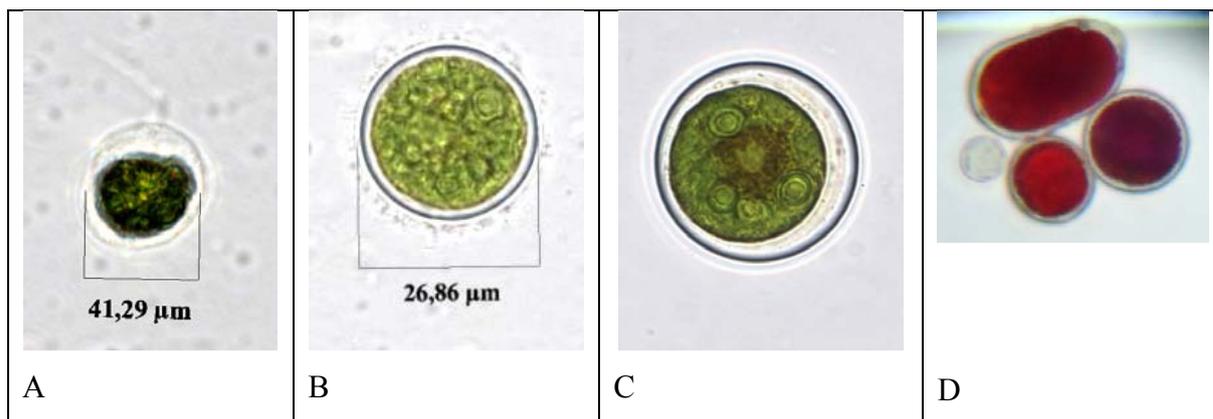


Figura 6 – Figuras de *Haematococcus pluvialis*. **(A)** Forma vegetativa, biflagelada (3 dias); **(B)** Forma palmeloide (8 dias); **(C)** aplanósporo (14 dias) e **(D)** hematocisto maduro (32 dias). Fotos obtidas de culturas do autor.

Como microalga fotoautotrófica, *H. pluvialis* realiza fotossíntese, e através desta o dióxido de carbono é incorporado em composto químico, a glicose. Com auxílio da enzima 1,5 ribulose-difosfato (RuBisCo) carboxilase/oxigenase, as reações de fixação do CO<sub>2</sub> são processadas. A sequência de transformações metabólicas até o produto final é conhecida como o ciclo de Calvin-Benson (CALVIN; BENSON, 1948). As exigências de energia na forma de ATP e NADPH traduzem as transformações do ciclo de Calvin-Benson, inteiramente dependentes da reação fotoquímica, que ocorrem na membrana tilacoidal ou intracitoplasmática (CAMPBELL et al., 1998). Durante as reações fotoquímicas, gera-se uma bomba de elétrons excitados e seu fluxo determina o gradiente do potencial-redox. Esta sequência de transformações metabólicas é conhecida como o ciclo de Calvin-Benson (CALVIN; BENSON, 1948). A fixação de dióxido de carbono não é diretamente dependente da luz e, assim, o processo é chamado de reação fotossintética no escuro. As exigências de energia na forma de ATP e NADPH traduzem as transformações do ciclo de Calvin-Benson, inteiramente dependentes da reação fotoquímica (CAMPBELL et al., 1998). Nesta fase, a energia luminosa é absorvida por estruturas organizadas conhecidas como fotossistemas I e II, localização dos pigmentos fotossintéticos e moléculas transportadoras de elétrons. Isto resulta em uma bomba de elétrons excitados e seu fluxo determina o gradiente do potencial-redox, gerando transportadores de elétrons fortemente eletronegativos. Nesse processo, são finalmente gerados ATP e NADPH. A fotólise da H<sub>2</sub>O, ou reação de Hill, fornece átomos de hidrogênio e elétrons durante o processo de fotossíntese, liberando O<sub>2</sub> (FROMME et al., 2006).

Utilizadoras da energia na forma de ATP e poder redutor na forma de NADPH, as reações de fixação do CO<sub>2</sub> ocorrem na ausência e presença de luz e, embora a carboxilação por

meio da RuBisCo seja a principal via de incorporação de CO<sub>2</sub> em microalgas, esta não é a única via. A carboxilação de fosfoenolpiruvato, catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, é uma outra via de fixação de CO<sub>2</sub>. Oxaloacetato é facilmente convertido em ácidos dicarboxílicos (4 C), por exemplo em malato ou citrato, e subseqüentemente em aminoácidos, tais como aspartato ou glutamato. A via da carboxilação do fosfoenolpiruvato, que decorre da via do ácido dicarboxílico em plantas vasculares, complementa a via redutora das pentoses-fosfato em microalgas. A presença de dois sistemas de carboxilação, operando em paralelo, representa uma importante adaptação das microalgas às alterações ambientais e dificuldades impostas pelo ambiente aquático em comparação com o terrestre quanto ao CO<sub>2</sub>.

Quanto à assimilação do CO<sub>2</sub>, sabe-se que em algumas situações a fixação do CO<sub>2</sub> pode exceder a taxa de assimilação de nitrogênio e, portanto, o excesso de carbono e energia derivada da fotossíntese são armazenados sob a forma de compostos ricos em energia, como os carboidratos e lipídios (FAY, 1983; CAMPBELL et al., 1998; ZAK et al., 2001; Chia et al., 2014). A literatura mostra que tal comportamento fisiológico é comum sob condições de estresse, seja ele por falta de nutrientes (CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013; CHIA; LOMBARDI; MELÃO; et al., 2013b), por excesso de metais (CHIA; MUSA, 2014) ou ainda por altas intensidades luminosas (DONG; ZHAO, 2004). Nessas situações, açúcares e amido são formados através da via redutora das pentoses-fosfato.

A atividade fotossintética em células de *H. pluvialis* varia entre os diferentes estágios do ciclo de vida envolvendo tipos celulares distintos (CHEN et al., 2012). Entre todos os tipos celulares existentes no ciclo de vida de *H. pluvialis*, as células vegetativas, verdes e biflageladas, apresentam a maior atividade fotossintética quantificada através de indução de fluorescência do fotossistema II (PSII). Conforme as células vão aumentando seu conteúdo de pigmentos carotenoides e iniciam a síntese de astaxantina, a atividade fotossintética sofre redução (HAN et al., 2012). Entretanto, Chen et al. (2012) constataram que as formas palmeloides já ricas em carotenos (alaranjadas), foi responsável por 74% da atividade das células vegetativas embora apresentassem redução na atividade fotossintética. Considerando-se que a divisão celular e o conseqüente acúmulo de biomassa de formas palmeloides é pequeno (ZHANG et al., 2009), desconhece-se a finalidade de manter elevada a atividade. Estudos recentes de Kristoffersen et al. (2012) demonstrou que os centros de reação da clorofila *a* não se alteraram significativamente em células com acúmulo de astaxantina, estudos esses realizados através de medição do tempo de vida da fluorescência das moléculas de clorofila *a* e do NADPH *in vivo*; o NADPH é necessário para a síntese de astaxantina no estágio de células

vermelhas e participa do mecanismo de fotoproteção em células estressadas (KRISTOFFERSEN et al., 2012).

Quando *H. pluvialis* na forma de células verdes biflageladas transforma-se em aplanósporos vermelhos ricos em astaxantina, a estrutura da membrana dos tilacoides, sítios fotossintéticos, é comprometida (HAN et al., 2012; PELED et al., 2012). Nesta fase ocorre perda de 50% do conteúdo de clorofila *a* (BOUSSIBA et al., 1999; HAN et al., 2012), além de alterações morfológicas significativas nas células palmeloides, tais como o acúmulo de ésteres de astaxantina, de amido e de lipídios, além da desestruturação dos tilacoides. Apesar dessas alterações, os aplanósporos são fotossinteticamente ativos apenas com pequeno declínio na taxa fotossintética máxima ( $P_{max}$ ) e no rendimento quântico máximo do fotossistema II. Quanto à eficiência fotossintética, há uma redução do rendimento quântico do PSII, apesar de diferenças modestas em termos de proteínas reguladoras entre células vegetativas e células palmeloides (GU et al., 2013). Por outro lado, apesar do declínio da atividade do PSII, a atividade do PSI foi aumentou durante a transformação de células vegetativas verde em aplanósporos vermelhos (HAGEN et al., 1993; TAN et al., 1995; QIU; LI, 2006).

### 3.4 FATORES DE CRESCIMENTO

Condições ambientais ideais definem a taxa de crescimento máxima em microalgas, objetivo de muitos estudos e da produção em massa desses organismos. Fatores limitantes levam à diminuição da taxa de crescimento e, conseqüentemente à perda de biomassa final, o que considerando *H. pluvialis*, resulta em menor número de células produtoras de astaxantina. Qualquer desequilíbrio ambiental que leve à redução do crescimento algal pode favorecer o acúmulo de substâncias de reserva e ajustes bioquímicos são necessários antes que as células possam estabelecer um novo estado de crescimento (VONSHAK; TORZILLO, 2004). Tanto no ambiente natural quanto em cultivos artificiais e controlados, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988).

Fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas individuais da espécie cultivada, bem como com uma possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Fatores químicos relacionam-se à composição do meio de cultura e influenciam tanto o crescimento como a composição bioquímica, que varia com a disponibilidade de nutrientes, salinidade e pH. Fatores físicos são relativos ao fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura (DARLEY, 1982; FÁBREGAS et al., 2001; HATA et al.,

2001; GUERIN et al., 2003; ROUSCH et al., 2003; GARCÍA-MALEA et al., 2005; IMAMOGLU et al., 2007; DEVGOSWAMI et al., 2011). Segundo Gladue (1991), a maioria das espécies algais é fotoautotrófica e, portanto, a síntese de material orgânico como reflexo da produção fotossintética pode ser expressa principalmente pelo incremento da população algal (BALECH, 1977), ou seja, a taxa de crescimento.

Em culturas, a luminosidade varia no espaço (profundidade e latitude) e no tempo (diariamente e sazonalmente), implicando ser este um fator condicionador do crescimento fitoplanctônico. De toda a radiação eletromagnética incidente sobre os organismos fotossintetizantes, somente o espectro visível, e.g., comprimentos de onda entre 400 e 720 nm (radiação fotossinteticamente ativa – PAR), podem ser absorvidos e usados para a fotossíntese (LIPS; AVISSAR, 1990). As clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas são os principais pigmentos envolvidos na fotossíntese em microalgas e cada um absorve luz em comprimentos de onda específicos (ROUND, 1983). Segundo Masojídek et al. (2013), aproximadamente 40% da energia solar que incide sobre a superfície terrestre num dia ensolarado constitui a PAR e equivale a cerca de  $1800 - 2000 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Uma vez captada pelos pigmentos fotossintéticos, a energia luminosa é transferida para os centros de reação onde será utilizada para as reações fotoquímicas. Em cultivos fotoautotróficos, a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético irá repercutir na quantidade de carbono que pode ser fixado, determinando a produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas microalgais (TZOVENIS et al., 2003). Nesses cultivos o regime de luz é um componente crítico na determinação da produção de biomassa (KIRK, 1983; RAVEN, 1984, 1988; FALKOWSKI et al., 1985; TZOVENIS et al., 2003). Numerosos estudos têm examinado como as taxas de crescimento do fitoplâncton fotoautotrófico são afetadas em diferentes condições de fotoperíodo e irradiância (CASTENHOLZ, 1964; PAASCHE, 1967; LITCHMAN, 1998). Uma alteração no regime de luz também pode influenciar a taxa de absorção de nutrientes (BATES, 1976; CLOERN, 1977). Entretanto, o excesso de luz é prejudicial aos fotoautotróficos, pois pode ser gerado efeito de inibição sobre os pigmentos através de sua foto-oxidação e também das enzimas envolvidas no processo fotossintético (BONEY, 1989). Inúmeras formulações matemáticas empíricas, desde as mais simples até equações com uma multiplicidade de fatores, são usadas para descrever a fotossíntese como uma função da intensidade e qualidade da luz, e do fotoperíodo (PETERSON et al., 1987).

Entretanto, não somente a intensidade de luz, mas também sua qualidade interfere no crescimento algal. Conforme Katsuda et al. (2004), *H. pluvialis* apresentou maior crescimento vegetativo quando iluminada com LED vermelho, mas quando submetida a LED azul, os

autores observaram supressão do crescimento vegetativo e a indução de intenso acúmulo de astaxantina. Rivkin (1989), aponta que a qualidade do espectro luminoso e a irradiação causaram distintos efeitos no crescimento e, especialmente, na composição bioquímica das espécies de microalgas estudadas, principalmente em relação à concentração de proteínas, polissacarídeos e clorofilas. Segundo Gunkel (1970), a quantidade, qualidade e mobilidade dos pigmentos fotossintéticos, a distribuição horizontal e vertical do fitoplâncton nos corpos d'água e o tamanho e morfologia das células, estão correlacionados com as condições quantitativas e qualitativas de luz. Boussiba et al. (2000), Orosa et al. (2005), Borowitzka et al. (1991) e García-Malea et al. (2006), relatam os efeitos da temperatura, irradiação, concentração de nitrato e fosfato, pH, e da interação desses fatores sobre o crescimento de *H. pluvialis*, sendo responsáveis por diferenças significativas no crescimento da microalga.

Quanto à nutrição, as microalgas necessitam de diversos nutrientes minerais e algumas, crescem melhor com o acréscimo de vitaminas. Quanto aos macronutrientes ou nutrientes majoritários, as microalgas requerem C, N, O, H e P, além de Ca, Mg, S e K. Como micronutrientes, metais traço ou elementos minoritários, geralmente requerem Fe, Mn, Cu, Mo e Co (GUILLARD, 1975). É conhecido que certas microalgas têm necessidades específicas e, conforme a literatura, as condições nutricionais ótimas requeridas para produção das células verdes de *H. pluvialis* incluem alta concentração de nitrato e fosfato (20 e 1 mM, respectivamente), pH entre 6.0 – 7.0 e adição de acetato (0,25% p/v) como fonte de energia adicional (BOROWITZKA et al., 1991; BOUSSIBA et al., 2000; OROSA et al., 2005). Segundo Garcia-Malea et al., (2005) a baixa produção de células verdes nas culturas de *H. pluvialis* pode limitar o processo de produção de astaxantina, uma vez que este pigmento é acumulado no interior dos cistos. Portanto, a otimização da fase de crescimento vegetativo em *H. pluvialis* é importante para alcançar-se bom rendimentos de astaxantina.

O controle do pH é importante para que os nutrientes estejam em forma disponível no meio de cultura e a alga possa utiliza-los. O borbulhamento de CO<sub>2</sub> em culturas de microalgas fotoautotróficas pode ser usado não somente como nutriente, mas também como controlador do pH, que aumenta em decorrência do crescimento algal. Sabe-se que em culturas estanques, o pH pode atingir valores elevados e tornar o meio impróprio para o crescimento algal. O uso de tampões de pH é pode evitar a variação do pH, ou proporcionar variações discretas, toleráveis pelas microalgas (LOURENÇO, 2006). Considerando que o pH controla o crescimento algal, o sistema carbonato (CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e o equilíbrio NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (BERENGUEL et al., 2004), seu estudo requer abordagem detalhada.

Dentre os macronutrientes, o carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para algas, inclusive as espécies mixotróficas. Essa demanda deve-se ao carbono constituir em esqueleto de todas as moléculas orgânicas sintetizadas pelas células, tais como as proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios, e outras. Culturas de microalgas podem tornar-se limitadas em carbono mesmo em baixa densidade celular (LOMBARDI; MALDONADO, 2011) e, dependendo da velocidade de crescimento haverá rápido consumo do carbono disponível com elevação do pH da cultura para valores superiores a pH 9.0 em sistemas não tamponados (LOURENÇO, 2006). O equilíbrio do carbono em sistemas aquosos é mostrado na Figura 7.

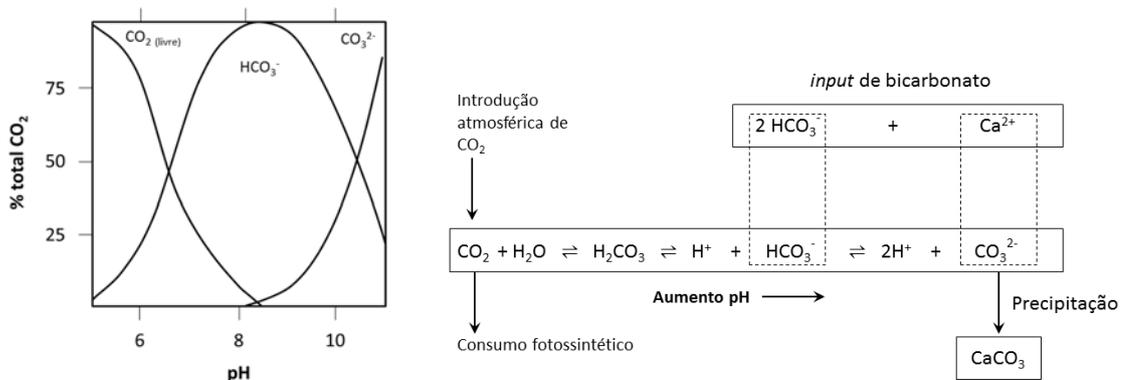


Figura 7 – O pH no sistema  $\text{CO}_2$  – carbonato em águas naturais. As quantidades relativas dos 3 componentes,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ , determinam o pH da água, como mostrado na figura. Alterações na concentração de um componente desloca o equilíbrio. Retirada fotossintética de  $\text{CO}_2$  podem elevar o pH até o ponto onde  $\text{CO}_3^{2-}$  é precipitado como um sal de cálcio.

### 3.5 SISTEMAS DE CULTIVOS

Os sistemas de cultivo para produção de biomassa microalgal são diversos e utilizados em escala laboratorial e industrial (UGWU et al., 2008; JORQUERA et al., 2010). Sistemas abertos consistem de áreas com grande superfície de contato com o ar e, embora apresentem menor produtividade, são preferidos em função dos menores custos de instalação e manutenção. Os tanques abertos tipo *raceway* são considerados a forma mais simples e de baixo custo de produzir microalgas. Tais tanques são do tipo *volta infinita*, onde a cultura é circulada continuamente e em círculos por meio de pás giratórias. Podem ser sistemas inclinados, onde a mistura é feita por bombeamento e pela força da gravidade, ou ainda lagoas circulares, onde a

agitação é provida por um braço rotatório. Em comum, todos esses tanques apresentam profundidade de cerca de 30 centímetros (TREDICI, 2004; UGWU et al., 2008). A Figura 8 mostra exemplos de sistemas de cultivo abertos.

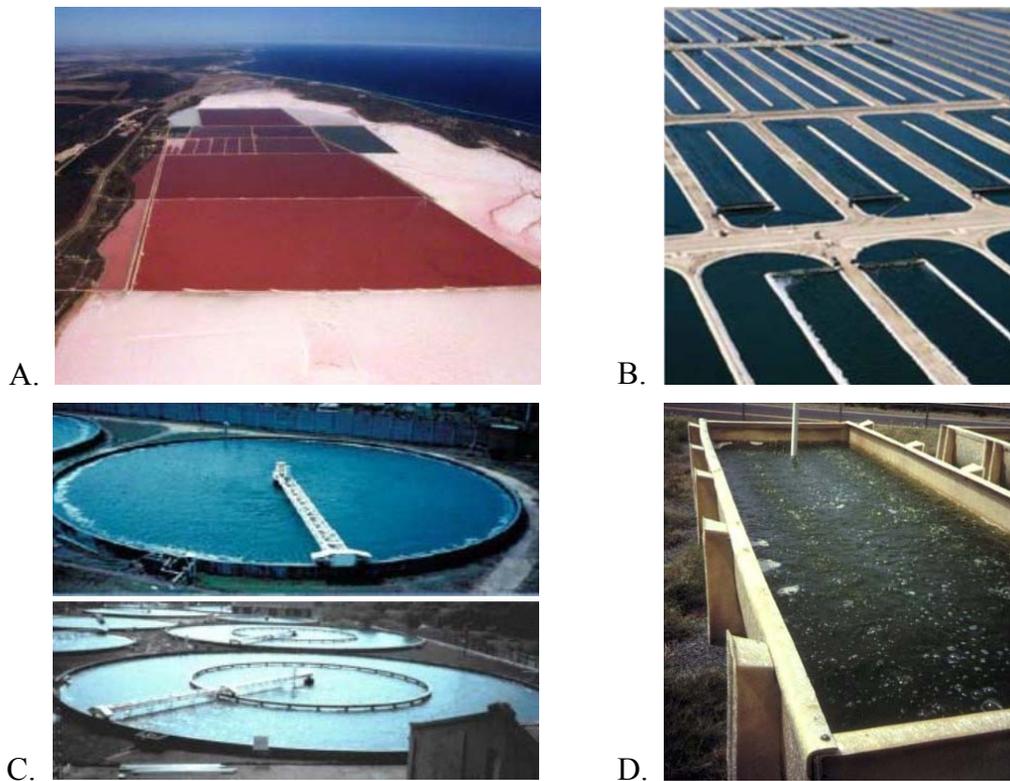


Figura 8 – Sistemas abertos para produção de microalgas. A. Produção de *Dunaliella salina* em lagoas abertas na Austrália. B. Sistema *raceway*, cultivo de *Spirulina* nos EUA. C. Lagoa circular para produção de *Chlorella* em Taiwan. D. Produção de *Nannochloropsis* para aquicultura. Fonte: Borowitzka (2005), Chisti (2007) e Benemann (2008).

Segundo Ugwu et al. (2008), uma das vantagens de utilizar lagoas abertas é que são mais fáceis de construir e operar do que os sistemas fechados. No entanto, existe uma deficiência de utilização da luz pelas células, que requerem grandes áreas de terra pois o sistema deve ser raso para que luz seja provida até o fundo. Além disso, existe um maior risco de contaminação por predadores.

Os sistemas fechados para cultivo de microalgas são representados por fotobiorreatores que podem assumir diferentes geometrias como planar, tubular, espiral, serpentina, entre outros. Neste tipo de sistema é possível controlar algumas variáveis do meio, como temperatura, fluxo de aeração e tipo de iluminação (solar, artificiais, ou ambas). A Figura 9 apresenta algumas configurações para fotobiorreatores.

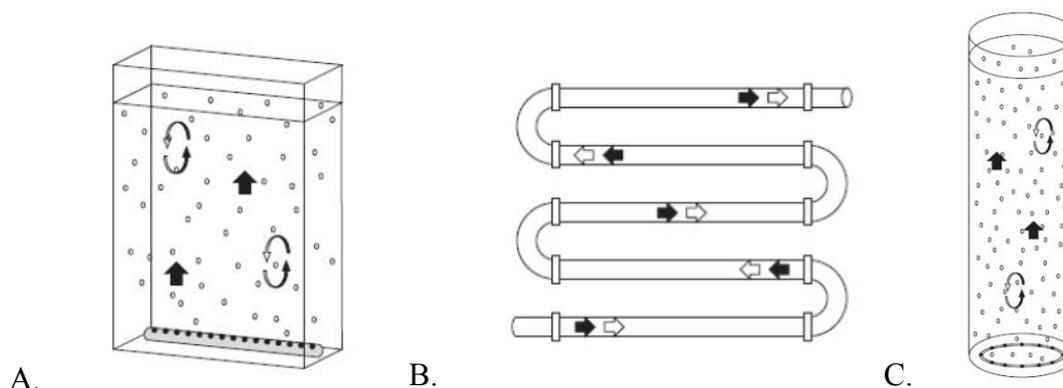


Figura 9 – Geometrias comuns na construção de fotobiorreatores. **A.** Plana. **B.** Tubular. **C.** Cilíndrica. Fonte: Adaptado de Jacobi et al. (2010).

As principais vantagens do uso de fotobiorreatores citados por Ugwu et al. (2008) são: menores perdas de água por evaporação, redução de contaminação por outros microorganismos, maior facilidade na colheita de biomassa, que se concentra em menores volumes de cultura, controle maior das trocas gasosas entre o cultivo e o ar atmosférico ou gás de combustão, menor área requerida, maior rendimento por unidade de área e volume, possibilidade de obter cultivos com alto grau de pureza, dentre outros. As limitações do uso de fotobiorreatores citadas por Mata et al. (2010) e Ugwu et al. (2008) são:

- Tipo tubular: acúmulo e crescimento de biomassa nas paredes, possibilidade de ocorrer gradiente de pH, gradiente de  $O_2$  e  $CO_2$  ao longo dos tubos;
- Placas planas: aumento de escala requer muitos compartimentos e materiais de suporte, estresse hidrodinâmico, acúmulo celular nas paredes;
- Colunas verticais: predomínio de pequena área de superfície iluminada, que se agrava com o aumento de escala, construção requer materiais sofisticados; possível estresse por cisalhamento.

Considerando ainda todos os sistemas apresentados, os mesmos podem seguir em método estanque ou estanques, semicontínuos e contínuos. No cultivo em estanque, as células são inoculadas no meio de cultura fresco e nenhum outro componente é adicionado ao longo do desenvolvimento do cultivo e, com o tempo os nutrientes esgotam-se e há acúmulo de metabólitos eventualmente liberados pelas algas. Esse método é caracterizado por etapas

definidas. A Figura 10 apresenta a curva de produção de biomassa em culturas laboratoriais de *Haematococcus pluvialis* em função de tempo experimental.

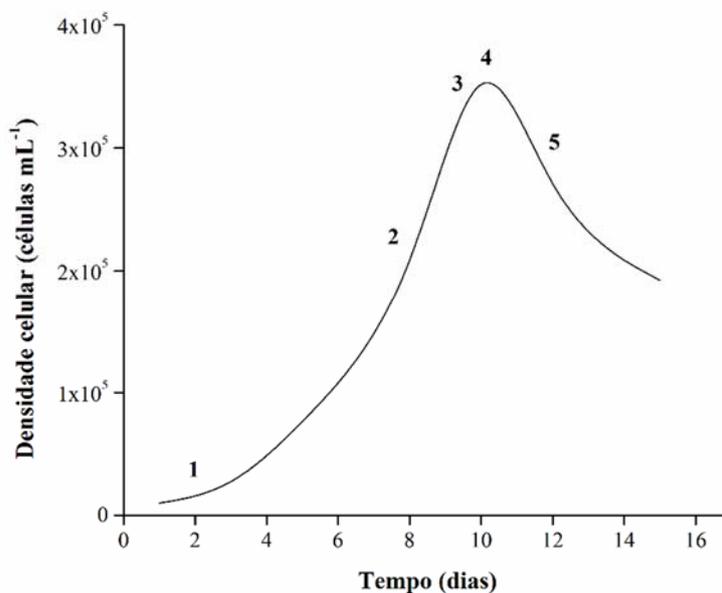


Figura 10 – Representação esquemática do desenvolvimento de *H. pluvialis* em um cultivo estanque (Meio Oligo modif. suplementado com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), exibindo cinco fases distintas de crescimento. Fonte: Resultados desta pesquisa.

- (1) **Fase de adaptação ou lag:** ocorre devido à presença de células inviáveis ou cistos (aplanósporos) no inóculo, ou devido ao período de adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo, mas pode ser evitada quando células em crescimento exponencial são usadas como inóculo;
- (2) **Fase exponencial ou logarítmica:** inicia o crescimento vegetativo e multiplicação celular. As células dividem-se como uma função exponencial do tempo enquanto substratos como luz e temperatura adequados estiverem disponíveis;
- (3) **Fase de redução do crescimento ou de transição:** marcada pelo decréscimo relativo da taxa de crescimento, pela redução dos nutrientes dissolvidos e, geralmente, pelo aumento dos efeitos do autosombreamento quando se trata de culturas densas;
- (4) **Fase estacionária:** nesta fase o cultivo, que atingiu o rendimento final máximo mantém-se sem aumento; não há crescimento, pois taxa mortalidade iguala-se à de formação de novas células;
- (5) **Fase de declínio ou de morte:** é marcada pela morte e lise de muitas células; não há crescimento efetivo.

Os cultivos contínuos são caracterizados por um processo permanente de saída de cultura com microalgas e entrada de meio no recipiente de cultivo, baseado em dois diferentes sistemas, turbidostato e quimiostato. Nesse último, a taxa de adição de meio e remoção de cultura são iguais e constantes, sendo o sistema utilizado quando deseja ajuste da fisiologia das células às condições de cultura existentes e da manutenção das taxas de crescimento específico em valores pré-determinados. No turbidostato, a concentração de células da cultura é mantida constante através do controle da vazão de meio.

Os cultivos semicontínuos são caracterizados pela remoção de meio usado com células em intervalos periódicos e adição de meio fresco sem células, o que resulta em diluição das culturas e consequente variação da densidade, como mostrado na Figura 11. Nessas culturas, o estado fisiológico das células é mantido saudável, similarmente aos sistemas contínuos (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Embora os cultivos contínuos e semicontínuos forneçam microalgas com maior uniformidade do que em outros tipos de cultivo, podem ser necessários dias ou até semanas para estabilizar esse regime de cultivo.

O cultivo contínuo é considerado o que melhor fornece as condições ideais de cultivo às células, uma vez que os nutrientes, pH, e outros parâmetros são mantidos constantes (LOMBARDI; WANGERSKY, 1991).

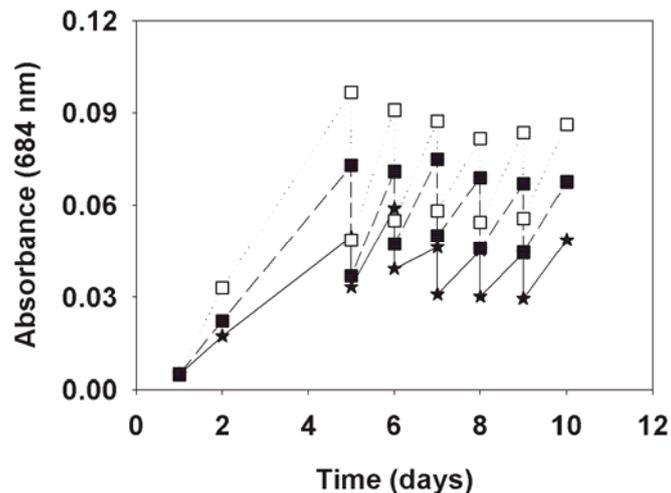


Figura 11 – Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em cultivo semicontínuo, com as características de variações de densidade de células em decorrência das remoções dos cultivos. Fonte: Chia et al. (2013).

### 3.6 FLUORESCÊNCIA *IN VIVO* EM CULTURAS DE MICROALGAS

A fluorescência *in vivo* vem sendo usada há muitas décadas como indicador de crescimento de microalgas em culturas. Medidas de fluorescência *in vivo* são realizadas em fluorímetros, que são calibrados com solução de clorofila. Esta pode ser obtida diretamente de culturas em fase exponencial de crescimento. Devido às suas vantagens, a fluorescência *in vivo* é a segunda forma mais difundida de monitoramento de cultivos de microalgas, ficando atrás apenas das contagens de células. Entretanto, a fluorescência *in vivo* apresenta algumas limitações pois baseia-se em respostas do aparato fotossintético e, por isso é influenciada pelo estado fisiológico das células. Por exemplo, culturas sob limitação de nutrientes podem exibir respostas de fluorescência mais altas sem que haja aumento de biomassa, o que pode-se dar em decorrência da perda de eficiência de captação de energia luminosa (LOURENÇO, 2006) ou aumento do tamanho celular (LOMBARDI, 1990).

A fluorescência é utilizada para avaliar a eficiência fotossintética e, nesse caso, aparato especial é usado, tal qual o PhytoPAM (Walz) e outros de fluorescência modulada. Quando a radiação luminosa atinge uma célula dotada de fotossistemas ativos, pode ocorrer: absorção efetiva da luz pelo processo fotossintético, que corresponde à menor parte do total, sua reflexão, sua conversão em energia térmica e produção de fluorescência.

As moléculas de clorofila absorvem fótons oriundos da luz e alteram temporariamente ( $\approx 10^{-8}$  s) suas configurações eletrônicas. Estes pigmentos passam do estado basal (Chl *a*) para o estado excitado, denominado de *singlet 1* (Chl *a*\*), que é instável. Desta maneira, após as clorofilas receberem a energia dos fótons, dissipam-na por meio de três vias principais, sendo que a somatória dessas vias iguala-se a 1:

- a) **Dissipação fotoquímica (*qP*):** é a utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese (Figura 12). Esta energia dissipada é usada para a formação do poder redutor (NADPH) e energia (ATP), os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético.
- b) **Fluorescência (*F*):** emissão de radiação na região do visível (vermelho e vermelho distante).
- c) **Dissipação não-Fotoquímica (*qN*):** é a dissipação de energia luminosa predominantemente na forma de calor (radiação infravermelha).

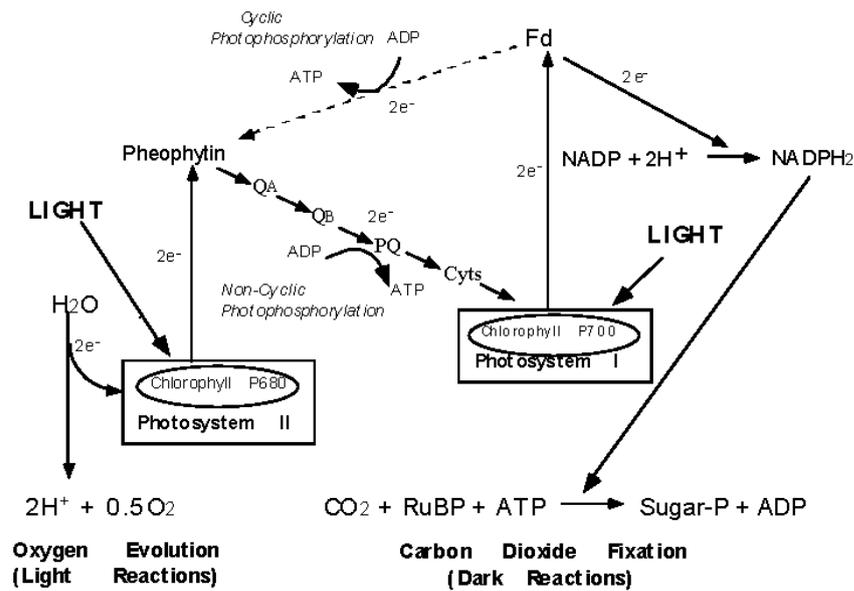


Figura 12 – Representação esquemática simplificada do processo fotossintético. Fonte: Campostrini (1998).

Os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofilas ( $qP + F + qN$ ) são competitivos (sua somatória é igual a 1,0), ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causará alterações complementares na emissão da fluorescência. Sendo assim, alterações na fluorescência podem mostrar a ausência ou presença de comprometimentos no processo fotossintético.

Na temperatura fisiológica, praticamente toda a fluorescência ( $\sim 99\%$ ) é proveniente das moléculas de clorofilas associadas ao PSII. Portanto, diz-se que as variações da fluorescência refletem o estado primário do PSII e seu rendimento de fluorescência ( $\phi$  PSII) pode ser definido como (BOLHÀR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993) apresentado abaixo.

$$\phi = F / (qP + F + qN)$$

Recentes progressos relacionados à pesquisa da fluorescência para inferir sobre eficiência fotossintética têm sido obtidos após construção dos fluorímetros específicos, dotados de dispositivos para fluorescência modulada (ÖGREN; BAKER, 1985; SCHREIBER et al., 1986; SCHREIBER, 1986). Estes equipamentos se diferenciam dos equipamentos do tipo não modulado, pois utilizam uma fonte luminosa de excitação modulada (1 a 100 kHz), em conjunto com um sistema de detecção de fluorescência. Estes aparelhos permitem monitorar a

fluorescência na presença de uma luz contínua de qualquer comprimento de onda, incluindo a luz solar. Um esquema ilustrado deste equipamento é mostrado na Figura 13. Normalmente, a luz modulada inicial aplicada após o tecido vegetal ter sido mantido no escuro é de baixa intensidade ( $<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e não induz excitação na clorofila *a* (portanto não há fluorescência – sinal basal,  $F_0$  – Figura 14), mas uma segunda fonte de luz fotossinteticamente ativa (luz actínica) de maior intensidade (intensidade usada em cultivos algais) induz a cinética da curva de fluorescência resultante da excitação da clorofila. As análises das dissipações ou *quenchings* podem ser obtidas com uma luz de elevada intensidade luminosa ( $>2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) usada para saturar os centros de reação dos fotossistemas. Os fluorímetros modulados têm facilitado as análises das dissipações de energia.

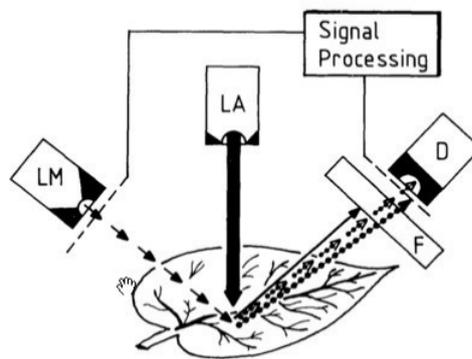


Figura 13 – Esquema genérico de construção de fluorímetro (sistema modulado) LA: fonte luminosa (luz actínica branca; LM: luz modulada; D: detector; am: amplificador sincronizado com o pulso da fonte luminosa; F: filtro de banda longa (690, 710 e 730 nm). Fonte: (BOLHÄR-NORDENKAMPF et al., 1989).

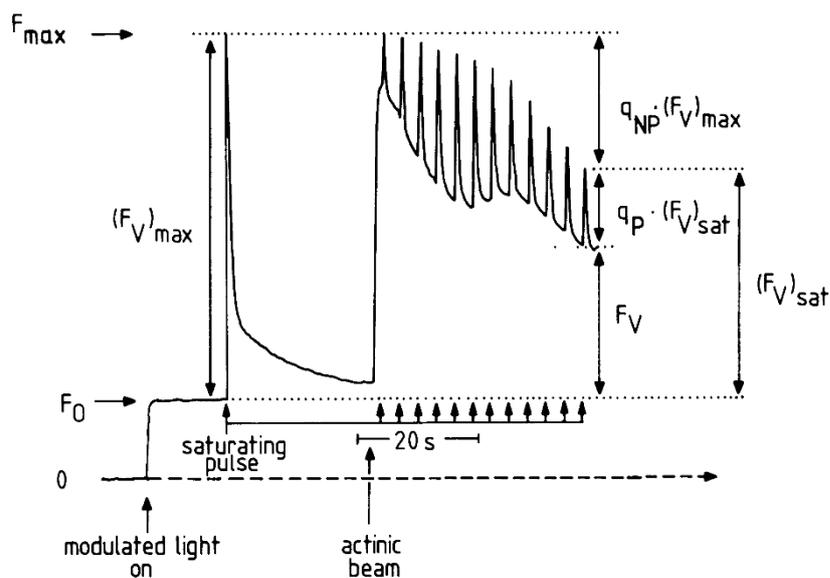


Figura 14 – Definição dos coeficientes de extinção e terminologia característica dos parâmetros da fluorescência medida com fluorímetros modulados. Note-se que com luz actínica desprezível,  $F_0$  é facilmente discernível.  $F_{\max}$  é a fluorescência máxima obtida de amostra adaptada ao escuro e posteriormente submetida a pulso saturante de luz.  $(F_V)_{\max}$ , emitindo a fluorescência máxima variável. A dissipação fotoquímica ( $q_P$ ) e não-fotoquímica ( $q_N$ ) são, respectivamente, determinadas por aplicação de um breve pulso de saturação em qualquer momento através da curva de indução, tal como indicado na Figura.  $(F_V)_{\text{sat}}$  é a fluorescência variável obtida com a adição do pulso de saturação. Figura obtida de um fluorímetro modelo Mini-PAM (Walz, Alemanha) e adaptada partir de Schreiber et al. (1986).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Em todo o desenvolvimento desta pesquisa empregou-se a microalga *Haematococcus pluvialis* por apresentar interesse tecnológico devido à elevada quantidade de astaxantina que produz e seu cultivo ainda ser rodeado de desafios não esclarecidos.

#### 4.1.1 *Haematococcus pluvialis*, Flotow, 1844.

Reino *Plantae*

Filo *Chlorophyta*

Classe *Chlorophyceae*

Ordem *Volvocales*

Família *Haematococcaceae*

Gênero *Haematococcus*

Espécie *Haematococcus pluvialis*

Posição taxonômica segundo van den Hoek et al. (1995).

A cepa desta espécie (Figura 15) foi adquirida do Canadian Center for the Culture of Microorganisms (UBC, Vancouver, Canada), sob o código 7072 e foi mantida no Laboratório Biotecnologia de Algas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, SP, Brasil) em meio L. C. Oligo (AFNOR, 1980).

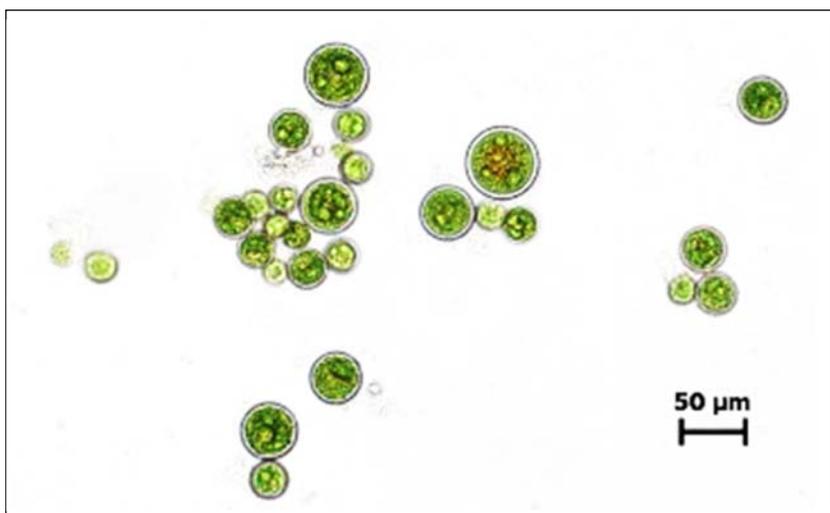


Figura 15 – Fase vegetativa da microalga *Haematococcus pluvialis*. Foto obtida de culturas do autor.

## 4.2 CULTURAS

Foram testados 4 meios de cultura diferentes (BBM, BG-11, OHM e L. C. OLIGO), resultando em 15 diferentes composições.

Culturas de *H. pluvialis* foram mantidas em Meio L. C. Oligo (AFNOR, 1980) modificado, cuja composição é mostrada na Tabela 3. Este meio foi empregado na manutenção dos inóculos e experimentos. Todos os meios de cultura para cultivos em modalidade estanque (*batch*) foram confeccionados com água destilada em frascos Erlenmeyer e esterilizados em autoclave (Phoenix, Linha AVPlus) a 121 °C por 20 minutos.

Antes do início dos experimentos a cepa era mantida em frascos de Erlenmeyer de até 500 mL durante 30 dias para a geração de biomassa e cistos. Após esse período, as culturas foram submetidas à luminosidade intensa ( $250 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (FÁBREGAS et al., 2001) por 10 dias para indução da formação cistos vermelhos maduros, que foram usados como inóculo para os experimentos. Devido à irregularidade na replicação inicial e ciclo de vida complexo da alga, todos os experimentos foram iniciados a partir de cistos vermelhos maduros, o que garantiu homogeneidade do inóculo e diminuição do erro experimental.

## 4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento desta tese foram realizados 4 experimentos de cultivos da microalga *H. pluvialis* (Figura 16). No primeiro (experimento E1) foi avaliada a influência do meio de cultura sobre os parâmetros de crescimento (densidade celular máxima, tempo de cultivo e taxa de crescimento específica em cultivos estanques), durante 24 dias, que corresponde ao tempo das fases exponencial e estacionária.



Figura 16 – Fluxograma do planejamento experimental.

Como resultado deste experimento, foi selecionado o meio de cultivo 6, (Tabela 3) para os experimentos seguintes. O segundo experimento (E2) teve como objetivo avaliar o efeito de tampões na manutenção do pH das culturas e os mesmos parâmetros de crescimento analisados no E1, além dos parâmetros da cinética de indução da fluorescência da clorofila e a composição bioquímica da biomassa foram avaliados. O terceiro experimento (E3) teve como objetivo comparar sistemas de cultivo estanque e contínuo no crescimento da microalga, durante 14 dias, correspondentes a 1ª e 2ª fases exponenciais, esperando-se com isso obter maior biomassa vegetativa e conseqüentemente cistos, uma vez que as condições no método contínuo são fisiologicamente mantidas ideais por período de tempo mais prolongado. Nesse, foram avaliados os parâmetros de crescimento, da cinética de indução da fluorescência da clorofila e o perfil bioquímico da biomassa. O quarto experimento (E4) fundamentou-se em cultivos estanques e contínuos buscando analisar curvas de saturação de luz e seus parâmetros, sob as mesmas condições de cultivo do experimento E3.

Para todos os experimentos estanques os ensaios foram feitos em Erlenmeyer de vidro com 500 mL capacidade contendo 200 mL de meio (Figura 17), inoculados com cistos maduros de *H. pluvialis* em densidade final de  $10^4$  células  $m L^{-1}$  (proporção de aproximadamente 10% em relação ao volume de meio de cultivo). Todos os cultivos foram mantidos sob iluminação com lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (General Eletric, 80 W), numa irradiância de  $65 \mu\text{mol f\u00f3tons } m^{-2} s^{-1}$ , fotoper\u00edodo 12 h luz : 12 h escuro e temperatura de  $23 \pm 2$  °C. Todos os experimentos, estanques e cont\u00ednuos, foram realizados com 3 r\u00e9plicas experimentais. Amostragens das culturas foram feitas em dias alternados.



Figura 17 – Frascos de cultura de *Haematococcus pluvialis* empregados nos experimentos.

Para os ensaios em diferentes pHs (E2) *H. pluvialis* foi cultivada em pH 6.0, 6.3, 6.7 e 7.2, próximo da faixa de cultivo sugerido pela literatura (SUH et al., 2006; KIM et al., 2006; CIFUENTES et al., 2003; HARKER et al., 1996; KOBAYASHI et al., 1993; OROSA et al., 2005) com o uso de tampões orgânicos, que foram usados em concentração final de 1,0 mM. Os tampões consistiram de ácido 2-morfolinoetano sulfônico monoidratado (MES), atuante para pH 6.0 e 6.3; piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES), para pH 6.7 e ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES), para pH 7.2. O controle não recebeu tampão mas teve o pH inicial ajustado em  $6.3 \pm 0.5$  (KOBAYASHI et al., 1993; HARKER et al., 1996; CIFUENTES et al., 2003; OROSA et al., 2005; SUH et al., 2006).

Tabela 3 – Concentrações finais dos componentes dos meios de cultura autotróficos usados para cultivo de *Haematococcus pluvialis*. Os valores estão expressos em molar (M), indicado em g L<sup>-1</sup>.

Reagentes	Meio 1		Meio 2		Meio 3		Meio 4		Meio 5		Meio 6		Meio 7	
	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo	Oligo (2×)	Oligo	Oligo	Oligo
		NaHCO <sub>3</sub> (2×)		NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (2×)		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2×)				NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)		NH <sub>4</sub> Cl + Vitaminas
B <sub>1</sub> (tiamina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,96×10 <sup>-7</sup>
B <sub>7</sub> (biotina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,05×10 <sup>-9</sup>
B <sub>12</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,69×10 <sup>-10</sup>
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	1,45×10 <sup>-6</sup>	2,90×10 <sup>-6</sup>	2,90×10 <sup>-6</sup>	2,90×10 <sup>-6</sup>	9,96×10 <sup>-6</sup>
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	1,43×10 <sup>-7</sup>	2,86×10 <sup>-7</sup>	2,86×10 <sup>-7</sup>	2,86×10 <sup>-7</sup>	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	1,70×10 <sup>-4</sup>	3,40×10 <sup>-4</sup>	3,40×10 <sup>-4</sup>	3,40×10 <sup>-4</sup>	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>	2,52×10 <sup>-7</sup>	2,52×10 <sup>-7</sup>	2,52×10 <sup>-7</sup>	1,26×10 <sup>-7</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	2,40×10 <sup>-7</sup>	2,40×10 <sup>-7</sup>	2,40×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	1,57×10 <sup>-6</sup>	3,14×10 <sup>-6</sup>	3,14×10 <sup>-6</sup>	3,14×10 <sup>-6</sup>	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	1,12×10 <sup>-6</sup>	2,24×10 <sup>-6</sup>	2,24×10 <sup>-6</sup>	2,24×10 <sup>-6</sup>	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>	9,80×10 <sup>-7</sup>	9,80×10 <sup>-7</sup>	9,80×10 <sup>-7</sup>	4,90×10 <sup>-7</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	2,30×10 <sup>-4</sup>	4,60×10 <sup>-4</sup>	4,60×10 <sup>-4</sup>	4,60×10 <sup>-4</sup>	1,04×10 <sup>-3</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,96×10 <sup>-3</sup>
KNO <sub>3</sub>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	2,40×10 <sup>-4</sup>	2,40×10 <sup>-4</sup>	2,40×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>
Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	1,20×10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-
Mn(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,40×10 <sup>-7</sup>	2,40×10 <sup>-7</sup>	2,40×10 <sup>-7</sup>	1,2×10 <sup>-7</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	3,58×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,87×10 <sup>-2</sup>
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	7,16×10 <sup>-4</sup>	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	2,00×10 <sup>-3</sup>	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>	4,80×10 <sup>-8</sup>	4,80×10 <sup>-8</sup>	4,80×10 <sup>-8</sup>	2,40×10 <sup>-8</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>	2,00×10 <sup>-7</sup>	2,00×10 <sup>-7</sup>	2,00×10 <sup>-7</sup>	1,00×10 <sup>-7</sup>

Os cultivos do experimento 3 ilustrados na Figura 18, o CO<sub>2</sub> foi usado para ajuste de pH e otimização do crescimento vegetativo. O gás foi obtido de um cilindro de ar comprimido enriquecido com CO<sub>2</sub> 20% (v/v) (White Martins) e a cultura foi aerada diariamente em uma vazão de 0,6 L min<sup>-1</sup>, durante 5 min pra manutenção do pH. O cultivo teve a duração de 14 dias. A vazão do gás foi estimada por intermédio de um rotâmetro de gás (MORIYA, 0 – 15 L min<sup>-1</sup>).



Figura 18 – Frascos de cultura de *Haematococcus pluvialis* suplementados com CO<sub>2</sub> empregados nos experimentos.

As culturas contínuas são apresentadas na Figura 19, fotobiorreatores cilíndricos confeccionados em acrílico com diâmetro interno de 15 cm e volume total de 2 L. Na parte inferior de cada reator há um tubo no qual ocorre entrada de CO<sub>2</sub> para manutenção de pH. Uma bomba peristáltica foi utilizada para alimentação de meio fresco e retirada de meio. O CO<sub>2</sub> usado foi o mesmo que no experimento anterior (80:20 – ar:CO<sub>2</sub>) com vazão de borbulhamento de 0,6 L min<sup>-1</sup>, durante 5 min diários pra manutenção do pH, durante 14 dias de cultivo. Essas culturas foram amostradas em dias alternados.

As curvas de saturação da fotossíntese em relação à luz fotossinteticamente ativa (RFA) foram obtidas com um fluorômetro multicanal de clorofila (PHYTO-PAM, Walz®), versão MODULAR. As variáveis  $\alpha$ , ETR<sub>max</sub> e I<sub>k</sub>, foram determinadas em diferentes níveis de RFA incidente (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 192, 256, 320, 384, 448, 512, 576, 640 e 704  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), iniciando as sequ\u00eancias sempre dos valores inferiores para os superiores. O tempo m\u00ednimo pr\u00e9-estabelecido para a estabiliza\u00e7\u00e3o das leituras em cada n\u00edvel de RFA foi de

20 segundos, e o máximo foi de 180 segundos. Todas as leituras foram realizadas entre as 08h00 e 9h00h, através da rotina *Light Curve* do software PhytoWin v. 2.13 e os dados de fluorescência obtidos, foram automaticamente armazenados e processados.

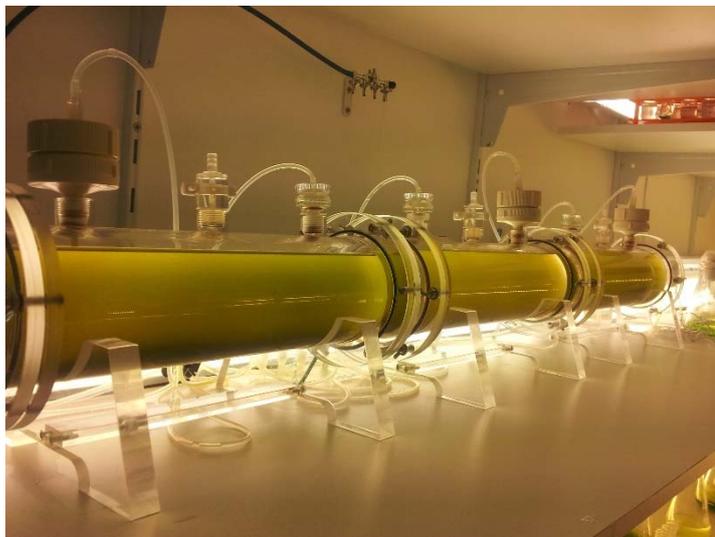


Figura 19 – Fotobiorreatores cilíndricos empregados nos experimentos. Cultivo contínuo de *Haematococcus pluvialis* suplementados com CO<sub>2</sub>.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Todas as culturas tiveram a duração de 24 dias e os parâmetros de crescimento foram monitorados em dias alternados. Amostras foram obtidas para contagem de células em câmara de Fuchs-Rosenthal sob microscópio óptico (Leica, Alemanha) e determinação da absorbância em 680 nm e 750 nm (KATSUDA et al., 2004) em espectrofotômetro (FEMTO Modelo 800 XI, São Paulo, Brasil). As taxas de crescimento específicas ( $\mu$ ) foram calculadas através da representação gráfica do log natural do número de células em função do tempo experimental e cálculo de regressão linear para a fase de crescimento exponencial (linear). Nesse caso, o coeficiente angular representa a taxa de crescimento específica. A densidade final de células foi determinada assim que a divisão celular começou a diminuir no final da fase exponencial (KNAUER et al., 1997), no 11º dia de cultivo. A concentração de clorofila *a* (mg L<sup>-1</sup>) foi determinada através de fluorescência *in vivo*, usando-se um fluorímetro da marca Turner Designs, U.S.A. (modelo *Trilogy*) por meio da relação entre concentração de clorofila *a* extraída

de culturas de *Chlorella sorokiniana* em fase exponencial de crescimento e intensidade de fluorescência obtida através de uma curva de calibração.

#### 4.5 PARÂMETROS DA CINÉTICA DE INDUÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA

Os parâmetros da cinética de indução da fluorescência da clorofila foram determinados para cada tratamento após 11 dias de cultivo, conforme modelo descrito por Roháček (2002) usando um aparelho PHYTO-PAM® Fluorometer Analyser (Walz, Alemanha) equipado com uma unidade óptica ED-101US/MP. O equipamento forneceu automaticamente, todos os valores que foram usados nas figuras (ETR,  $\alpha$  e  $I_k$  e as curvas de saturação de luz).

Amostras das culturas foram obtidas cerca de 2 – 3 h após início do fotoperíodo com as células adaptadas ao escuro (estado adaptado ao escuro, EAE) por 15 min para determinação dos parâmetros da fluorescência inicial ( $F_o$ ) obtido com luz modulada de baixa intensidade ( $< 0,3 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de acordo com Genty et al. (1989) e Havaux et al. (1991). A fluorescência máxima foi determinada após pulsos de luz saturante com  $2.600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e duração de 0,3 s, que foram reproduzido sem frequência de 600 Hz. A fluorescência variável ( $F_v$ ) foi determinada pela diferença entre  $F_o$  e  $F_m$ . Com os valores de  $F_v$  e  $F_m$  foi obtida a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (SCHREIBER et al., 1986; SCHREIBER; BILGER, 1993), valor fornecido pelo equipamento. Determinados os parâmetros no EAE, as amostras foram submetidas à luz actínica em intensidade de  $64 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 10 min para a determinação dos parâmetros do estado adaptado à luz (EAL): fluorescência máxima na luz ( $F_m'$ ) e fluorescência inicial na luz ( $F_o'$ ). Observamos que essa intensidade de luz é próxima daquela em que a célula é exposta durante o cultivo e, assim torna-se possível quantificar o rendimento fotossintético durante os cultivos. Nesta análise foram obtidos os parâmetros de fluorescência variável no EAL ( $F_v' = F_m' - F_o'$ ), coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ), coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ - 99% calor) e  $\Phi_{\text{PSII}}$  (eficiência quântica fotoquímica efetiva do PSII  $F_v'/F_m'$ ) (ROHÁČEK, 2002). Todos esses valores são fornecidos pelo equipamento. Os valores dos parâmetros de fluorescência foram normalizados em relação à  $F_o$  de acordo com Roháček e Barták (1999). Antes da determinação das amostras, um branco era realizado através de filtragem ( $0,22 \mu\text{m}$ ) de parte da amostra e o líquido sem células usado como branco, de modo a detectar qualquer sinal de fluorescência de fundo.

#### 4.6 CURVAS DE SATURAÇÃO DA FOTOSÍNTESE EM RESPOSTA À RADIAÇÃO LUMINOSA (CURVAS DE LUZ)

As curvas de saturação da fotossíntese foram obtidas no mesmo fluorômetro usado para a cinética de indução da fluorescência, um PHYTO-PAM(Walz®).

Os parâmetros das curvas foram obtidos usando o modelo de Eilers e Peeters(1988) e o ajuste dos dados por meio da equação:

$$ETR = \frac{PAR}{aPAR^2 + b PAR + c}$$

Onde ETR é a taxa de transporte de elétrons, PAR é a irradiância ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a, b e c s\u00e3o os par\u00e2metros de ajuste. Com estes par\u00e2metros \u00e9 poss\u00edvel calcular a inclina\u00e7\u00e3o inicial ( $\alpha = c^{-1}$ ), a taxa m\u00e1xima de fotoss\u00edntese ( $P_{\text{max}} = [b + 2(ac)^{1/2}]^{-1}$ ) e a irradi\u00e2ncia \u00f3tima ( $I_k = P_{\text{max}}/\alpha$ ) (Figura 20).

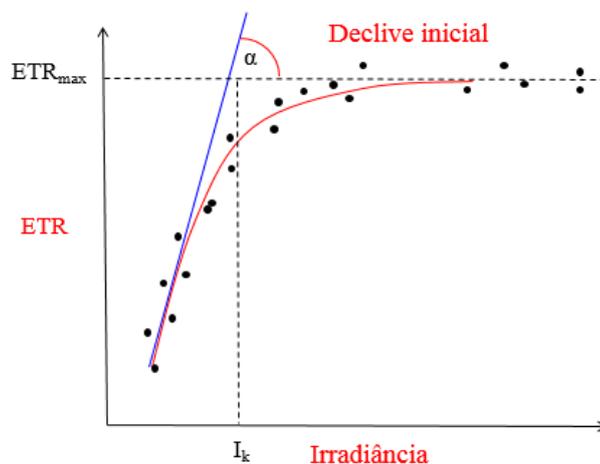


Figura 20 – Curva t\u00edpica Fotoss\u00edntese versus Irradi\u00e2ncia, indicando os par\u00e2metros obtidos. Fonte: Adaptado de Harding et al., (1987).

As vari\u00e1veis  $\alpha$ ,  $rETR_{\text{max}}$  ( $P_{\text{max}}$ ) e  $I_k$ , foram determinadas em diferentes intensidades de luz act\u00ednica incidente (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 192, 256, 320, 384, 448, 512, 576, 640 e 704  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), iniciando as seq\u00fc\u00eancias sempre dos valores inferiores para os superiores. O tempo m\u00ednimo pr\u00e9-estabelecido para a estabiliza\u00e7\u00e3o das leituras em cada intensidade de luz act\u00ednica foi de 20 segundos, e o m\u00e1ximo foi de 180 segundos. Todas as leituras foram realizadas

entre as 8:00 e 9:00 h, através da rotina *Light Curve* do software PhytoWin v. 2.13 e os dados de fluorescência obtidos, foram automaticamente armazenados e processados.

#### 4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA DA BIOMASSA

A composição bioquímica da biomassa considerou a concentração lipídios (totais e classes), de carboidratos e proteínas intracelulares totais. Para a determinação de proteínas e carboidratos intracelulares totais amostras das culturas foram centrifugadas em 385 g durante 10 min. e o material sedimentado foi mantido em freezer a -20 °C até o momento da determinação. Os carboidratos foram determinados utilizando metodologia descrita em Liu et al. (1973) com glicose como padrão. Proteínas foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando soro albumina fração V (BSA) como padrão, enquanto a extração das proteínas seguiu o protocolo de Rausch (1981).

A composição relativa de classes lipídicas foi determinada usando-se procedimento descrito em Lombardi (1990) e Parrish (1999) através de cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama (TLC/FID). A extração dos lipídios foi realizada pelo método modificado de Folch, conforme os procedimentos descritos em Parrish (1999), tendo clorofórmio:metanol (4:1 v/v) como solvente. Para a extração, suspensão algal foi filtrada através de filtro de fibra de vidro (WHATMAN GF/C), previamente calcinado em forno mufla (400 °C, 12 h). Cetona (3-Hexadecanona) foi usada como padrão interno (0,05 µg/µL) adicionada ao filtro imediatamente após filtragem. Em seguida os filtros foram imersos em clorofórmio e mantidos em tubos de vidro com tampa de Teflon® em freezer a -20 °C até o momento de análise, o que não ultrapassou o período de 90 dias.

A cromatografia foi processada em amostras concentradas em rota-evaporador a 25 °C utilizando-se um analisador Iatroscan™ TLC/FID modelo MK-6 s (Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japão). O sistema foi calibrado a partir de padrões de lipídios comercializados pela Sigma-Aldrich (EUA). As condições analíticas utilizadas para o Iatroscan foram: fluxo de hidrogênio 173 mL min<sup>-1</sup>, o fluxo de ar 2 L min<sup>-1</sup> e velocidade de digitalização 4 mm s<sup>-1</sup>. O processo cromatográfico constou de fracionamentos desenvolvidos em composições de solventes distintas resultando em diferentes polaridades de separação cromatográfica. A primeira e mais apolar constou de hexano:dietiléter:ácido fórmico (98,95:1:0,05), que separou hidrocarbonetos alifáticos (HC), ésteres de ceras (WE) e etil cetona (KET - padrão interno). A

segunda mistura foi elaborada com hexano:dietiléter:ácido fórmico (79:20:1), em que quantifica-se triacilgliceróis (TG), ácidos graxos livres (FFA), álcoois alifáticos livres (ALC) e esteróis livres (ST) e, a terceira, de maior polaridade entre as três, deu-se em acetona (100%) inicialmente (15 min) e em seguida as colunas eram inseridas em uma mistura de solventes de clorofórmio:metanol:água (5:4:1), obtêm-se os lipídios polares móveis em acetona (AMPL - lipídios relacionados a pigmentos) e fosfolipídios (PL).

Qualquer material de metal ou vidro que fosse entrar em contato com as amostras, eram previamente calcinados em 400 °C durante 12 h. Frascos de Teflon® e materiais de vidro foram enxaguados com clorofórmio e metanol imediatamente antes do uso para reduzir a contaminação. Todos os reagentes utilizados para a análise bioquímica foram de grau HPLC.

A composição de ácidos graxos seguiu adaptação de método descrito pela AOCS (Método Oficial Ce1h-05, 2005) e pela AOAC (Método Oficial 996.06, 1996) que consiste em três etapas principais: extração, transesterificação e análise dos ácidos graxos. Essas determinações foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto do Departamento de Farmácia, USP – SP.

#### *Extração*

A extração dos lipídios foi realizada pelo método modificado de Folch, conforme os procedimentos descritos em Parrish (1999).

#### *Transesterificação*

A transesterificação foi realizada através da adição, nas amostras secas, de 200 µL de clorofórmio, 1,7 mL de metanol, 30 µL de uma solução 25 µM de ácido nonadecanoico (padrão interno) e 100 µL HCl concentrado. Após agitação por 1 min em vortex, as amostras foram aquecidas em banho seco a 100 °C por 15 min e posteriormente deixadas resfriar. Em seguida foram adicionados 1 mL de hexano e 1 mL de água Milli-Q e, após agitação (vortex, 1 min) foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min. A fase orgânica foi transferida para um frasco e seguiu para análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).

#### *Análise dos ácidos graxos*

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram analisados por GC-MS usando-se um cromatógrafo acoplado a detector de massas (5975C INERT XL EI/CI - Agilent). Os componentes foram separados em coluna capilar VF-23 ms (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) nas condições cromatográficas: programação de temperatura da coluna 50 °C por 1 min, 50 – 130

°C a 20 °C/min, 130 – 220 °C a 5 °C/min, permanecendo a 220 °C por 10 min; temperatura do injetor de 220 °C; temperatura da fonte de 280 °C; gás de arraste He; fluxo linear de gás de 20 cm/s; *split* 10:1. Os padrões FAMEs utilizados para a identificação foram: C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0, C14:1 ( $\omega$ 5), C15:1 (*cis*- $\omega$  5), C16:1 ( $\omega$ 7), C17:1 ( $\omega$ 7), C18:1 (*cis*- $\omega$ 9), C18:1 (*trans*-11), C20:1 ( $\omega$ 9), C22:1 ( $\omega$ 9), C24:1 ( $\omega$ 9), C16:2, C16:3, C16:4, C18:2n6c, C18:3n3, C18:3n6, C18:4, C20:4n6 (189.19 e 189.20, Sigma).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foram empregados os programas, ORIGINPRO 9.0, ASSISTAT 7.7 e SISVAR 5.3.

Os dados obtidos como resposta dos tratamentos foram submetidos ao Teste de Levene ( $p < 0,05$ ) para conferir a homogeneidade das variâncias e ao Teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) para verificar a normalidade.

Para cada parâmetro considerado neste trabalho foi desenvolvida uma Análise de Variância (ANOVA FATORIAL) para um fator. Quando o resultado da ANOVA denotou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos, foi aplicado o teste de separação de médias de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ) para estabelecer as diferenças entre os tratamentos e/ou as interações. Quando a análise estatística de significância dos dados foi aplicada a partir dos testes não paramétricos para comparações múltiplas o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA) e pós-teste de Dunn que mostra onde se deu significância entre os dados. Foram considerados níveis de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO

Foram testados 4 diferentes meios de cultura (Tabela 4), e o meio Oligo foi selecionado por favorecer maiores taxas de crescimento nas culturas de *H. pluvialis* e menor tempo de indução para produção dos cistos vermelhos maduros.

Tabela 4 – Meios de cultura testados em culturas de *H. pluvialis*.

Meio de cultura	Taxa de crescimento (d <sup>-1</sup> )	Densidade celular máxima (cel m L <sup>-1</sup> )	Observações
BBM (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + NaNO <sub>3</sub> )	0,21	1,53×10 <sup>5</sup> (18 dias)	
BBM + NaNO <sub>3</sub> (2×)	0,11	2,20×10 <sup>4</sup> (15 dias)	
BBM + NH <sub>4</sub> Cl	0,32	6,87×10 <sup>4</sup> (17 dias)	Maior tempo para produção do heterocisto.
BBM + NH <sub>4</sub> Cl + vitaminas	0,34	2,54×10 <sup>4</sup> (19 dias)	
BBM + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,26	5,65×10 <sup>4</sup> (18 dias)	
BG-11	0,23	1,45×10 <sup>5</sup> (17 dias)	Células pequenas e amareladas.
BG-11 + NH <sub>4</sub> Cl (2×)	0,31	8,63×10 <sup>5</sup> (17 dias)	Tempo de produção do heterocisto muito longo.
OHM	0,14	8,20×10 <sup>4</sup> (18 dias)	Na confecção do meio houve precipitação.
Oligo	0,30	3,00×10 <sup>5</sup> (21 dias)	
<b>Oligo (2×) + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (2×)</b>	<b>0,53</b>	<b>5,30×10<sup>5</sup> (13 dias)</b>	
Oligo + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2×)	0,45	1,73×10 <sup>5</sup> (20 dias)	Menor tempo de produção do heterocisto.
Oligo + NaHCO <sub>3</sub> (2×)	0,23	3,70×10 <sup>5</sup> (19 dias)	
Oligo + NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2×)	0,36	4,58×10 <sup>5</sup> (24 dias)	
Oligo + NH <sub>4</sub> Cl + Vitaminas	0,40	3,89×10 <sup>5</sup> (24 dias)	
Oligo + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (2×)	0,26	2,60×10 <sup>5</sup> (24 dias)	

Os resultados do estudo do crescimento de *H. pluvialis* em meio LC Oligo de diferentes composições (Meios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) são mostrados na Figura 21. O crescimento vegetativo foi monitorado e a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) diferiu entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) seguindo a ordem decrescente:  $\mu_{\text{MEIO 6}} > \mu_{\text{MEIO 5}} > \mu_{\text{MEIO 7}} = \mu_{\text{MEIO 3}} > \mu_{\text{MEIO 1}} > \mu_{\text{MEIO 4}} > \mu_{\text{MEIO 2}}$ , como mostrado na Figura 22.

A inoculação de cistos de *H. pluvialis* resultou na regeneração de aproximadamente 100% dos cistos em células vegetativas flageladas verdes em contraste com mortalidade de 30% quantificada em um estudo anterior em nosso laboratório (dados não publicados) a partir da inoculação de células flageladas verde, além de alto erro experimental entre as repetições, problemas superados através da inoculação de cistos.

Em nossos experimentos, a contagem celular máxima ( $p < 0,05$ ), foi obtida no Meio 6 ( $5,27 \times 10^5$  células  $mL^{-1}$ ) no 13º dia de análise. Tem-se relatado baixa densidade celular em culturas de *H. pluvialis* independente da composição do meio de cultura, em sua maioria sem adição de substrato orgânico. Em meio F1, KAEWPINTONG et al. (2007) obteve  $5,4 \times 10^4$  células  $mL^{-1}$ , mas a grande maioria dos resultados da literatura relatam densidade celular de  $1,0 - 2,5 \times 10^5$  células  $mL^{-1}$  (HAGEN et al., 1993 - meio Hedlich; TRIPATHI et al., 1999 - meios BBM e Z8; CIFUENTES et al., 2003 - Bristol; SUH et al., 2006 - meio FBBM; KAEWPINTONG et al., 2007 - meio F1) e excepcionalmente  $5,5 \times 10^5$  células  $mL^{-1}$  (KOBAYASHI et al., 1993 - meio Basal; SUH et al., 2006). Nossos resultados concordam com os da literatura, quanto ao crescimento vegetativo em um período de 12 – 15 dias (TRIPATHI et al., 1999; FÁBREGAS et al., 2001 - meio OHM; SUH et al., 2006; KAEWPINTONG et al., 2007).

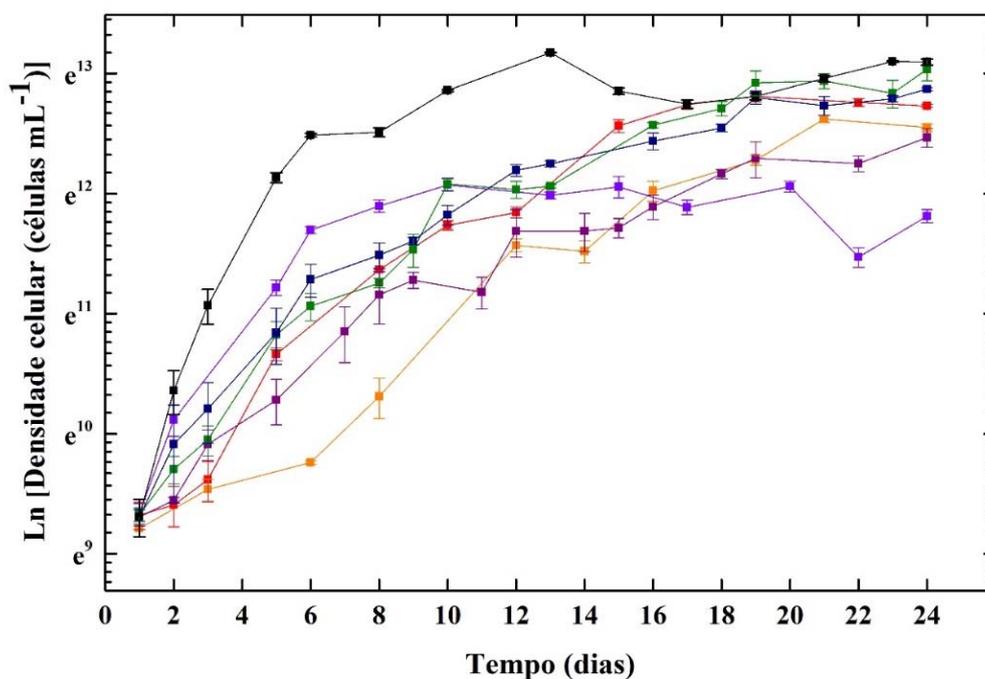


Figura 21 – Curvas de crescimento de *H. pluvialis* em diferentes meios de cultivos (25 °C e 65  $\mu mol$  fótons  $m^{-2} s^{-1}$ ). Símbolos: ■ Meio 1: Oligo; ■ Meio 2: Oligo [ $NaHCO_3$  (2 $\times$ )]; ■ Meio 3: Oligo [ $NH_4HCO_3$  (2 $\times$ )]; ■ Meio 4: Oligo [ $NH_4NO_3$  (2 $\times$ )]; ■ Meio 5: Oligo [ $(NH_4)_2SO_4$  (2 $\times$ )]; ■ Meio 6: Oligo (2 $\times$ ) [ $NH_4HCO_3$  (2 $\times$ )]; ■ Meio 7: Oligo [ $NH_4Cl$  + vitaminas]. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

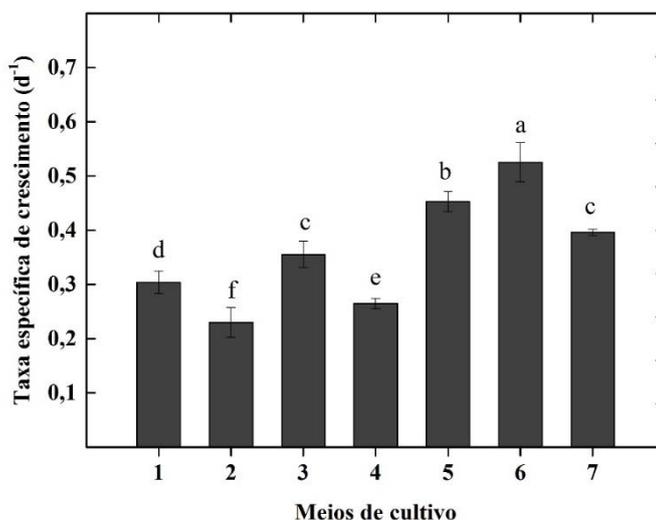


Figura 22 – Taxas de crescimento específicas (médias  $\pm$  SD) e teste de comparação de suas médias para os cultivos de *H. pluvialis*. **Tratamentos:** (1) Meio Oligo; (2) Meio Oligo [ $\text{NaHCO}_3$  (2 $\times$ )]; (3) Meio Oligo [ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (2 $\times$ )]; (4) Meio Oligo [ $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (2 $\times$ )]; (5) Meio Oligo [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2 $\times$ )]; (6) Meio Oligo (2 $\times$ ) [ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (2 $\times$ )]; (7) Meio Oligo [ $\text{NH}_4\text{Cl}$  + vitaminas]. Valores seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Dentre os meios de cultivo autotróficos utilizados, o Meio 6 apresentou a maior taxa específica de crescimento com um valor de  $0,53 \text{ d}^{-1}$ . Vários autores têm reportado velocidade de crescimento do *H. pluvialis* sob diferentes condições de cultivo autotróficos, variando de  $0,31 - 0,70 \text{ d}^{-1}$  em cultivos em escala comercial e laboratorial (OLAIZOLA, 2000; CIFUENTES et al., 2003; OROSA et al., 2005; KAEWPINTONG et al., 2007).

A fonte de nitrogênio também pode ser responsável pela diferença na cinética de crescimento observada entre o Meio 6 ( $\text{KNO}_3$  duplicado e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  duplicado) e os demais, uma vez que vários autores reportam a importância da fonte de nitrogênio e/ou sua concentração na divisão celular de *H. pluvialis* (SARADA et al., 2002; CIFUENTES et al., 2003; OROSA et al., 2005). Sarada et al. (2002) testou diferentes fontes de nitrogênio [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NaNO}_3$ ] e observou máxima concentração celular em  $\text{KNO}_3$  e a menor em  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Segundo Sarada et al. (2002), as células que cresceram em  $\text{KNO}_3$  foram menores do que as crescidas nas outras fontes de nitrato, mas o conteúdo de clorofila foi maior em  $\text{NaNO}_3$  e menor em  $\text{KNO}_3$ . Cifuentes et al. (2003) observaram variação na taxa de crescimento em culturas mantidas sob diferentes fontes de nitrogênio:  $0,44 \text{ d}^{-1}$  (N – ureia),  $0,59 \text{ d}^{-1}$  (N –  $\text{NaNO}_3$ ) e  $0,70 \text{ d}^{-1}$  (N –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Comparando os resultados de taxa de crescimento deste estudo com os da

literatura, concluímos que a velocidade específica de crescimento obtida ficou dentro da faixa esperada.

## 5.2 CRESCIMENTO, FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *H. pluvialis* EM DIFERENTES pHs

A variação do pH é mostrada na Figura 23 em função do tempo experimental. Ela indica que o uso de tampões de pH foi importante para a manutenção diária do pH da cultura, resultando em pequena oscilação do pH desde o início até ao fim dos experimentos. No tratamento controle, em que não foi adicionado tampão, a variação foi de pH 6.3 a pH 10.3, variação maior do que nos sistemas tamponados. As taxas de crescimento foram calculadas e são mostradas na Figura 24, onde observa-se que são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) e seguiram a ordem decrescente  $\mu_{\text{pH } 6.3} > \mu_{\text{pH } 7.2} = \mu_{\text{pH } 6.7} = \mu_{\text{pH } 6.0} > \mu_{\text{controle}}$ .

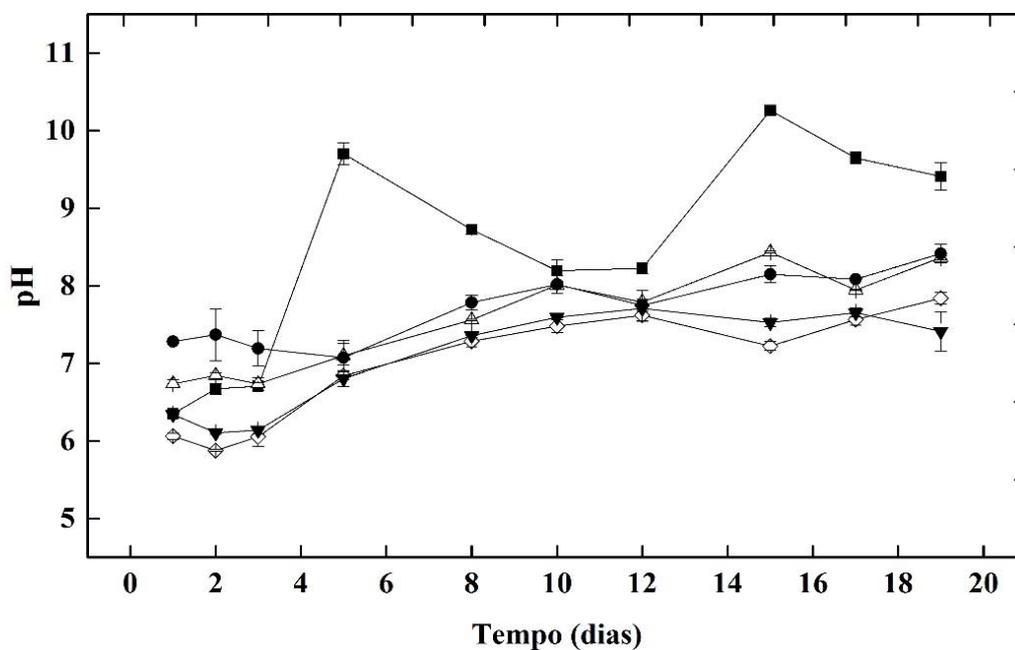


Figura 23 – Variação do pH em culturas tamponadas de *H. pluvialis* em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ Controle; ◇ pH 6.0; ▼ pH 6.3; △ pH 6.7; ● pH 7.2. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

Com os cistos inoculados, todas as culturas foram sincronizadas garantindo fase de crescimento similar simultaneamente de modo a diminuir erro experimental nas repetições. No entanto, o atraso inicial obtido para culturas tamponadas no pH 6.7 e 7.2 até entrada em crescimento exponencial refletiu-se na razão proteína:carboidrato, como discutido ao final desta pesquisa.

A derivação de pH nos sistemas tamponados em contraste com a maior variação de pH nos não tamponados, está em acordo com dados da literatura. Borowitzka et al. (1991) usou acetato como tampão de meio de cultura no pH 6.5 e 7.5 para crescer *H. pluvialis* e depois de 30 dias obteve pH 9.4 e 9.8, respectivamente. Segundo os autores, a concentração de íons  $H^+$  passou de  $3 \times 10^{-7}$  a  $4 \times 10^{-10}$  mol  $L^{-1}$  para a cultura tamponada em pH 6.5. Isso significa uma diminuição de cerca de  $10^{-8}$  mol  $L^{-1}$  de íons  $H^+$   $d^{-1}$ . Similarmente ao nosso experimento, o controle no estudo de Borowitzka et al. (1991) não foi acrescido de tampão de pH e, no final dos experimentos os autores detectaram pH 11.0 nas culturas. Nos nossos experimentos, o valor máximo de pH foi 10.0 e obtido após 18 – 20 dias. Os autores concluíram que a utilização do acetato aumentou a taxa de crescimento e induziu a formação de aplanósporos vermelhos e células palmeloides. Em relação a morfologia das células, nossos resultados são diferentes dos apresentados em Borowitzka et al. (1991), uma vez que não obtivemos qualquer efeito em aplanósporos ou formação células palmeloides. Em concordância com os resultados de Borowitzka et al. (1991), obtivemos nesta pesquisa uma variação diária na concentração de íons  $H^+$  de  $2,3 \times 10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ .

Dos resultados aqui obtidos com controle de pH, podemos inferir que desde o início até ao fim do experimento, o  $HCO_3^-$  foi a espécie de carbono inorgânico predominante, enquanto que no estudo de Borowitzka et al. (1991) em  $pH > 10.5$  a espécie predominante foi  $CO_3^{2-}$ . Na situação onde  $CO_3^{2-}$  predominou as células foram possivelmente limitadas em carbono inorgânico, mas no presente estudo, é possível que tal limitação não tenha ocorrido pela predominância do  $HCO_3^-$ . Podemos ainda extrapolar que esta pode ser uma razão provável para a formação aplanósporo vermelho no estudo de Borowitzka et al. (1991), mas não neste estudo.

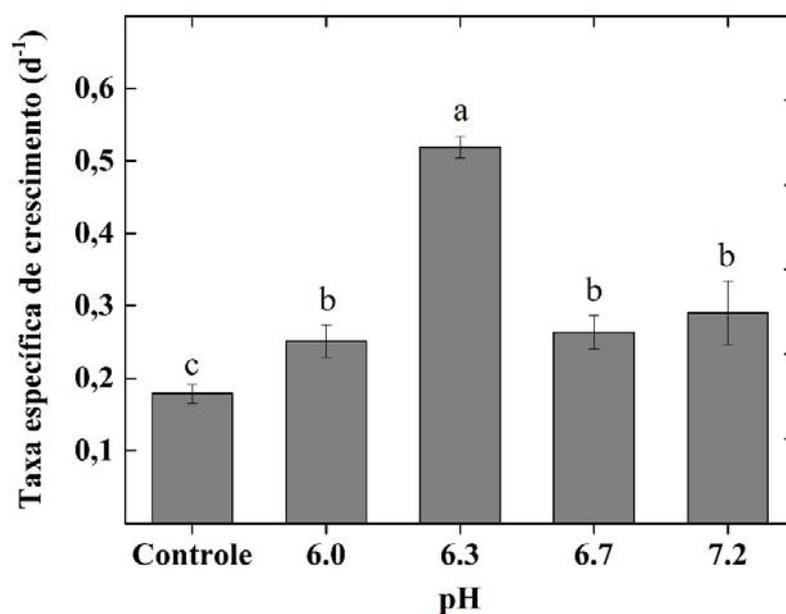


Figura 24 – Valores médios, desvio padrão e teste de comparação de médias das taxas de crescimento nos cultivos de *H. pluvialis* sob diferentes pHs. As médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Lababpour et al. (2004) investigaram o crescimento de *H. pluvialis* sem controle de pH por tamponamento. Tendo pH inicial de 6,8 e após 150 h (~ 6 dias) de cultivo pH 10,0, os autores não observaram diferenças significativas no crescimento vegetativo de *H. pluvialis*, resultado que concorda com os de Borowitzka et al. (1991).

A influência do pH na taxa de crescimento durante a fase vegetativa de *H. pluvialis* sem tamponamento foi avaliada por Sarada et al. (2002) e Nagaraj et al. (2012). Sarada et al. (2002) obteve biomassa máxima em culturas com um pH inicial de 7,0, mas nenhum crescimento em pH 5,0, enquanto Nagaraj et al. (2012) obteve máxima de biomassa ( $4,2 \times 10^5$  células m L<sup>-1</sup>) em pH 7,0 após 18 dias de incubação. Comparando nossos resultados com os de Nagaraj et al. (2012), observamos que densidade em nossas culturas foi mais baixa mas ainda dentro do esperado segundo outros autores (HARKER et al., 1996; TRIPATHI et al., 1999; KAEWPINTONG et al., 2007). No caso dos resultados deste estudo, não houve diferença significativa na densidade celular ( $p > 0,05$ ) para o 6º dia de cultivo entre os diversos tratamentos. O 4º dia para o pH 6,3 e o 6º dia para os demais tratamentos foram escolhidos como representativos da metade da fase exponencial de crescimento pois a taxa de crescimento específico atinge valor máximo e constante.

Os resultados deste estudo confirmam os da literatura quanto ao melhor pH para o crescimento para *H. pluvialis*, que se deu em pH 6.3 – 6.5. As taxas de crescimento obtidas nos sistemas estanque e tamponados foram iguais ou menores que 0,53 d<sup>-1</sup>, dentro da faixa apresentada na literatura, com variação de 0,31 a 0,70 d<sup>-1</sup>, segundo Kobayashi et al. (1993); Harker et al. (1996); Cifuentes et al. (2003); Orosa et al. (2005); Kim et al. (2006); Suh et al. (2006). A melhor taxa de crescimento obtida nas culturas estanques e tamponadas foi em pH 6.3 (0,53 d<sup>-1</sup>), cerca de 50% maior do que o controle e 40% maior do que os outros tratamentos. Em comparação com outras microalgas, como *Chlorella vulgaris* (0,84 d<sup>-1</sup>), *Isochrysis* sp (0,97 d<sup>-1</sup>) e *Chaetoceros muelleri* (2,7 d<sup>-1</sup>), esta taxa de crescimento que obtivemos com *H. pluvialis* relativamente baixa (RENAUD et al., 2002; LÓPEZ-ELÍAS et al., 2005; CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013).

Com o objetivo de aumentar a produtividade de células vegetativas de *H. pluvialis*, Orosa et al. (2005) investigaram o efeito da presença e ausência de acetato e a taxa de crescimento obtida sem acetato em meio BBM foi 0,51 d<sup>-1</sup> e 0,61 d<sup>-1</sup> com suplementação de acetato. Hata et al. (2001) testaram diferentes valores de pH inicial (pH 5.0 – 9.0) em culturas de *H. pluvialis* sob metabolismo heterotrófico e obtiveram a maior taxa de crescimento com valor de 0,20 dia<sup>-1</sup>, cerca de 50% menor do que o valor que obtivemos com células vegetativas verdes.

As curvas de crescimento e o rendimento quântico do PSII são mostrados na Figura 25. Observa-se que a fase de regeneração de cistos para células verdes flageladas, no início das culturas, foi marcada por um aumento no rendimento quântico máximo do PSII até a fase de crescimento exponencial, onde foi mantido em 0,70. O tratamento tamponado em pH 6.3 apresentou típico padrão de crescimento da cultura de *H. pluvialis*, com duas fases exponenciais de crescimento, uma primeira exponencial do 1º ao 5º dia de cultura, e uma segunda, a partir do 9º ao 17º dia. Neste pH não foi detectada fase *lag* de crescimento, como presente nos cultivos em pH 6.7 e 7.2 das culturas tamponadas.

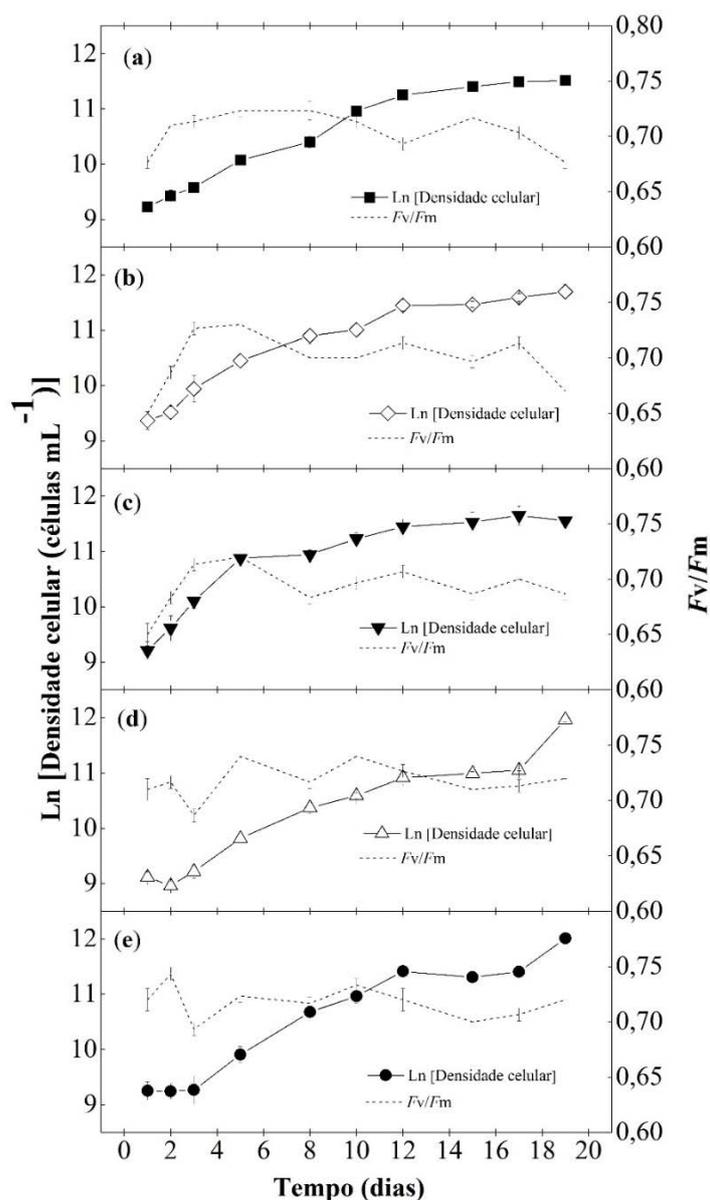


Figura 25 – Densidade populacional em logaritmo natural ( $\text{Ln}$ ) e  $F_v/F_m$  de culturas de *H. pluvialis* tamponadas em pH em função do tempo experimental. **SÍMBOLOS:** ■ Controle (a); ◇ pH 6.0 (b); ▼ pH 6.3 (c); △ pH 6.7 (d); ● pH 7.2 (e). Barra de erro representa o desvio padrão. Amostragem para  $F_v/F_m$  e densidade celular realizada no 5º dia de cultivo, garantia de fase exponencial de crescimento.

As respostas fotossintéticas (rendimento quântico máximo e efetivo,  $F_o$  e  $F_m$ ) para culturas em crescimento exponencial (até 6º dia experimental) estão representados nas Figura 26 ( $F_o$  e  $F_m$ ) e 25 ( $qP$  e NPQ).  $F_o$  representa a emissão de fluorescência clorofila *a* produzida pela excitação do complexo coletor de luz ( $\text{LHC}_{II}$ ) antes da transferência de energia para o centro de reação do PSII (KRAUSE; WEIS, 1991), enquanto  $F_m$  representa a fluorescência máxima quando o primeiro aceptor de elétrons (quinona A –  $Q_A$ ) é reduzido (NEDBAL et al., 2000). No presente trabalho, o maior valor da  $F_m$  foi obtido para as culturas mantidas em pH

6.0. A dissipação fotoquímica ( $qP$ ) e a dissipação não-fotoquímica associada ao calor (NPQ) são mostrados na Figura 27. A NPQ diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e o maior valor foi obtido para cultura tamponada em pH 6.0. Exceto para pH 6.0, cultura tamponada que apresentou o menor  $qP$ , nenhuma outra variação significativa na  $qP$  foi detectada.

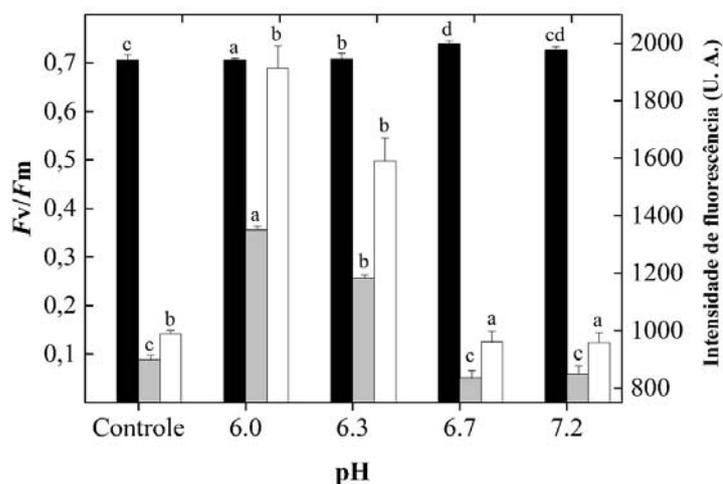


Figura 26 – Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$  – barra preta; eixo y esquerdo), fluorescência máxima ( $F_m$  – barra cinza; eixo y direito) e fluorescência inicial ( $F_o$  – barra branca; eixo y direito), das culturas de *H. pluvialis* no crescimento exponencial. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

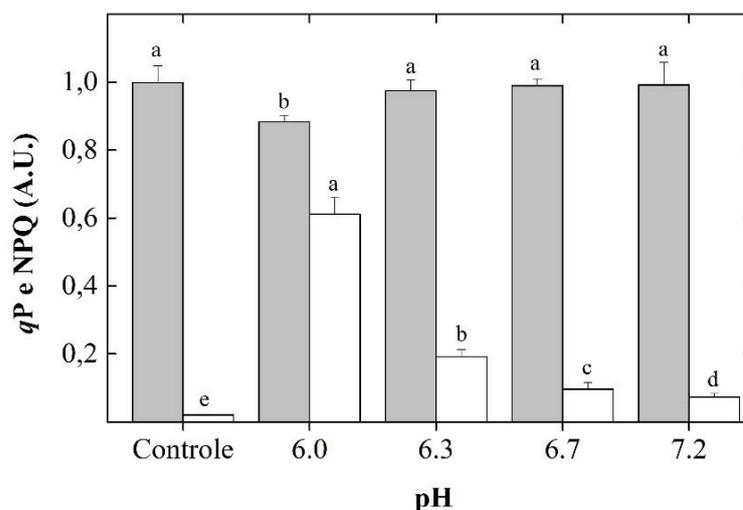


Figura 27 – Valores médios de dissipação fotoquímica ( $qP$  – barra cinza) e dissipação não-fotoquímica relacionado à perda de calor (NPQ – barra branca). Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O metabolismo fotossintético pode ser determinado em diferentes fases do ciclo de vida de *H. pluvialis*, apesar da variação no teor de clorofila *a* para cada fase (GU et al., 2013). Naturalmente, os valores mais altos para rendimento quântico máximo ( $\sim 0,70 - 0,74$ ) são obtidos na fase de crescimento vegetativo (nesta pesquisa a partir do 4º ao 12º dia de cultivo), como na maioria das células fitoplanctônicas (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Em relação às células palmeloides, onde síntese de carotenoide predomina (COLLINS et al., 2011), valores mais baixos de rendimento quântico máximo são esperados. Neste estudo, as células palmeloides estiveram presentes desde o 13º até o 18º dia de cultivo. Os resultados de  $F_v/F_m$  máximos e efetivos obtidos nesta pesquisa sugerem que as células saudáveis estão em acordo com os rendimentos quânticos normalmente obtidos para microalgas saudáveis na literatura, como relatado em Herrmann et al. (1996), Vonshak e Torzillo (2004), Lombardi e Maldonado (2011), Kumar et al. (2014). Para *H. pluvialis*, Chen et al. (2012) encontraram valores de  $F_v/F_m$  máximos de  $\sim 0,70$ , similar ao desta pesquisa, no entanto, diferente de nossos resultados, Wang et al. (2011) obtiveram valores de  $F_v/F_m$  de  $\sim 0,4 - 0,5$  para *H. pluvialis*.

Nestes experimentos, houve um atraso para que cistos inoculados começassem sua transformação em células vegetativas verdes flageladas, como pode ser visto pelos 3 dias de fase de latência (*lag*) ou aclimação necessários para culturas tamponadas em pH 6.7 e 7.2 começarem o crescimento exponencial em comparação com a culturas em pH 6.3. Foi neste pH que a cultura entrou em crescimento exponencial vegetativo imediatamente após a inoculação e exibiu a mais elevada taxa de crescimento. Esse resultado é importante pois pode refletir em ganhos para sistemas de produção de *H. pluvialis*, onde o tempo e taxa de crescimento microalgal, junto ao rendimento de biomassa, são importantes. No 4º dia de cultivo, a cultura tamponada em pH 6.3 possuía  $\sim 6.0 \times 10^4$  cél m L<sup>-1</sup>, enquanto os outros tiveram de  $2,0 \times 10^4 - 3,6 \times 10^4$  cél m L<sup>-1</sup>. Estes resultados concordam com os de Gu et al. (2013) que investigaram *H. pluvialis* em diferentes fases de crescimento e mostraram extenso mecanismo de aclimação durante o processo de envelhecimento. Os autores propuseram que as células vegetativas verdes e as células palmeloides com predominância de astaxantina podem afetar o rendimento final de astaxantina. De acordo com Bousiba e Vonshak (1991), e Nagaraj et al. (2012), quando *H. pluvialis* é exposta à situação adversa, há uma redução no  $F_v/F_m$ , indicando danos no PSII das células verdes móveis. Isso pode impedir a transferência de energia para o centro de reação do PSII pela desconexão do centro coletor de luz (LHCII) (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989; BAKER; ROSENQVIST, 2004; HAN et al., 2012). Os resultados deste estudo mostraram menor  $F_m$  para o controle e culturas em pH 6.7 e 7.2 do que aqueles em pH 6.0 e 6.3.

O NPQ e  $qP$  são mecanismos que protegem o PSII contra os efeitos nocivos da alta intensidade de luz através da dissipação do excesso de energia de excitação, minimizando assim os fotodanos (KRAUSE; JAHNS, 2003) e, alterações nesses mecanismos podem diagnosticar o mau funcionamento do PSII. A utilização adequada de energia fotoquímica no metabolismo do carbono é caracterizada por valores elevados  $qP$ . Um declínio na  $qP$  pode ocorrer quando a absorção de luz excede a exigência de assimilação de carbono (KRAUSE; JAHNS, 2003). Apesar de não ser estritamente linear,  $qP$  e o estado redox da  $Q_A$  podem ser correlacionados, e  $qP$  pode ser considerado como uma medida aproximada da fração de centros reacionais com  $Q_A$  oxidada (TRISSEL; LAVERGNE, 1995), ou centros de reação abertos (Genty et al. 1989; Maxwell e Johnson 2000). Na presente pesquisa, os valores obtidos para  $qP$  mantiveram-se dentro da faixa de 0,88 – 0,98 para todos os tratamentos, com o valor mais baixo (0,88) na cultura tamponada no pH 6.0, indicando que a faixa de pH utilizada neste estudo não afetou a absorção de luz pelos centros de reação do PSII, separação de cargas, nem transferência de elétrons para  $Q_A$ .

O resultado mais importante observado em relação ao efeito dos diferentes pH foi o efeito deste na restauração dos cistos após inoculação das culturas. O outro mecanismo de dissipação de energia, o NPQ (perda de calor) foi maior nas culturas tamponadas em pH 6.0, sugerindo que este pH foi inadequado ao crescimento de *H. pluvialis*, uma vez que a dissipação de energia térmica representa um mecanismo de fotoproteção. De acordo com Roháček e Barták (1999), em *H. pluvialis* este processo está relacionado com a formação de zeaxantina. Torzillo et al. (2003) e Chen et al. (2012) analisaram a variação de parâmetros de fotossíntese durante o ciclo de vida de *H. pluvialis* e obtiveram um aumento do NPQ em culturas em pH 7.0, quando observaram transformações morfológicas de células verdes móveis em cistos totalmente vermelhos. Esses resultados diferem dos obtidos neste estudo, uma vez que na cultura mantida sob pH 7.2, foi obtido apenas um pequeno aumento de NPQ.

A composição bioquímica da biomassa (proteínas, carboidratos e lipídios) é apresentada na Figura 28 e a razão proteína:carboidrato (P:C) na Figura 29. Os maiores conteúdos de proteínas e carboidratos foram obtidos em culturas tamponadas em pH 6.7 ( $p < 0,05$ ), apresentando  $395 \text{ pg células}^{-1}$  de carboidratos em células em crescimento exponencial (11 dias), 16% superior em comparação com o controle. Considerando os lipídios totais, não foi observado diferença significativa comparando os vários tratamentos e controle. Em relação à razão P:C, observa-se que os tratamentos tamponados apresentaram maior relação P:C do que o controle ( $p < 0,05$ ). Este resultado reflete melhores condições fisiológicas nos sistemas

tamponados em relação àquelas sem tampão. A cultura tamponada em pH 6.7 apresentou razão P:C 47,5% maior do que o controle.

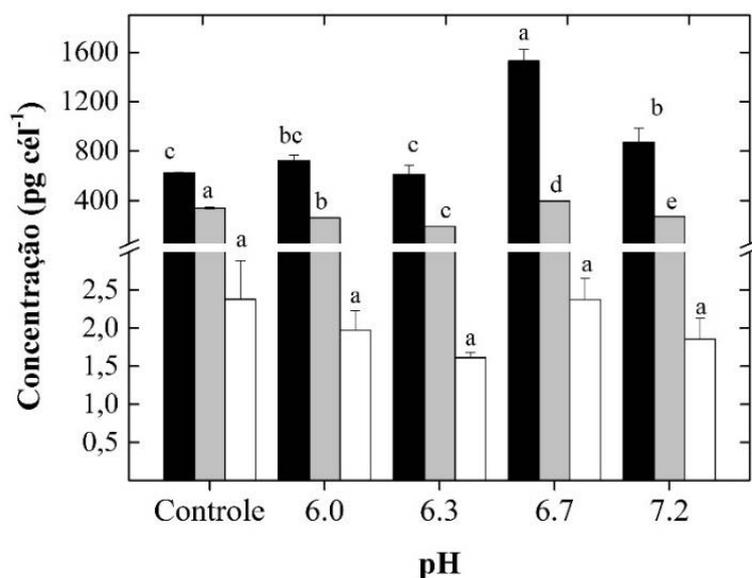


Figura 28 – Concentração de proteínas totais (barra preta), carboidratos totais (barra cinza) e lipídios totais (barra branca) em culturas de *H. pluvialis* em fase exponencial de crescimento em função do pH. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

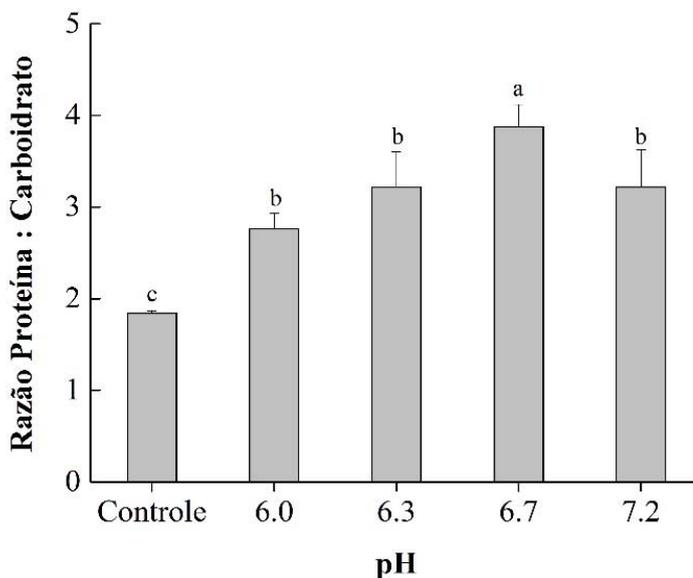


Figura 29 – Razão proteína:carboidrato (P:C) no crescimento exponencial de culturas de *H. pluvialis* tamponadas em diferentes pH. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Concentração de proteínas de 1,53 ng cél<sup>-1</sup> foi obtida em *H. pluvialis* flagelada verde em crescimento exponencial em culturas tamponadas em pH 6.7. Esse valor foi cerca de cinco vezes maior do que o relatado em Kobayashi et al. (1997). No entanto, foi 30% menor do que a relatada em Kobayashi et al. (1993) em culturas de *H. pluvialis* suplementadas com Fe<sup>2+</sup> em pH inicial de 6.8. Tripathi et al. (2002) obtiveram concentração de proteína de 3,5 ng células<sup>-1</sup> para *H. pluvialis* (Meio KM1), 2,3 vezes maior do que o obtido neste estudo. Kakizono et al. (1992) cultivaram *H. pluvialis* em meio BBM com suplemento de acetato de sódio em pH 6.8 e, no sexto dia, obtiveram um teor de proteína de 0,38 ng células<sup>-1</sup>. Sabe-se que proteínas são parte do material estrutural e presentes em quantidades elevadas em crescimento exponencial e células saudáveis (GANF et al., 1986; KILHAM et al., 1997). Embora tenham sido amostradas em fase de crescimento exponencial, as culturas em pH 6.0, pH 6.3 tamponada e pH 6.3 controle (não tamponada) podem ser consideradas fisiologicamente mais velhas por não apresentarem fase lag em comparação com a cultura em pH 6.7. Isso justifica o maior conteúdo proteico em pH 6.7.

Apesar de importância dos carboidratos para o metabolismo celular, poucos estudos relatam sobre a síntese dessa biomolécula em *H. pluvialis*. Este estudo mostrou não haver diferença significativa na concentração de carboidratos nos diversos pH. A faixa de 0,35 – 0,40 ng células<sup>-1</sup> de carboidratos presente em todas as amostras, independentemente do pH da cultura, encontra-se próximo aos resultados de Recht et al. (2012), que cultivou *H. pluvialis* em pH 7.6 e obteve 0,30 ng células<sup>-1</sup> de carboidratos.

Neste estudo, lipídios totais variou de 1,8 – 2,5 pg célula<sup>-1</sup> para todos os cultivos durante a fase exponencial de crescimento. Essas baixas concentrações de lipídios aliadas aos elevados valores de  $F_v/F_m$  (~ 0,70 - 0,74) são indicativos de que *H. pluvialis* encontrava-se em condições favoráveis de crescimento. De acordo com Saha et al. (2013) e Lombardi e Wangersky (1991), o acúmulo de lipídios neutros e ésteres de astaxantina em *H. pluvialis* estão correlacionadas com condições de estresse.

A menor razão P:C obtida para o controle, cujo pH não foi tamponado sugere que o tamponamento das culturas forneceu melhores condições à microalga, em contraste com a alta variação de pH obtida para o controle. Sabe-se que a razão proteína:carboidrato é indicativo do estado nutricional em células de fitoplâncton (KILHAM et al., 1997) e, de acordo com Healey e Hendzel (1980) e Kilham et al. (1997), uma diminuição na razão P:C sugere células limitadas por nutrientes. A partir desses resultados, podemos inferir que em culturas sob oscilações de pH como observado no controle, a disponibilidade de nutrientes pode sofrer variações e, para a microalga isso poderia ter agido como um sinal de estresse. Os resultados de P:C deste estudo

estão de acordo com os apresentados em Rocha et al. (2014) que estudaram a reutilização do meio de cultura com *Scenedesmus quadricauda*. Os autores obtiveram razão P:C de 5,0 para o controle, enquanto obtivemos uma razão P:C ~ 4.0 para a cultura em pH 6.7. Em geral, os resultados da relação P:C confirmaram que o estado fisiológico de *H. pluvialis* é melhor mantido sob condições tamponadas de pH. É importante observar que os menores valores da razão P:C nas culturas em pH 6.0 e 6.3 pode ser devido à idade das mesmas, pois estas não apresentaram fase *lag*, seguindo diretamente para a exponencial, enquanto que a cultura em pH 6.7 apresentou atraso para iniciar fase exponencial e, portanto no momento de amostragem para determinação de proteínas e carboidratos, esta encontrava-se mais jovem do que as outras duas. Sendo fisiologicamente mais velhas, espera-se menor conteúdo protéico nas culturas em pH 6.0 e 6.3 em comparação com culturas mais jovens (pH 6.7).

As classes lipídicas (Figura 30) com maior representatividade na biomassa de *H. pluvialis* foram os lipídios relacionados a pigmentos (lipídios polares móveis em acetona – AMPL) e os relacionados com a parede celular (fosfolipídios – PL) nas culturas em pH 6.0 (AMPL 18,5%) e 6.3 (AMPL 19,3%), enquanto os fosfolipídios foram superiores significativamente ( $p < 0,05$ ) em pH 7.2 (68,9%). Hidrocarbonetos alifáticos (HC) com 6,9% do total dos lipídios, e os triacilgliceróis (TG) com 5,6%, ambos obtidos em culturas mantidas em pH 7.2. Os tratamentos controle, pH 6.0, 6.3 e 6.7 promoveram as maiores proporções de ésteres de ceras, cerca de 5,3%, 5,5% e 6,2%, respectivamente. Os ácidos graxos livres (FFA) (6,7%) e esteróis livres (ST) (8,7%) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e menores do que o tratamento controle. Os álcoois alifáticos livres (ALC) (13,7%) predominaram ( $p < 0,05$ ) em pH 6.0. Não foi obtida correlação nem tendência entre aumento ou redução de pH e produção de classes lipídicas específicas.

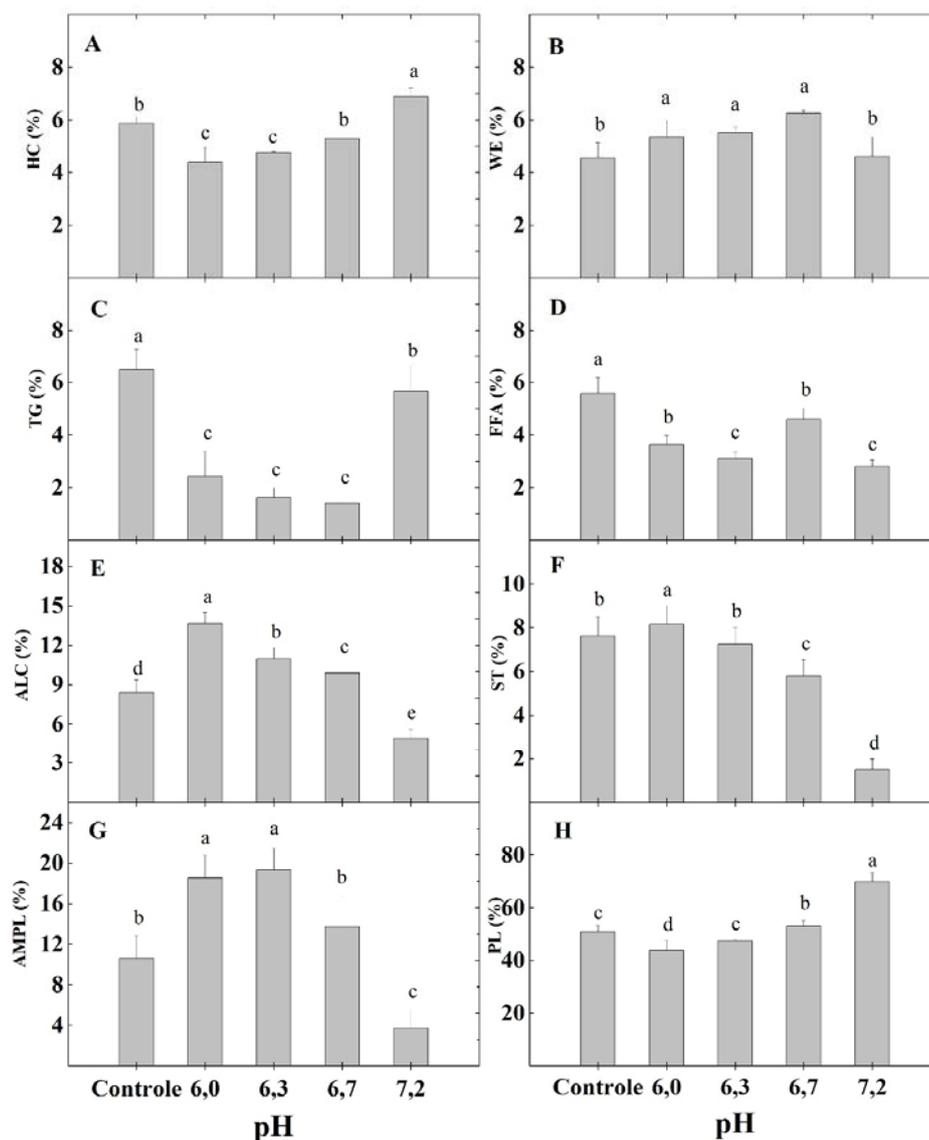


Figura 30 – Composição relativa de classes lipídicas durante crescimento exponencial em culturas de *H. pluvialis* tamponadas em diferentes pH. **Siglas:** HC – hidrocarbonetos alifáticos, WE – éster de cera, TG – triacilgliceróis, FFA – ácidos graxos livres, ALC –álcool alifático livre, ST –esteróis livres, AMPL – lipídio polar móvel em acetona e PL – fosfolipídios. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A capacidade de *H. pluvialis* crescer ou sobreviver em uma ampla gama de condições ambientais, juntamente com a sua capacidade de modificar de forma eficiente seu metabolismo lipídico em resposta a diferentes condições ambientais (GRÜNEWALD et al., 2001; CERÓN et al., 2007; DAMIANI et al., 2010), tornou-os organismos-alvo na produção de compostos de alto valor agregado, como a produção biotecnológica de triglicerídeos não-polares (TAGs).

Em uma investigação sobre os efeitos do cádmio e do fósforo na taxa de crescimento, produção de biomassa e composição bioquímica de *Chlorella vulgaris*, Chia et al. (2013) obteve cerca de 3% do total de lipídios, como hidrocarbonetos alifáticos no tratamento controle em pH 7,0, enquanto que no presente estudo com *H. pluvialis* o HC esteve presente em 6,9% ( $p < 0,05$ ), nas culturas em pH 7.2. Sabe-se que hidrocarbonetos são precursores na síntese de astaxantina em *H. pluvialis* (FAN et al., 1995). Em *Scenedesmus quadricauda*, a porcentagem de hidrocarbonetos foi de 28%, valor relativamente elevado em comparação com outras espécies (ROCHA et al., 2014).

Quanto ao percentual relativo de ésteres de ceras na biomassa da microalga *H. pluvialis* destacam-se as culturas em pH 6.7 com 6,2% do total de lipídios, semelhante aos resultados de Withers e Nevenzel (1977), que obtiveram 5% para o dinoflagelado marinho *Peridinium foliaceum*. Ésteres de cera são considerados biomoléculas incomuns em algas e geralmente são biossintetizados em cultivos heterotróficos (WITHERS; NEVENZEL, 1977). Antia et al. (1974) investigou o perfil lipídico da criptofíceia *Chroomonas salina* e obteve ésteres de cera em torno de 87%. Wayama et al. (2013) em estudos ultraestruturais com *H. pluvialis* sobre produção de óleos e astaxantina constatou acúmulo triacilgliceróis (TAG), que foi linearmente correlacionado com o acúmulo de monoésteres de astaxantina. Isso justifica os níveis reduzidos de TAG em nossos resultados (5%) na fase exponencial de crescimento, em células verdes vegetativas, onde a astaxantina não é sintetizada em grande quantidade.

A produção de classes lipídicas em microalgas foi estudada por Lombardi e Wangersky (1995). Os autores mostram que a diatomácea *Chaetoceros gracilis*, a haptófito *Isochrysis galbana* e a clorofíceia *Dunaliella tertiolecta*, não produziram álcool alifático livre em fase exponencial de crescimento. Diferentemente, em nossos estudos *H. pluvialis* produziu 14% de álcool alifático livre relativo ao total de lipídios. Os autores detectaram menos de 2% de esteróis livres, enquanto que neste trabalho, o controle apresentou 8,7%. Os lipídios estruturais, representados pelos lipídios polares móveis em acetona (AMPL) e fosfolipídios (PL), foram os componentes mais representativos do total de lipídios em todos os pHs nesta pesquisa. AMPL é uma classe de lipídios polares que pode conter 35 – 50% de clorofila (PARRISH; WANGERSKY, 1987; LOMBARDI; WANGERSKY, 1991) e também encontram-se associados com a taxa de crescimento das culturas. Em nosso experimento o conteúdo de AMPL em pH 6.0 e no 6.3 foram similares com valores 18,5 e 19,3%, respectivamente. Lombardi e Wangersky (1995) detectaram 45% de AMPL em *D. tertiolecta*, fase de crescimento exponencial. Nesta pesquisa, os fosfolipídios (PL) foram mais representativos em pH 7.2 (69%). Chia et al. (2013) obteve 45% na biomassa de *Chlorella*

*vulgaris* em pH 7.0 e, Lombardi e Wangersky (1995) 25% em *D. tertiolecta*. A composição de ácidos graxos é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição de ácidos graxos de *H. pluvialis* em diferentes pH (% p/p, n=3). Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Ácidos graxos (AG)	Controle	6.0	6.3	6.7	7.2
<b>Ácidos graxos (% p/p)</b>					
<b>Saturados</b>					
4:0	n. d.				
6:0	n. d.				
8:0	n. d.				
10:0	n. d.				
11:0	n. d.				
12:0	n. d.				
14:0	n. d.				
15:0	n. d.				
16:0	23,5 ± 1,7 <sup>a</sup>	24,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	22,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	23,02 ± 0,2 <sup>a</sup>	20,4 ± 0,5 <sup>a</sup>
17:0	n. d.				
18:0	2,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
20:0	n. d.				
21:0	n. d.				
22:0	n. d.				
23:0	n. d.				
24:0	n. d.				
<b>Total</b>	<b>25,7 ± 1,4<sup>a</sup></b>	<b>26,3 ± 0,7<sup>a</sup></b>	<b>24,7 ± 0,8<sup>a</sup></b>	<b>25,3 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>22,9 ± 0,7<sup>a</sup></b>
<b>Monoinsaturados</b>					
14:1 (ω 5)	n. d.				
15:1 (cis-ω 5)	n. d.				
16:1 (ω 7)	1,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	n. d.	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
17:1 (ω 7)	n. d.				
18:1 (cis-ω 9)	4,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,5 <sup>b</sup>
18:1 (trans-11)	4,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	5,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
20:1 (ω 9)	n. d.				
22:1 (ω 9)	n. d.				
24:1 (ω 9)	n. d.				
<b>Total</b>	<b>10,2 ± 0,7<sup>a</sup></b>	<b>10,5 ± 0,5<sup>a</sup></b>	<b>9,5 ± 1,1<sup>a</sup></b>	<b>7,1 ± 0,3<sup>c</sup></b>	<b>8,2 ± 0,4<sup>b</sup></b>
<b>Poli-insaturados</b>					
16:2	4,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
16:3	3,6 ± 0,5 <sup>c</sup>	4,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
16:4	9,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	8,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	9,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	13,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
C18:2n6c	25,1 ± 3,4 <sup>a</sup>	24,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	24,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	26,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	24,3 ± 1,6 <sup>a</sup>
18:3n3	17,5 ± 2,7 <sup>a</sup>	13,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	15,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	17,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	17,3 ± 0,9 <sup>a</sup>
18:3n6	1,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	n. d.	1,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
18:4	1,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	n. d.	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
20:4n6	1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	n. d.	1,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>64,1 ± 1,9<sup>c</sup></b>	<b>63,2 ± 1,1<sup>c</sup></b>	<b>65,9 ± 0,6<sup>b</sup></b>	<b>67,6 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>68,9 ± 0,4<sup>a</sup></b>

n.d. = não detectado

O ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) e o ácido linoleico (C<sub>18:2n6c</sub>) foram os de maior abundância em todas as culturas, tamponadas ou não, e variando de 20,4% para C<sub>16:0</sub> a 26,5 para C<sub>18:2n6c</sub>, respectivamente. O segundo ácido graxo mais abundante foi o ácido graxo saturado C<sub>18:3n3</sub> e variou entre os tratamentos de ~ 14 – 18 %. O perfil de ácidos graxos monoinsaturados foi similar no controle (25,7%), no pH 6.0 (26,3%) e no pH 6.3 (24,7%). Os cultivos em pH 6.7 e 7.2 apresentaram conteúdo ácidos graxos poli-insaturados 6% maior ( $p < 0,05$ ) do que o controle. Estes resultados concordam com os de Céron et al. (2007) e Damiani et al. (2010), que concluíram que o ácido palmítico (C<sub>16:0</sub> – saturado) e linoleico (C<sub>18:2n6c</sub> – poli-insaturado) foram os mais abundantes em *H. pluvialis*. Com relação aos ácidos graxos monoinsaturados nossos resultados foram cerca de 50% menores do que os obtidos por Damiani et al. (2010). Já para os ácidos graxos poli-insaturados (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> e C<sub>20</sub>), os resultados obtidos são coerentes com os apresentados por Zhekisheva et al. (2002), como os componentes poli-insaturados de maior abundância em células vegetativas de *H. pluvialis*. Nesta microalga a astaxantina está presente principalmente complexada com éster, formado por combinação de vários ácidos graxos. A composição padrão da molécula de astaxantina proveniente deste micro-organismo é aproximadamente 70% monoésteres, 25% diésteres e 5% livre (LORENZ; CYSEWSKI, 2000b), sendo os monoésteres ligados aos ácidos graxos C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> e C<sub>18:2</sub>.

### 5.3 CRESCIMENTO, FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *H. pluvialis*, EM CULTURAS CONTÍNUAS E ESTANQUES.

Os perfis de crescimento dos cultivos estanques e contínuos, aerados com ar enriquecido com CO<sub>2</sub> (20%, v/v) são apresentados na Figura 31. O crescimento no sistema contínuo foi cerca de 3,2 vezes maior ( $p < 0,05$ ) que no sistema estanque, ambos tamponados com tampão MES em pH 6.3 e com a mesma vazão de borbulhamento de CO<sub>2</sub>/ar (0,6 L min<sup>-1</sup>). A densidade celular máxima alcançada no 14º dia de cultivo no método contínuo foi  $6,01 \times 10^5$  células m L<sup>-1</sup>. Estes resultados são cerca de 33% maior do que o obtido por López et al. (2006) em fotobiorreator cilíndrico na forma de coluna e sob aeração com vazão de 1 v/v/min (1 L min<sup>-1</sup>) de injeção de CO<sub>2</sub> para manutenção do pH. Os autores obtiveram  $4,5 \times 10^5$  células m L<sup>-1</sup> de biomassa máxima em 16 dias de cultivo. Del Río et al. (2005) cultivaram *H. pluvialis* em fotobiorreator de coluna com método contínuo, aeração sem suplemento de CO<sub>2</sub> e N–NaNO<sub>3</sub> como forma de nitrogênio e obtiveram densidade celular máxima de  $2,0 \times 10^6$  células m L<sup>-1</sup>, ou seja, cerca de 3 vezes maior ao obtido em nossos experimentos.

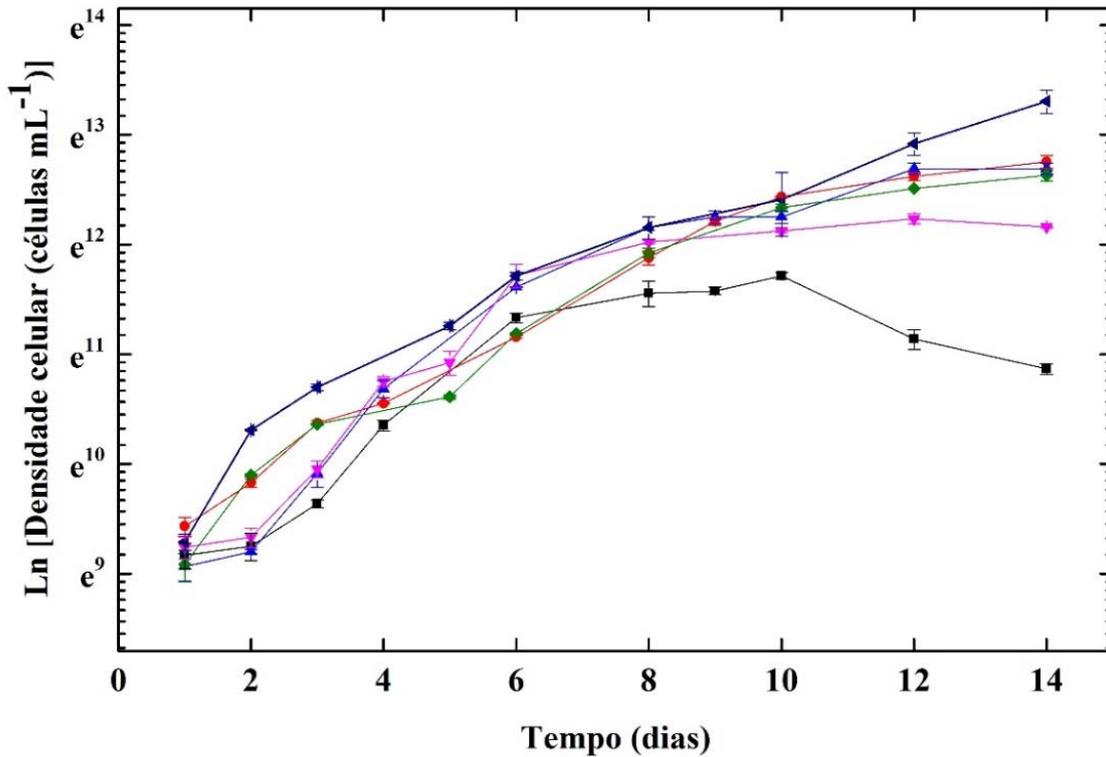


Figura 31 – Curva de crescimento de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo).  
**Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Estanque:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◀ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

A Figura 32 mostra a variação do pH em função do tempo experimental. Ela indica que ambos os sistemas, estanques e contínuos, enriquecidos com CO<sub>2</sub> e/ou tamponados foram importantes para a manutenção diária do pH da cultura. O controle do sistema estanque, em que não foi adicionado tampão e nem borbulhado com gás, o pH variou de 6.3 a 9.8 enquanto que nos demais tratamentos uma variação máxima de 0,7 pontos foi obtida (pH 6.3 a 7.0). A derivação de pH nos sistemas tamponados e suplementados com CO<sub>2</sub> em contraste com a maior variação de pH no sistema estanque controle obtidos nesta pesquisa estão de acordo com dados da literatura. Borowitzka et al. (1991) usou acetato como tampão de pH para o meio de cultura (pH 6.5 e 7.5) em cultivos de *H. pluvialis* e após 30 dias obteve pH 9.4 e 9.8, respectivamente. Portanto, a concentração de íons H<sup>+</sup> passou de 5 × 10<sup>-7</sup> a 1,0 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, o que significa uma diminuição de cerca de 4 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> de íons H<sup>+</sup> d<sup>-1</sup>. Semelhante ao nosso experimento, o controle experimental nos ensaios de Borowitzka et al. (1991) não possuía tampão de pH e, no

final dos seus experimentos obteve o pH 11.0, enquanto que no presente estudo foi obtido pH 10.0 após 14 dias de cultivo.

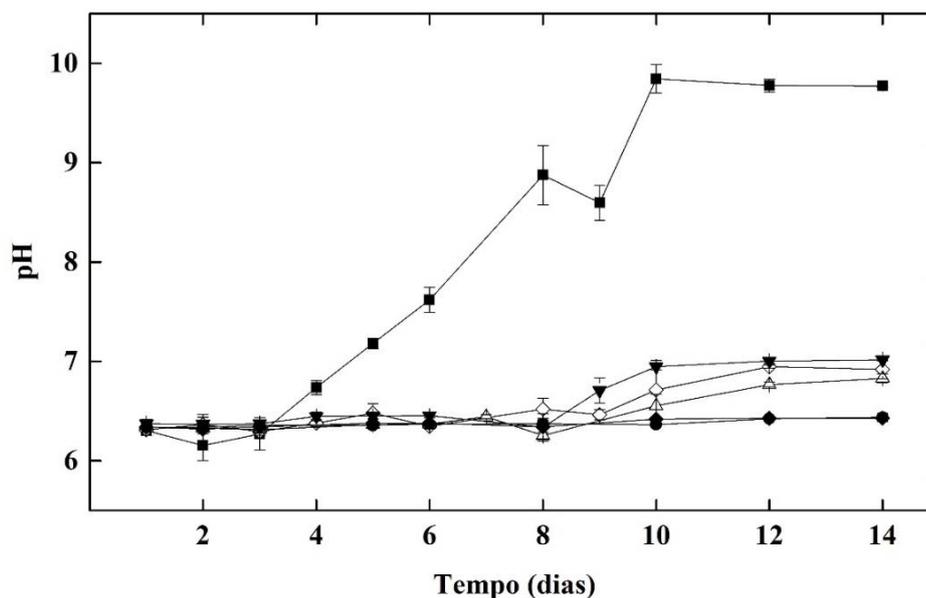


Figura 32 – Variação do pH em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo) de *H. pluvialis* em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ Estanque: Controle; ▼ Estanque: CO<sub>2</sub> 20%; △ Estanque: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ◇ Contínuo: Controle; ◆ Contínuo: CO<sub>2</sub> 20%; ● Contínuo: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

No sistema estanque borbulhado com gás CO<sub>2</sub>:ar e tamponado a concentração de íons H<sup>+</sup> passou de  $3 \times 10^{-7}$  a  $1,48 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, o que significa uma diminuição de  $3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de íons H<sup>+</sup> d<sup>-1</sup>. Nas culturas contínuas borbulhadas e borbulhadas tamponadas não houve variação significativa de pH em função do tempo experimental.

A Figura 33 mostra as taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ). Os valores foram diferentes entre os diferentes cultivos ( $p < 0,05$ ) e seguiram a ordem decrescente  $\mu_4 = \mu_5 = \mu_6 > \mu_1 > \mu_3 > \mu_2$ . Nas condições deste trabalho, a maior taxa de crescimento foi obtida para culturas contínuas ( $0,6 - 0,7$  d<sup>-1</sup>), cerca de 27% maior do que as culturas estanques. Com o objetivo de aumentar a produtividade de células vegetativas de *H. pluvialis*, Del Río et al. (2005) investigaram o efeito da concentração de nitrato e, para a melhor condição testada, obtiveram taxa de crescimento de  $0,9$  d<sup>-1</sup>.

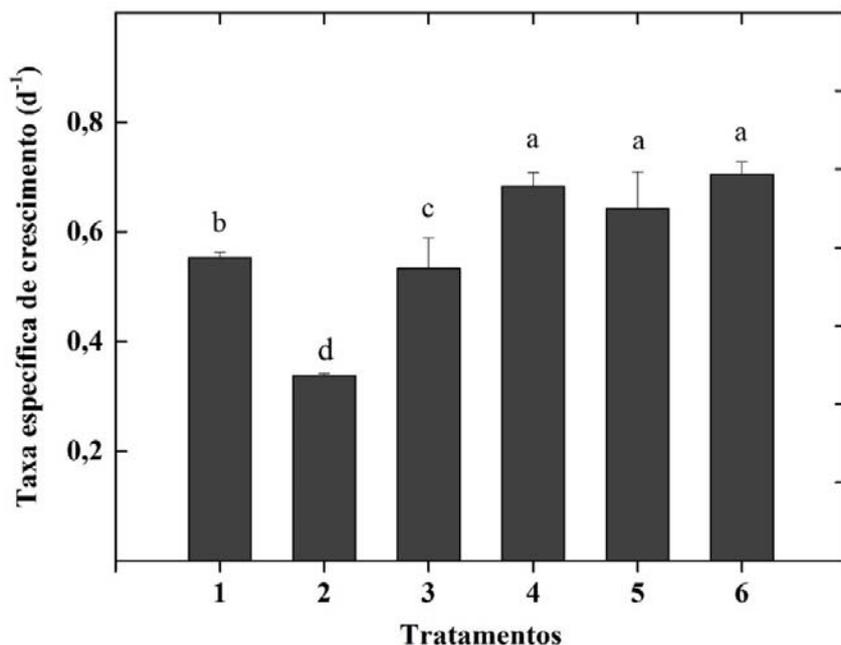


Figura 33 – Taxas de crescimento específicas para culturas estanques e contínuas de *H. pluvialis*. **Tratamentos:** (1) **Estanque:** Controle; (2) **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; (3) **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; (4) **Contínuo:** Controle; (5) **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; (6) **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Os valores representam a média  $\pm$ SD. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As curvas de crescimento e o rendimento quântico máximo do PSII são mostrados na Figura 34 e Tabela 6. A fase de regeneração, que se dá no início das culturas, onde os cistos transformam-se em células vegetativas flageladas, foi marcada por um aumento no rendimento quântico máximo do PSII, mantido em  $\pm 0,7$  durante a fase de crescimento exponencial. Os dois métodos de cultivo diferiram em relação à presença/ausência de fase *lag* de crescimento, sendo nas culturas contínuas os cistos entraram diretamente na fase exponencial, mas as estanques apresentaram uma fase *lag* ou de adaptação para iniciar crescimento exponencial.

Tabela 6 – Valores de taxa de crescimento, densidade celular máxima e eficiência quântica ( $F_v/F_m$ ) para os vários tratamentos desta pesquisa.

Tratamentos	Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ )	Densidade celular máxima ( $cel\ m\ L^{-1}$ )	$F_v/F_m$
Estanque (controle)	0,55	$1,06 \times 10^5$ (10º dia)	0,72
Estanque ( $CO_2$ 20%)	0,34	$2,10 \times 10^5$ (10º dia)	0,71
Estanque (Tampão + $CO_2$ 20%)	0,53	$2,00 \times 10^5$ (12º dia)	0,70
Contínuo (controle)	0,68	$3,40 \times 10^5$ (14º dia)	0,70
Contínuo ( $CO_2$ 20%)	0,64	$3,00 \times 10^5$ (14º dia)	0,71
Contínuo (Tampão + $CO_2$ 20%)	0,71	$6,00 \times 10^5$ (14º dia)	0,73

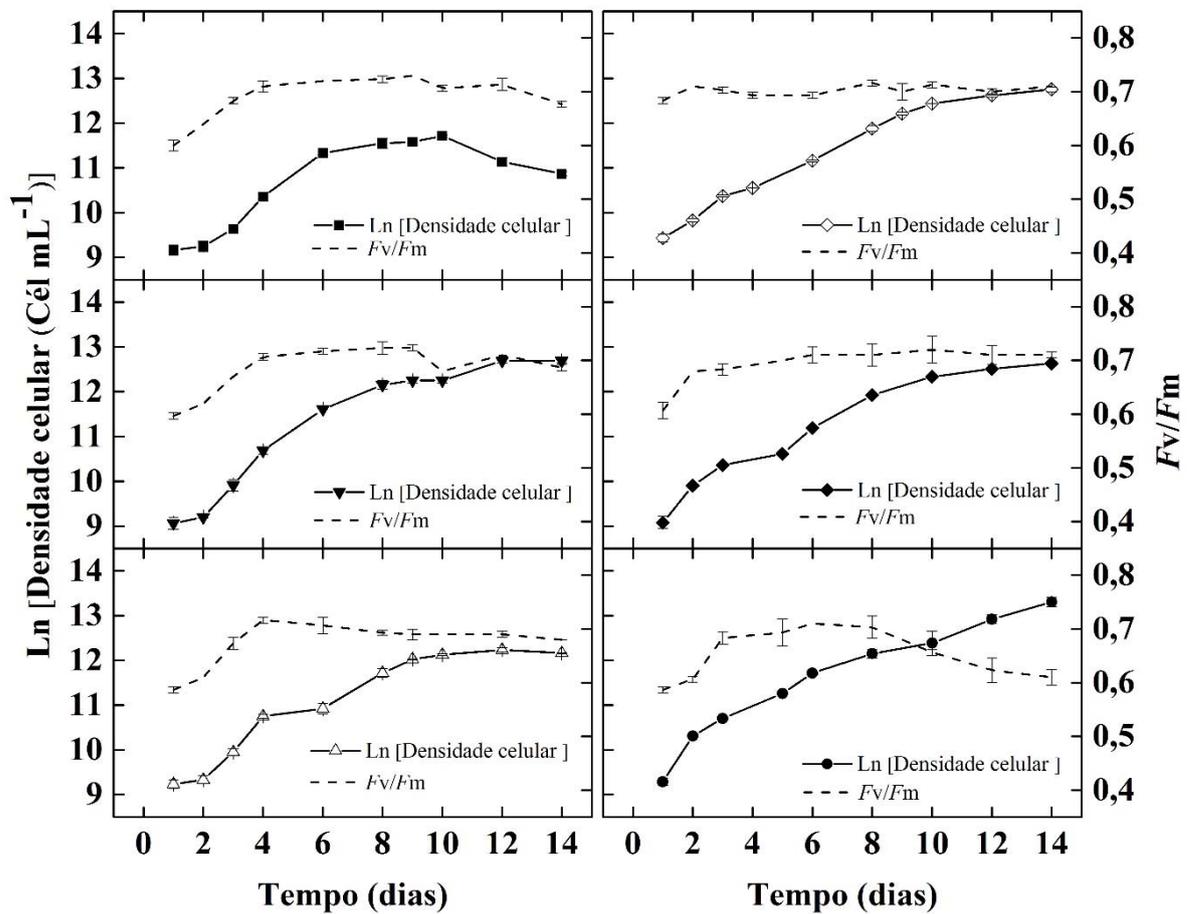


Figura 34 – Densidade populacional em logaritmo natural (Ln) e rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) de culturas de *H. pluvialis* em regimes de cultivo (estanque e contínuo) em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ Estanque: Controle; ▼ Estanque:  $CO_2$  20%; Δ Estanque: Tampão +  $CO_2$  20%; ◇ Contínuo: Controle; ◆ Contínuo:  $CO_2$  20%; ● Contínuo: Tampão +  $CO_2$  20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

As respostas fotossintéticas ( $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v'/F_m'$  – rendimento quântico efetivo) para os sistemas de cultivos estanque e contínuo são apresentados na Figura 35 ( $F_o$ ), Figura 36 ( $F_m$ ), Figura 37 ( $F_v'/F_m'$ ). Neste estudo, o sistema que apresentou maior variação de  $F_o$  (500 u. a.) foi o controle no regime estanque. Quanto ao  $F_m$ , apenas o controle apresentou valores menores. Observamos que o rendimento quântico efetivo ( $F_v'/F_m'$ ) apresentou uma menor variação nos cultivos contínuos (0,66 – 0,70) enquanto que nos estanques a variação foi de 0,5 – 0,7.

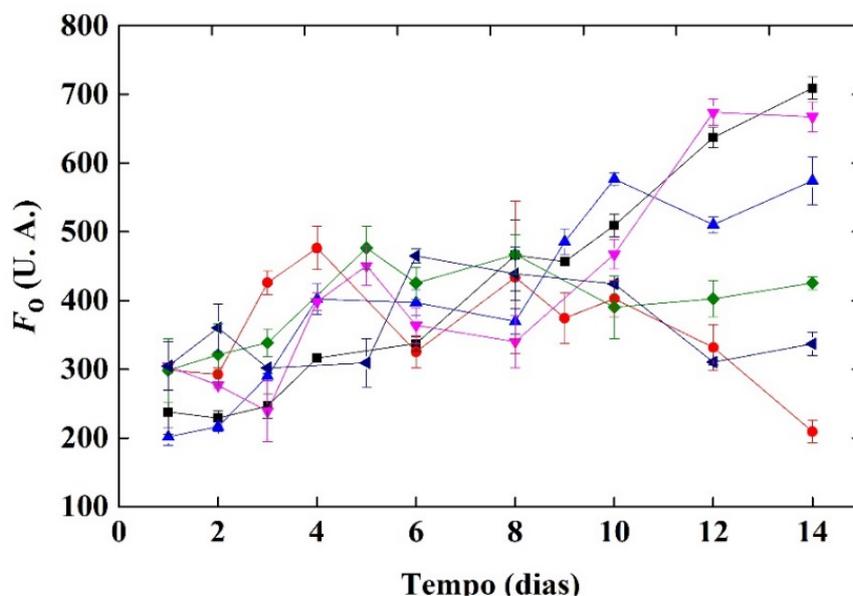


Figura 35 – Fluorescência inicial –  $F_o$  (U. A.), das culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ Estanque: Controle; ▲ Estanque: CO<sub>2</sub> 20%; ▼ Estanque: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● Contínuo: Controle; ◆ Contínuo: CO<sub>2</sub> 20%; ◄ Contínuo: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

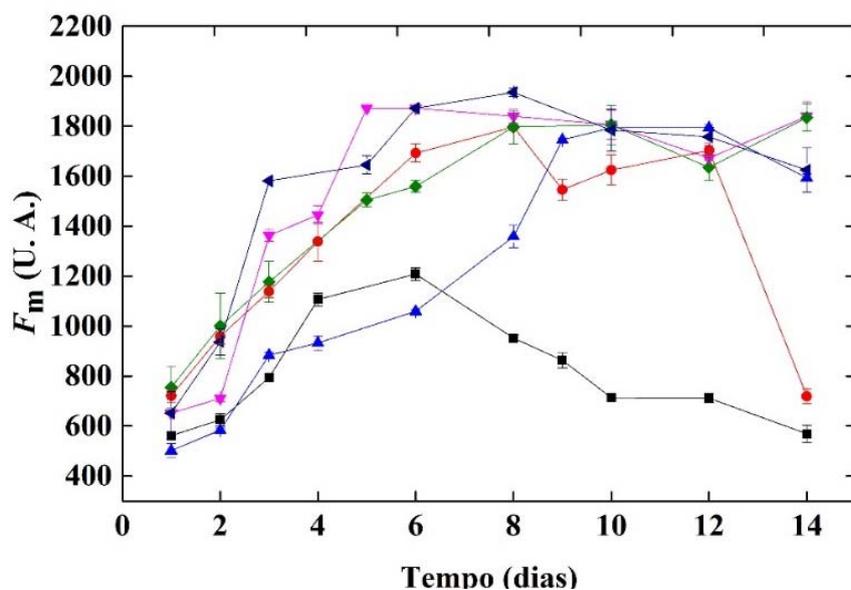


Figura 36 – Fluorescência máxima ( $F_m$ ), das culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ Estanque: Controle; ▲ Estanque: CO<sub>2</sub> 20%; ▼ Estanque: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● Contínuo: Controle; ◆ Contínuo: CO<sub>2</sub> 20%; ◄ Contínuo: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

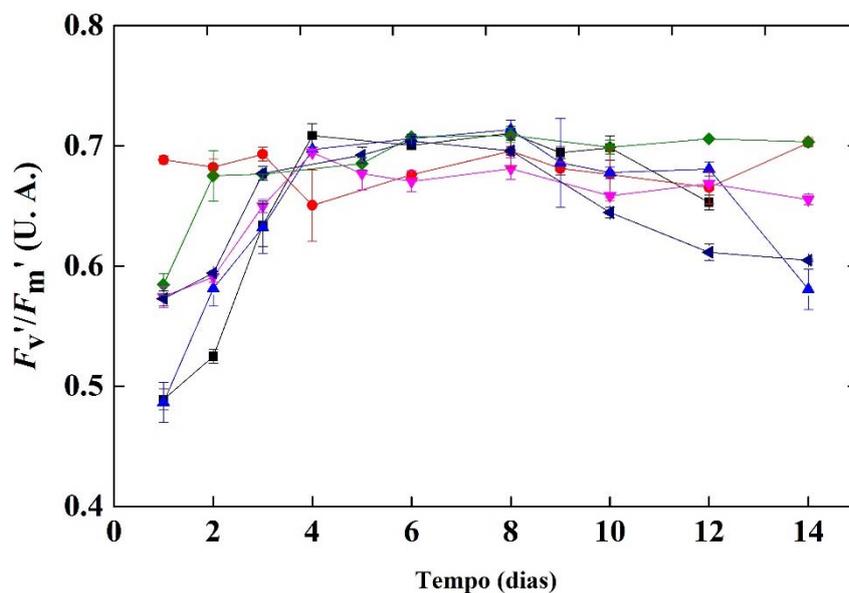


Figura 37 – Rendimento quântico efetivo ( $F_v'/F_m'$ ), das culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). **Símbolos:** ■ Estanque: Controle; ▲ Estanque: CO<sub>2</sub> 20%; ▼ Estanque: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● Contínuo: Controle; ◆ Contínuo: CO<sub>2</sub> 20%; ◄ Contínuo: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

De acordo com Gu et al., (2013), o metabolismo fotossintético pode ser determinado em condições saudáveis e sob estresse em diferentes fases do ciclo de vida de *H. pluvialis*, mesmo considerando que diferentes concentrações de clorofila *a* possam estar presentes nas diferentes fases. Nesta pesquisa, valores de rendimento quântico máximo 0,70 – 0,72 foram obtidos para a fase de crescimento vegetativo (exponencial). Esses resultados estão de acordo com outros da literatura para diversas microalgas (PARKHILL et al., 2001; LOMBARDI; MALDONADO, 2011) que obtiveram valores em torno de 0,69 – 0,74 (CHEN et al., 2012) para microalgas em fase exponencial de crescimento. Os valores que obtivemos de rendimento quântico máximo tanto para as culturas estanque (4º ao 8º dia de cultivo) como também para as contínuas (2º ao 14º dia de cultivo) confirmam as condições ideais de cultivo em nossos experimentos.

Em relação às células palmeloides, nas quais a síntese de carotenoides predomina (COLLINS et al., 2011), valores mais baixos de rendimento quântico máximo são esperados. Nesta pesquisa, as células palmeloides, através de visualização microscópica, estiveram presentes apenas no sistema estanque controle, desde o 10º até o 14º dia de cultivo no presente trabalho, situação em que os valores obtidos foram de 0,68 – 0,67.

Os resultados do  $F_v/F_m$  (máximos) e  $F'_v/F'_m$  (efetivos) obtidos nesta pesquisa estão de acordo com os obtidos para microalgas saudáveis na literatura (0,70 – 0,74) (HERRMANN et al., 1996; VONSHAK; TORZILLO, 2004; LOMBARDI; MALDONADO, 2011; KUMAR et al., 2014). Para *H. pluvialis*, Chen et al. (2012) encontraram valores de  $F_v/F_m$  de  $\sim 0,70$ , no entanto  $F'_v/F'_m$  efetivos variou de  $\sim 0,60$  – 0,70, valores maiores quando comparados às culturas estanques desta pesquisa (0,48 – 0,70). Bousiba e Vonshak (1991) e Nagaraj et al. (2012) afirmam que quando as células de *H. pluvialis* são expostas a situação adversa, há uma redução no  $F_v/F_m$ , indicando danos no PSII das células verdes móveis. Isso pode impedir a transferência de energia para o centro de reação do PSII pela desconexão do centro coletor de luz (LHCII) (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989; BAKER; ROSENQVIST, 2004; HAN et al., 2012).

A dissipação fotoquímica ( $qP$ ) e a dissipação não-fotoquímica associada à perda de calor (NPQ) são mostradas na Figura 38 ( $qP$ ) e na Figura 39 (NPQ).

Os resultados de dissipação fotoquímica desta pesquisa, e.g., energia luminosa absorvida que foi direcionada para o centro de reação e efetivamente usada na fotossíntese, confirmam que o método contínuo para cultivo de *H. pluvialis* foi melhor do que o estanque para a manutenção das células. Nos sistemas estanques a variação de  $qP$  foi maior do que nos contínuos, significando que nem toda energia absorvida nos estanques foi direcionada para

fotossíntese tão efetivamente quanto nos sistemas contínuos. A utilização adequada de energia fotoquímica no metabolismo do carbono é caracterizada por valores elevados de  $qP$ . Um declínio na  $qP$  pode ocorrer quando a absorção de luz excede a exigência de assimilação de carbono (KRAUSE; JAHNS, 2003). Apesar de não ser estritamente linear,  $qP$  e o estado redox da quinona A ( $Q_A$ ) podem ser correlacionados, e  $qP$  pode ser considerado como uma medida aproximada da fração de centros reacionais com  $Q_A$  oxidada (TRISSEL; LAVERGNE, 1995), ou centros de reação abertos (Genty et al. 1989; Maxwell e Johnson 2000), ávidos por receber o elétron resultante da excitação da clorofila. Na presente pesquisa, os valores obtidos para  $qP$ , mantiveram-se dentro da faixa de 0,95 – 0,98 para as culturas contínuas, com os valores mais baixos nas (0,62 – 0,71) nas culturas estanques, indicando que a variação do pH afetou a absorção de luz pelos pigmentos dos centros de reação do PSII e a transferência de elétrons para  $Q_A$ .

A dissipação na forma NPQ, que mostra a energia absorvida perdida na forma de calor em relação à absorvida, variou significativamente ( $p < 0,05$ ) nos controles do método estanque e do método contínuo de cultivo, sendo nesses casos obtidos os maiores valores de NPQ. Isso denota as piores condições de cultivo à microalga nas condições usadas neste trabalho. Sabe-se que a NPQ é mecanismo de proteção do PSII contra os efeitos nocivos da alta intensidade luminosa através da dissipação do excesso de energia de excitação, numa tentativa de minimizar fotodanos (KRAUSE; JAHNS, 2003). É reportado na literatura que microalgas em estado fisiológico ainda que parcialmente saudáveis são mais sensíveis à luz, de modo que para uma mesma intensidade luminosa, essa célula poderá responder com aumento de NPQ ou não, dependendo das condições ambientais e não somente da intensidade de luz incidente (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Os valores de NPQ foram menores nas culturas contínuas quer tenha sido suplementada com  $CO_2$  ou não. Nas demais culturas NPQ foi elevado, revelando a ação de mecanismo de fotoproteção. Baseado nos estudos de Roháček e Barták (1999), Demmig-Adams e Adams (1992) e Horton e Ruban (1992), podemos inferir que este processo está relacionado com a formação de zeaxantina em *H. pluvialis*. Esses autores mostraram que a zeaxantina pode atuar como uma armadilha dissipativa de energia no sistema antena e propuseram ser facilitadora da agregação do LHCII e, como consequência, incrementaria a energia não-radiativa. Torzillo et al. (2003) e Chen et al. (2012) analisaram a variação de parâmetros da fotossíntese durante o ciclo de vida de *H. pluvialis* e obtiveram um aumento do NPQ em culturas sob estresse, quando observaram transformações morfológicas de células verdes móveis em cistos vermelhos.

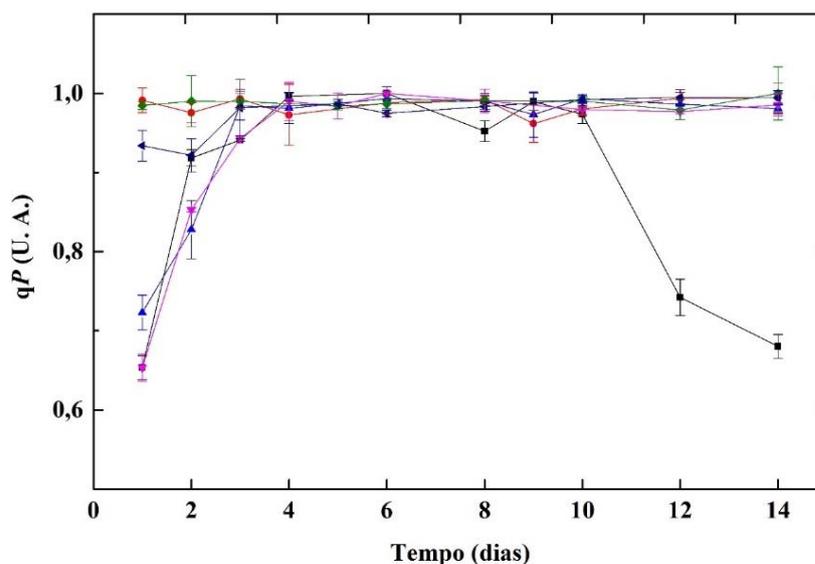


Figura 38 – Valores médios obtidos para a dissipação fotoquímica ( $qP$ ) em culturas de *H. pluvialis*, em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◄ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

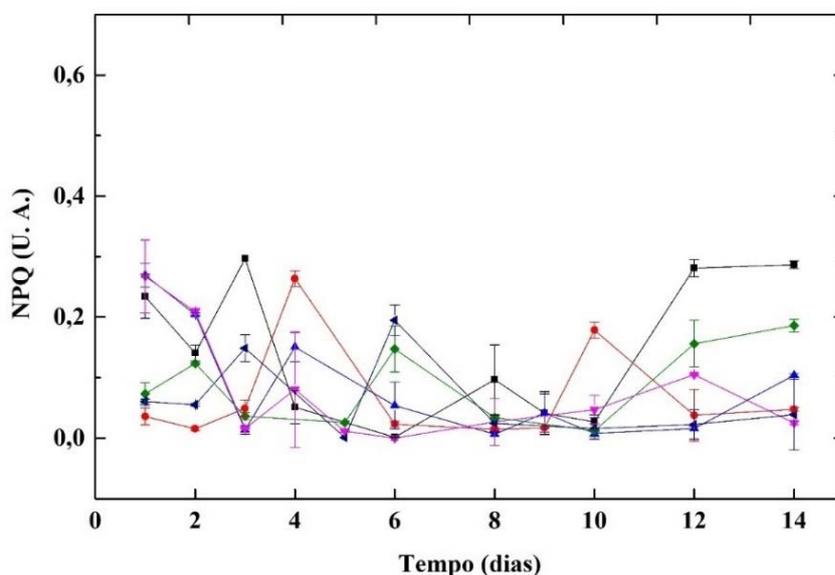


Figura 39 – Valores médios obtidos para a dissipação não-fotoquímica relacionada à perda de calor (NPQ) em culturas de *H. pluvialis*, em função do tempo experimental. **Símbolos:** ■ **Estanque:** Controle; ▲ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ▼ **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ● **Contínuo:** Controle; ◆ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◄ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

A concentração de proteínas e carboidratos para os sistemas estanque e contínuos é apresentada na Figura 40 e a razão proteína:carboidrato (P:C) na Figura 41. O maior conteúdo de proteína foi obtido no sistema contínuo tamponado e suplementado com CO<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ), apresentando 546 pg células<sup>-1</sup> de proteínas na fase de crescimento exponencial, 62,5% superior em comparação com o controle no sistema contínuo e 77% superior ao sistema estanque tamponado e com borbulhamento de CO<sub>2</sub>. Com relação aos carboidratos o sistema que apresentou maior conteúdo foi o sistema estanque (controle) ( $p < 0,05$ ), com 95 pg células<sup>-1</sup> no crescimento exponencial. Este valor é 137,5 % superior em comparação com o controle no sistema contínuo. É conhecido da literatura que elevada produção de carboidratos resulta de células fisiologicamente não saudáveis.

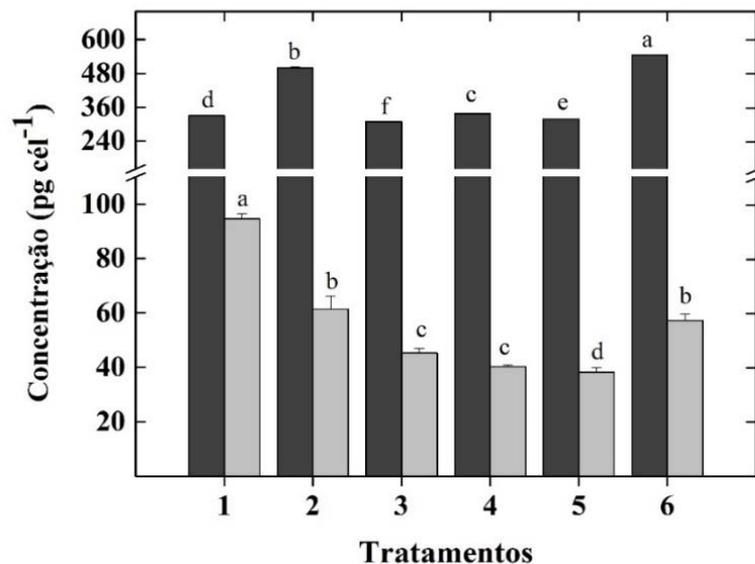


Figura 40 – Concentração de proteínas (cinza escuro) e carboidratos totais (cinza claro) durante crescimento exponencial de *H. pluvialis* em modalidades de cultivo estanque e contínuo. Barra de erro representa o desvio padrão. **Tratamentos: (1) Estanque: Controle; (2) Estanque: CO<sub>2</sub> 20%; (3) Estanque: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; (4) Contínuo: Controle; (5) Contínuo: CO<sub>2</sub> 20%; (6) Contínuo: Tampão + CO<sub>2</sub> 20%.** Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A razão P:C foi menor ( $p < 0,05$ ) na cultura estanque controle, o que significa células menos saudáveis. A cultura contínua controle apresentou razão P:C 2,4, maior do que o estanque controle. Sabe-se que a razão proteína:carboidrato é indicativo de estado nutricional no fitoplâncton (KILHAM et al., 1997) e, de acordo com Healey e Hendzel (1980) e Kilham et al (1997), uma diminuição na razão P:C indica células limitadas por nutrientes. A partir desses resultados, podemos confirmamos o melhor estado nutricional das células mantidas na

modalidade contínua e, sob variação de pH a disponibilidade de nutrientes pode sofrer variação e ter sinalizado estresse às algas. Conseqüentemente, isso pode ter refletido na baixa razão P:C observada. A razão P:C obtida para *H. pluvialis* foi maior em sistema contínuo foi aproximadamente 2x maior do que o apresentado em Rocha et al. (2014), que estudou *Scenedesmus quadricauda*. Acrescentamos que nesta pesquisa a condição contínua forneceu, sob todos os aspectos da fisiologia analisados, as melhores respostas da microalga.

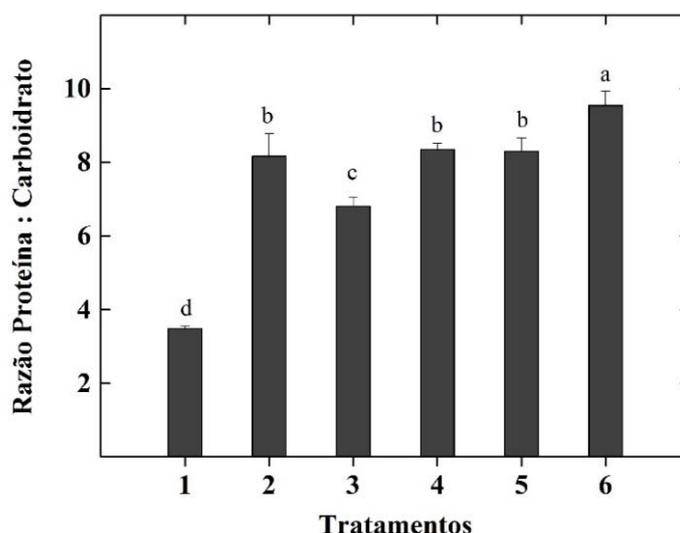


Figura 41 – Razão proteína:carboidrato (P:C) no crescimento exponencial de culturas de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). Barra de erro representa o desvio padrão. **Tratamentos:** **(1) Estanque:** Controle; **(2) Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; **(3) Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; **(4) Contínuo:** Controle; **(5) Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; **(6) Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### 5.4 CURVAS DE SATURAÇÃO DE LUZ DE *H. pluvialis* EM CULTURAS CONTÍNUAS E ESTANQUES.

O efeito de diferentes intensidades de luz sobre a capacidade fotossintética de *H. pluvialis* foi quantificado através de fluorescência da clorofila em culturas estanques e contínuas. O ajuste das curvas de saturação de luz (Figura 42) foi feito pelo próprio equipamento, que forneceu os valores de eficiência fotossintética ( $\alpha$ ). Esses valores dizem quão eficiente é a conversão da luz em energia química pela microalga. Os resultados mostraram que

os maiores  $\alpha$  foram obtidos nos sistemas contínuos e na cultura estanque borbulhada e tamponada. Em geral  $\alpha$  variou de 0,54 a 0,62.

As células móveis exibiram diferentes respostas fisiológicas em função da modalidade do cultivo (estanque *versus* contínuo) e o maior valor do parâmetro de saturação de luz ( $I_k$ ) foi obtido no sistema estanque borbulhado com CO<sub>2</sub>, cerca de 26% maior que o sistema contínuo submetido à mesma condição de borbulhamento. Nesse caso variou de 209,56 a 359,24  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em todos os tratamentos. Estes resultados indicam que culturas borbulhadas com CO<sub>2</sub> e sem variação de pH, possuem maior capacidade adaptativa à luz e melhores condições fisiológicas são a elas oferecidas. Isso ocorreu nos sistemas contínuos independente de tamponamento de pH, mas no sistema estanque, somente nas culturas tamponadas. Observamos que nos sistemas contínuos, o pH permaneceu com pouca alteração em decorrência da entrada de meio fresco e saída de meio usado. De acordo com o discutido em Parsons et al (1984) quanto à adaptação de microalgas à luz em curvas de saturação de luz, podemos extrapolar que *Haematococcus pluvialis*, que normalmente vive em áreas de baixa luminosidade, tais como cavidades rochosas, período de outono ou inverno em lagos de regiões temperadas a subtropicais, seria classificada como uma espécie de sombra e é saturada pela luz mais rapidamente do que espécies de sol, que deverá apresentar taxa fotossintética inferior à espécie de sombra, no caso *H. pluvialis*.

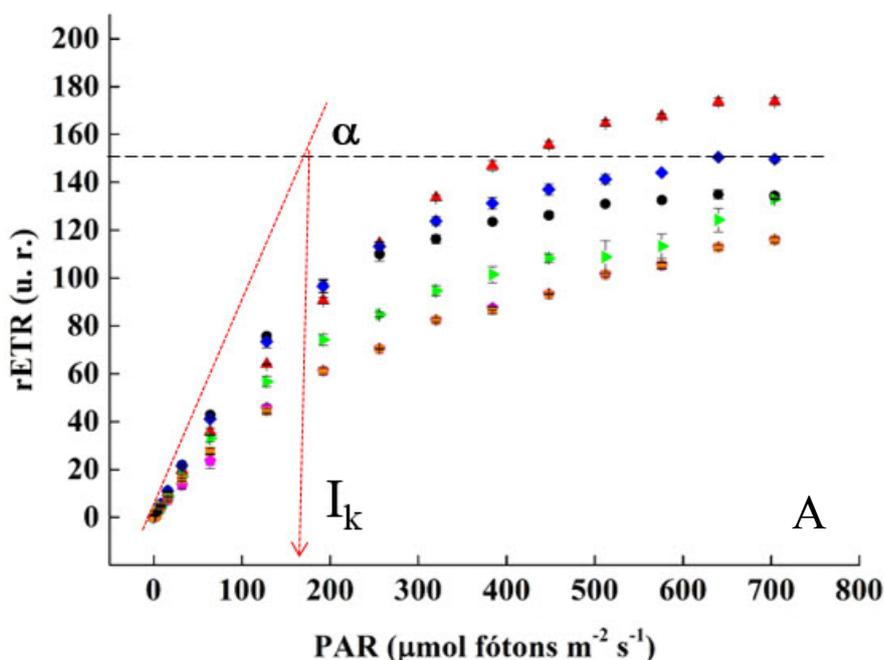
Células vegetativas móveis em cultivos tamponados e borbulhados com CO<sub>2</sub> apresentaram os valores mais elevados ( $p < 0,05$ ) de  $\alpha$ , da ordem de 0,62 e 0,58  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Quanto ao valor de  $r\text{ETR}_{\text{max}}$  (Tabela 7) não houve diferença significativa entre os cultivos tamponados e borbulhados ( $p > 0,05$ ).

Tabela 7 – Parâmetros das curvas fotossíntese-irradiância (F-I) da população de *H. pluvialis* em diferentes regimes de cultivo (estanque e contínuo). Barra de erro representa o desvio padrão. Teste de comparação de médias: médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores fornecidos pelo Phyto-PAM.

Tratamentos	$r\text{ETR}_{\text{max}} (P_{\text{max}})$ ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-2}$ )	$I_k$ ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\alpha$	
			mg C	mg Chl $a^{-1}/$ $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Estanque: Controle	111,02 $\pm$ 6,74 <sup>c</sup>	306,37 $\pm$ 12,32 <sup>b</sup>	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	
Estanque: CO <sub>2</sub> 20%	109,68 $\pm$ 0,32 <sup>d</sup>	359,24 $\pm$ 14,21 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	
Estanque: Tampão + CO <sub>2</sub> 20%	129,75 $\pm$ 4,78 <sup>a</sup>	209,56 $\pm$ 14,13 <sup>d</sup>	0,62 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	
Contínuo: Controle	122,76 $\pm$ 9,94 <sup>b</sup>	226,19 $\pm$ 21,96 <sup>c</sup>	0,54 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	
Contínuo: CO <sub>2</sub> 20%;	146,03 $\pm$ 7,12 <sup>a</sup>	265,69 $\pm$ 16,91 <sup>b</sup>	0,55 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	
Contínuo: Tampão + CO <sub>2</sub> 20%	132,45 $\pm$ 8,42 <sup>a</sup>	229,68 $\pm$ 13,91 <sup>c</sup>	0,58 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	

Segundo Ralph e Gademann (2005), os valores de rETR e eficiência fotossintética aumentam sob condições de baixa intensidade luminosa e, conforme aumenta a irradiância seguem até saturação dos transportadores de elétrons, quando a eficiência fotossintética inicia redução. Segundo Falkowski e Raven (2013), a curva de saturação de luz pode ser dividida em 3 partes, uma primeira em baixas intensidades de luz, onde a fotossíntese é apenas limitada pela luz e por nenhum outro fator. Nessa situação as reações dependentes da luz controlam a velocidade com que se processa a fotossíntese. A segunda parte, onde se observa que a fotossíntese não aumenta, mas atinge um platô, condição de altas intensidades de luz mais elevadas uma segunda parte em intensidades de luz maiores. No platô, que delimita a taxa fotossintética máxima, pois mesmo aumentando a intensidade luminosa, não há correspondente aumento da taxa fotossintética, a limitação passa agora para as reações independentes da luz. Segundo a teoria que descreve curvas de saturação de luz, a intensidade de luz onde a inclinação inicial ( $slope = \alpha$ ) e o platô se encontram descreve a razão entre a concentração de enzimas ativas na fotossíntese e a concentração de pigmentos ativos na fotossíntese. Neste ponto a intensidade de luz é conhecida como parâmetro de saturação de luz ( $I_k$ ), valor que pode descrever o estado fisiológico da alga além de dizer se espécie é adaptada à sombra ( $I_k$  baixo) ou à luz ( $I_k$  alto). Torzillo et al. (2005) estudou o efeito da irradiância de luz no crescimento e composição de pigmentos em *Haematococcus pluvialis*. Os autores mostraram que as taxas de transferência de elétrons máximas ( $rETR_{max}$ ), medidas próximo ao platô da curva de saturação de luz, diminuíram com o aumento da irradiância, mudanças no  $\alpha$ , e alteração do  $I_k$ . No presente trabalho, as células móveis do cultivo contínuo borbulhado e tamponado apresentaram os maiores valores de  $rETR_{max}$ , provavelmente devido ao aumento dos componentes da cadeia de transporte de elétrons (MOHAMMED et al., 1995). Resultados semelhantes em torno de 81  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-2}$  foram encontrados por Wang et al. (2014), quando investigando sobre a aclimação de *H. pluvialis* e observou alterações no perfil lipídico. Fan et al. (1994) estudando os efeitos da temperatura e da irradiância em *Haematococcus pluvialis* obteve no 3º dia de cultivo, sob irradiância de 60  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $I_k$  de 212  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Han et al., (2012) analisando os mecanismos de proteção de células flageladas de *Haematococcus pluvialis* obteve  $I_k$  em torno de 110  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sob condições de cultivo de alta irradiância (150  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); Wang et al. (2014) obteve valor de  $I_k$  em torno de 231  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cosgrove (2007) investigando a produção primária e os aspectos ecofisiológicos, em culturas da microalga *Nannochloropsis oculata*, obteve valor de  $I_k$  em torno de 160  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto Grobbellar et al., (1996), analisando a influência do fotoperíodo nos processos de fotoaclimação, obteve  $I_k$  em torno de 440  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em culturas de *Scenedesmus*

*obliquus* Em nosso trabalho a eficiência fotossintética ( $\alpha$ ) de células flageladas foi em média próximo ao obtido por Wang et al. (2014), cujo  $\alpha$  inicial foi de 0,35, ao investigar os processos de aclimação sob baixa e alta irradiância em microalgas. Em nosso estudo, os maiores valores de  $rETR_{max}$  foram encontrados nas culturas contínuas, que não apresentaram variação de pH, independente da adição de tampão. Observamos que todas as culturas contínuas foram submetidas a borbulhamento de  $CO_2$ , que além da reposição de meio, pode ter contribuído para a manutenção do pH. Nessas condições, as densidades celulares eram maiores e a luminosidade que penetrava cultura adentro era, provavelmente menor do que nas estanques, já que a luz incidente era a mesma. Valores elevados de  $rETR_{max}$  sugerem que *H. pluvialis* apresenta plasticidade fisiológica respondendo positivamente à luz (KITAJIMA, 1994; VALLADARES et al., 2002). Nessas culturas também foram obtidos os maiores valores de  $\alpha$  e  $I_k$  (intensidade de luz no ponto de saturação), significando melhor aproveitamento da luz. Esses resultados mostraram que a espécie *H. pluvialis* adapta-se ao seu ambiente de luz por meio de ajustes no número e tamanho das unidades fotossintéticas, de forma que a irradiância recebida seja utilizada mais eficientemente (CHOI et al., 2003; LABABPOUR et al., 2004).



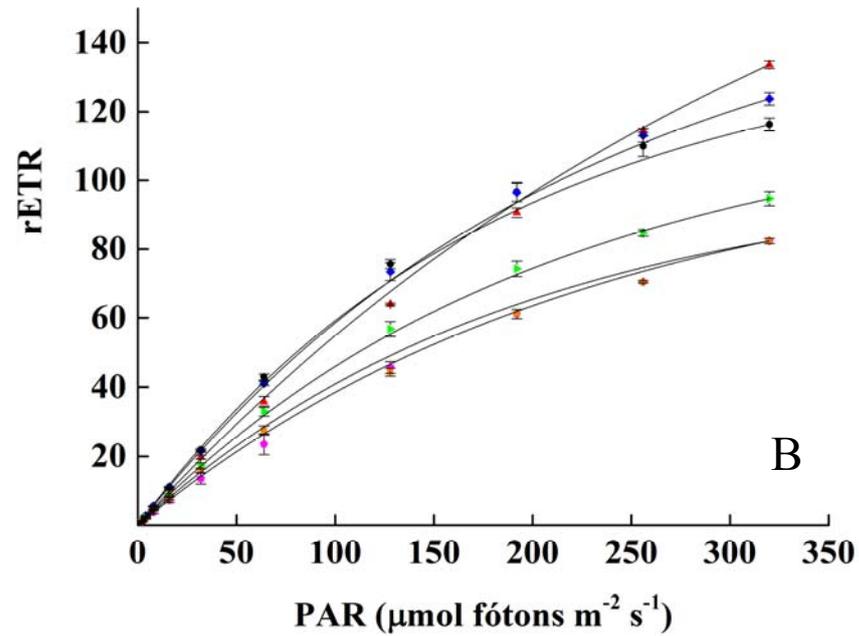


Figura 42 – Curva de Saturação de Luz (RLC): Fotossíntese (rETR) versus Irradiância (PAR) de *H. pluvialis* sob diferentes condições de cultivo. A: curva com todos os pontos; B: ampliação de parte da curva A, incluindo rETR (0 – 140) e PAR (0 – 350). **Símbolos:** ► **Estanque:** Controle; ■ **Estanque:** CO<sub>2</sub> 20%; ● **Estanque:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%; ◆ **Contínuo:** Controle; ▲ **Contínuo:** CO<sub>2</sub> 20%; ◆ **Contínuo:** Tampão + CO<sub>2</sub> 20%. Barra de erro representa o desvio padrão de três réplicas.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

- *H. pluvialis*, como a maioria dos flagelados, apresenta ciclo de vida complexo e responde através de encistamento às variações nas condições do meio. O meio de cultura LC Oligo modificado foi, dentre os testados, aquele que mais se adequou aos propósitos de aumento de densidade celular nas culturas.
- A manutenção de pH de cultivo dentro de amplitude estreita próximo de pH 6.3 forneceu um ambiente químico mais estável para as células, proporcionando as melhores condições para a germinação dos cistos, diminuição da fase de latência (*lag*) para iniciar o crescimento exponencial e apresentou a maior taxa de crescimento em relação às culturas tamponadas em pH 6.0, 6.7, e 7.2. Esses resultados foram suportados pela maior densidade de células e valores de  $F_v/F_m$  próximos dos ideais para microalgas em geral ( $\sim 0,70 - 0,80$ ). No entanto, o indicador de células saudáveis, a razão P:C, foi maior ( $\sim 4,0$ ) para culturas tamponadas em pH 6.7, enquanto lipídios totais não foram correlacionados com pH das culturas.
- O sucesso ou fracasso da produtividade de biomassa de *H. pluvialis* depende do sistema de cultura. Para sucesso, recomenda-se a manutenção de altas taxas fotossintéticas. As culturas contínuas suplementadas com CO<sub>2</sub> e tamponadas em pH 6.3 renderam mais biomassa do que culturas estanques nas mesmas condições. Nas culturas contínuas, a manutenção do pH, estabilidade na atividade fotossintética e razão proteínas:carboidratos foram mantidas em valores melhores do que nas culturas estanques. As culturas contínuas apresentaram maior taxa de transferência de elétrons ( $rETR_{max}$ ) e com isso, conclui-se que apresentam maior capacidade adaptativa à luz, confirmando a predominância de células móveis nesses sistemas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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, n. 1, p. 300–305, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.21391/abstract>>. Acesso em: 5/8/2012.

ANDREWES, A. G.; PHAFF, H. J.; STARR, M. P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1003–1007, 1976. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200843903>>. Acesso em: 25/10/2014.

ANTIA, N. J.; LEE, R. F.; NEVENZEL, J. C.; CHENG, J. Y. Wax ester production by the marine cryptomonad *Chroomonas salina* grown photoheterotrophically on glycerol. **The Journal of Protozoology**, v. 21, n. 5, p. 768–771, 1974.

APT, K. E.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology**, v. 35, n. 2, p. 215–226, 1999.

ARMSTRONG, G. A.; HEARST, J. E. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 2, p. 228–237, 1996. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/content/10/2/228.short>>. Acesso em: 5/11/2014.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258166>>. Acesso em: 8/11/2013.

BALECH, E. **Introducción al fitoplancton marino**. 1st ed. Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1977.

BAR, E.; RISE, M.; VISHKAUTSAN, M.; ARAD, S. (MALIS). Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 527–534, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161711820195>>. Acesso em: 23/10/2014.

BARRA, L.; CHANDRASEKARAN, R.; CORATO, F.; BRUNET, C. The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. **Marine Drugs**, v. 12, n. 3, p. 1641–1675, 2014. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/12/3/1641/htm>>. Acesso em: 20/11/2014.

BATES, S. S. Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 2, p. 212–218, 1976.

BECKER, W. Microalgae in Human and Animal Nutrition. In: A. Richmond (Ed.); **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. p.312–351, 2004. Blackwell Publishing Ltd.

BEN-AMOTZ, A.; SHAISH, A.; AVRON, M. Mode of action of the massively accumulated  $\beta$ -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. **Plant Physiology**, v. 91, n. 3, p. 1040–1043, 1989. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.91.3.1040>>. .

BENEMANN, J. R. **Opportunities and Challenges in Algae Biofuels Production**. 2008.

BERENGUEL, M.; RODRÍGUEZ, F.; ACIÉN, F. G.; GARCÍA, J. L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, v. 14, n. 4, p. 377–387, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959152403000738>>. Acesso em: 29/10/2014.

BERTOLDI, F. C.; ANNA, E. S.; LUIZ, J.; et al. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nxtAction=lnk&exprSearch=522576&indexSearch=ID>>. Acesso em: 18/8/2012.

BIDIGARE, R. R.; ONDRUSEK, M. E.; KENNICUTT, M. C.; et al. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. **Journal of Phycology**, v. 29, n. 4, p. 427–434, 1993. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.1993.tb00143.x>>. Acesso em: 23/10/2014.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497–514, 1989. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2389624>>. Acesso em: 25/3/2014.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: D. O. Hall; J. Scurlock; H. Bolhár-Nordenkamp; R. Leegood; S. Long (Eds.); **Photosynthesis and production in a changing environment: A field and laboratory manual**. v. XXVII, p.193–206, 1993. London: Chapman & Hall London.

BONEY, A. D. **Phytoplankton: new studies in biology**. 2 ed ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1989.

BOROWITZKA, M. A. Culturing microalgae in outdoor ponds. In: R. A. Andersen (Ed.); **Algal Culturing Techniques**. 1 st ed., p.205–218, 2005. Elsevier/Academic Press.

BOROWITZKA, M. A.; HUISMAN, J. M.; OSBORN, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*<sup>1</sup>. Effects of nutrients on growth and cell type. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 4, p. 295–304, 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02392882>>. Acesso em: 26/6/2014.

BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 2, p. 111–117, 2000.

Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034%2Fj.1399-3054.2000.108002111.x>>. Acesso em: 26/6/2014.

BOUSSIBA, S.; BING, W.; YUAN, J.-P.; ZARKA, A.; CHEN, F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 7, p. 601–604, 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1005507514694>>. Acesso em: 6/8/2012.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*<sup>1</sup>. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, n. 7, p. 1077–1082, 1991. Disponível em: <<http://pcp.oxfordjournals.org/content/32/7/1077.short>>. Acesso em: 6/8/2012.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A. Procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*. **US Patent 6,022,701**, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRINDA, B. R.; SARADA, R.; KAMATH, B. S.; RAVISHANKAR, G. A. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1290–1295, 2004. Disponível em: <<http://tejas.serc.iisc.ernet.in/~currsci/nov102004/1290.pdf>>. Acesso em: 3/8/2012.

CALO, P.; MIGUEL, T. DE; VELÁZQUEZ, J. B.; VILLA, T. G. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 6, p. 575–578, 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00129380>>. Acesso em: 25/10/2014.

CALVIN, M.; BENSON, A. A. The path of carbon in photosynthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 107, n. 2784, p. 476–480, 1948. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/107/2784/476.short>>. Acesso em: 30/10/2014.

CAMPBELL, D.; HURRY, V.; CLARKE, A. K.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 667–683, 1998.

CAMPO, J. A. DEL; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163–1174, 2007.

CAMPO, J. A. DEL; RODRÍGUEZ, H.; MORENO, J.; et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 848–854, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689249>>. Acesso em: 26/9/2014.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a, considerações teóricas e aplicações práticas. **UENF**, **198f**, p. 1–34, 1998. Disponível em: <<http://www.uenf.br/downloads/ApostiladeFluorescencia.pdf>>. Acesso em: 7/10/2013.

CANTER-LUND, H.; LUND, J. W. G. **Freshwater algae: their microscopic world explored**. England: Biopress Ltd, 1995.

CASTENHOLZ, R. W. The effect of daylength light intensity on the growth of littoral marine diatoms in culture. **Physiologia Plantarum**, v. 17, n. 4, p. 951–963, 1964. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1964.tb08222.x>>. Acesso em: 12/11/2014.

CERÓN, M. C.; GARCÍA-MALEA, M. C.; RIVAS, J.; et al. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 1112–1119, 2007.

CHEN, Z.; WANG, G.; NIU, J. Variation in Rubisco and other photosynthetic parameters in the life cycle of *Haematococcus pluvialis*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2012.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. DA G. G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1427–1438, 2013.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. DA G. G.; PARRISH, C. C. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 128-129, p. 171–182, 2013a.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. DA G. G.; PARRISH, C. C. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 128-129, p. 171–182, 2013b.

CHIA, M. A.; MUSA, R. I. Effect of indigo dye effluent on the growth, biomass production and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorococcales). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 419–428, 2014. Academia Brasileira de Ciências. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652014000100419&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652014000100419&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 24/2/2015.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHOI, S.-L.; SUH, I. S.; LEE, C.-G. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 4, p. 403–409, 2003.

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, n. 3-4, p. 343–357, 2003.

CLOERN, J. E. Effects of light intensity and temperature on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyceae) growth and nutrient uptake rates. **Journal of Phycology**, v. 13, n. 4, p. 389–395, 1977. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.1977.tb02947.x>>. Acesso em: 12/11/2014.

COHEN, Z. **Chemicals from Microalgae**. CRC Press, 1999.

COLLINS, A. M.; JONES, H. D. T.; HAN, D.; et al. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **PloS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24302, 2011.

COSGROVE, J. J. **Marine phytoplankton primary production and ecophysiology using chlorophyll-a fluorescence**, 2007. Disponível em: <<http://researchrepository.murdoch.edu.au/503/>>. Acesso em: 5/8/2014.

CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 557–583, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012246>>. Acesso em: 9/1/2015.

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

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 599–626, 1992. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pp.43.060192.003123>>. Acesso em: 25/2/2015.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5601, p. 2149–2153, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481128>>. Acesso em: 24/7/2012.

DEVGOSWAMI, C. R.; KALITA, M. C.; TALUKDAR, J.; BORA, R.; SHARMA, P. Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 61, p. 13128–13138, 2011.

DISCH, A.; SCHWENDER, J.; MÜLLER, C.; LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 381–388, 1998. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/bj/333/bj3330381.htm>>. Acesso em: 6/1/2015.

- DONG, Q.; ZHAO, X. Simultaneous carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Preprints of Papers- American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 116–117, 2004.
- DROOP, M. R. Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 20, n. 4, p. 391–397, 1954. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00690882>>. Acesso em: 23/10/2014.
- DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 56, p. 163–176, 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/ame/v56/n2-3/p163-176/>>. Acesso em: 15/11/2014.
- EILERS, P. H. C.; PEETERS, J. C. H. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. **Ecological Modelling**, 1988.
- ELLIOT, A. M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. **Archiv der Protistenkunde**, v. 82, p. 250–272, 1934.
- EVENS, T. J.; NIEDZ, R. P.; KIRKPATRICK, G. J. Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 411–422, 2008.
- FÁBREGAS, J.; DOMINGUEZ, A.; REGUEIRO, M.; MASEDA, A.; OTERO, A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 530–535, 2000.
- FÁBREGAS, 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.
- FALKOWSKI, P. G.; GAN, R.; WYMAN, K. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 30, n. 2, p. 311–321, 1985.
- FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic photosynthesis**. 2nd ed. Princeton University Press, 2013.
- FAN, L.; VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, n. 5, p. 829–833, 1994.
- FAN, L.; VONSHAK, A.; GABBAY, R.; et al. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 8, p. 1519–1524, 1995.

FAY, P. **The Blue Greens (Cyanophyta – Cyanobacteria)**. 5th ed. London: Edward Arnold Publishers, 1983.

FRASER, P. D.; SHIMADA, H.; MISAWA, N. Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 252, n. 2, p. 229–236, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523693>>. Acesso em: 14/1/2015.

FROMME, P.; YU, H.; DERUYTER, Y. S.; et al. Structure of photosystems I and II. **Comptes Rendus Chimie**, v. 9, n. 2, p. 188–200, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631074805003048>>. Acesso em: 31/10/2014.

FUENTE, J. C. DE LA; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. DEL. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, n. 1-2, p. 90–95, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381206002706>>. Acesso em: 5/11/2014.

GANF, G.; STONE, S.; OLIVER, R. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. **Marine and Freshwater Research**, v. 37, n. 2, p. 183, 1986.

GARCÍA-MALEA, M. C.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; CERÓN, M. C.; MOLINA, E. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 981–989, 2006.

GARCÍA-MALEA, M. C.; ACIÉN, F. G.; RÍO, E. DEL; et al. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 651–657, 2009.

GARCÍA-MALEA, M. C.; BRINDLEY, C.; RÍO, E. DEL; et al. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 107–114, 2005.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416589800169>>. Acesso em: 21/4/2013.

GLADUE, R. M. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds. In: W. Fulks; K. L. Main (Eds.); **Rotifer and Microalgae Culture Systems: Proceedings of a U.S.-Asia Workshop**. p.275–286, 1991. Honolulu, Hawaii: Argent Laboratories.

GONG, X.; CHEN, F. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 5, p. 437–444, 1997.

GONZÁLEZ, M. S. La astaxantina y su biosíntesis. **Contactos**, p. 61–64, 2000. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:La+astaxantina+y+su+bio+sisntesis#1>>. Acesso em: 5/11/2014.

GREEN, J. The occurrence of astaxanthin in the euglenoid *Trechelomonas volvocina*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 13, p. 313–316, 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14109727>>. Acesso em: 23/10/2014.

GROBBELAAR, J. U.; NEDBAL, L.; TICHÝ, V. Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 4-5, p. 335–343, 1996.

GRÜNEWALD, K.; ECKERT, M.; HIRSCHBERG, J.; HAGEN, C. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1261–1268, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/1/2015.

GRÜNEWALD, K.; HIRSCHBERG, J.; HAGEN, C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 6023–6029, 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/276/8/6023.full>>. Acesso em: 30/1/2013.

GRUNG, M.; METZGER, P.; LIAAEN-JENSEN, S. Algal carotenoids 53; secondary carotenoids of algae 4; secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, race L, new strain. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 1, p. 25–29, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305197894901112>>. Acesso em: 23/10/2014.

GU, W.; XIE, X.; GAO, S.; et al. Comparison of different cells of *Haematococcus pluvialis* reveals an extensive acclimation mechanism during its aging process: from a perspective of photosynthesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67028, 2013.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 625–644, 2011.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210–216, 2003.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W. L. Smith; M. H. Chanley (Eds.); **Culture of Marine Invertebrate Animals**. p.29–60, 1975.

Boston, MA: Springer US. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4615-8714-9>>. Acesso em: 12/11/2014.

GUNKEL, W. Light:1. Bacteria, fungi and blue-green algae,. In: O. Kinne (Ed.); **Marine ecology: a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters: 1. Environmental factors: 1.** p.103–124, 1970. London: Interscience/Wiley.

HAGEN, C.; BRAUNE, W.; BJORN, L. O. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a “sunshade.” **Journal of Phycology**, v. 30, n. 2, p. 241–248, 1994.

HAGEN, C.; BRAUNE, W.; GREULICH, F. Functional aspects of secondary carotenoids lacustris [Girod] Rostafinski (Volvocales) IV . Protection from photodynamic damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 20, n. 2-3, p. 153–160, 1993.

HAGEN, C.; GRÜNEWALD, K.; SCHMIDT, S.; MÜLLER, J. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. **European Journal of Phycology**, v. 35, n. 1, p. 75–82, 2000.

HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 217–226, 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1017/S0967026202003669>>. Acesso em: 3/8/2012.

HAN, D.; LI, Y.; HU, Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. **Algae**, v. 28, n. 2, p. 131–147, 2013. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=JORHBK&py=2013&vnc=v28n2&sp=131>>. .

HAN, D.; WANG, J.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) to photooxidative stress. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 3, p. 693–705, 2012.

HARDING, L. W.; FISHER, T. R. J.; TYLER, M. A. Adaptative responses of photosynthesis in phytoplankton: specificity to time-scale of change in light. **Biological Oceanography**, v. 4, n. 4, p. 403–437, 1987.

HARKER, M.; TSAVALOS, A. J.; YOUNG, A. J. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 4, p. 399–406, 1995.

HARKER, M.; TSAVALOS, A. J.; YOUNG, A. J. Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 3, p. 207–214, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096085249500002X>>. Acesso em: 6/8/2012.

HATA, N.; OGBONNA, J.; HASEGAWA, Y.; TARODA, H.; TANAKA, H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 5, p. 395–402, 2001.

HAVAUX, M.; STRASSER, R. J.; GREPPIN, H. A theoretical and experimental analysis of the qP and qN coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. **Photosynthesis Research**, v. 27, n. 1, p. 41–55, 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2F978-94-007-2997-5>>. Acesso em: 31/10/2013.

HEALEY, F. P.; HENDZEL, L. L. Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, n. 3, p. 442–453, 1980. NRC Research Press Ottawa, Canada.

HERRMANN, H.; HÄDER, D.-P.; KÖFFERLEIN, M.; SEIDLITZ, H. K.; GHETTI, F. Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 34, n. 1, p. 21–28, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134495072454>>. Acesso em: 12/11/2013.

HOEK, C. VAN DEN; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

HORTON, P.; RUBAN, A. V. Regulation of Photosystem II. **Photosynthesis Research**, v. 34, p. 375–385, 1992.

HU, Z.-C.; ZHENG, Y.-G.; WANG, Z.; SHEN, Y.-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 586–590, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905004928>>. Acesso em: 7/4/2015.

HUANG, J.-C.; CHEN, F.; SANDMANN, G. Stress-related differential expression of multiple beta-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 2, p. 176–185, 2006.

IMAMOGLU, E.; SUKAN, F.; DALAY, M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. **International Journal of Natural and Engineering Sciences**, v. 1, n. 3, p. 5–9, 2007.

INOUE, K.; FURBEE, K. J.; URATSU, S.; et al. Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 4, p. 561–570, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2006.00690.x>>. Acesso em: 24/2/2015.

IP, P.-F.; CHEN, F. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3491–

3496, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305002059>>. Acesso em: 25/10/2014.

IP, P.-F.; WONG, K.-H.; CHEN, F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1761–1766, 2004. Elsevier Ltd. The Journal's web site is located at <http://www.elsevier.com/locate/procbio>. Disponível em: <<http://hub.hku.hk/handle/10722/68603>>. Acesso em: 18/10/2014.

JACOBI, A.; IVANOVA, D.; POSTEN, C. Photobioreactors: hydrodynamics and mass transfer. *Computer Applications in Biotechnology*. **Anais...** v. 11, p.162–167, 2010. Disponível em: <<http://www.ifac-papersonline.net/Detailed/42620.html>>. Acesso em: 13/11/2014.

JIN, E.; POLLE, J. E.; LEE, H. K.; HYUN, S. M.; CHANG, M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 165–174, 2003.

JOHNSON, E. A.; AN, G.-H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 297–326, 1991. Informa UK Ltd UK. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07388559109040622>>. Acesso em: 25/10/2014.

JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E. A.; EMBIRUÇU, M.; GHIRARDI, M. L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1406–1413, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409012449>>. Acesso em: 11/7/2014.

KAERPINTONG, K.; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. **Bioresource technology**, v. 98, n. 2, p. 288–295, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516464>>. .

KAKIZONO, T.; KOBAYASHI, M.; NAGAI, S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 403–405, 1992.

KATSUDA, T.; LABABPOUR, A.; SHIMAHARA, K.; KATOH, S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 81–86, 2004.

KILHAM, S.; KREEGER, D.; GOULDEN, C.; LYNN, S. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**, v. 38, n. 3, p. 591–596, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2427.1997.00231.x>>. Acesso em: 9/4/2014.

KIM, M. K.; PARK, J. W.; PARK, C. S.; et al. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2220–2228, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406004767>>. Acesso em: 4/3/2013.

KIM, Z.-H.; KIM, S.-H.; LEE, H.-S.; LEE, C.-G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 414–419, 2006.

KIRK, J. T. O. **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**. Cambridge University Press, 1983.

KITAJIMA, K. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. **Oecologia**, v. 98, n. 3-4, p. 419–428, 1994. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00324232>>. Acesso em: 21/1/2015.

KNAUER, K.; BEHRA, R.; SIGG, L. Effects of free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 220–229, 1997.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 867–873, 1993. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/59/3/867>>. Acesso em: 13/2/2013.

KOBAYASHI, M.; KURIMURA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; TSUJI, Y. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 94–97, 1997.

KOBAYASHI, M.; SAKAMOTO, Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 4, p. 265–269, 1999. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers.

KRAUSE, G. H.; JAHNS, P. Light-harvesting antennas in photosynthesis. In: B. R. Green; W. W. Parson (Eds.); **Light-harvesting antennas in photosynthesis**, Advances in Photosynthesis and Respiration. v. 13, p.373–399, 2003. Dordrecht: Springer Netherlands. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-2087-8>>. Acesso em: 16/6/2014.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 313–349, 1991. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525?journalCode=arplant.2>>. Acesso em: 9/11/2013.

KRISTOFFERSEN, A. S.; SVENSEN, Ø.; SSEBIYONGA, N.; et al. Chlorophyll a and NADPH fluorescence lifetimes in the microalgae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under normal and astaxanthin-accumulating conditions. **Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 10, p. 1216–1225, 2012. Society for Applied Spectroscopy. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/sas/sas/2012/00000066/00000010/art00019?token=005211cf6405847447b496e6c2473446f5e3a63212333757e6f4f2858592f3f3b578d401a815ff89db>>. Acesso em: 28/10/2014.

KUMAR, K. S.; DAHMS, H.-U.; LEE, J.-S.; et al. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104C, p. 51–71, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651314000578>>. Acesso em: 17/3/2014.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 10, p. 929–934, 1998.

LABABPOUR, A.; HADA, K.; SHIMAHARA, K.; KATSUDA, T.; KATOH, S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 6, p. 452–456, 2004.

LADYGIN, V.; SHIRSHIKOVA, G. [The current concepts of functional role of carotenoids in the eukaryotic chloroplasts]. **Zhurnal Obshchei Biologii**, v. 67, n. 3, p. 163–189, 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/16862869>>. Acesso em: 6/1/2015.

LANG, N. J. Electron microscopic studies of extraplastidic astaxanthin in *Haematococcus*. **Journal of Phycology**, v. 4, n. 1, p. 12–19, 1968. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.1968.tb04670.x>>. Acesso em: 26/10/2014.

LEE, Y.-K.; DING, S.-Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 30, n. 3, p. 445–449, 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.1994.00445.x>>. Acesso em: 24/10/2014.

LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. **Photosynthesis Research**, v. 106, n. 1-2, p. 155–177, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20706789>>. Acesso em: 3/8/2012.

LEÓN, R.; MARTÍN, M.; VIGARA, J.; VILCHEZ, C.; VEGA, J. M. Microalgae mediated photoproduction of  $\beta$ -carotene in aqueous-organic two phase systems. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 177–182, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389034403000480>>. Acesso em: 28/10/2014.

LEYA, T.; RAHN, A.; LÜTZ, C.; REMIAS, D. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for

biotechnology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 3, p. 432–443, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19159422>>. Acesso em: 13/10/2014.

LI, J.; ZHU, D.; NIU, J.; SHEN, S.; WANG, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 568–374, 2011. Elsevier Inc.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 764–771, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17497732>>. Acesso em: 10/9/2014.

LI, Y.; SOMMERFELD, M.; CHEN, F.; HU, Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 253–263, 2010.

LIPS, S. H.; AVISSAR, Y. J. Photosynthesis and ultra structure in microalgae. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. p.45–67, 1990. Boca Raton, Florida: CRC Press.

LITCHMAN, E. Population and community responses of phytoplankton to fluctuating light. **Oecologia**, v. 117, n. 1-2, p. 247–257, 1998. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032434840&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 12/11/2014.

LIU, B.-H.; LEE, Y.-K. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 301–307, 2000. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1008185212724>>. Acesso em: 25/10/2014.

LIU, D.; WONG, P. T. S.; DUTKA, B. J. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. **Water Research**, v. 7, n. 5, p. 741–746, 1973.

LOMBARDI, A. T. **Influencia de fósforo e sílica na produção de lipídios por células de *Chaetoceros gracilis* cultivadas em cultura continua tipo cage turbidostato**, 1990. Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11120-011-9655-z>>. Acesso em: 23/10/2013.

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J. Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. **Hydrobiologia**, v. 306, n. 1, p. 1–6, 1995.

LOMBARDI, A.; WANGERSKY, P. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, 1991.

LÓPEZ, M. C. G.-M.; SÁNCHEZ, E. D. R.; LÓPEZ, J. L. C.; et al. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 3, p. 329–342, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165605007467>>. Acesso em: 4/12/2014.

LÓPEZ-ELÍAS, J. A.; VOLTOLINA, D.; ENRÍQUEZ-OCAÑA, F.; GALLEGOS-SIMENTAL, G. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery. **Aquacultural Engineering**, v. 33, n. 3, p. 181–191, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860905000051>>. Acesso em: 8/4/2015.

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

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 160–167, 2000b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779900014335>>. Acesso em: 5/11/2014.

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

MA, R. Y.-N.; CHEN, F. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 1175–1179, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959201001571>>. Acesso em: 25/10/2014.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; MICHAL KOBLÍŽEK. Handbook of Microalgal Culture. In: A. Richmond; Q. Hu (Eds.); **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**, 2013. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118567166>>. Acesso em: 12/11/2014.

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, n. 1, p. 217–232, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109001646>>. Acesso em: 21/5/2013.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/51/345/659.short>>. .

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1145–1150, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606002330>>. Acesso em: 5/11/2014.

MIAO, F.; LU, D.; LI, Y.; ZENG, M. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 352, n. 2, p. 176–81, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269706001710>>. Acesso em: 13/10/2014.

MIURA, Y.; KONDO, K.; SAITO, T.; et al. Production of the carotenoids lycopene,  $\beta$ -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1226–1229, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26/10/2014.

MOHAMMED, G. H.; BINDER, W. D.; GILLIES, S. L. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 10, n. 1-4, p. 383–410, 1995. Disponível em: <[http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02827589509382904#.VP6uMOH0\\_t8](http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02827589509382904#.VP6uMOH0_t8)>. Acesso em: 10/3/2015.

MUNIR, N.; SHARIF, N.; NAZ, S.; MANZOOR, F. Algae: A potent antioxidant source. **Sky Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 3, p. 22–31, 2013.

MUNIR, S. M.; ABDUL MANAN, Z.; WAN ALWI, S. R. Holistic carbon planning for industrial parks: a waste-to-resources process integration approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 33, p. 74–85, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652612002491>>. Acesso em: 8/10/2014.

NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; SUNDARARAJ, R.; RENGASAMY, R. Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. **Phykos - Official Journal of Phycological Society, India**, v. 42, n. 1, p. 59–71, 2012.

NAGUIB, Y. M. A. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 290–298, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269798929311>>. Acesso em: 7/4/2015.

NEDBAL, L.; SOUKUPOVÁ, J.; KAFTAN, D.; WHITMARSH, J.; TRTÍLEK, M. Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. **Photosynthesis Research**, v. 66, n. 1-2, p. 3–12, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1010729821876>>. Acesso em: 29/4/2014.

NGUYEN, K. D. Astaxanthin: a comparative case of synthetic VS. natural production. **Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works**, 2013.

NI, H.; HE, G.; RUAN, H.; CHEN, Q.; CHEN, F. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of  $\beta$ -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 6, n. 6, p. 514–522, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1389882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4/11/2014.

ÖGREN, E.; BAKER, N. R. Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. **Plant, Cell & Environment**, v. 8, n. 7, p. 539–547, 1985. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1985.tb01691.x>>. Acesso em: 20/1/2015.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 499–506, 2000.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459–466, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034403000765>>. Acesso em: 10/10/2014.

ONCEL, S. S.; IMAMOGLU, E.; GUNERKEN, E.; SUKAN, F. V. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 414–420, 2011.

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

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 553–556, 2000. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008173807143>>. Acesso em: 23/10/2014.

PAASCHE, E. Marine plankton algae grown with light-dark cycles. I. *Coccolithus huxleyi*. **Physiologia Plantarum**, v. 20, n. 4, p. 946–956, 1967. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1967.tb08382.x>>. Acesso em: 12/11/2014.

PARKHILL, J.; MAILLET, G.; CULLEN, J. J. Fluorescence based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 4, p. 517–529, 2001.

PARRISH, C. C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: M. T. Arts; B. C. Wainman (Eds.); **Lipids in Freshwater Ecosystems**. p.4–20, 1999. Springe New York.

PARRISH, C. C.; WANGERSKY, P. J. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 35, n. 11, p. 119–128, 1987.

PARSONS, T. R.; TAKAHASHI, M.; HARGRAVE, B. **Biological Oceanographic Processes**. 3 rd ed. New York: Pergamon Press (Oxford), 1984.

PELED, E.; PICK, U.; ZARKA, A.; et al. Light-induced oil globule migration in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1209–1219, 2012.

PÉREZ-LÓPEZ, P.; GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; JEFFRYES, C.; et al. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. **Journal of Cleaner Production**, v. 64, p. 332–344, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652613004721>>. Acesso em: 21/1/2014.

PETERSON, D. H.; PERRY, M. J.; BENCALA, K. E.; TALBOT, M. C. Phytoplankton productivity in relation to light intensity: A simple equation. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 24, n. 6, p. 813–832, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0272771487901545>>. Acesso em: 12/11/2014.

PROCTOR, V. Preferential assimilation of nitrate ion by *Haematococcus pluvialis*. **American Journal of Botany**, v. 44, n. 2, p. 141–143, 1957. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/2438304>>. Acesso em: 21/1/2014.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

QIN, S.; LIU, G.-X.; HU, Z.-Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 795–802, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308001074>>. Acesso em: 24/9/2014.

QIU, B.; LI, Y. Photosynthetic acclimation and photoprotective mechanism of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) during the accumulation of secondary carotenoids at elevated irradiation. **Phycologia**, v. 45, n. 2, p. 117–126, 2006.

RALPH, P. J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v. 82, n. 3, p. 222–237, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304377005000586>>. Acesso em: 12/11/2013.

RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. **Hydrobiologia**, v. 78, n. 3, p. 237–251, 1981.

RAVEN, J. A. A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. **New Phytologist**, v. 98, n. 4, p. 593–625, 1984. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.1984.tb04152.x>>. Acesso em: 12/11/2014.

RAVEN, J. A. Limits to growth. In: M. A. BOROWITZKA; L. J. BOROWITZKA (Eds.); **Microalgal biotechnology**. p.331–356, 1988. Cambridge: Cambridge University.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1495–1503, 2012.

REMIAS, D.; KARSTEN, U.; LÜTZ, C.; LEYA, T. Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. **Protoplasma**, v. 243, n. 1-4, p. 73–86, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20229328>>. Acesso em: 25/10/2014.

REMIAS, D.; LÜTZ-MEINDL, U.; LÜTZ, C. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. **European Journal of Phycology**, v. 40, n. 3, p. 259–268, 2005. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09670260500202148>>. Acesso em: 23/10/2014.

RENAUD, S. M.; THINH, L.-V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, n. 1-4, p. 195–214, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848601008754>>. Acesso em: 8/4/2015.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. China: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

RÍO, E. DEL; ACIÉN, F. G.; GARCÍA-MALEA, M. C.; et al. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 91, n. 7, p. 808–15, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937954>>. Acesso em: 15/5/2014.

RÍO, E. DEL; ACIÉN, F. G.; GUERRERO, M. G. Photoautotrophic production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. In: O. V. Singh; S. P. Harvey (Eds.); **Sustainable Biotechnology**. p.247–258, 2010. Dordrecht: Springer Netherlands. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3295-9>>. Acesso em: 21/10/2014.

RISE, M.; COHEN, E.; VISHKAUTSAN, M.; et al. Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 287–292, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161711811892>>. Acesso em: 25/10/2014.

RIVKIN, R. B. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton I. Photosynthesis, chemical composition and growth. **Marine Ecology Progress**

**Series**, v. 55, p. 291–304, 1989. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/meps/55/m055p291.pdf>>.

ROCHA, G. S.; PINTO, F. H. V.; MELÃO, M. DA G. G.; LOMBARDI, A. T. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? **Journal of Applied Phycology**, v. Abril, 2014.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v. 40, n. 1, p. 13–29, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020125719386>>. Acesso em: 7/9/2013.

ROHÁČEK, K.; BARTÁK, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. **Photosynthetica**, v. 37, n. 3, p. 339–363, 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1007172424619>>. Acesso em: 20/4/2013.

ROUND, F. E. **Biologia das algas**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Dois S. A., 1983.

ROUSCH, J. M.; BINGHAM, S. E.; SOMMERFELD, M. R. Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 295, n. 2, p. 145–156, 2003.

SAHA, S. K.; MCHUGH, E.; HAYES, J.; et al. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 128C, p. 118–124, 2013. Elsevier Ltd.

SAID RABBANI; BEYER, P.; LINTIG, J. V.; HUGUENEY, P.; KLEINIG, H. Induced  $\beta$ -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1239–1248, 1998. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/116/4/1239.short>>. Acesso em: 5/11/2014.

SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; ACIÉN, F. G.; et al. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398–405, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308000238>>. Acesso em: 31/10/2014.

SANTOS, M. F.; MESQUITA, J. F. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales). I. Some aspects of carotenogenesis. **Cytologia**, v. 49, n. 1, p. 215–228, 1984. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cytologia1929/49.215?from=CrossRef>>. Acesso em: 26/10/2014.

SARADA, R.; BHATTACHARYA, S.; RAVISHANKAR, G. A. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 517–521, 2002.

SCHMIDT, I.; SCHEWE, H.; GASSEL, S.; et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma* / *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 555–571, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046372>>. Acesso em: 12/10/2014.

SCHOEFS, B.; RMIKI, N.-E.; RACHADI, J.; LEMOINE, Y. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. **FEBS Letters**, v. 500, n. 3, p. 125–128, 2001.

SCHREIBER, U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis research**, v. 9, n. 1-2, p. 261–72, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442302>>. Acesso em: 20/1/2015.

SCHREIBER, U.; BILGER, W. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. (H.-D. Behnke, U. Lüttge, K. Esser, J. W. Kadereit, & M. Runge, Eds.) **Progress in Botany / Fortschritte der Botanik**, v. 54, p. 151–173, 1993. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-78020-2\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-78020-2_8)>. Acesso em: 31/10/2013.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 10, n. 1-2, p. 51–62, 1986. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00024185>>. Acesso em: 31/10/2013.

SHAHID, M.; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 310–331, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652613001698>>. Acesso em: 11/7/2014.

SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v. 5, n. 12, p. 1532–1553, 2012. Molecular Diversity Preservation International. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1996-1073/5/5/1532>>. Acesso em: 15/8/2014.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. NREL/ TP-580-24190**. Washington, D.C. (United States): Golden: National Renewable Energy Laboratory, 1998.

SOLOVCHENKO, A. E.; MERZLYAK, M. N. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, n. 6, p. 719–737, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1021443708060010>>. Acesso em: 15/12/2014.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705497>>. Acesso em: 14/7/2012.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009829970300030X>>. Acesso em: 9/11/2014.

STEPHENSON, A. L.; KAZAMIA, E.; DENNIS, J. S.; et al. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 7, p. 4062–4077, 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef1003123>>. Acesso em: 10/7/2014.

SUH, I. S.; JOO, H.-N.; LEE, C.-G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. **Journal of biotechnology**, v. 125, n. 4, p. 540–546, 2006.

SUN, N.; WANG, Y.; LI, Y.-T.; HUANG, J.-C.; CHEN, F. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1288–1292, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308002419>>. Acesso em: 25/10/2014.

SUNDA, W.; KIEBER, D. J.; KIENE, R. P.; HUNTSMAN, S. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. **Nature**, v. 418, n. 6895, p. 317–20, 2002. Macmillan Magazines Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature00851>>. Acesso em: 27/11/2014.

TAN, S.; CUNNINGHAM, F. X.; YOUMANS, M.; et al. Cytochrome f loss in astaxanthin-accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes, and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells. **Journal of Phycology**, v. 31, n. 6, p. 897–905, 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.1995.00897.x>>. Acesso em: 28/10/2014.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 104, n. 1-2, p. 119–189, 1993. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05866.x>>. Acesso em: 31/10/2014.

TARDY, F.; HAVAUX, M. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 34, n. 1, p. 87–94, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101134495072721>>. Acesso em: 5/11/2014.

TORZILLO, G.; GOKSAN, T.; FARALONI, C.; KOPECKY, J.; MASOJÍDEK, J. Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of

*Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2, p. 127–136, 2003.

TORZILLO, G.; GÖKSAN, T.; ISIK, O.; GÖKPINAR, Ş. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **European Journal of Phycology**, v. 40, n. 2, p. 233–240, 2005.

TRAN, D.; HAVEN, J.; QIU, W.-G.; POLLE, J. E. W. An update on carotenoid biosynthesis in algae: phylogenetic evidence for the existence of two classes of phytoene synthase. **Planta**, v. 229, n. 3, p. 723–729, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066941>>. Acesso em: 9/1/2015.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: A. Richmond (Ed.); **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. p.178–214, 2004. Blackwell Publishing Ltd.

TRIKI, A.; MAILLARD, P.; GUDIN, C. Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). **Phycologia**, v. 36, n. 3, p. 190–194, 1997.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 197–199, 1999.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Effect of culture conditions on growth of green alga - *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24, n. 3, p. 323–329, 2002.

TRISSEL, H.; LAVERGNE, J. Fluorescence induction from photosystem II: analytical equations for the yields of photochemistry and fluorescence derived from analysis of a model including exciton-radical pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 183, 1995. CSIRO PUBLISHING. Disponível em: <[http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp\\_journal\\_fulltext.cfm?nid=102&f=PP9950183](http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=102&f=PP9950183)>. Acesso em: 16/6/2014.

TZOVENIS, I.; PAUW, N. DE; SORGELOOS, P. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 223–242, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848602003757>>. Acesso em: 12/11/2014.

UENOJO, M.; MAROSTICA, M.; PASTORE, G. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/21.pdf>>. Acesso em: 5/11/2014.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379512>>. Acesso em: 11/7/2014.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009.

VALLADARES, F.; CHICO, J. M.; ARANDA, I.; et al. The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. **Trees-Structure and Function**, v. 16, n. 6, p. 395–403, 2002. Springer-Verlag. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00468-002-0184-4>>. Acesso em: 24/2/2015.

VECKTEL, B.; KALLMANN, U.; RUPPEL, H. G. Secondary carotenoids of *Eremosphaera viridis* De Bary (Chlorophyceae) under nitrogen deficiency\*. **Botanica Acta**, v. 105, n. 3, p. 219–222, 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00290.x>>. Acesso em: 23/10/2014.

VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Environmental Stress Physiology. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. p.57–99, 2004.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483734>>. Acesso em: 20/7/2014.

WANG, B.; ZARKA, A.; TREBST, A.; BOUSSIBA, S. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 6, p. 1116–1124, 2003.

WANG, B.; ZHANG, Z.; HU, Q.; et al. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106679, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0106679>>.

WANG, H.-C.; CHO, M.-G.; RIZNICHENKO, G.; RUBIN, A. B.; LEE, J.-H. Investigation of the maximum quantum yield of PS II in *Haematococcus pluvialis* cell cultures during growth: effects of chemical or high-intensity light treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**, v. 104, n. 3, p. 394–398, 2011. Elsevier B.V.

WANG, J.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Occurrence and environmental stress responses of two plastid terminal oxidases in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Planta**, v. 230, n. 1, p. 191–203, 2009.

WAYAMA, M.; OTA, S.; MATSUURA, H.; et al. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. (M. Sun, Ed.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53618, 2013.

WILDE, E. W.; BENEMANN, J. R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 4, p. 781–812, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0734975093900036>>. Acesso em: 23/11/2014.

WITHERS, N. W.; NEVENZEL, J. C. Phytol esters in a marine dinoflagellate. **Lipids**, v. 12, n. 12, p. 989–993, 1977.

YAMANE, Y. I.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4471–4478, 1997.

YOKOYAMA, A.; MIKI, W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 2, p. 139–144, 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07513.x>>. Acesso em: 25/10/2014.

YOSHIHIRO, Y.; KASHINO, Y.; KOIKE, H.; SATOH, K. Increases in the fluorescence Fo level and reversible inhibition of photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. **Photosynthesis Research**, v. 52, n. 1, p. 57–64, 1997. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005884717655>>. Acesso em: 25/3/2014.

YUAN, J.-P.; CHEN, F.; LIU, X.; LI, X.-Z. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 319–325, 2002. Netherlands. Disponível em: <<http://hub.hku.hk/handle/10722/68723>>. Acesso em: 26/10/2014.

ZAK, E.; NORLING, B.; MAITRA, R.; et al. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13443–13448, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=60890&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/10/2014.

ZEILER, K. G.; HEACOX, D. A.; TOON, S. T.; KADAM, K. L.; BROWN, L. M. The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 707–712, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/019689049500103K>>. Acesso em: 26/11/2014.

ZHANG, B. Y.; GENG, Y. H.; LI, Z. K.; HU, H. J.; LI, Y. G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, n. 3-4, p. 275–281, 2009. Elsevier B.V.

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