

# Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional

Moira Nunes<sup>(1)</sup>, Armando Augusto Henriques Vieira<sup>(2)</sup>, Ernani Pinto<sup>(3)</sup>,  
Ronaldo Leal Carneiro<sup>(3)</sup> e Antonio Carlos Monteiro<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Produção Vegetal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: moirazoo@hotmail.com, montecar@fcav.unesp.br <sup>(2)</sup>Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Botânica, Rodovia Washington Luís, Km 235, Caixa Postal 676, CEP 13565-905 São Carlos, SP. E-mail: ahvieira@ufscar.br <sup>(3)</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 17, Cidade Universitária, CEP 05508-900 São Paulo, SP. E-mail: ernani@usp.br, carneiro.rleal@gmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas das células de *Haematococcus pluvialis* ao processo de indução à carotenogênese, sob estresse luminoso e nutricional. As células foram aclimatadas durante 15 dias em meio WC, com aeração com ar atmosférico sintético filtrado e fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup>, intensidade luminosa de 50 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 23°C. Foram comparados dois tratamentos: cultivo nas condições descritas, mas com aumento da intensidade luminosa para 350 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; e cultivo nas mesmas condições do tratamento anterior, mas com aeração contendo 4% de CO<sub>2</sub>. Os tratamentos foram conduzidos em triplicata, durante dez dias. Com a adição de CO<sub>2</sub> e o incremento da iluminação, observou-se aumento da razão carotenoides/clorofila e da biomassa celular. As células cessaram a divisão no segundo dia de estresse, quando o nitrato se tornou limitante, e aumentaram significativamente seu biovolume. A excreção de carbono orgânico e a concentração de astaxantina aumentam em resposta à adição de CO<sub>2</sub>. O estresse por intensidade luminosa, aliado à adição de CO<sub>2</sub>, otimiza a carotenogênese em *H. pluvialis* e aumenta a produção de astaxantina.

Termos para indexação: astaxantina, carbono orgânico dissolvido, carotenoide, intensidade luminosa, microalga.

## Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* cells induced by light and nutrient stresses

Abstract – The objective of this work was to evaluate the responses of *Haematococcus pluvialis* cells to the carotenogenesis induction process, under light and nutrition stress. Cells were acclimated during 15 days in WC medium, with aeration with synthetic, filtered atmospheric air and flow rate of 100 mL min<sup>-1</sup>, light intensity of 50 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, photoperiod of 12 hours, and temperature of 23°C. The following two treatments were compared: cultivation under the described conditions, but with increase of light intensity up to 350 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; and cultivation under the same conditions as the previous treatment, but with aeration containing 4% CO<sub>2</sub>. The treatments were done in triplicate, during ten days. With the addition of CO<sub>2</sub> and the increment in lighting, an increase was observed in the carotenoids/chlorophyll ratio and cell biomass. Cells stopped dividing on the second day of stress, when nitrate became limiting, and significantly increased their biovolume. The excretion of organic carbon and the concentration of astaxanthin increase in response to the addition of CO<sub>2</sub>. Stress by light intensity combined with CO<sub>2</sub> addition optimizes carotenogenesis in *H. pluvialis* and increases astaxanthin production.

Index terms: astaxanthin, dissolved organic carbon, carotenoid, light intensity, microalga.

### Introdução

A microalga *Haematococcus pluvialis*, reconhecida como um dos microrganismos que mais produzem astaxantina, tem despertado o interesse acadêmico e industrial há décadas (Becker, 2004). A astaxantina (3,3'-dihidroxy-β,β-carotene-4,4'-dione) é um pigmento vermelho amplamente utilizado na alimentação de peixes, como salmão e truta, e de aves

e suínos (Cardozo et al., 2007), e é considerada agente promotor de melhorias significativas no desempenho animal.

Amar et al. (2004) relataram incremento de parâmetros do sistema imunológico da truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), enquanto Cuzon et al. (2004) demonstraram que o fornecimento de astaxantina na alimentação de reprodutores do camarão (*Litopennaeus*

*vannamei*) proporcionou maior sobrevivência de náuplios.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos para aumentar o rendimento da produção de astaxantina durante o cultivo de *H. pluvialis* (Sarada et al., 2002; Cifuentes et al., 2003; Domínguez-Bocanegra et al., 2004; Imamoglu et al., 2009). Grande parte dos resultados mostra que a adição de mais de um fator estressante à célula, até devida proporção, aumenta a produtividade final deste carotenoide na biomassa (Fabregas et al., 2003; Saha et al., 2013).

Entre as formas mais funcionais de estresse celular, destacam-se: a privação de nutrientes específicos, como nitrogênio ou fósforo (Fabregas et al., 2003; Imamoglu et al. 2009); a adição de NaCl (Kobayashi et al., 1997); o estresse oxidativo, promovido por meio da adição de ferro (Kobayashi et al., 1993); o aumento da relação C/N disponível para a célula (Kang et al., 2007); e o aumento da intensidade luminosa (Wang et al., 2003; Torzillo et al., 2005).

Um ótimo desempenho no processo de carotenogênese está invariavelmente relacionado ao aumento substancial da intensidade luminosa. Esta relação positiva entre o incremento da iluminação e o desempenho da carotenogênese foi observada em células submetidas a um aumento de quatro (Kang et al., 2007) e de seis a sete vezes o valor inicial da intensidade luminosa (Imamoglu et al., 2009).

Fatores indutores do aumento da síntese de astaxantina pela célula de *H. pluvialis* podem ser acompanhados por meio das alterações de parâmetros fisiológicos e abióticos, como aumento do tamanho e da biomassa celular (Cifuentes et al., 2003), da razão carotenoides/clorofila a (Car/Chl a) intracelular (Kobayashi et al., 1993, 1997; Orosa et al., 2005), ou, ainda, da razão C/N disponível para a célula (Kobayashi et al., 1997; Kang et al., 2007).

Göksan et al. (2010), ao adicionar acetato de sódio no meio de cultura de células de *H. pluvialis* no final da fase exponencial, obtiveram células encistadas (aplanósporos vermelhos) com maior peso seco e maior concentração de pigmentos, o que mostra que a adição de uma fonte de carbono é benéfica nessa etapa de indução à carotenogênese. Resultados semelhantes foram obtidos por Kobayashi et al. (1993), que adicionaram acetato de sódio em culturas na fase exponencial de crescimento.

O carbono orgânico excretado pelas células do fitoplâncton desempenha papel fundamental no equilíbrio do ecossistema aquático e contribui com grande parte do carbono orgânico dissolvido neste ambiente. Muitos destes compostos apresentam propriedades de interesse industrial químico e farmacêutico (Dubinsky & Berman-Frank, 2001; Cardozo et al., 2007). Além disso, por serem metabólitos primários, apresentam estreita relação com o processo de fotossíntese e podem ser liberados de forma passiva (difusão de compostos como carboidratos, polissacarídeos, polipeptídeos, aminoácidos livres e ácidos orgânicos) ou ativa (secretados como enzimas extracelulares e sideróforos) (Sigeo, 2005). A excreção de carbono orgânico dissolvido pelas células também indica estresse celular, visto que o aporte nutricional do meio afeta diretamente a quantidade e a composição do exsudato (Sigeo, 2005).

Entretanto, estudos relacionados à excreção de carbono orgânico pelas células de *H. pluvialis* são raros, e o mecanismo de excreção da microalga estudada é pouco conhecido. Também são escassas as informações sobre a relação da concentração de astaxantina e esta excreção.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas das células de *H. pluvialis* ao processo de indução à carotenogênese, sob estresse luminoso e nutricional.

## Material e Métodos

O experimento com a cepa axênica de *H. pluvialis* (Cmea 227 C1), proveniente da coleção da Universidade Federal Fluminense, RJ, foi conduzido no Laboratório de Ficologia, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de São Carlos, no período de março a abril de 2011.

A microalga foi cultivada em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972), com pH 7,0 e a seguinte composição final: NaNO<sub>3</sub> (1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2,5x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,5x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (1,5x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5,0x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O (1,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>), tampão Tris (0,5 g L<sup>-1</sup>); solução de micronutrientes – CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (4,01x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub> (7,65x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (4,20x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (9,10x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (2,48x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>) e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,62x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>); solução de ferro e EDTA (1,17x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e 1,17x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>

de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O); e solução de vitaminas (mg L<sup>-1</sup> de água destilada) – 0,1 de tiamina/HCl; 0,0005 de biotina e 0,0005 de vitamina B<sub>12</sub>.

Durante 15 dias, tempo necessário para a cultura atingir a fase exponencial, as células foram aclimatadas em frascos com capacidade de 1 L, que receberam 10.000 células mL<sup>-1</sup> de *H. pluvialis*. As condições experimentais foram determinadas em ensaios prévios: 900 mL de meio WC, com aeração com ar atmosférico sintético filtrado, com fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup>. As culturas foram mantidas em intensidade luminosa de 50 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Kang et al., 2005, 2007), fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 23°C. O período experimental foi realizado com o intuito de aclimatar e multiplicar as células nas condições ideais de crescimento até atingirem a fase exponencial, para realização do experimento de resposta ao estresse luminoso e nutricional.

No décimo sexto dia, a concentração foi de 5,25x10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>, e os cultivos foram distribuídos em frascos contendo 500 mL de cultura, que consistiram nos dois tratamentos comparados. No primeiro, a intensidade luminosa foi alterada para 350 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, tendo-se mantido os mesmos fotoperíodo, aeração e temperatura. No segundo, além do aumento da iluminação na mesma proporção, a aeração nos cultivos foi substituída por mistura gasosa (semelhante ao ar atmosférico) contendo 4% de CO<sub>2</sub>, tendo-se mantido o fluxo de aeração (100 mL min<sup>-1</sup>), o fotoperíodo e a temperatura. Essas condições de estresse foram mantidas durante dez dias. Nessa etapa, apenas o fator nutricional foi a variante analisada durante a avaliação das respostas ao estresse.

A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, e a taxa de crescimento específica (μ) foi determinada de acordo com a seguinte equação:  $\mu = (3,322 / (T2 - T1) \times (\text{Log } N2 / N1))$ , em que μ é a velocidade de crescimento; 3,322 é o fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10; (T2 - T1) é o intervalo de tempo em dias; N1 é a densidade celular inicial; N2 é a densidade celular final; e Log é o logaritmo em base 10. A velocidade ou a taxa de crescimento específica de cada unidade experimental foi obtida tendo-se considerado o dia de cultivo no qual a população alcançou a máxima densidade celular.

A biomassa seca foi determinada por meio da filtração de alíquotas de 10 mL em filtros de fibra de vidro (1,2 μm), previamente secos em mufla e

calibrados. O cálculo da biomassa seca (células mL<sup>-1</sup>; μg por célula) foi realizado após a secagem dos filtros em estufa, a 60°C, durante 3 horas.

Para a determinação da quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) e nitrato dissolvido nos cultivos, 5 mL de amostra foram filtrados em filtros de acetato estéreis, com malha de 0,22 μm, durante todo o período experimental (Sigleo, 1996). O COD foi mensurado em analisador de carbono orgânico total TOC-V CPH, (Shimadzu do Brasil, São Paulo, SP), e o nitrato foi determinado por meio da reação colorimétrica, segundo Mackereth et al. (1978).

Para a quantificação de clorofila a e carotenoides totais, amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro (1,2 μm) e maceradas em acetona a 90%, na fase de aclimação. Durante a etapa em que as células foram submetidas a fatores estressantes, a extração dos pigmentos foi realizada com solução 50% (v/v) de dimetil sulfoxido (DMSO) e acetona a 90%. As amostras permaneceram no escuro, por 24 horas, refrigeradas a 4°C. A leitura foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 480, 665 e 750 nm (Strickland & Parsons, 1968).

A quantidade celular dos carotenoides totais e da clorofila a foi calculada com a fórmula descrita por Strickland & Parsons (1968). A maturação celular foi acompanhada por meio da razão intracelular Car/Chl a (Kobayashi et al., 1993, 1997), a qual distingue células vegetativas (verdes), cistos imaturos (marrons) e cistos maduros (vermelhos).

Ao final do cultivo (vigésimo quinto dia), as culturas foram centrifugadas a 3.500 g, a 10°C, por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e as células concentradas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

A extração dos pigmentos foi realizada com DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, EUA), aquecido a 50°C, e as amostras foram homogeneizadas em vórtex, a cada 10 min, durante a incubação (Lorenz, 2001).

A concentração de astaxantina foi determinada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em aparelho equipado com bombas LC-10ATVP (Shimadzu do Brasil, São Paulo, SP) e detector UV-VIS SCL-10AVP (Shimadzu do Brasil, São Paulo, SP). Os extratos foram separados, tendo-se utilizado coluna analítica Luna C18, 100A (250x4,6 mm, 5 μm), com fluxo de injeção de 1 mL min<sup>-1</sup>. Os pigmentos

foram separados em condições de gradiente com uso de solução A (acetato de amônia: metanol, 20:80, v/v) e B (acetona: metanol, 20:80, v/v), e a corrida seguiu com o gradiente: 0 min 40% A, 60% B; 10 min 20% A, 80% B; 20 min 20% A, 80% B; 22 min 0% A, 100% B; 32 min 0% A, 100% B; 40 min 40% A, 60% B; e 55 min 40% A, 60% B.

A coluna foi calibrada com padrão de astaxantina livre, 98% de pureza (A9335, Sigma-Aldrich Co., LLC., St. Louis, MO, EUA). Picos correspondentes ao espectro de absorção da astaxantina livre foram mensurados em  $478 \pm 4$  nm (Britton, 1995) e considerados como astaxantina não hidrolisada. Os valores da quantificação de astaxantina por HPLC são apresentados como o total de equivalentes de astaxantina por grama de massa seca celular.

Na fase de aclimação, realizada entre o primeiro e o décimo quinto dia, o cultivo foi conduzido com seis repetições, as quais foram divididas em dois tratamentos, na fase seguinte. Assim, na fase de aplicação dos fatores de estresse, realizada entre o décimo sexto e o vigésimo quinto dia, os tratamentos – exposição a  $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e exposição a  $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  combinada com 4% de  $\text{CO}_2$  – foram realizados com três repetições cada um. Todas as análises laboratoriais foram realizadas em triplicata.

Os resultados obtidos foram avaliados quanto a sua homogeneidade, e as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SAS 8.0. (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Realizou-se a análise de variância, e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

A aclimação da cultura de *H. phuvialis* foi realizada com intuito de manter as condições ideais para o crescimento vegetativo, e para que as respostas fisiológicas e metabólicas das células mostrassem maior eficiência quando expostas aos fatores estressantes. No início do cultivo (primeiros 15 dias), a máxima densidade celular obtida foi de  $4,45 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  e a taxa de crescimento específica (mensurada no décimo quinto dia de cultivo) foi de  $\mu = 0,24$ .

As baixas concentração celular e taxa específica de crescimento, obtidas em cultivos dessa espécie de microalga, também foram relatadas em diversos estudos realizados nas mais variadas condições

experimentais (Dom\u00ednguez-Bocanegra et al., 2004; Orosa et al., 2005). Na fase de aclimação, Kang et al. (2005) obtiveram valores m\u00e1ximos de  $\mu = 0,23$  por dia, em experimentos realizados com o mesmo fotoper\u00edodo e a mesma ilumina\u00e7\u00e3o que os aplicados no presente trabalho. Ao cultivarem c\u00e9lulas vegetativas de *H. phuvialis* em meios alternativos contendo acetato de s\u00f3dio, com fotoper\u00edodo semelhante e ilumina\u00e7\u00e3o de  $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Kobayashi et al. (1993) encontraram valores excepcionais de concentra\u00e7\u00e3o celular, pr\u00f3ximos a  $55 \times 10^4$  c\u00e9lulas  $\text{mL}^{-1}$ . Contudo, essa fonte de carbono propicia ambiente favor\u00e1vel \u00e0 contamina\u00e7\u00e3o bacteriana, e, por esse motivo, o cultivo mixotr\u00f3fico ainda \u00e9 bastante questionado por diversos autores (Kobayashi et al., 1993, 1997). Al\u00e9m disso, a aplica\u00e7\u00e3o de  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono \u00e9 mais barata em raz\u00e3o da sua disponibilidade, por exemplo, a partir da fermenta\u00e7\u00e3o nas usinas produtoras de etanol.

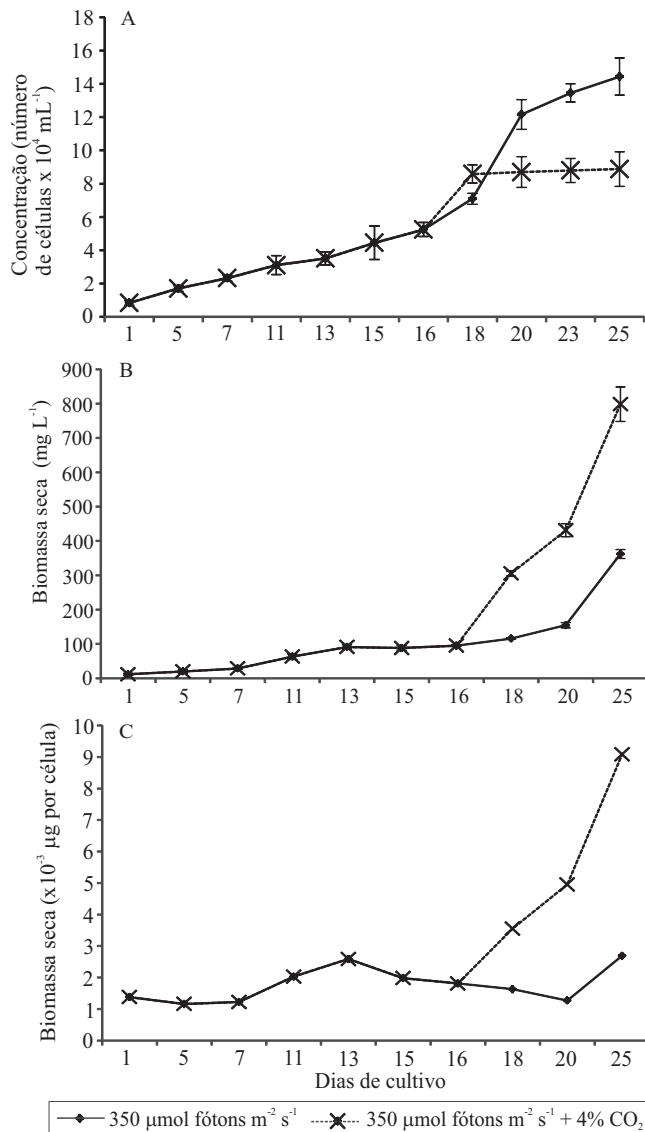
Na etapa de aclima\u00e7\u00e3o das culturas, a densidade celular e o aumento da biomassa da alga apresentaram desempenho semelhante (Figura 1), e a raz\u00e3o Car/Chl a sofreu pouca modifica\u00e7\u00e3o, tendo-se mantido pr\u00f3xima a 0,3 durante todo o per\u00edodo de crescimento e aclima\u00e7\u00e3o (Figura 2 A). Houve pequena varia\u00e7\u00e3o na quantidade de carbono excretado pelas c\u00e9lulas (Figura 2 C), decorrente do metabolismo reprodutivo e do aumento da quantidade de c\u00e9lulas.

No d\u00e9cimo sexto dia de cultivo, as c\u00e9lulas de *H. phuvialis* expostas \u00e0s condi\u00e7\u00f5es estressantes apresentaram respostas distintas. Quando as culturas foram expostas apenas \u00e0 maior ilumina\u00e7\u00e3o, as c\u00e9lulas continuaram o crescimento vegetativo e houve aumento gradual na concentra\u00e7\u00e3o celular, que atingiu m\u00e1xima densidade ( $14,44 \times 10^4$  c\u00e9lulas  $\text{mL}^{-1}$ ) no \u00faltimo dia de cultivo (Figura 1 A). No tratamento com aumento da intensidade luminosa e adi\u00e7\u00e3o de 4% de  $\text{CO}_2$  na aera\u00e7\u00e3o, a concentra\u00e7\u00e3o celular final atingida foi de  $8,88 \times 10^4$  c\u00e9lulas  $\text{mL}^{-1}$ . Com a adi\u00e7\u00e3o de  $\text{CO}_2$  nos cultivos, houve pequeno incremento na concentra\u00e7\u00e3o celular; por\u00e9m, a reprodu\u00e7\u00e3o foi interrompida no segundo dia de estresse (d\u00e9cimo oitavo dia de cultivo), quando a quantidade de nitrato tornou-se fator limitante (Figura 2 B). Esses fatores estressantes induziram a uma mudan\u00e7a morfol\u00f3gica nas c\u00e9lulas, que perderam seus flagelos e come\u00e7aram a se encistar e a adquirir colora\u00e7\u00e3o avermelhada. O volume e o tamanho celular tamb\u00e9m come\u00e7aram a aumentar significativamente, o que foi traduzido em acr\u00e9scimo da produtividade final

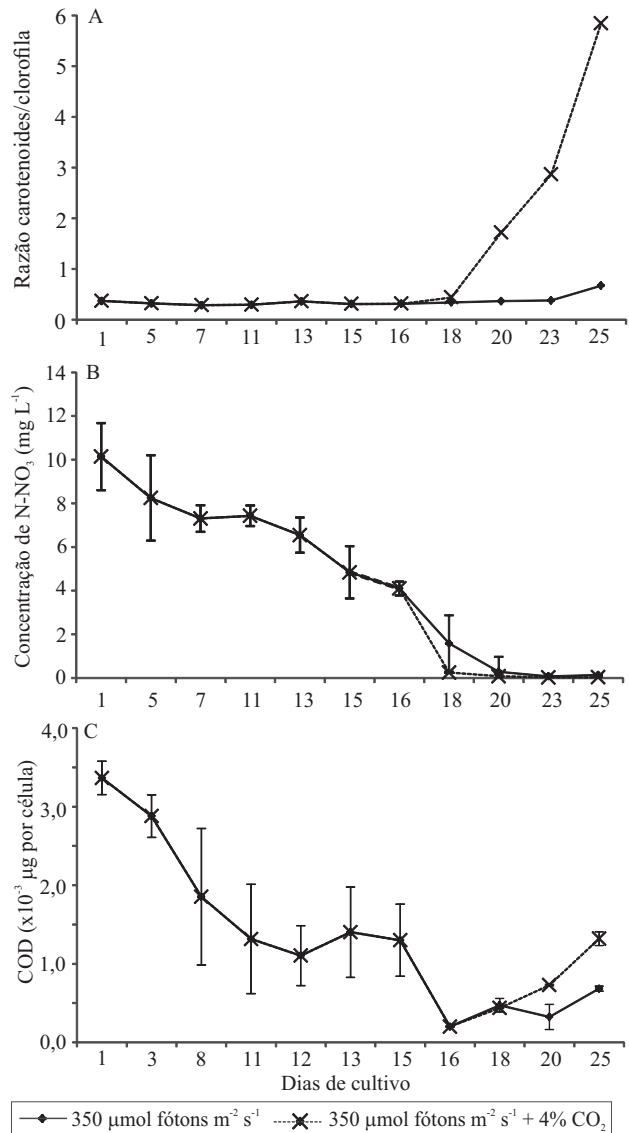
de biomassa, que chegou a  $798,3 \text{ mg L}^{-1}$  no vigésimo quinto dia de exposição aos fatores de estresse (Figuras 1 C e B).

O início do processo de carotenogênese induzido nas células por meio da adição de 4% de  $\text{CO}_2$  na

aeração, aliado ao aumento da intensidade luminosa, foi evidenciado no segundo dia de estresse (décimo oitavo dia de cultivo), quando houve esgotamento da fonte de nitrogênio, cessamento da divisão celular e aumento gradativo da massa seca celular.



**Figura 1.** Valores médios de concentração celular (A), biomassa (B) e massa seca celular (C) obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis*. Do primeiro ao décimo quinto dia, os dados se referem ao período de aclimação; do décimo sexto ao vigésimo quinto dia, os cultivos foram expostos aos fatores de estresse:  $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e a  $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  combinados com 4% de  $\text{CO}_2$ . As m\u00e9dias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras indicam desvio padr\u00e3o.



**Figura 2.** Valores m\u00e9dios da raz\u00e3o carotenoides/clorofila (A), concentra\u00e7\u00e3o de nitrato no meio ( $\text{N-NO}_3$ ) (B) e carbono org\u00e2nico dissolvido (COD) (C) obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis*. Do primeiro ao décimo quinto dia, os dados se referem ao per\u00edodo de aclima\u00e7\u00e3o; do décimo sexto ao vig\u00e9simo quinto dia, os cultivos foram expostos aos fatores de estresse:  $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e a  $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  combinados com 4% de  $\text{CO}_2$ . As m\u00e9dias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras indicam desvio-padr\u00e3o.

A razão Car/Chl a começou a diferir entre os tratamentos a partir do segundo dia de estresse (Figura 2 A). Condicionada pelo aumento da relação C/N no meio de cultivo, a partir do décimo oitavo dia, pôde-se observar que a razão Car/Chl a aumentou rapidamente e coincidiu com a depleção do nitrato no meio. O valor da razão observado nestas culturas, no último dia de cultivo, foi de 5,83. No tratamento com alteração apenas da quantidade de luz, a razão Car/Chl a começou a aumentar a partir do oitavo dia de estresse, tendo como razão final o valor de 0,67.

Esse comportamento também foi relatado por Orosa et al. (2005), que demonstraram que as células apresentaram rápido aumento da razão Car/Chl a no momento em que houve deficiência de nitrato no meio de cultivo. Adicionalmente, Kobayashi et al. (1997) e Jeon et al. (2006) comprovaram que a manipulação da relação C/N, para produção de astaxantina, somente é eficaz na presença de luz. Portanto, um aumento substancial da intensidade luminosa é primordial (Li et al., 2010).

Do mesmo modo, o consumo da fonte de nitrogênio foi diferenciado entre os cultivos. Quando adicionado 4% de CO<sub>2</sub> na aeração, houve rápido consumo do nitrato no meio. Os resultados são indicativos de deficiência desse nutriente logo no segundo dia de estresse e de total depleção no quarto dia (Figura 2 B). No tratamento com exposição apenas ao aumento de iluminação, essa condição de depleção de nitrato foi observada somente no oitavo dia de estresse. Ao final do experimento, houve diferença significativa na quantidade de nitrato presente nos diferentes tratamentos (Tabela 1).

A quantificação da astaxantina em HPLC está de acordo com os demais parâmetros apresentados, e, nas culturas em que houve fornecimento adicional da fonte de carbono inorgânico, o teor de astaxantina (mg eq. astaxantina g<sup>-1</sup> de células) foi 4,2 vezes maior que o observado no tratamento sem o fornecimento adicional.

A taxa de excreção de carbono orgânico dissolvido/célula aumentou exponencialmente em ambos os tratamentos logo após as células serem submetidas aos fatores estressantes (Figura 2 C). A taxa de excreção celular de COD teve incremento contínuo a partir do momento em que as culturas receberam estresse luminoso aliado à suplementação com CO<sub>2</sub>; contudo, este gradiente foi menor nas culturas que receberam apenas estresse luminoso. Ao final do experimento, no tratamento em que foi fornecido CO<sub>2</sub> na aeração, a quantidade de carbono orgânico dissolvido presente nos cultivos de *H. pluvialis* foi maior do que nos cultivos de células expostas somente ao aumento de iluminação (Tabela 1).

Organismos fitoplanctônicos podem liberar, para o meio ambiente, quantidades de carbono orgânico dissolvido derivado diretamente da fotossíntese, seja de forma ativa ou passiva (Sigee, 2005). Fatores de estresse, como depleção de nutrientes e outros que incrementem a fotossíntese, mas não a citocinese, aumentam as taxas de excreção de carbono orgânico dissolvido (Dubinsky & Berman-Frank, 2001). De fato, quando as condições ideais de crescimento foram mantidas, a quantidade de carbono excretado foi relativamente constante. Portanto, os aumentos das taxas de excreção nas culturas comprovam o efeito de estresse causado pelo aumento da intensidade de luz e do CO<sub>2</sub>.

Contudo, células expostas a condições nas quais os nutrientes tornam-se limitantes, mas que ainda apresentam aparelho fotossintético ativo, aumentam a taxa de excreção por não haver divisão celular, e o carbono assimilado em excesso é eliminado por difusão. A quantidade de carbono excretado pelas células varia de acordo com as espécies estudadas, o ambiente ao qual estão expostas, o estado fisiológico e o tamanho da célula (Dubinsky & Berman-Frank, 2001).

**Tabela 1.** Valores médios±desvio-padrão de nitrato (N-NO<sub>3</sub>), carbono orgânico dissolvido e astaxantina quantificados no décimo dia de estresse (vigésimo quinto dia de experimento), em cultivos de *Haematococcus pluvialis*<sup>(1)</sup>.

| Tratamento  | N-NO <sub>3</sub> dissolvido<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Carbono orgânico dissolvido<br>(x10 <sup>-3</sup> µg por célula) | Astaxantina (mg eq. astaxantina<br>g <sup>-1</sup> de células) |
|---|---|--|--|
| 350 µmol fótons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>                         | 0,14±0,041a   | 0,68±0,03b   | 4,15±0,09b   |
| 350 µmol fótons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> + 4% de CO <sub>2</sub> | 0,03±0,003b   | 1,32±0,09a   | 17,66±1,22a  |
| CV (%)  | 14,27   | 7,62   | 7,98   |

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A escassez de dados na literatura a respeito da excreção de carbono orgânico pela microalga *H. pluvialis* dificulta a comparação da taxa de excreção de carbono celular obtida no presente trabalho. No entanto, a excreção de COD foi efetivamente maior nas culturas em que a síntese de astaxantina foi induzida por meio da manipulação da relação C/N aliada ao aumento da irradiação. A eficiência desta forma de estresse foi confirmada pela quantidade significativamente maior de astaxantina produzida nesse tratamento (1,77%) do que naquele com estresse apenas luminoso (0,41%).

Parte do carbono absorvido é utilizada para acumular reservas, na forma de compostos nitrogenados ligados à cadeia de carbonos, como, por exemplo, os carotenoides, que, nesse caso, servirão principalmente como proteção à célula (Dubinsky & Berman-Frank, 2001; Collins et al., 2011). Considerados como pigmentos secundários, os carotenoides são fundamentais na transferência de energia no fotossistema II (PSII), e, conforme Wang et al. (2003), as células de *H. pluvialis* mantêm sua função PSII, durante a fase de carotenogênese, e a fixação de carbono inorgânico, por meio da atividade fotossintética.

Em situações de estresse, a atividade do fotossistema I (PSI) é reduzida, e o O<sub>2</sub> gerado no PSII continua a ser eliminado e acumulado, e pode ser rapidamente convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HO (Wang et al., 2003). Essas formas reativas de oxigênio, conhecidas como “reactive oxygen species” (ROS), podem causar diversos danos irreversíveis às células, como destruição de membranas ou inibição da atividade enzimática. Assim, como mecanismo de defesa, a célula de *H. pluvialis* produz a astaxantina, um composto antioxidante que inibe os danos causados pela ROS gerada (Li et al., 2008). Kobayashi et al. (1993) concluíram que a carotenogênese é uma resposta da célula mediada pela ROS.

Nesse contexto, o aumento na excreção de carbono dissolvido comprova que a atividade fotossintética é mantida, o que gera excesso de O<sub>2</sub>, que, por sua vez, induz ao processo de biossíntese e ao acúmulo de astaxantina. Alguns autores sugerem, ainda, que o estresse gerado pela depleção de nutrientes é a forma mais efetiva de geração de ROS, o que leva a uma forma eficaz de indução à carotenogênese (Wang et al., 2003).

## Conclusões

1. A síntese de astaxantina, a biomassa seca final e a excreção de carbono orgânico dissolvido por *Haematococcus pluvialis* são maiores quando aplicado o estresse luminoso, com a adição de 4% de CO<sub>2</sub>, na fase exponencial de crescimento.

2. O aumento da taxa de excreção de carbono orgânico pelas células está diretamente relacionado à efetividade do estresse de indução à carotenogênese, quando o fator adição de carbono inorgânico, aliado ao aumento da intensidade luminosa, é aplicado na razão de sete vezes, na fase exponencial de crescimento.

## Referências

- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish and Shellfish Immunology**, v.16, p.527-537, 2004. DOI: 10.1016/j.fsi.2003.09.004.
- BECKER, W. Microalgae for aquaculture: the nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p.380-391.
- BRITTON, G. UV/Visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Ed.). **Carotenoids. Volume 1B: spectroscopy**. Basel: Birkhauser Verlag, 1995. p.13-62.
- CARDOZO, K.H.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.60-78, 2007.
- 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. **Biology Research**, v.36, p.343-357, 2003. DOI: 10.4067/S0716-97602003000300006.
- COLLINS, A.M.; JONES, H.D.T.; HAN, D.; HU, Q.; BEECHEM, T.E.; TIMLIN, J.A. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **PLoS One**, v.6, e24302, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0024302.
- CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v.235, p.513-551, 2004. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.022.
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R.; LEGARRETA, I.G.; JERONIMO, F.M.; CAMPOCOSIO, A.T. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresources Technology**, v.92, p.209-214, 2004.

- DUBINSKY, Z.; BERMAN-FRANK, I. Uncoupling primary production from population growth in photosynthesizing organisms in aquatic ecosystems. **Aquatic Science**, v.63, p.4-17, 2001. DOI: 10.1007/PL00001343.
- FABREGAS, J.; DOMINGUEZ, A.; MASEDA, A.; OTERO, A. Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.545-551, 2003. DOI: 10.1007/s00253-002-1204-4.
- GÖKSAN, T.; AK, L.; GÖKPINAR, S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.1276-1282, 2010. DOI: 10.4014/jmb.0909.09005.
- GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidae. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.
- IMAMOGLU, E.; DALAY, M.C.; SUKAN, F.V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **New Biotechnology**, v.26, p.199-204, 2009. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.007.
- JEON, Y.-C.; CHO, C.-W.; YUN, Y.-S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.490-495, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.12.021.
- KANG, C.D.; LEE, J.S.; PARK, T.H.; SIM, S.J. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.237-241, 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-1889-2.
- KANG, C.D.; LEE, J.S.; PARK, T.H.; SIM, S.J. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.987-994, 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0759-x.
- 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, p.867-873, 1993.
- KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI, V. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.351-356, 1997. DOI: 10.1007/s002530051061.
- LI, Y.; SOMMERFELD, M.; CHEN, F.; HU, Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.1783-1797, 2008. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.12.007.
- LI, Y.; SOMMERFELD, M.; CHEN, F.; HU, Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v.22, p.253-263, 2010. DOI: 10.1007/s10811-009-9453-6.
- LORENZ, R.T. **HPLC and spectrophotometric analysis of carotenoids from *Haematococcus* algae powder**. 2001. Available at: <http://www.ruscom.com/cyan/web02/pdfs/naturose/axbul15.PDF>. Accessed on: 31 Aug. 2011.
- MACKERETH, F.J.H.; HERON, J.; TALLING, J.F. **Water analysis: some revised methods for limnologists**. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1978. 120p.
- OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v.96, p.373-378, 2005. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.
- SAHA, S.K.; MCHUGH, E.; HAYES, J.; MOANE, S.; WALSH, D.; MURRAY, P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v.128, p.118-124, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.049.
- SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v.37, p.623-627, 2002. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00246-1.
- SIGEE, D.C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment**. West Sussex: J. Wiley, 2005. 524p. DOI: 10.1002/0470011254.
- SIGLEO, A.C. Biochemical components in suspended particles and colloids: carbohydrates in the Potomac and Patuxent Estuaries. **Organic Geochemistry**, v.24, p.83-93, 1996. DOI: 10.1016/0146-6380(96)00003-4.
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. Pigment analysis. In: STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. (Ed.). **A practical handbook of seawater analysis**. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1968. p.185-206.
- TORZILLO, G.; GOKSAN, T.; ISIK O.; GOKPINAR, S. 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, p.233-240, 2005. DOI: 10.1080/09670260500123609.
- 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, p.1116-1124, 2003. DOI: 10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x.

---

Recebido em 31 de agosto de 2011 e aprovado em 3 de julho de 2013