UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RUPTURA CELULAR, EXTRAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE ASTAXANTINA DE *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta)

FRANCISCO R. DA S. MACHADO JR.

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador
Profª. Drª. Janaína F. de Medeiros Burkert
Coorientadora

RIO GRANDE-RS
JUNHO, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RUPTURA CELULAR, EXTRAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE ASTAXANTINA DE *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta)

Eng^{o}. de Alimentos Francisco Roberto da Silva Machado Junior

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador
Prof^{a}. Dr^{a}. Janaína F. de Medeiros Burkert
Coorientadora

RIO GRANDE-RS
JUNHO, 2014

Lembre-se de que cada dia que você deixa de se preparar ou de se dedicar, significa um dia mais distante da realização de seus sonhos.

Bernardinho.

Nunca, jamais desanimes, embora venham ventos contrários.

Santa Paulina.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela família que tenho e por sempre me proporcionar coisas boas ao longo de minha caminhada, entre elas a oportunidade de estudar.

"Existem pessoas que percorrem a vida conosco, sofrendo com nossas dúvidas e medos, e exultantes com a nossa felicidade...". Minha eterna gratidão e amor aos meus pais, Francisco (Bebeto) e Dilma, pelo exemplo de vida, caráter, amor, carinho, esforço e apoio incondicional para minha formação. Obrigado por sempre acreditarem em mim.

"Também existem aquelas que demonstram que se você quer muito uma coisa, você vai lá e faz... e faz bem feito...". Ao meu irmão Gabriel, exemplo de empenho, força de vontade, humildade e competência em tudo que faz.

"Outras pessoas dão brilho aos nossos olhos, leveza aos nossos passos e serenidade à nossa vida...". Obrigado Francieli, minha namorada e companheira em todas as horas, pela bondade, carinho, amor, compreensão e ajuda em todos os momentos.

"Os que ao longo de nossa caminhada deixam um pouco de si e levam consigo um pouco de nós...". Ao meu orientador, André, assim como a professora Janaína, pela orientação, amizade e contribuição nesta etapa da minha formação, e ao professor Vladimir, pela receptividade e orientação quando de minhas estadas na Universidade Federal de Santa Catarina.

"Aqueles que a vida se encarrega de fazer cruzar o nosso caminho, transformando em amigos...". Aos meus amigos Adriano, Cristiano, Felipe, Gustavo e Vilásia, pelas conversas, risadas e amizade verdadeira.

"Os que ao cruzar o nosso caminho se tornaram muito importantes...". À Elisane e Mariano, mesmo que à distância, não só pela amizade, mas pela importante participação na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, pelos momentos de descontração e agradável companhia.

À Daiane Félix, pela amizade e parceria na empreitada de iniciar a linha de microalgas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos.

Ao aluno Thalles, pela amizade e por toda ajuda neste trabalho como aluno de iniciação científica.

À Roberta e Deborah, pela amizade e ajuda com análises, bem como aos demais colegas dos laboratórios de Engenharia Bioquímica e de Microbiologia da FURG, que de uma forma ou de outra contribuíram neste trabalho.

À Daiane Boschetto, pela receptividade, amizade e fundamental participação nos experimentos de encapsulamento, e aos colegas do LATESC (UFSC) pela agradável convivência.

À amiga Kelin pela presteza e amizade de sempre, e aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (UFSC) pela disponibilidade quando solicitados.

Aos professores Leonor, Michele, Pinto, Vanessa e Vladimir por aceitarem participar como banca na defesa desta tese, enriquecendo este trabalho.

À Islanda, secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela presteza e disponibilidade sempre que solicitada.

À FURG e UFSC pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/Rede NANOFOTOBIOTEC pela concessão de bolsa e apoio financeiro, e à FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS x
LISTA DE FIGURAS xii
RESUMO xiv
ABSTRACT xv
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL 1
1. INTRODUÇÃO 2
2. OBJETIVOS 5
2.1 Objetivo Geral 5
2.2 Objetivos Específicos 5
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 8
3.1 Microalgas 8
3.2 *Haematococcus pluvialis* 9
3.2.1 Características gerais 9
3.2.2 Condições de cultivo de *H. pluvialis* 11
3.2.3 Cultivos em fotobiorreator 11
3.2.4 Intensidade de luz 12
3.2.5 Temperatura 13
3.2.6 pH 14
3.3 Métodos de ruptura celular 14
3.3.1 Métodos mecânicos de ruptura celular 15
3.3.1.1 Abrasivos 15
3.3.1.2 Homogeneização sob alta pressão 16
3.3.1.3 Ondas ultrassônicas 16
3.3.2 Métodos não mecânicos de ruptura celular 17
3.3.2.1 Químicos 17
3.3.2.2 Enzimáticos 17
3.4 Carotenoides 18
3.4.1 Micro-organismos produtores de carotenoides 19
3.4.2 Biosíntese de carotenoides 21
3.4.3 Funções e propriedades e dos carotenoides 21

3.5 Astaxantina 22
3.5.1 Característica gerais 23
3.5.2 Produção de astaxantina 26
3.5.3 Extração da astaxantina 27
3.5.4 Encapsulamento de astaxantina 29
3.6 Nanoencapsulamento 29
3.7 Emprego de fluidos supercríticos em nanoencapsulamento 31
3.8 Técnica de *Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS)* 33
CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO 36
4. MATERIAL E MÉTODOS 37
4.1 Infraestrutura 38
4.2 Micro-organismo 39
4.3 Manutenção dos micro-organismos 39
4.4 Cultivo da microalga 39
4.5 Ruptura química com DMSO e extração com diferentes solventes 42
4.6 Estudo de diferentes técnicas de ruptura celular 43
4.6.1 Técnicas mecânicas de ruptura celular 43
4.6.1.1 Ondas ultrassônicas 43
4.6.1.2 Maceração com terra diatomácea 43
4.6.1.3 Abrasão com pérolas de vidro 44
4.6.1.4 Imersão em nitrogênio líquido 44
4.6.1.5 Ruptor ultrassônico 44
4.6.2 Avaliação da atividade lítica de preparados enzimáticos sobre a parede celular de *H. pluvialis* 44
4.6.2.1 Preparados enzimáticos comerciais 44
4.6.2.2 Caracterização dos preparados enzimáticos 45
Atividade enzimática de β-1,3-glucanase 45
Atividade enzimática de protease 45
Atividade enzimática de xilanase 46
4.6.2.3 Planejamentos experimentais fracionários 46
4.6.3 Técnicas enzimáticas de ruptura celular 47
4.6.4 Técnicas combinadas de ruptura celular 48
4.6.5 Determinação de carotenoides totais 48

4.6.6 Determinação da extratibilidade de carotenoides 48
4.6.7 Análise estatística 48
4.7 Tecnologia supercrítica para obtenção de nanocápsulas contendo astaxantina 49
4.7.1 Condições experimentais de precipitação 50
4.7.2 Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento 51
4.7.3 Funcionamento da Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento 56
4.7.4 Determinação do percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%) 61
4.7.5 Análise e caracterização das partículas obtidas 62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 63
5.1 Ruptura química com DMSO e extração com diferentes solventes 63
5.2 Estudo de diferentes técnicas de ruptura celular 65
5.2.1 Técnicas mecânicas de ruptura celular 65
5.2.2 Caracterização dos preparados enzimáticos 67
5.2.3 Avaliação da atividade lítica dos preparados enzimáticos utilizando planejamento experimental fracionário 68
5.2.4 Lise enzimática assistida por ultrassom 71
5.2.5 Técnicas combinadas de ruptura celular 73
5.3 Tecnologia supercrítica para obtenção de nanocápsulas contendo astaxantina 75
6. CONCLUSÕES 80
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83
APÊNDICE A 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da microalga *H. pluvialis*..... 9
Tabela 2 - Micro-organismos produtores de carotenoides 20
Tabela 3 - Composição dos meios de cultivos BBM e BBM e acetato de sódio 39
Tabela 4 - Comprimento de onda e coeficiente de absortividade específico para astaxantina 42
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{4-1} em níveis reais e codificados (entre parênteses) 47
Tabela 6 - Teores de carotenoides extraídos por éter de petróleo para diferentes relações biomassa/DMSO 63
Tabela 7 - Carotenoides totais obtidos com diferentes solventes 64
Tabela 8 - Concentração e extratibilidade de carotenoides utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular 66
Tabela 9 - Atividades das enzimas majoritárias presentes nos preparados enzimáticos comerciais..... 67
Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{4-1} em níveis reais e codificados (entre parênteses) 68
Tabela 11 - Efeito principal das variáveis estudadas sobre a atividade lítica relativa de Glucanex® 69
Tabela 12 - Efeito principal das variáveis estudadas sobre a atividade lítica relativa de Lyticase® 70
Tabela 13 - Efeito principal das variáveis estudadas sobre a atividade lítica relativa de Driselase® 70
Tabela 14 - Médias ± desvios padrões da extratibilidade (%) e de carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$), utilizando diferentes técnicas enzimáticas de ruptura celular na biomassa submetida ou não ao processo de congelamento 72
Tabela 15 - Médias ± desvios padrões da extratibilidade (%) e de carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$), utilizando as técnicas de maceração com terra diatomácea, lise enzimática assistida por ultrassom e combinação de ambas..... 74
Tabela 16 - Resultados do tamanho médio de partícula (X), tamanho mínimo de partícula (Xmin), tamanho máximo de partícula (Xmax), desvio padrão (σ), coeficiente

de variação (VC), percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%) 76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia óptica das células vegetativas de *H. pluvialis* crescendo ativamente (a); Células de *H. pluvialis* que acumularam astaxantina (b) 10
Figura 2 - Estrutura da astaxantina 24
Figura 3 - Isômeros configuracionais da astaxantina 25
Figura 4 - Capilar aspersor 34
Figura 5 - Câmara de precipitação 34
Figura 6 - Esquema do aparato experimental utilizado na técnica SEDS 35
Figura 7 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho 38
Figura 8 - Cultivos em fotobiorreatores com aeração por borbulhamento de ar (A – começo dos cultivos; D – Final dos cultivos) 40
Figura 9 - Extratos pré e pós-cultivo de *H. pluvialis* 41
Figura 10 - Biomassa contendo astaxantina proveniente do cultivo de *H. pluvialis* 41
Figura 11 - Vista geral do aparato experimental utilizado (LATESC – UFSC) 49
Figura 12 - Copolímero PHBV purificado 50
Figura 13 - Solução orgânica contendo o princípio ativo + PHBV 51
Figura 14 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para a precipitação e encapsulamento de astaxantina produzida por *H. pluvialis* 52
Figura 15 - Sistema de montagem do capilar 54
Figura 16 - Tampa da câmara de precipitação mostrando o suporte onde o filtro é inserido 55
Figura 17 - Aparato utilizado na abertura/fechamento da câmara de precipitação 57
Figura 18 - Válvula de controle da pressão interna da câmara envolta por uma fita de aquecimento e recoberta com lã de vidro e papel alumínio 59
Figura 19 - A – Tampa da câmara com partículas; B – Coleta; C – Partículas formadas na câmara; D – Partículas coletadas 60
Figura 20 - Microscopia óptica das células de *H. pluvialis* antes (a) e após (b) o processo de ruptura celular através da técnica combinada entre maceração com terra diatomácea associada com lise enzimática 75
Figura 21 - Microscopias eletrônicas da coprecipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV 77

Figura 22 - Influência da relação biomassa contendo astaxantina sobre a eficiência de encapsulamento (EE%), com o extrato obtido por lise enzimática assitida por ultrassom 79

APÊNDICE A

Tabela 1A - Resultados do tamanho médio de partícula (X), tamanho mínimo de partícula (X_{min}), tamanho máximo de partícula (X_{max}), desvio padrão (σ), coeficiente de variação (VC), percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%) nos ensaios de precipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV 101

Figura 1A - Microscopias eletrônicas da coprecipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV 102

Figura 2A - Efeito da pressão e da relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano no tamanho das partículas precipitadas 103

Figura 3A - Influência da relação biomassa contendo astaxantina sobre a eficiência de encapsulamento (EE%) 104

RESUMO

O interesse na produção de astaxantina de fontes naturais vem aumentando significativamente, devido principalmente à sua capacidade como potente agente antioxidante. Na obtenção da astaxantina por via biotecnológica, a microalga *Haematococcus pluvialis* é um dos micro-organismos industrialmente mais interessantes. Entretanto, como a maioria dos carotenoides, a astaxantina é uma molécula altamente insaturada que pode ser facilmente degradada por processos térmicos. Em função desta instabilidade, uma possibilidade que se abre, a fim de proteger sua atividade biológica de fatores ambientais e reforçar a sua estabilidade física, é o encapsulamento. Neste sentido, este trabalho vem contribuir em inovações relacionadas ao desenvolvimento de tecnologia para ruptura celular, extração e nanoencapsulamento de astaxantina produzida por via biotecnológica, mais especificamente de astaxantina obtida através do cultivo de *H. pluvialis*. Neste estudo, os cultivos foram realizados em meio BBM e acetato de sódio e conduzidos a temperatura constante de 25±1 ºC em fotobiorreatores de 1 L com aeração por borbulhamento de ar de 300 $mL.min^{-1}$, agitação manual diária e sob iluminância constante de 444 µmol $fótons.m^{-2}s^{-1}$ durante 15 dias, sendo inoculados com suspensão de microalgas previamente preparada, na proporção de 10%, e pH ajustado em 7,0. A biomassa foi recuperada dos cultivos por centrifugação e seca a 35 °C por 48 h. Em seguida, foram empregadas diferentes técnicas de ruptura celular (química, mecânica e enzimática). Após a ruptura, foi realizada a extração dos carotenoides e a quantificação dos carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$) e da extratibilidade (%). Entre os solventes testados no método de ruptura química, o diclorometano foi o selecionado para a extração dos pigmentos carotenoides. Dentre as técnicas mecânicas de ruptura celular, a maceração da biomassa congelada com terra diatomácea resultou na maior extratibilidade e carotenoides totais (66,01% e 972,35 $\mu g.g^{-1}$). A melhor condição de lise da parede celular de *H. pluvialis*, utilizando o preparado enzimático Glucanex®, ocorreu em pH do meio reacional de 4,5 a 55 ºC, com atividade inicial de β-1,3-glucanase de 0,6 $U.mL^{-1}$ e um tempo de reação de 30 min, alcançando-se 17,73% de atividade lítica relativa. Nestas condições, com a reação enzimática assistida por ultrassom sem congelamento prévio da biomassa, atingiu-se 83,90% e 1235,89 $\mu g.g^{-1}$, respectivamente, para extratibilidade e carotenoides totais. Dentre as técnicas combinadas testadas, a maceração com terra diatomácea associada à lise enzimática apresentou valores de extratibilidade e carotenoides totais de, respectivamente, 93,83% e 1382,12 $\mu g.g^{-1}$. No encapsulamento do extrato contendo astaxantina obtido por lise enzimática associada por ultrassom, envolvendo a coprecipitação com PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)) em fluidos supercríticos, o aumento da pressão tendeu a reduzir o diâmetro da partícula formada, enquanto que o aumento da relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano usada na etapa de extração incrementou o percentual de encapsulamento e a eficiência de encapsulamento para ambas pressões testadas (80 e 100 bar). Os maiores valores de percentual de encapsulamento (17,06%) e eficiência de encapsulamento (51,21%) foram obtidos nas condições de 80 bar e relação biomassa:diclorometano de 10 $mg.mL^{-1}$. Nestas condições, o diâmetro médio de partícula foi de 0,228 µm. Com base nos resultados obtidos, técnicas para a obtenção de astaxantina de *H. pluvialis* e seu encapsulamento foram desenvolvidas com sucesso, podendo ser extendidas a outros produtos intracelulares de microalgas.

Palavras-chave: astaxantina, biomassa microalgal, carotenoides, lise enzimática, encapsulamento, *Haematococcus pluvialis*.

ABSTRACT

The interest in the production of astaxanthin from natural sources has increased significantly, mainly due to its capacity as a powerful antioxidant. In the biotechnological production of astaxanthin, the microalgae *Haematococcus pluvialis* is one of the industrially most interesting microorganisms. However, as most of the carotenoids, astaxanthin is a highly unsaturated molecule and can be easily degraded by thermal processes. In function of this instability, in order to protect its biological activity of environmental factors and enhance their physical stability, the encapsulation is a possibility to avoid damages. Thus, this work contributes with innovations in the development of technologies related to cell rupture, extraction and nanoencapsulation of astaxanthin produced by biotechnological methods, more specifically astaxanthin obtained in the cultivation of *H. pluvialis.* In this study, the cultivation was performed using BBM and sodium acetate medium and performed at a constant temperature of 25±1 °C in photobioreactors of 1 L with aeration of 300 ml.min $^{-1}$, daily manual agitation and under constant illuminance of 444 μmol fotons.m^{-2}s^{-1} for 15 days, inoculated with a previously prepared suspension of microalgae, corresponding to 10%, and pH adjusted to 7.0. The biomass was recovered from cultures by centrifugation and dried at 35 °C for 48 h. In sequence, different techniques of cell disruption were employed (chemical, mechanical and enzymatic). After the rupture, it was performed the extraction of carotenoids, and total carotenoids (μg.g^{-1}) and extractability (%) were determined. Among the solvents tested in chemical rupture method, dichloromethane was selected for extraction of carotenoid pigments. Among the mechanical cell disruption techniques, maceration with diatomaceous earth with previous freezing of biomass resulted in the highest extractability and total carotenoid (66.01% and 972.35 μg.g^{-1}). The best condition for enzymatic lysis of cell wall, using the enzymatic preparation Glucanex®, has occurred in pH 4.5 at 55 °C, with β-1,3-glucanase initial activity of 0.6 U.mL^{-1} and reaction time of 30 min. In these condictions, with enzymatic reaction assisted by ultrasound without previous freezing, it was reached 83.90% and 1235.89 μg.g^{-1}, respectively, for extractability and total carotenoid. Among the combined techniques, maceration with diatomaceous earth associated with enzymatic lysis showed values for extractability and total carotenoid of 93.83% and 1382.12 μg.g^{-1}, respectively. In the encapsulation of the extract containing astaxanthin produced by enzymatic lysis assisted by ultrasound, involving the coprecipitation with PHBV (poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)) in pressurized fluids, the increase of pressure decreased the particle diameter, while the increase of biomass containing astaxanthin:dichoromethane ratio led to an increase of encapsulation percentage and encapsulation efficiency for both pressures (80 and 100 bar). The best values for encapsulation percentage (17.06%) and encapsulation efficiency (51.21%) were obtained with 80 bar and biomass:dichloromethane ratio of 10 mg.mL^{-1}. In these condictions, the mean diameter of the particles was 0.228 μm. Based on the results obtained, techniques for obtaining astaxanthin from *H. pluvialis* and their encapsulation have been successfully developed, may be extended to other intracellular products from microalgae.

Keywords: astaxanthin, microalgal biomass, carotenoids, enzymatic lysis, *Haematococcus pluvialis*, encapsulation.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Com a cada vez mais crescente exigência por parte dos consumidores, novos processos vêm sendo desenvolvidos para promover o aumento na qualidade dos produtos e atender com satisfação esta parcela da população. Neste sentido, as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética desenvolvem processos que buscam empregar, em suas formulações, aditivos obtidos por via biotecnológica, em substituição aos sintéticos, em virtude da alta demanda por produtos de origem natural.

Os carotenoides são pigmentos que estão amplamente distribuídos na natureza, de maneira que estão presentes em quase todos os filos dos reinos animal e vegetal. São responsáveis pelas colorações amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos, como frutas, vegetais, peixes e crustáceos (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Dentre os carotenoides, destaca-se a astaxantina, que é um pigmento de coloração vermelho-alaranjada, obtido por via sintética ou a partir de fontes naturais, como leveduras e microalgas, e cuja aplicação comercial mais importante é na aquicultura, onde sua utilização tem sido cada vez mais explorada na formulação de rações para alimentação de peixes e crustáceos criados em cativeiro (CHIEN, PAN; HUNTER, 2003), fornecendo a coloração típica do tecido muscular, que é amplamente aceita pelos consumidores em todo o mundo.

Este carotenoide também apresenta benefícios à saúde humana, fortalecendo o sistema imunológico e promovendo a redução de doenças degenerativas como o câncer e a prevenção da catarata (AMAR et al., 2004). Tem sido relatada, também, sua excelente ação na proteção de lipídios contra a peroxidação (NAGUIB, 2000).

Anualmente, o mercado de carotenoides sintéticos movimenta aproximadamente cerca de US$ 300 milhões. Dentre os principais produtores industriais, destacam-se as empresas Hoffmann-La Roche e BASF, que produzem seis diferentes tipos de carotenoides sintéticos, onde o preço de mercado para a astaxantina é cerca de 10 vezes superior ao do β-caroteno (VALDUGA et al., 2009a).

Entretanto, os corantes derivados de fontes naturais possuem propriedades biológicas que os diferenciam significativamente dos obtidos sinteticamente, dentre as quais destaca-se a atividade antioxidante. Neste cenário, a produção de carotenoides oriundos de fontes microbianas apresenta-se como uma alternativa na substituição dos pigmentos sintéticos, uma vez que estes contêm diferentes isômeros e estruturas

químicas, que acarretam em uma perda da sua atividade biológica (RODRIGUEZ-SAIZ, FUENTE; BARRETO, 2010; LI et al., 2011).

Na obtenção da astaxantina por via biotecnológica, apenas alguns organismos são industrialmente interessantes, como a levedura *Phaffia rhodozyma* (LIU, WU; HO, 2006) e a microalga *Haematococcus pluvialis* (HE, DUNCAN; BARBER, 2007).

H. pluvialis é uma microalga reconhecida mundialmente como a maior produtora natural de astaxantina (CAVALHEIRO et al., 1999) e é caracterizada por ser unicelular, flagelada e produzir cistos, os quais são considerados geralmente como uma resposta às condições desfavoráveis do meio. A formação de cistos é frequente e acompanhada por uma mudança da coloração das células de verde para alaranjada ou vermelha (GOODWIN, 1980), caracterizando assim a produção de astaxantina como principal carotenoide. Segundo KAMATH et al. (2005), a astaxantina compreende de 85-88% do conteúdo de carotenoides totais presentes nas células encistadas de *H. pluvialis.*

No entanto, sua fácil decomposição quando exposta ao calor, luz e oxigênio, bem como a sua limitada solubilidade/dispersibilidade em água, tem limitado o uso da astaxantina (TACHAPRUTINUN et al., 2009). Uma alternativa viável para controlar esta instabilidade intrínseca elevada, que faz com que estes compostos não sejam normalmente tratados em sua forma cristalina, mas sim como emulsões ou microcápsulas, é o nanoencapsulamento em polímeros biocompatíveis. A utilização desta técnica garantiria uma liberação contínua de extrato ocasionando uma ação antioxidante mais prolongada e eficaz, proporcionando um maior *shelf-life*, além de melhorar a dispersão do material encapsulado.

O processo de encapsulamento é geralmente realizado através da formação de uma matriz polimérica ou camada de revestimento em torno de um composto especial para proteger sua atividade biológica de fatores ambientais e melhorar a sua estabilidade físico-química (FÉLIX, 1999). A aplicação deste tipo de técnica vem atraindo maior atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades, como no caso da possibilidade de alteração da hidrofobicidade de compostos, facilitando assim sua redispersão em água, o que é importante para efeitos de direcionamento a alvos específicos do organismo.

Além do potencial incremento das propriedades de dissolução de compostos hidrofóbicos, como os carotenoides, os sistemas de liberação controlada podem oferecer

outras vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de biocompostos, como: aumento na biodisponibilidade, melhoria na proporcionalidade das doses, redução da variabilidade em indivíduos alimentados ou em jejum e melhoria na taxa de absorção (tanto em animais quanto em humanos) (MÜLLER, JACOBS; KAYSER, 2001).

O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (ENGEBIO) e o Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade (LASCQ) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) vêm desenvolvendo conjuntamente trabalhos de pesquisa na área de produção e recuperação de carotenoides microbianos, envolvendo leveduras (FONSECA et al., 2011; MICHELON et al., 2012; SILVA et al., 2012) e, mais recentemente, microalgas (REIS, 2012).

Neste contexto, este trabalho vem contribuir em inovações tecnológicas relacionadas ao processo de ruptura celular, extração e nanoencapsulamento de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis.*

As atividades desenvolvidas estão inseridas nos projetos “Rede Nanofotobiotec – Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos” (Edital 04/CII-2008, REDE NANOBIOTEC – BRASIL/CAPES, processo nº 56.4889/2010-5) e “Encapsulamento de Agentes Bioativos e Imobilização de Enzimas em Nanoestruturas via Tecnologia Supercrítica" (Edital FAPERGS/CNPq 008/2009, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - PRONEX, processo nº 10/0011-4), este último envolvendo uma colaboração entre a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram realizados os experimentos de encapsulamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral desenvolver tecnologia para ruptura celular, extração e encapsulamento de astaxantina produzida por *H. pluvialis*.

2.2 Objetivos Específicos

- A partir da biomassa produzida de *H. pluvialis*, avaliar diferentes solventes na ruptura química da parede celular da microalga;
- Avaliar diferentes técnicas de ruptura mecânica da parede celular de *H. pluvialis*, verificando os efeitos sobre os carotenoides totais recuperados e a extratibilidade dos carotenoides;
- Avaliar três diferentes preparados comerciais de enzimas líticas, quanto à atividade lítica relativa sobre a parede celular de *H. pluvialis*;
- Avaliar diferentes técnicas de lise enzimática da parede celular, verificando os efeitos sobre os carotenoides totais recuperados e a extratibilidade dos carotenoides;
- Avaliar técnicas combinadas (mecânica e enzimática) de ruptura da parede celular de *H. pluvialis*, verificando os efeitos sobre os carotenoides totais recuperados e a extratibilidade dos carotenoides;
- A partir de extratos obtidos da biomassa de *H. pluvialis*, obter cápsulas contendo astaxantina, pela coprecipitação do composto bioativo em PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)) empregando a técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS - *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids)*, com dióxido de carbono supercrítico como antissolvente e diclorometano como solvente orgânico, avaliando o efeito da pressão e da relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano na etapa de extração sobre o percentual de encapsulamento e a eficiência de encapsulamento.

- Caracterizar as partículas obtidas, em termos de tamanho de partícula, avaliando o efeito da pressão e da relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano na etapa de extração.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

O termo microalgas não tem valor taxonômico, engloba micro-organismos algais com clorofila *a* e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica, e sua caracterização implica na consideração de uma série de critérios (HOEK, MANN; JAHNS, 1995; RAVEN, EVERT; EICHHORN, 2001).

Segundo TOMASELLI (2004), estes micro-organismos têm sido tradicionalmente classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além desses, técnicas de biologia molecular igualmente têm sido usadas (HU, 2004).

As classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae), e as algas douradas (Chrysophyceae). As algas verde-azuladas (Cyanophyceae) também são referidas como microalgas. As diatomáceas são a forma de vida dominante de fitoplâncton e, provavelmente, representam o maior grupo de produtores de biomassa na Terra (DEMIRBAS, 2010).

Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, esses são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas (ABALDE, 1995). São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004).

O número exato de espécies microalgais ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (PULZ; GROSS, 2004).

3.2 *Haematococcus pluvialis*

3.2.1 Características gerais

Haematococcus pluvialis é uma microalga dulcícola da classe Chlorophyceae (Tabela 1), mundialmente conhecida por ser a maior produtora natural de astaxantina, um pigmento carotenoide responsável pela coloração avermelhada na carne de camarões, salmões e outros organismos (CAVALHEIRO et al., 1999).

Tabela 1 - Classificação da microalga *H. pluvialis*

Divisão	Chlorophyta
Classe	Chlorophyceae
Ordem	Volvocales
Família	Haematococcaceae
Gênero	*Haematococcus*
Espécie	*Haematococcus pluvialis*
Sinonímia	*Haematococcus lacustris, Spharella lacustris*

Fonte: CAVALHEIRO et al. (1999)

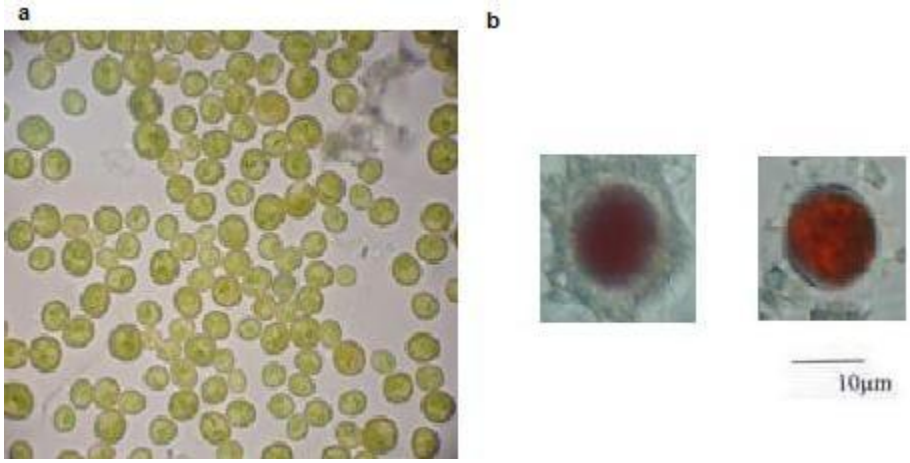
Caracteriza-se por ser unicelular, flagelada e produzir cistos, os quais são considerados geralmente como uma resposta às condições desfavoráveis do meio onde se desenvolvem. A formação de cistos é frequente e acompanhada por uma mudança da cor verde para alaranjada ou vermelha (GOODWIN; JAMIKORN, 1953). Seu habitat natural são cavidades rochosas periodicamente preenchidas com água da chuva. Este habitat é típico em banhos de pássaros, outros ornamentos de jardim e recipientes contendo água da chuva. Pode ser encontrada também em piscinas rochosas, mas é pouco tolerante a altas salinidades. Ocasionalmente, a microalga *H. pluvialis* ocorre 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).

Durante o ciclo de vida da *H. pluvialis*, 4 estágios ou tipos de células podem ser reconhecidos: microzooides flagelados, macrozooides flagelados, células palmeloides imóveis e hematocistos ou aplanósporos, os quais são grandes células vermelhas com uma parede celular altamente resistente (ELLIOT, 1934).

Os aplanósporos destacam-se como a principal forma celular de acumulação de grandes concentrações de astaxantina, e surgem como formas de repouso ou resistência da espécie a condições desfavoráveis, tais como deficiência de nutrientes, excesso ou falta de luz, temperaturas inadequadas ao crescimento e presença de substâncias que interferem no metabolismo (KOBAYASHI et al.,1992; BOUSSIBA; VONSHAK, 1991; FAN, VONSHAK; BOUSSIBA, 1994). Desta forma, uma vez que as condições tornam-se desfavoráveis, a forma vegetativa rapidamente se diferencia numa estrutura de resistência não flagelada. Por outro lado, as maiores biomassas e taxas de crescimento da espécie são geralmente atingidas na fase de macrozooides flagelados.

Sua forma é facilmente reconhecida por apresentar um protoplasto muito afastado da parede celular. Entre a parede celular e o protoplasto existe uma camada de mucilagem atravessada por delicados filamentos de citoplasma dificilmente visíveis com microscopia. Em poucos dias, as células aumentam seu volume drasticamente e entram numa fase de repouso em que a célula é cercada por uma parede de celulose pesada e resistente. Este processo é denominado encistamento. Os protoplastos são então acentuados por uma coloração vermelha (Figura 1), produzindo então um derivado carotenoide, a astaxantina (BOUSSIBA, 2000).

Figura 1 – Microscopia óptica das células vegetativas de *H. pluvialis* crescendo ativamente (a); Células de *H. pluvialis* que acumularam astaxantina (b)



Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG (Aumentado 100 x)

A microalga *H. pluvialis* pode conter entre 1,5 e 3% de astaxantina na biomassa seca. Seu crescimento é estimulado em duas fases, sendo que na primeira fase

do cultivo pode ser realizada em fotobiorreatores, sob condições adequadas à produção de elevadas densidades de células. Quando ocorre o preparo do meio de cultivo, há produção das células vegetativas típicas da espécie: células verdes, dotadas de dois flagelos e com parede celular fina. No final da etapa de cultivo em fotobiorreator, quando o meio de cultura dispõe de menor quantidade de nutrientes, as células começam a assumir coloração avermelhada. A segunda fase de cultivo é caracterizada pelo acúmulo intenso de astaxantina, alcançada sob condições de alta intensidade luminosa e preferencialmente com meio de cultura pobre em nutrientes. Em resposta a essas condições, formam-se cistos, que são células vermelhas dotadas de parede celular grossa e sem flagelos. Os cistos de *H. pluvialis* são densos. Assim, se a movimentação do cultivo for interrompida, elas decantam rapidamente. Esse fato contribui bastante para a coleta de biomassa final formada, pois menores volumes de meio de cultura são recolhidos juntamente com os cistos (LOURENÇO, 2006).

3.2.2 Condições de cultivo de *H. pluvialis*

Um dos aspectos fundamentais do cultivo de microalgas é o conhecimento dos nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Todos os meios de cultura devem observar as necessidades nutricionais das microalgas (LOURENÇO, 2006).

Nos cultivos de microalgas, o conhecimento das condições de desenvolvimento é muito importante para obtenção das melhores condições de processo como o pH, temperatura, concentração de nutrientes, entre outros (HENRARD, 2009). Ao longo dos cultivos, as condições em que os mesmos são estabelecidos influenciam diretamente na composição das microalgas, sendo importante seu estudo, a fim de maximizar a produção dos biocompostos desejados. Na formulação dos meios de cultivo, estes são compostos geralmente por vitaminas e nutrientes, que contém macroelementos como carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, silicato, enxofre e potássio e microelementos como ferro, manganês, cobre, molibdênio, cobalto, zinco, entre outros (SOARES, 2010).

3.2.3 Cultivos em fotobiorreator

Segundo BOUSSIBA (2000), tanto no estado de crescimento vegetativo quanto de encistamento, é possível usar com sucesso inúmeros modelos de biorreatores (tanque agitado, coluna de bolhas e biorreator *airlift*, biorreator tubular, etc.), mas basicamente dividem-se em sistemas aberto ou fechado.

As vantagens e desvantagens de alguns fotobiorreatores são relatadas por algumas empresas e autores. Na Suíça, fotobiorreatores com luz artificial estão sendo usados para a produção comercial de astaxantina, enquanto que no Havaí, uma combinação de fotobiorreatores fechados e tanques de cultura abertos estão sendo usados com êxito para produção de *H. pluvialis* (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

No cultivo de células fotossintéticas, o design dos fotobiorreatores para uma iluminação efetiva é essencial para reduzir o custo de produção. Enquanto a luz solar é a fonte de luz mais barata disponível, sua intensidade não é constante e varia durante o dia e conforme a região, e a intensidade de energia é limitada. Logo, para alcançar condições de cultivo controladas e alta produtividade, um mecanismo de iluminação elétrica com alta eficiência e que emite luz com efeito fisiológico favorável nas células fotossintéticas deve ser usado em sistemas de fotobiorreatores (KATSUDA et al., 2004).

Devido à baixa velocidade de crescimento, suscetibilidade à contaminação e preferência por baixa temperatura de crescimento (HARKER, TSAVALOS; YOUNG, 1996), o cultivo em tanques de cultura abertos tem sido geralmente mal sucedido. No entanto, segundo BOUSSIBA (2000) é o sistema mais econômico e mais utilizado por grandes produtoras de astaxantina por *H. pluvialis.*

3.2.4 Intensidade de luz

A intensidade luminosa e o comprimento de onda da fonte de iluminação influenciam diretamente o crescimento de microalgas. Os cloroplastos, responsáveis pela fotossíntese, podem ser irreversivelmente destruídos a altas intensidades de luz ultravioleta, por longos períodos de tempo (RICHMOND, 2004).

Segundo GHIGGI (2007), a produção de células vegetativas verdes de *H. pluvialis* não tolera alta irradiação e, logo, deve ser cultivada em condições de baixa intensidade de luz. Entretanto, este regime de pouca luz resulta em baixa velocidade de

crescimento, requerendo a adição de fontes orgânicas de carbono para melhorar o crescimento.

De acordo com a potência e o espectro da fonte luminosa, o conteúdo de pigmentos das microalgas pode sofrer variações (HENRARD, 2009). O aumento de carotenoides está relacionado a uma adaptação necessária da célula a fim de proteger da luz as moléculas de clorofila (GOODWIN, 1980).

A exposição das células aos ciclos claro/escuro no interior do fotobiorreator é um fator favorável ao crescimento, mas depende da intensidade da luz, da altura do meio liquido, da agitação e da densidade celular (VONSHAK et al., 1982).

Segundo BOUSSIBA (2000), a intensidade de luz ótima para a fase de crescimento celular está na faixa de 60-110 μmol fótons.$m^{-2}s^{-1}$. SCHOEFS et al. (2001) cultivaram *H. pluvialis* em biorreator *airlift* com fluxo de fótons na superfície do bioreator de aproximadamente 50 μmol fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e temperatura de cultivo constante em 20±1 ºC, mantendo a cultura em alta e constante taxa de divisão celular. Por outro lado, KAEWPINTONG et al. (2007) relataram que a ótima intensidade de luz para crescimento de *H. pluvialis* foi de 20 μmol fótons.$m^{-2}s^{-1}$.

3.2.5 Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos. Dependendo do ambiente, a temperatura deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos (LOURENÇO, 2006).

Segundo BOUSSIBA (2000), para o estado de encistamento, o limite máximo de temperatura poderia ser de até 35 ºC, enquanto o limite mínimo poderia ser tão baixo quanto 2 ºC. Os melhores resultados foram obtidos quando a temperatura foi mantida em 32 ºC.

Um dos efeitos mais importantes da temperatura no metabolismo das células é a influência na respiração, cuja taxa aumenta exponencialmente com a temperatura e, consequentemente, provocando variações na produção de biomassa algal (RICHMOND, 2004).

Ainda de acordo com o autor, a temperatura tem grande influência na composição química das microalgas, como na concentração de ácidos graxos e na formação da estrutura de proteínas e lipídios.

3.2.6 pH

Segundo SARADA, TRIPATHI, RAVISHANKAR (2002), a produção de carotenoides por microalgas é significantemente afetada pelo pH do meio. A influência do pH na produção de astaxantina foi determinada por esses autores através da indução de *stress* nutricional em meio basal com diferentes pHs (5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0), que levou a uma alta concentração de pigmento (clorofila e carotenoide) em pH 7,0-8,0 e significantemente menor em pH 6,0.

No entanto, culturas de *H. pluvialis* que cresceram em pH 7,0 apresentaram maior produção de astaxantina que aquelas que cresceram em pH 6,0, 8,0 e 9,0. De acordo com os autores, os resultados indicaram que a resposta ao *stress* varia com o pH do meio e que pH 7,0 foi o melhor em termos de produção de astaxantina.

3.3 Métodos de ruptura celular

Partindo de uma suspensão de células, é possível isolar produtos de interesse de forma individual quando se processa previamente a biomassa com um tratamento adequado para promover a ruptura celular (WAGNER, SCENI; RAMBALA, 2008).

O conhecimento da estrutura da parede celular é importante na seleção do processo de ruptura. As técnicas disponíveis para liberação de produtos intracelulares incluem processos mecânicos e não mecânicos. Estes métodos podem ser realizados de forma separada, mas a combinação de dois ou mais deles pode melhorar a eficiência da ruptura (THAMMAKITTI et al., 2004). A eficácia desses vários processos difere para distintas espécies microbianas (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002).

A completa destruição da parede celular para liberação de compostos intracelulares requer a desestruturação dos compostos da parede celular, para a destruição da resistência de contato. Meios mecânicos levam a uma destruição não específica, enquanto métodos não mecânicos são mais específicos e suaves (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002).

Na literatura, alguns métodos de extração por solventes orgânicos, incorporando processos de decomposição das células encistadas, como o *spray drying*, moagem criogênica, tratamento com ácido ou base e lise enzimática, têm sido desenvolvidos para a recuperação de astaxantina a partir de células vermelhas

encistadas de *H. pluvialis* (OLAIZOLA, 2003; GUERIN, HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003).

Segundo GOOD e CHAPMAN (1979), a parede celular espessa da *H. pluvialis* dificulta a extração de carotenoides por solventes e, por consequência, a biodisponibilidade de astaxantina. Neste sentido, para que a extração seja eficiente e para que haja biodisponibilidade de astaxantina, deve haver uma homogeneização das células.

De acordo com HAGEN, SIEGMUND, BRAUNE (2002), *H. pluvialis* forma aplanósporos em resposta a condições de *stress* como esgotamento de nutrientes ou forte insolação. Coforme comentado pelos autores, a espessa parede celular do aplanósporo de *H. pluvialis* é caracterizada por uma extraordinária resistência a agentes mecânicos e químicos, bem como uma permeabilidade muito baixa. Este fato contribui para o decréscimo da biodisponibilidade dos carotenoides acumulados se a célula íntegra for utilizada, havendo então a necessidade de aplicar técnicas de ruptura, em geral de custo elevado. E considerando que predomina em sua composição mananas, o uso de enzimas líticas para ruptura celular é promissor.

Já de acordo com KOBAYASHI et al. (1997), BOUSSIBA, FAN, VONSHAK (1992) e MENDES-PINTO et al. (2001), diferentes métodos são relatados na literatura para a extração de astaxantina microalgal, como os que utilizam solventes e os que utilizam tratamento com enzimas extracelulares.

3.3.1 Métodos mecânicos de ruptura celular

3.3.1.1 Abrasivos

O moinho de bolas, originalmente utilizado nas indústrias de tintas, foi adaptado com sucesso para o rompimento celular, tanto em laboratório quanto industrialmente. É um método simples e efetivo para o rompimento da parede celular de diferentes tipos de micro-organismos. O esquema básico desses equipamentos consiste em uma câmera de moagem encamisada com uma haste longitudinal rotatória no centro. Na haste estão presos agitadores de diferentes formatos que são responsáveis por transmitir energia cinética a pequenas esferas (geralmente de diâmetro inferior a 1,5

mm) contidas na câmera, forçando-as a colidirem umas com as outras (MIDDELBERG, 1995).

A seleção do diâmetro das esferas e da carga de partículas é de grande importância para uma maior eficiência no processo de ruptura celular, dependendo da localização do bioproduto na célula. Uma carga geralmente de 80-90% do volume livre do compartimento de abrasão é considerada ótima (MIDDELBERG, 1995).

3.3.1.2 Homogeneização sob alta pressão

A homogeneização sob alta pressão consiste em fazer passar suspensões de células, a alta pressão, através de um pequeno orifício que liga uma câmara com a pressão atmosférica. Pela súbita descompressão, as células se rompem. Esta mudança brusca de pressão gera grande quantidade de calor, por isso é necessário um sistema de refrigeração eficaz (TREVAN et al., 1990).

O grau de ruptura verificada nesse tipo de equipamento depende da fase de crescimento do micro-organismo, sendo que as células da fase estacionária são mais resistentes que as da fase exponencial (TREVAN et al., 1990). A ruptura em homogeneizador sob alta pressão gera um rompimento não específico, pois ocorre em apenas uma parte da parede celular. O homogenizador é um equipamento vital nas indústrias de laticínios para ruptura dos glóbulos de gordura do leite e controle de tamanho destes (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002).

3.3.1.3 Ondas ultrassônicas

O mecanismo de ruptura celular por ondas ultrassônicas está associado com o fenômeno de cavitação. Este fenômeno resulta na liberação de ondas de choque altamente energéticas, que causam a aparição de tensões mecânicas, provocando danos na superfície atingida. As forças cisalhantes produzidas pelo turbilhonamento gerado durante a cavitação geram pequenas bolhas de ar, e quando estas bolhas são maiores que as células, elas fazem com que estas células se movimentem de forma violenta até que ocorra o rompimento das mesmas. Por outro lado, quando as bolhas são menores que as células, elas são capazes de gerar *stress* cisalhante disrruptivo sem a necessidade de movimentação das células. Dessa forma células maiores sentem mais o turbilhão de

ruptura do que células menores (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002). Grande parte da energia ultrassônica absorvida pela suspensão celular se transforma em calor, por isto um controle de temperatura é necessário (MIDDELBERG, 1995), caso contrário pode haver significante degradação dos carotenoides, como no caso da astaxantina produzida por *H. pluvialis*.

3.3.2 Métodos não mecânicos de ruptura celular

3.3.2.1 Químicos

Os compostos álcalis mais utilizados para ruptura celular são a amônia e o hidróxido de sódio, porque causam inativação de patógenos ou micro-organismos geneticamente modificados durante o rompimento. A geração de poluentes é a principal desvantagem no uso de álcalis em rompimento celular. Com relação aos compostos detergentes, estes são caracterizados por apresentarem a propriedade de dissociar proteínas e lipoproteínas das paredes celulares, provocar a formação de poros e liberar a molécula-alvo. A eficiência do rompimento depende do pH e da temperatura e pode ser aumentado por um pré-tratamento à base de solventes orgânicos que iniciam e estimulam a autólise (WAGNER, SCENI; RAMBALA, 2008).

Os solventes orgânicos servem para romper muitos tipos de células e podem ser qualificados como um meio tradicional de ataque. Não são empregados para ruptura em escala industrial por diversas razões, entre elas o alto custo e a toxicidade (TREVAN et al., 1990).

As rupturas químicas mais utilizadas são as que empregam o dimetilsulfóxido (DMSO) ou o tolueno, sendo que ambos alteram a composição das membranas, aumentando a sua permeabilidade (WAGNER, SCENI; RAMBALA, 2008).

3.3.2.2 Enzimáticos

O método de lise enzimática é adequado para a recuperação de biomoléculas sensíveis à tensão de cisalhamento ou à pressão de trabalho dos homogeneizadores. Os fatores que devem ser considerados quando da utilização deste método são a presença

de inibidores, possibilidade de reciclo da enzima e resistência à tensão de cisalhamento (FLEURI; SATO, 2005).

O mecanismo de rompimento é baseado no fato de que a pressão osmótica interna rompe a membrana, ou parte dela, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado para o meio externo. As vantagens desse mecanismo são: fácil controle do pH e da temperatura do meio, baixo investimento de capital, alta especificidade para degradação da parede celular e uso em associação com métodos mecânicos. As enzimas agem sinergicamente na lise da parede celular, mas somente duas são essenciais para o rompimento da célula: a protease lítica específica, que degrada a camada externa de mananaproteína; e a β-1,3-glucanase lítica, que degrada a camada interna de glucana, implicando no rompimento celular por diferença de pressão osmótica (FLEURI; SATO, 2005).

A eficácia de enzimas na lise dos componentes da parede celular pode variar dependendo do estágio de crescimento celular, do gênero e da espécie do micro-organismo.

3.4 Carotenoides

Os carotenoides, melaninas, clorofilas, antocianinas e flavonoides são pigmentos que se encontram naturalmente em certos organismos e alimentos. Destes, os mais conhecidos e utilizados, de maior valor econômico e tecnológico, pertencem ao grupo dos carotenoides, por suas aplicações na indústria farmacêutica, química e de alimentos (CAMPOCOSÍO, 2008).

Os carotenoides são compostos químicos da classe de hidrocarbonetos (carotenos) e de seus derivados oxigenados (xantofilas). Sua estrutura básica reflete seu modo de biossíntese e consistem de oito unidades isoprenoides unidas e uma série de duplas ligações conjugadas conferindo-lhes a capacidade cromófora (DAVIES, 1976). O grupamento carotenoide abrange aproximadamente 600 compostos naturais (obtidos de plantas e micro-organismos), os quais são responsáveis pela grande variedade de cores vistas na natureza.

Entretanto, somente as plantas, algas e algumas espécies de fungos e bactérias sintetizam carotenoides. Desta forma, devem ser fornecidos na dieta de animais, muitas

vezes convertidos em outros carotenoides e incorporados dentro dos tecidos musculares (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

As moléculas de carotenoides possuem um sistema de ligações duplas que constitui o grupo cromóforo responsável pela cor que proporcionam aos alimentos. São ligações interatômicas, denominadas conjugadas, entre os átomos de carbono. Para que a cor amarela apareça, são necessárias, no mínimo sete ligações conjugadas. O aumento neste número de ligações conjugadas resulta em maiores bandas de absorção em maiores comprimentos de onda e, desta forma, os carotenoides tornam-se vermelhos (BRITTON, 1995; MORAIS, 2006).

Além de conferir cor, também apresentam papéis biológicos importantes como componentes para armazenar luz em organismos fotossintéticos, e também atuam como fotoprotetores, antioxidantes e reguladores de fluidos da membrana (CAMPOCOSÍO, 2008; VALDUGA et al., 2009a).

3.4.1 Micro-organismos produtores de carotenoides

Na obtenção da astaxantina por via biotecnológica, apenas alguns micro-organismos são biotecnologicamente interessantes, destacando-se o fungo *Blakeslea trispora* e a microalga marinha *Dunaliella* pela produção de β-caroteno, e a produção de astaxantina pela microalga verde *Haematococcus sp.*, pela bactéria marinha *Agrobacterium aurantiacum* e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON; AN, 1991; CHUMPOLKULWONG et al., 1997; CANNIZZARO et al., 2004; WANG et al., 2006). Na Tabela 2 estão apresentados os micro-organismos tecnologicamente interessantes com potencial para serem empregados na bioprodução dos principais carotenoides.

Tabela 2 - Micro-organismos produtores de carotenoides

Espécie	Carotenoides principais
Cianobactéria	
Anabaena variabilis	cantaxantina
Aphanizomenon flos-aquae	cantaxantina
Nostoc commune	cantaxantina
Algas verdes	
Chlorela pyrenoidosa	luteína
Spongiococcum excetricum	luteína
Haematococcus pluvialis	astaxantina
Dictycoccus cinnabarinus	cantaxantina
Fungos e leveduras	
Blakeslea trispora	β-caroteno e licopeno
Rhodotorula sp.	toruleno e β-caroteno
Rhodosporidium sp.	toruleno e β-caroteno
Dacrymyces deliquescens	luteína
Rhodotorula glutinis	β-caroteno, toruleno e torularrodina
Phaffia rhodozyma	astaxantina
Bactérias	
Streptomyces chrestomyceticus	xantofilas
Mycobacterium phlei	xantofilas e β-caroteno
Flavobacterium sp.	zeaxantina e β-caroteno
Deinococcus sp.	derivados 4-ceto do γ-caroteno
Mycobacterium smegmatis	derivados 4-ceto do γ-caroteno
Brevibacterium sp.	cantaxantina e astaxantina
Rhodococcus maris	cantaxantina
Mycobacterium brevicaie	cantaxantina
Mycobacterium lactiola	astaxantina
Pseudomonas sp.	rodoxantina

Fonte: adaptado de VALDUGA et al. (2009a)

3.4.2 Biosíntese de carotenoides

A biossíntese de carotenoides ocorre a partir da via de terpenoides ou isoprenoides, a qual também é utilizada para a produção de uma ampla variedade de compostos. Em organismos fotossintetizantes, as reações de biossíntese ocorrem no cloroplasto, a partir de CO_2, via acetil-coenzima A e ácido mevalônico, mecanismo conhecido como via mevalônica (MISAWA, 1997). Tetraterpenos são sintetizados através de reações de condensação de duas moléculas de C_{20} geranilgeranil pirofosfato catalisadas pela enzima fitoeno sintase. Reações similares de condensação a partir de C_{15} farnesil pirofosfato levam à formação de triterpenoides. O sistema de duplas ligações conjugadas desses carotenoides é estendido sequencialmente, integrando uma das duplas ligações isoladas a cada instante.

Plantas, fungos e bactérias, por exemplo, possuem enzimas fitoeno desaturases específicas que influenciam no número de etapas de desaturação. Essas reações individuais de desaturação levam à formação dos produtos ζ-caroteno, neurosporeno, licopeno e 3,4-didehidrolicopeno, respectivamente (SANDMANN, 2006). O licopeno é precursor dos carotenoides cíclicos, como β-caroteno e α-caroteno, cujas reações de hidroxilação dão origem às xantofilas zeaxantina e luteína, respectivamente (MISAWA, 1997).

3.4.3 Funções e propriedades dos carotenoides

Além de colorir, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes, destacando-se o combate de doenças onde os radicais livres apresentam papel importante, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (LORENZ; CYSEWSKI, 2000; MALDONADE, 2009; BHOSALE, 2004).

Embora os carotenoides possuam diferentes propriedades biológicas, exibem propriedades físico-químicas similares (ARMSTRONG, 1997). As duas funções biológicas essenciais dos carotenoides em membranas fotossintéticas são absorver energia solar e exercer proteção contra danos solares. Muitas outras bioatividades têm sido consideradas em adição às suas propriedades antioxidantes (PALOZZA; KRINSKY, 1992).

Os carotenoides são precursores da vitamina A, e através da atividade antioxidante, neutralizam os radicais livres atuando como doadores de elétrons. Desta forma, os antioxidantes evitam os danos causados pelos radicais livres às células vivas, tornando o sistema imunológico mais resistente. Tem-se demonstrado que os carotenoides atuam na prevenção de doenças crônicas, por isso que a demanda e o mercado destes pigmentos incrementou-se rapidamente nos últimos anos (CAMPOCOSÍO, 2008).

Nas indústrias de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Com o crescente interesse pela saúde, os carotenoides também têm sido adicionados aos alimentos a fim de enriquecer o produto. São também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores, coloração específica e foto proteção (SÁNCHEZ-CONTRERAS, JIMÉNEZ; SANCHEZ, 2000).

A maioria dos carotenoides são termolábeis, principalmente as xantofilas. A luz solar direta ou luz ultravioleta podem causar a foto isomerização cis-trans, podendo inclusive, em condições mais energéticas, causar sua destruição. Estes pigmentos são facilmente oxidados por oxigênio ou peróxidos, e mesmo pelo oxigênio do ar, dependendo da luz, calor e presença de pró-oxidantes. Essas reações talvez sejam causadas pela formação de radicais livres (BOBBIO, 2003).

A oxidação altera cor, até mesmo eliminando-a, sendo mais intensa em alimentos liofilizados, nos quais a camada protetora de absorção primária de água foi reduzida e a porosidade do alimento é muito grande, aumentando a superfície de contato com o oxigênio (BOBBIO, 2001).

Os carotenoides são normalmente estáveis ao pH dos alimentos processados. São muito pouco solúveis em água, não sendo importantes as perdas por solubilidade no processamento, mas podem ser importantes as perdas quando o alimento é cortado, triturado, entre outros. Neste caso, as perdas são causadas por ação de peroxidases que entram em contato com os carotenoides (BOBBIO, 2001).

3.5 Astaxantina

3.5.1 Características gerais

A astaxantina (3,3´-dihidroxi-β- β'-caroteno 4,4´) é um pigmento carotenoide responsável pela coloração vermelho-alaranjada característica de alguns peixes (truta e salmão), pássaros (flamingo, canários) e crustáceos (camarão e lagosta) (JOHNSON; AN, 1991).

Na indústria farmacêutica, também tem sido relatada sua ação na prevenção de doenças cardiovasculares, prevenção de catarata e bioatividade contra a bactéria *Helyobacter pylori* (HIGUERA-CIAPARA, FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006).

Além disso, a astaxantina apresenta importante função biológica, servindo como um precursor da vitamina A, estando associada com a reprodução e desenvolvimento embrionário em peixes e também com a proteção das células contra danos oxidativos (PARAJÓ, SANTOS; VÁZQUEZ, 1998).

Além de suas aplicações como corante, a astaxantina tem um importante e crescente papel no comércio mundial devido às suas propriedades antioxidantes. Na nutrição humana, a astaxantina vem ganhando popularidade como um suplemento dietético, devido às suas poderosas propriedades no combate aos radicais livres. Atualmente, produtos contendo astaxantina de origem microalgal estão disponíveis no mercado, sendo promovidos como agentes anti-inflamatórios, bem como imunoestimulantes. No cenário mundial, a grande maioria da oferta comercial (aproximadamente 97%) é atribuída a astaxantina sintética (SCHMIDT et al., 2010).

Do ponto de vista econômico e comercial, astaxantina é o segundo carotenoide mais importante, tendo atingido, em 2007, US$ 219 milhões no mercado mundial (29% das vendas totais de carotenoides) e com perspectiva de atingir US$ 253 milhões em 2015, com uma taxa de crescimento anual de 1,8% (BCC RESEARCH, 2008).

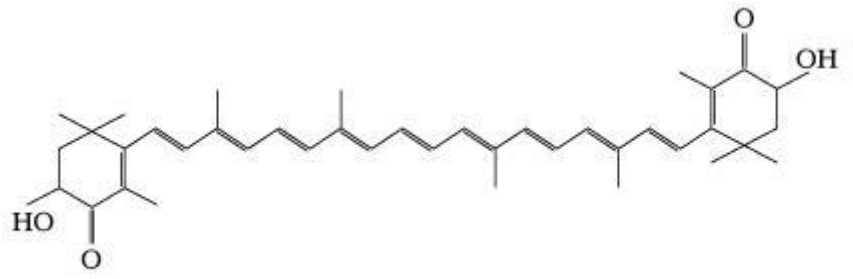
Segundo MORTENSEN et al. (1997), citados por GUERIN, HUNTLEY, OLAIZOLA (2003), a astaxantina constitui um potente antioxidante biológico capaz de exercer forte atividade na eliminação de radicais livres, prevenindo que moléculas ou tecidos possam ser danificados.

Como a maioria dos carotenoides, a astaxantina é uma molécula altamente insaturada e, portanto, pode ser facilmente degradada por processos térmicos ou oxidada durante a fabricação e armazenamento de alimentos. Isto pode causar a perda de

propriedades biológicas, bem como a produção de compostos que produzam sabor ou aroma indesejáveis (URICH, 1994). Também a alta temperatura e determinadas condições de luz podem promover a isomerização destes compostos para a sua forma *cis*, e que os isômeros *cis* de carotenoides precursores de vitamina A têm menos atividade do que seus correspondentes *trans* (SWEENEY; MARSH, 1973).

Na estrutura molecular da astaxantina (Figura 2), cada anel da extremidade de sua cadeia carrega uma hidroxila característica no carbono 3 e um grupo cetônico no carbono 4.

Figura 2 - Estrutura da astaxantina

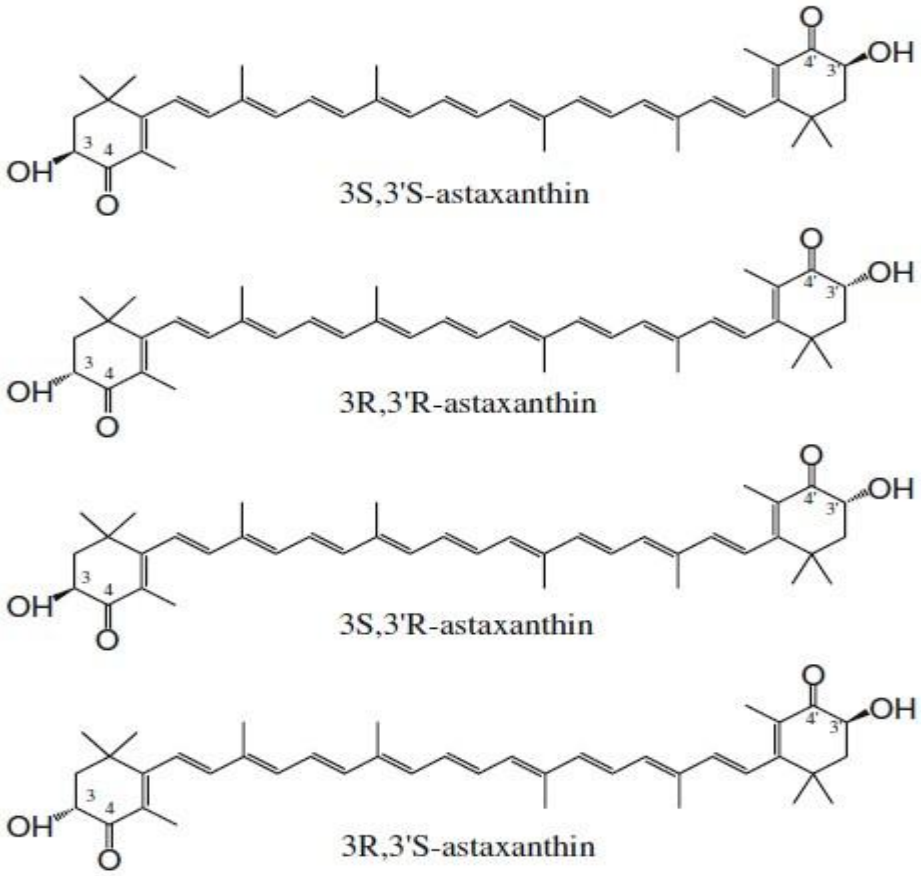


Fonte: RICHMOND (2004)

Quando biossintetizada, a astaxantina pode apresentar diferentes formas ópticas. Possui na sua molécula dois carbonos assimétricos nas posições 3 e 3’, podendo existir em quatro configurações, incluindo os enantiômeros (3R, 3’R), (3S, 3’S) e a forma *meso* (3R, 3’R) (Figura 3) (JOHNSON; AN, 1991).

O isômero (3S, 3'S) é a forma predominante na natureza, onde é encontrada principalmente em *H. pluvialis* e salmão (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; GREWE, MENGE, S; GRIEHL, 2007; SCHMIDT et al., 2010).

Figura 3 - Isômeros configuracionais da astaxantina



Fonte: SCHMIDT et al. (2010)

Dentre as inúmeras propriedades da astaxantina, como a já mencionada atividade antioxidante, destacam-se também as propriedades anti-inflamatória, anticâncer, antidiabetes, prevenção de doenças cardiovasculares, prevenção de catarata e na bioatividade contra a bactéria *Helicobacter pylori*. Entretanto, sua atividade antioxidante parece ser responsável pelas demais. Tal propriedade é associada à sua estrutura especial, com 11 duplas ligações carbono-carbono conjugadas, fazendo que a astaxantina apresente 10 vezes mais eficácia no combate aos radicais livres quando comparado ao β-caroteno e até 500 vezes maior que a da vitamina E. Essa eficácia tem levado à sua introdução no cada vez mais promissor mercado de nutracêuticos, sendo comercializada na forma de cápsulas. Estudos têm demonstrado sua ação contra a foto oxidação induzida por radiação UV superior ao β-caroteno. Também demonstrou excelente ação na proteção de lipídios contra peroxidação (HIGUERA-CIAPARA, FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006). De acordo com a FDA (*Food and*

Drug Administration), desde 2009, nos EUA, o uso da astaxantina é permitido como um aditivo de cor para fins específicos em alimentos de animais e peixes (RODRIGUEZ-SAIZ, FUENTE; BARRETO, 2010).

3.5.2 Produção de astaxantina

Segundo BONFIM (1999), devido ao elevado valor comercial da astaxantina e as desvantagens práticas em sua síntese química (complexa e de elevado custo), existe um grande interesse no uso de fontes biológicas de astaxantina. A obtenção de astaxantina por via biotecnológica tem sido desenvolvida com a microalga verde *H. pluvialis* e a levedura *P. rhodozyma* (RODRIGUEZ-SAIZ, FUENTE; BARRETO, 2010).

Mesmo com o uso cada vez mais crescente de carotenoides em alimentos, produtos farmacêuticos e rações, existe o predomínio de formas sintéticas destes compostos. No entanto, uma vez dominado o processo de obtenção de carotenoides, a síntese passaria a envolver custos menores e eliminaria a necessidade de realização de cultivos para obtenção de biomassa e separação de substância de interesse, reduzindo desta forma a carga de trabalho e o tempo de produção. Essas caracteristicas conjugadas acarretariam menor preço de venda (LOURENÇO, 2006).

De acordo com o autor, a obtenção de carotenoides naturais pode estar em declínio no mundo, pois as diferenças de custo final dos produtos são grandes. Entretanto, dois fatores vêm sustentando a continuidade dos cultivos para a obtenção de carotenoides por via biotecnológica. O primeiro deles está associado às propriedades diferenciadas dos isômeros produzidos. No caso do β-caroteno, apenas a forma trans da molécula pode ser produzida sinteticamente, ao passo que na obtenção da forma natural existe uma mistura de isômeros cis e trans, e que a presença dos dois isômeros misturados pode acarretar em atividade biológica mais elevada. O segundo fator é o crescimento mundial do segmento do mercado que prefere consumir produtos naturais, rejeitando formas sintéticas. Consumidores com esse perfil se submetem a pagar preços mais elevados para consumir produtos de origem natural, uma vez que tenha certeza da procedência do produto. Logo, verifica-se um mercado disponível para carotenoides naturais, o que vem estimulando a abertura de empresas em vários países (LOURENÇO, 2006).

A microalga *H. pluvialis* produz uma concentração de astaxantina consideravelmente maior que a levedura *P. rhodozyma*, no entanto esta tem como vantagem uma rápida velocidade de desenvolvimento, podendo proporcionar um bom rendimento de produção de astaxantina (JOHNSON; AN, 1991). Neste sentido, estudos têm sido conduzidos por diferentes grupos de pesquisa para investigar os cultivos de *H. pluvialis*, desde a seleção de linhagens adequadas para cultivos em massa e a produção e acumulação de astaxantina (ZHANG et al., 2009).

3.5.3 Extração da astaxantina

Para a obtenção do composto de interesse, no caso, a astaxantina, o conhecimento da estrutura da parede celular do micro-organismo é passo importante na seleção do processo de ruptura e extração, e difere para distintas espécies microbianas (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002). Para a extração de carotenoides a partir de materiais marinhos, alguns estudos têm sido realizados para investigar o efeito das condições operacionais e de encontrar as condições ideais para o processo de obtenção dos extratos (CARERI et al., 2001; MACIAS-SANCHEZ et al., 2005). Este tratamento é determinado pela localização celular do composto de interesse, dependendo se é um composto intracelular ou um composto excretado de forma espontânea ou induzida pela célula (WAGNER, SCENI; RAMBALA, 2008).

De acordo com GHIGGI (2007), a literatura descreve algumas técnicas para a recuperação da biomassa de microalgas, incluindo floculação, filtração, centrifugação e flotação com ar, e tem indicado que a centrifugação é possivelmente a técnica mais confiável e apenas um pouco mais cara que as demais, em escala industrial.

A biomassa de *H. pluvialis* é comumente obtida em escala laboratorial, por centrifugação (GUERIN, HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). Como a água apresenta uma densidade inferior que os haematocistos produzidos, a obtenção dos haematocistos em escala industrial é facilmente realizada por sedimentação e subseqüente centrifugação (BOUSSIBA, 2000).

Segundo GHIGGI (2007), para obtenção de astaxantina de *H. pluvialis*, tem-se a vantagem das células tornarem-se grandes e pesadas durante a carotenogênese, e em função disto ocorrer a formação de cistos que sedimentam rapidamente no meio de crescimento. Para aumentar a biodisponibilidade da astaxantina, a biomassa celular deve

ser rompida (GUERIN, HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003), e este procedimento pode ser realizado por moagem da biomassa com gral (GARCÍA-MALEA et al., 2006; LORENZ; CYSEWSKI, 2000; CIFUENTES et al., 2003), por homogenizadores de tecidos (LABABPOUR; LEE, 2006; CIFUENTES et al., 2003; YUAN; CHEN, 1998), ou nitrogênio líquido em gral (CIFUENTES et al., 2003).

De acordo com YUAN e CHEN (2000), em experimentos de bancada, a moagem em gral com pistilo foi simples, rápida e eficiente para a extração de pigmentos da alga *H. pluvialis*, especialmente para uma grande quantidade de células algais.

A recuperação de componentes lipossolúveis como a astaxantina é mais acentuada quando na ausência de água na biomassa. Entretanto, como a astaxantina é um composto que degrada com calor, produtores comerciais têm desenvolvido tecnologias que removem esta água, mas que limitem a exposição da astaxantina a condições que causam degradação (OLAIZOLA, 2003). Ainda segundo o autor, produtores comerciais de astaxantina não purificam astaxantina a partir do extrato bruto. Neste caso, o extrato de células secas é, preferencialmente, armazenado sob baixas temperaturas (-80 ºC) ou ainda sob ausência de oxigênio, como embalagens a vácuo ou bolsas com introdução de nitrogênio.

Após aplicadas as técnicas de rompimento ao extrato contendo o pigmento, este pode ser extraído com solventes orgânicos como acetona (LABABPOUR; LEE, 2006), dimetilsulfóxido (DMSO) (BOUSSIBA; VONSHAK 1991), metanol (KATSUDA et al., 2004), diclorometano:metanol (25:75 v/v) (YUAN; CHEN, 1998, 2000), acetona:metanol (1:2 v/v) (FABREGAS et al., 2001).

Segundo LABABPOUR e LEE (2006), a extração por acetona é consideravelmente menos tóxica que outros solventes como metanol, hexano, clorofórmio, n-propanol e acetonitrila. De acordo com JOHNSON e AN (1991), solventes como o diclorometano (~30 $g.L^{-1}$), clorofórmio (~10 $g.L^{-1}$), dimetilsulfoxido (~0.5 $g.L^{-1}$) e acetona (~0.2 $g.L^{-1}$) poderiam facilmente dissolver astaxantina à temperatura ambiente. Entretanto, YUAN e CHEN (2000) observaram que apesar de o diclorometano ser um bom solvente para extração de astaxantina, as células e a solução de extrato de diclorometano não puderam ser separadas completamente por centrifugação e restaram ainda suspensas na solução de extrato. Quando diclorometano foi misturado com metanol, as células suspensas na solução de extrato foram completamente precipitadas por centrifugação a 10000 x g por 5-10 min. Além disso,

YUAN e CHEN (2000) observaram que mistura de metanol e diclorometano foi um extrator efetivo para ésteres de astaxantina.

3.5.4 Encapsulamento de astaxantina

A astaxantina é uma molécula altamente insaturada, que se decompõe facilmente quando exposta ao calor, luz e oxigênio (CHRISTOPHERSEN et al., 1991). Além disso, sua cor avermelhada intensa aliada à limitada dispersão/solubilidade em água têm dificultado as aplicações da astaxantina. Como resultado, derivados de astaxantina com solubilidade e estabilidade melhoradas foram estudados. Na literatura são mencionados alguns ésteres de astaxantina, como diisocianato dissódico de astaxantina, difosfato tetrasódio de astaxantina, diisocianato de vitamina C de astaxantina e outros ésteres de ácidos graxos de astaxantina (NAKAO et al., 2008).

Outra possibilidade que se abre, devido à sua instabilidade intrínseca elevada, é o encapsulamento deste composto. O processo de encapsulamento geralmente é realizado através da formação de uma matriz polimérica ou camada de revestimento em torno de um determinado composto, a fim de proteger sua atividade biológica de fatores ambientais e reforçar a sua estabilidade. Entre as matrizes mais comumente utilizadas, estão aquelas compostas por amido e gelatina hidrolisada (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004). Segundo os autores, os métodos empregados são baseados no preparo da emulsão entre os carotenoides e a matriz de encapsulamento, seguido de secagem por atomização da emulsão. Ainda de acordo com a fonte, a principal desvantagem desses métodos é que as perdas de carotenoides ocorrem durante o processo, e o produto obtido não apresenta uma boa estabilidade.

Já na produção de microcápsulas com liberação prolongada de medicamentos, o uso de quitosana tem sido mencionado para o microencapsulamento de astaxantina (FÉLIX, 1999). Estudos realizados mostraram que a quitosana pode ser utilizada para encapsulamento da astaxantina devido à natureza rígida de sua configuração química, e essa propriedade tem sido usada com sucesso para a preparação de filmes, géis e esferas, que são atualmente utilizados na biomedicina, indústrias de cosméticos e alimentos (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004).

3.6 Nanoencapsulamento

A nanotecnologia refere-se à tecnologia e à engenharia envolvidas na concepção, caracterização e aplicação de estruturas menores e dispositivos cuja organização funcional em pelo menos uma dimensão está na escala do nanômetro (um bilionésimo de metro), tornando possível a criação de estruturas funcionais que não poderiam ter sido concebidas utilizando tecnologia convencional. Existe um interesse crescente em materiais nanoestruturados, devido principalmente ao seu potencial em várias áreas científicas e tecnológicas, como catálise, liberação controlada de fármacos e bioencapsulação. Este interesse envolve novos métodos de preparo, como no caso da formação de nanopartículas sólidas a partir da liofilização de dispersões de polifosfato de alumínio, em meio aquoso, utilizando componentes de sistemas estritamente inorgânicos (MONTEIRO et al., 1999).

Existe uma certa controvérsia com relação ao emprego do termo nanopartículas uma vez que este é usado de acordo com o tamanho da partícula obtida e da área que estuda a produção e aplicação destes compostos. Entretanto, do ponto de vista físico, as partículas com tamanho menor que 1 µm são geralmente consideradas nanopartículas, enquanto que as partículas maiores são denominadas micropartículas (AZEVEDO 2002).

Deste modo, o termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas. Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatório, onde é possível se identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (AZEVEDO, 2002).

O encapsulamento de ativos tem sido muito utilizado nos últimos anos com a finalidade de se aumentar a estabilidade, a eficácia e diminuir as quantidades necessárias de bioativos, além de reduzir efeitos colaterais no caso de medicamentos. Dentre os principais sistemas de micro e nanocarreadores destacam-se os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas e as partículas poliméricas.

Do ponto de vista tecnológico, são conhecidas algumas técnicas tradicionais para a precipitação de partículas na escala nanométrica, como o *spray drying*, recristalização por solvente orgânico, moagem mecânica e liofilização. Segundo HONG et al. (2000), as variáveis que influenciam diretamente na funcionalidade e nas propriedades de aplicação destes materiais na ordem nanométrica são o tamanho de partícula, a distribuição de tamanho de partícula, a morfologia e configuração da rede cristalina.

Quando se fala de princípios ativos precipitados na escala nanométrica, surge a necessidade de evitar que fatores externos possam degradá-los. E é nesta direção que os estudos envolvendo escalas nanométricas convergem, pois através do encapsulamento (utilizando biopolímeros como agentes encapsulantes), é que se estabelece se o princípio ativo será liberado através de difusão (através dos poros ou cadeias do polímero) ou por degradação (polímero degrada e ocorre a liberação) (WANG et al., 2006). Assim, o processo de formação de nanocápsulas pode se dar através da formação de uma fina camada de polímero recobrindo o composto ou pela coprecipitação do polímero, onde várias partículas do composto encontram-se inseridas no interior da partícula precipitada.

Na literatura são descritas diferentes técnicas para a precipitação de diferentes materiais incluindo princípios ativos e biopolímeros, destacando-se o emprego de fluidos pressurizados como solvente ou como antissolvente. Estes fluidos, na forma supercrítica, fornecem partículas na ordem nanométrica com elevadas porcentagens de encapsulamento (KALOGIANNIS, MICHAILOF; PANAYIOTOU, 2006).

3.7 Emprego de fluidos supercríticos em encapsulamento

Com a necessidade cada vez mais crescente por parte dos segmentos industriais em trabalharem com compostos que apresentem características controladas, novas tecnologias alternativas de precipitação e encapsulamento de materiais estão surgindo. Desta forma, a tecnologia de fluidos supercríticos vem despontando como uma nova e importante alternativa para a produção de compostos, uma vez que consegue aperfeiçoar e preencher as lacunas apresentadas pelos métodos convencionais.

Estes processos apresentam como vantagens, entre outras características, uma maior eficiência na formação de micro ou nanopartículas, uma estreita distribuição de

tamanhos das partículas formadas, boa eficiência de encapsulamento, alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termossensíveis, além de ser uma tecnologia ambientalmente limpa (FAGES et al., 2004).

Outra característica importante na utilização dos fluidos supercríticos frente às técnicas convencionais é a possibilidade de explorar suas propriedades específicas. No caso do dióxido de carbono supercrítico, o fluido supercrítico mais utilizado para processos de precipitação, ele é ambientalmente limpo e apresenta-se como uma alternativa promissora para substituir técnicas nocivas com solventes orgânicos e clorofluorocarbonetos. Também apresenta como características importantes o fato de não ser tóxico, não ser inflamável, além do que sua utilização não exerce influência no efeito estufa, já que existe a possibilidade de recuperá-lo durante o processamento (NALAWADE, PICCHIONI; JANSSEN, 2006).

Ainda segundo os autores, com relação às suas propriedades, os fluidos supercríticos são caracterizados por apresentarem particularidades descritas como intermediárias entre as de um líquido e um gás. Além disso, essas propriedades podem ser facilmente alteradas com mudanças de pressão e temperatura. Suas condições supercríticas são atingidas com certa facilidade em escalas experimentais (T_c = 31,1 °C, P_c = 73,8 bar) e pode ser removido do processo através de um sistema de despressurização simples.

No que se refere à sua classificação, os processos com fluidos supercríticos são descritos de acordo com o papel do fluido supercrítico no processo, e são classificados como solvente, antissolvente, co-solvente ou soluto, ou mesmo gás propelente (JUNG; PERRUT, 2001; MARTÍN; COCERO, 2008).

Na literatura, pesquisas mais recentes mostram a viabilidade da utilização da tecnologia supercrítica na obtenção de compostos sólidos na escala de micro ou nano, que são de interesse e podem ser aplicados nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas. HE et al. (2006) estudaram a eficiência da etapa de atomização, pureza e influência das variáveis de operação no processo de formação de micropartículas de carotenoides naturais com CO_2 supercrítico, e verificaram que pequenas partículas de carotenoides podem ser obtidas de acordo com a metodologia empregada.

Já REVERCHON; SPADA (2004), ao avaliarem a possibilidade de produzir micropartículas da substância antibacteriana eritromicina, estudaram a influência sobre

a morfologia, sobre o tamanho e distribuição de partícula e de diferentes tipos de solventes (metanol, etanol, acetona), através de atomização com fluidos supercríticos. Após os experimentos, os autores não constataram degradação e encontraram poucos traços residuais destes solventes nas micropartículas do composto formadas.

FRANCESCHI (2009) e FRANCESCHI et al. (2008a; 2009), no estudo da precipitação e encapsulamento de β-caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica com o mesmo aparato experimental utilizado neste trabalho (Figura 11), constatou a viabilidade técnica do processo para posterior aplicação em produtos alimentícios com o intuito de aumentar a vida de prateleira de diversos produtos, protegendo compostos sensíveis de degradarem em função dos processos térmicos.

BOSCHETTO (2013), ao realizar o estudo do encapsulamento do extrato de semente de uva, avaliando o efeito das variáveis de processo nas características das partículas de extrato de uva coprecipitadas, empregando dióxido de carbono pressurizado como antissolvente, também com o mesmo aparato experimental utilizado neste trabalho, verificou que não ocorreu fracionamento do óleo utilizado, e que as partículas obtidas foram da ordem nanométrica.

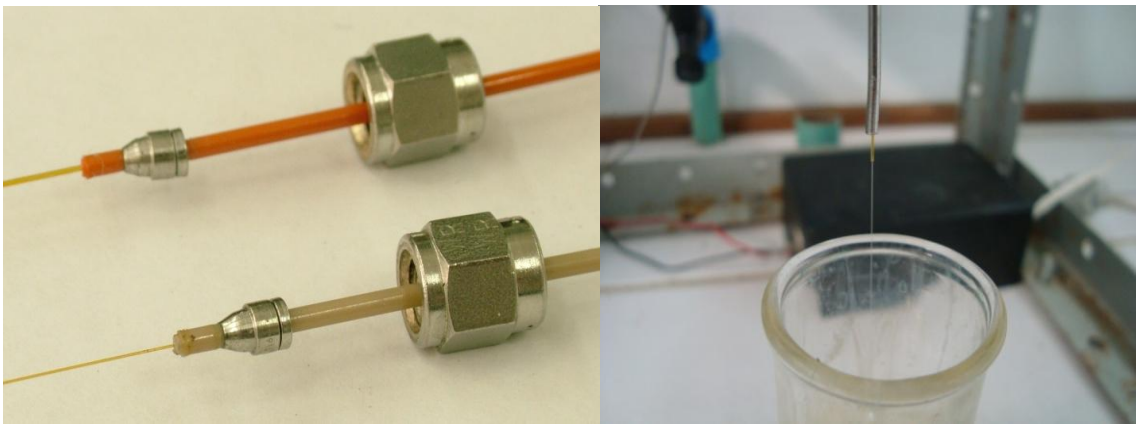
Já de acordo com WEIDNER (2009), embora existam poucos trabalhos nesta área referentes a alimentos ou ingredientes alimentícios (dextrana, β-caroteno, lecitina, sacarose), os processos que utilizam fluidos pressurizados como antissolvente têm demonstrado grande potencial industrial, não somente para polímeros, mas também para a área alimentícia.

3.8 Técnica de *Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS)*

A técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS - *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids)* utiliza fluidos pressurizados ou supercríticos como antissolventes, causando a precipitação do substrato que inicialmente foi dissolvido em uma solução orgânica. A principal característica deste processo é a maneira como se dá o contato entre a solução orgânica e o antissolvente comprimido (FRANCESCHI, 2009).

Ainda segundo o autor, a solução e o antissolvente comprimido são aspergidos simultaneamente através de bocais coaxiais (Figura 4) na câmara de precipitação (Figura 5) já contendo antissolvente pressurizado.

Figura 4 - Capilar aspersor



Fonte: do autor

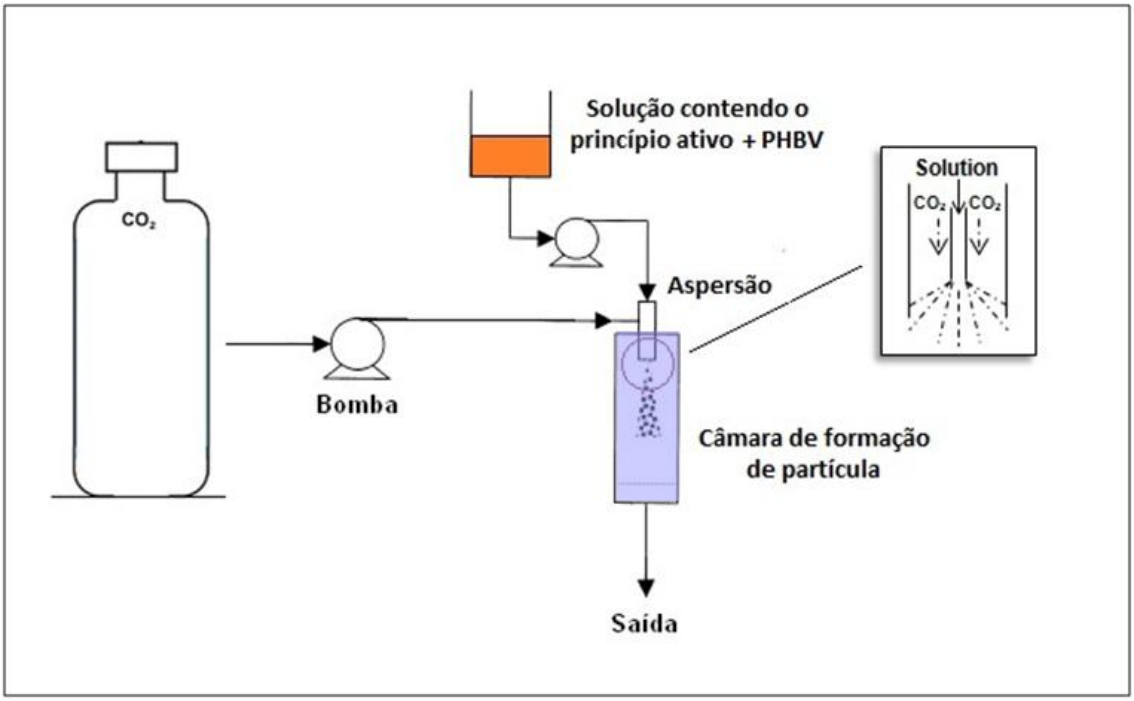
Como o antissolvente entra na câmara em alta velocidade, ocasiona uma dispersão do jato da solução em gotículas extremamente pequenas. Além disso, as condições são arranjadas de modo que o antissolvente extraia o solvente da solução através de um íntimo contato entre solução e antissolvente.

Figura 5 - Câmara de precipitação

Fonte: do autor

O princípio utilizado no processo pode ser visualizado no esquema a seguir (Figura 6).

Figura 6 - Esquema do aparato experimental utilizado na técnica SEDS



Fonte: adaptado de FRANCESCHI (2009)

FRANCESCHI et al. (2008a) e BOSCHETTO (2013) utilizaram com sucesso a técnica SEDS para precipitação de β-caroteno puro e extrato de semente de uva, respectivamente, em copolímero PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)), utilizando dióxido de carbono supercrítico como antissolvente.

Quando se trata destes processos de encapsulamento, um fator fundamental para uma boa eficiência de encapsulamento é que o material a ser encapsulado (princípio ativo) precipite antes do polímero, gerando núcleos primários que propiciem o desenvolvimento do polímero em torno dos núcleos já formados. Outro fator importante nesta técnica é a etapa de secagem com antissolvente puro ao final do processo de precipitação, pois evita a condensação da fase líquida que, ao entrar em contato com as partículas precipitadas, modifica suas características (REVERCHON, 1999).

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4. MATERIAL E MÉTODOS

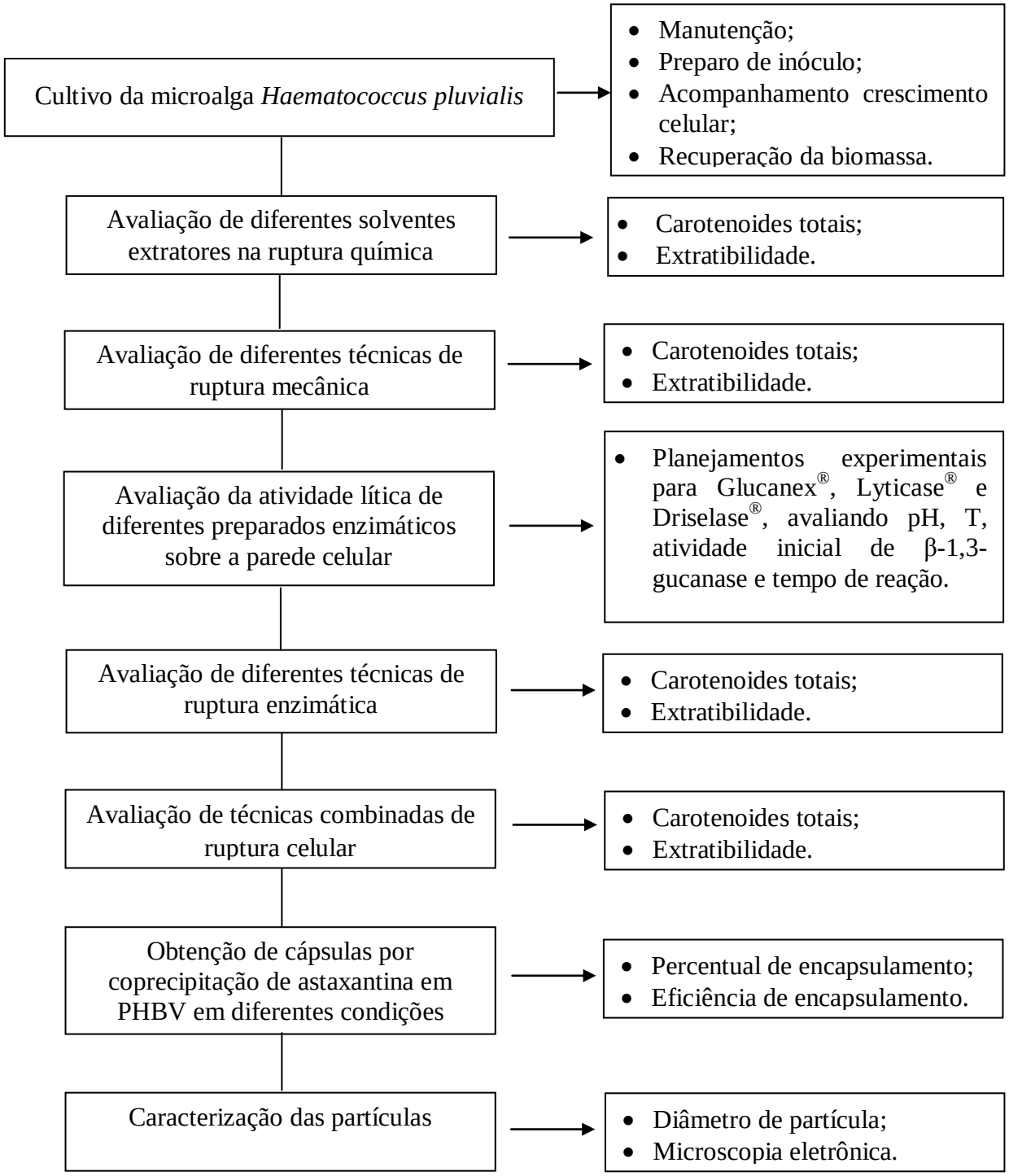
Na primeira missão de estudos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica – LATESC, dentro do projeto "Encapsulamento de Agentes Bioativos e Imobilização de Enzimas em Nanoestruturas via Tecnologia Supercrítica" (Edital FAPERGS/CNPq 008/2009, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - PRONEX, processo nº 10/0011-4), ocorrida em 2012, tinha-se como proposta inicial o estudo do encapsulamento da astaxantina de *Haematococcus pluvialis* utilizando o extrato obtido a partir da ruptura química da parede celular com DMSO e extração com éter de petróleo, técnica esta que garante a recuperação dos carotenoides intracelulares e já utilizada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (ENGEBIO) da FURG para biomassa de *Phaffia rhodozyma* (FONSECA et al., 2011) e *H. pluvialis* (REIS, 2012).

Entretanto, verificou-se durante a missão a impossibilidade de utilização do extrato obtido através deste método de ruptura por não ser possível solubilizar o biopolímero PHBV junto com este extrato. Desta forma, tomou-se como decisão a extração direta com diclorometano a partir da biomassa microalgal, sem ruptura prévia da parede celular, já que o PHBV é solúvel neste solvente, não havendo com esta técnica quaisquer outros interferentes que pudessem afetar negativamente o procedimento de encapsulamento.

Desta forma, um primeiro grupo de experimentos de encapsulamento foi executado, possibilitando uma primeira avaliação da técnica SEDS no encapsulamento de astaxantina de *H. pluvialis*, quanto ao efeito das principais variáveis de processo. Os resultados obtidos são apresentados no Apêndice A.

Todavia a técnica de extração sem ruptura celular resultou em limitada recuperação dos carotenoides presentes na biomassa, motivando a proposição de um estudo abordando diferentes técnicas de ruptura celular, estabelecendo-se a sequência de etapas mostrada na Figura 7, de forma a estabelecer uma técnica de ruptura que garantisse a recuperação dos carotenoides sem os inconvenientes da ruptura química com DMSO para, então, em uma segunda missão de estudos, em 2013, avaliar o encapsulamento deste novo extrato, tomando como base a experiência adquirida com a primeira missão de estudos.

Figura 7 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho



4.1 Infraestrutura

Os cultivos microalgais e os experimentos de ruptura celular e extração dos carotenoides foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos -

ENGEBIO, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Já os experimentos referentes à tecnologia de precipitação de partículas e nanoencapsulamento foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica – LATESC, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 Micro-organismo

A linhagem da microalga *H. pluvialis* utilizada neste trabalho foi doada pela Coleção de Microalgas Elisabeth Adair, do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas da Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ.

4.3 Manutenção dos micro-organismos

Os cultivos estoques foram mantidos em fotobiorreatores de 1 L a 25±1 ºC, sob constante iluminância de 111 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} em meio de cultivo *Bold Basal Medium* (BBM), cuja composição é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos meios de cultivo BBM e BBM e acetato de sódio

Componente	**BBM (mg.L^{-1})**	**BBM e acetato de sódio (mg.L^{-1})**
KH_2PO_4	175	175
$CaCl_2.2H_2O$	25	25
K_2HPO_4	75	75
$MgSO_4.7H_2O$	75	75
$NaNO_3$	250	250
NaCl	25	25
H_3BO_3	115	115
$FeSO_4.7H_2O$	4,9	4,9
$EDTA.Na_2$	10	10
CH_3COONa	-	2000

Fonte: DONG; ZHAO (2004); GHIGGI (2007)

4.4 Cultivo da microalga

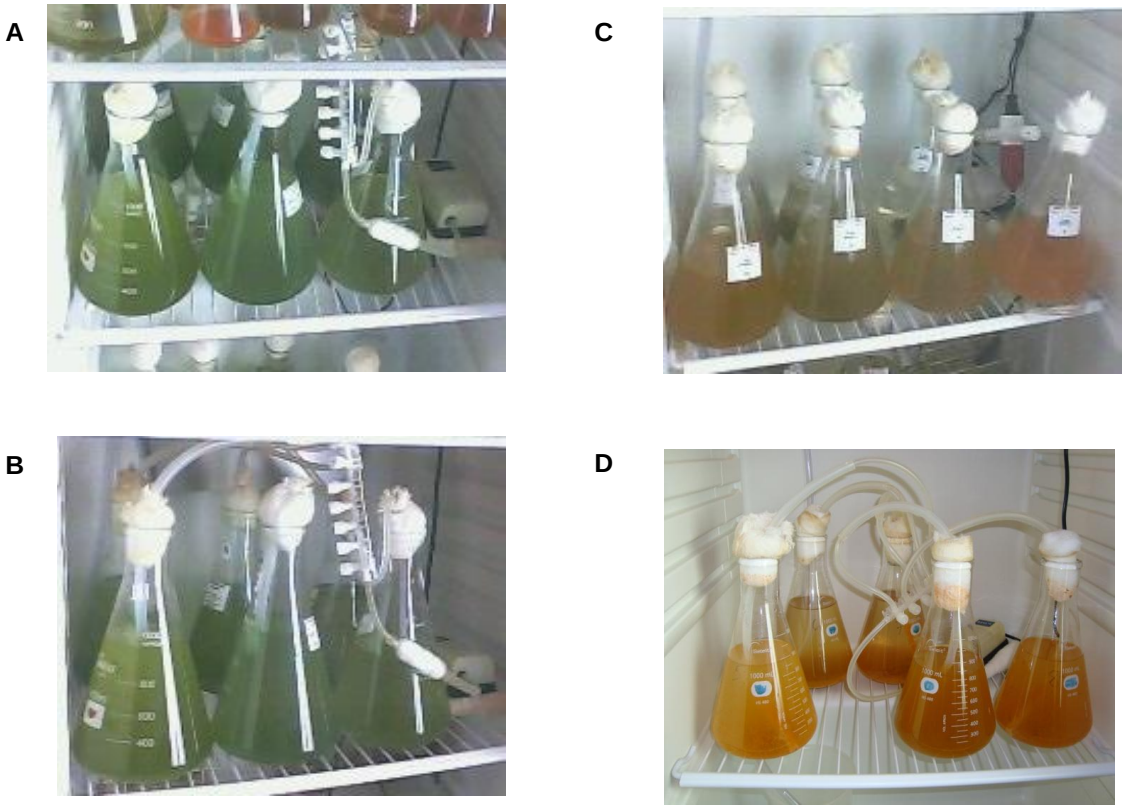
Utilizando os inóculos previamente preparados, foi realizada a produção da biomassa de *H. pluvialis*, conforme ilustrado na Figura 8.

Os cultivos foram conduzidos à temperatura constante de 25±1 ºC em fotobiorreatores de 1 L com aeração por borbulhamento de ar de 300 $mL.min^{-1}$, agitação manual diária e sob iluminância constante de 444 µmol $fótons.m^{-2}.s^{-1}$ durante 15 dias.

Foi utilizado o meio de cultivo BBM e acetato de sódio, conforme GHIGGI (2007) (Tabela 3), escolhido entre diferentes meios após estudo prévio realizado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – ENGEBIO da FURG (MACHADO JR et al., 2012). O volume de inóculo adicionado correspondeu a 10% do volume.

Inicialmente, o pH foi ajustado para 7,0 e ao longo dos cultivos o pH do meio normalmente decrescia nas primeiras horas de bioprodução, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanecia constante, indicando o final da bioprodução.

Figura 8 - Cultivos em fotobiorreatores com aeração por borbulhamento de ar (A – começo dos cultivos; D – Final dos cultivos)



Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG

Ao longo dos cultivos, a biomassa foi estimada através de leitura diária da absorvância a 560 nm utilizando espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China), conforme ONCEL et al. (2011). A conversão da absorvância em biomassa foi realizada utilizando uma curva padrão para a microalga previamente estabelecida.

A biomassa foi recuperada dos cultivos (Figura 9) por centrifugação (1745 x g por 10 min). Após, foi submetida à secagem a 35 °C por 48 h em estufa e armazenada a -18 °C (MORAES, BURKERT; KALIL, 2010). Os ensaios de ruptura celular foram realizados nas células (Figura 10) submetidas ou não ao processo de congelamento.

Figura 9 - Extratos pré e pós-cultivo de *H. pluvialis*

Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG

Figura 10 - Biomassa contendo astaxantina proveniente do cultivo de *H. pluvialis*

Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG

4.5 Ruptura química com DMSO e extração com diferentes solventes

Para o estudo da ruptura química com dimetilsulfóxido (DMSO), foi utilizada a biomassa recuperada após 15 dias de cultivo, baseando-se no método proposto por FONSECA et al. (2011).

Primeiramente foi avaliado o efeito da relação biomassa/DMSO, adicionando diferentes quantidades de biomassa (0,005, 0,010, 0,025 e 0,050 g) para 2 mL de DMSO, utilizando como solvente o éter de petróleo.

Após estabelecida a melhor relação biomassa/DMSO, foram testados diferentes solventes (acetona, diclorometano, éter de petróleo e hexano) para avaliar seu efeito na extração de carotenoides. A determinação da concentração de carotenoides totais nos diferentes extratos foi feita utilizando comprimento de onda e coeficiente de absortividade específico para cada solvente, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Comprimento de onda e coeficiente de absortividade específico para astaxantina

Solvente	λ (nm)	Absortividade Específica	Referência
Acetona	477	2198	NOBRE et al. (2006)
Diclorometano	486	2100	MENDES-PINTO, CHOUBERT; MORAIS (2004)
Éter de Petróleo	474	2100	AN, SCHUMAN; JOHNSON (1989)
Hexano	470	2100	RODRIGUEZ-AMAYA (2001)

A concentração de carotenoides totais, expressos como astaxantina, foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$Carotenoides \quad totais\,(\mu g.g^{-1}) = \frac{A * V * 10^{6}}{A_{1cm}^{1\%} * 100 * m_{amostra}} \qquad (1)$$

Onde, A = absorvância; V = volume (mL); $m_{amostra}$ = biomassa seca (g); $A_{1cm}^{1\%}$ =absortividade específica.

4.6 Estudo de diferentes técnicas de ruptura celular

Para a extração dos carotenoides produzidos pela microalga *H. pluvialis*, diferentes técnicas de ruptura celular (mecânicas e enzimáticas) foram testadas com a biomassa submetida ou não ao processo de congelamento (-18 ºC por 48 h) durante o armazenamento (MORAES, BURKERT; KALIL, 2010), a fim de verificar a influência do congelamento na ruptura da parede celular.

Em todos os experimentos, após a aplicação da técnica de ruptura celular em estudo, foi realizada centrifugação (1745 x g por 10 min) para sedimentar o debris celular. O sobrenadante foi transferido para frasco âmbar e, a seguir, 10 mL de NaCl 20% (m/v) e 10 mL de diclorometano foram adicionados e, após a formação de duas fases, a fase com solvente foi filtrada através de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e o filtrado foi utilizado para a quantificação de carotenoides.

4.6.1 Técnicas mecânicas de ruptura celular

4.6.1.1 Ondas ultrassônicas

Esta técnica foi aplicada adaptando-se o método proposto por MICHELON et al. (2012). Frascos âmbar contendo 0,5 g de biomassa e 6 mL de diclorometano foram submetidos a 4 ciclos de 10 min em banho ultrassônico (Maxiclean 700, Estados Unidos) a 40 kHz.

4.6.1.2 Maceração com terra diatomácea

Em gral, 0,5 g de células juntamente com 0,5 g de terra diatomácea (Celite Nuclear, Brasil; d=35 µm) foram macerados durante 10 min, e a estes foram adicionados 6 mL de diclorometano (adaptado de VALDUGA et al., 2009b).

4.6.1.3 Abrasão com pérolas de vidro

Em tubos de centrífuga protegidos da luz contendo 0,5 g de biomassa e 6 mL de diclorometano, foi adicionada uma carga de 1,1 $g.mL^{-1}$ de pérolas de vidro (0,5>d>0,59 mm). Em seguida os tubos foram submetidos à agitação vigorosa em agitador tipo vórtex por 10 min (adaptado de MICHELON et al., 2012).

4.6.1.4 Imersão em nitrogênio líquido

Tubos de centrífuga protegidos da luz contendo 0,5 g de biomassa foram adicionados de 6 mL de diclorometano, seguido do congelamento em nitrogênio líquido por imersão e posterior maceração da mistura em gral com pistilo (adaptado de MICHELON et al., 2012).

4.6.1.5 Ruptor ultrassônico

Tubos de centrífuga protegidos da luz contendo 0,5 g de biomassa e 6 mL de diclorometano (parcialmente imersos em banho de gelo) foram submetidos a 3 ciclos de 9 min (3 em 3 min) em ruptor dotado de uma sonda ruptora (Sonic Ruptor 250, Estados Unidos) a 20 kHz.

4.6.2 Avaliação da atividade lítica de preparados enzimáticos sobre a parede celular de *H. pluvialis*

4.6.2.1 Preparados enzimáticos comerciais

Para esta etapa foram testados 3 preparados enzimáticos comerciais avaliando suas respectivas enzimas majoritárias, a fim de verificar qual enzima possuía maior atividade nos preparados comerciais, e por consequência, uma maior possibilidade de atuar na ruptura da parede celular do micro-organismo em estudo. Os compostos enzimáticos testados foram: Driselase® (Novozymes S.A., Tokyo, Japão), contendo as enzimas majoritárias β-1,3-glucanase e xilanase, obtida do fungo *Basidiomycetes sp.*; Glucanex® (Novozymes S.A., Bagsvaerd, Dinamarca), contendo as enzimas β-1,3-

glucanase e protease, proveniente do fungo *Trichoderma harzianum*; Lyticase® (Novozymes S.A., Franklinton, Estados Unidos), contendo as enzimas majoritárias β-1,3-glucanase e protease, oriundo da bactéria *Arthrobacter luteus*.

4.6.2.2 Caracterização dos preparados enzimáticos

Atividade enzimática de β-1,3-glucanase

A mistura de 250 µL de solução enzimática e 250 µL de solução 1% de laminarina obtida da alga *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich) em tampão acetato de sódio 0,1 mol.L^{-1}, pH 5,5, foi incubada a 55 ºC por 30 min. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 min (SAEKI et al., 1994 citados por MICHELON et al., 2012). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico utilizando glicose como açúcar padrão e leitura da absorvância a 540 nm (MILLER, 1959). Para o controle foram determinados os açúcares redutores presentes na solução enzimática utilizando água destilada no lugar da solução de laminarina. Uma unidade de atividade de β-1,3-glucanase (U) é definida como a quantidade de enzima que produz a liberação de 1 µmol de glicose por minuto, por 1 mL de solução enzimática.

Atividade enzimática de protease

A atividade de protease foi analisada utilizando azocaseína como substrato, conforme método estabelecido por DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI (2009). A mistura (500 µL) contendo 100 µL de tampão tris-HCl (100 µmol.L^{-1}, pH 8,0), 300 µL de azocaseína 1% (m/v) diluída em tampão tris-HCl (100 µmol.L^{-1}, pH 8,0) e 100 µL de enzima convenientemente diluída foi incubada a 40 °C durante 30 min. A reação foi paralisada com a adição de 600 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). Após a mistura foi centrifugada (6000 rpm por 20 min), onde 800 µL do sobrenadante foram misturados com 200 µL de NaOH 1,8 N e determinada a absorvância a 420 nm. Uma unidade de atividade de protease (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento de 0,1 unidades de absorvância nas condições do ensaio.

Atividade enzimática de xilanase

Em tubos de ensaio grandes com rosca foram adicionados 0,9 mL de xilana 1% (Sigma-Aldrich, Beechwood, Alemanha) e 0,1 mL de extrato de enzima. A solução foi aquecida a 50 °C durante 5 min e 1 mL de DNS foi adicionado. Levou-se à fervura durante 5 min, esfriou-se em banho de gelo e adicionou-se então 16 mL de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico utilizando glicose como açúcar padrão (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade de xilanase (U) é descrita como a quantidade de enzima que produz a redução de 10 mg de açúcar em 1 mL de meio em 1 min nas condições de ensaio padrão.

4.6.2.3 Planejamentos experimentais fracionários

A fim de selecionar um preparado enzimático comercial e estabelecer uma condição para a lise enzimática, foram realizados planejamentos experimentais fracionários 2_{IV}^{4-1} para cada preparado comercial. As variáveis estudadas foram o pH do meio reacional, temperatura, atividade inicial de β-1,3-glucanase e o tempo de reação, sendo que as faixas estudadas foram baseadas em estudo anterior do grupo (MICHELON et al., 2012). A resposta avaliada foi à atividade lítica relativa (%). A matriz do planejamento experimental fracionário está apresentada na Tabela 5.

A atividade lítica relativa da parede celular foi determinada utilizando uma mistura contendo 2 mL de suspensão de células da microalga *H. pluvialis* com densidade ótica (DO) igual a 1,68 (0,041 g) a 660 nm (VENTOM; ASENJO, 1991) e 2 mL de solução enzimática em tampão apropriado. Simultaneamente foi preparado, como referência, um tubo branco onde no lugar da solução enzimática foi acrescentado somente tampão. A atividade lítica relativa foi calculada através da modificação do método descrito por OBATA; IWATA; NAMBA (1977) através da Equação 2.

$$Atividade\ lítica\ \ relativa(\%) = \frac{(DO\ referência\ final\ -\ DO\ mistura\ final)}{DO\ referência\ inicial} * 100 \qquad (2)$$

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{4-1} em níveis reais e codificados (entre parênteses)

Ensaio	*X1*	*X2*	*X3*	*X4*
1	4,5 (-1)	35 (-1)	0,2 (-1)	30 (-1)
2	8,5 (1)	35 (-1)	0,2 (-1)	90 (1)
3	4,5 (-1)	55 (1)	0,2 (-1)	90 (1)
4	8,5 (1)	55 (1)	0,2 (-1)	30 (-1)
5	4,5 (-1)	35 (-1)	0,6 (1)	90 (1)
6	8,5 (1)	35 (-1)	0,6 (1)	30 (-1)
7	4,5 (-1)	55 (1)	0,6 (1)	30 (-1)
8	8,5 (1)	55 (1)	0,6 (1)	90 (1)
9	6,5 (0)	45 (0)	0,4 (0)	60 (0)
10	6,5 (0)	45 (0)	0,4 (0)	60 (0)
11	6,5 (0)	45 (0)	0,4 (0)	60 (0)

X1: pH do meio reacional; *X2*: Temperatura (°C); *X3*: Atividade inicial de β-1,3-glucanase ($U.mL^{-1}$); *X4*: Tempo de reação (min)

4.6.3 Técnicas enzimáticas de ruptura celular

Com o preparado enzimático selecionado e nas condições estabelecidas de lise celular, a técnica enzimática de ruptura celular foi aplicada. Tubos contendo suspensão de biomassa com absorvância de 1,68 a 660 nm (MICHELON et al., 2012), correspondendo a 0,041 g de biomassa seca de *H. pluvialis* submetida ou não ao congelamento, foram adicionados de tampão e extrato enzimático de modo a coincidir com a atividade inicial de β-1,3-glucanase estabelecida no planejamento experimental. A mistura final (4 mL) foi incubada na temperatura e pelo tempo também estabelecidos no planejamento experimental. Em seguida, uma centrifugação foi realizada (1745 × g por 10 min) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 4 mL de água destilada para eliminar resíduos de tampão e enzima e em seguida foi adicionado 6 mL de diclorometano.

Também foi avaliada a lise enzimática assistida por ultrassom, conduzindo a reação enzimática acima descrita em banho de ondas ultrassônicas (Maxiclean 700, Estados Unidos) com uma fequência de 40 kHz.

4.6.4 Técnicas combinadas de ruptura celular

Foram ainda testadas duas técnicas combinadas, envolvendo os métodos que apresentaram os melhores resultados na ruptura mecânica e enzimática.

4.6.5 Determinação de carotenoides totais

Os carotenoides totais foram determinados através de espectrofotometria pela leitura do filtrado a 474 nm e calculada usando a Equação 3 (CHUMPOLKULWONG et al., 1997, DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUÑOZ, 2004).

$$Carotenoides \quad totais(\mu g.g^{-1}) = \frac{A*V*10^4}{2100*m_{amostra}} \tag{3}$$

Onde, A = absorvância a 474 nm; V = volume (mL) do diclorometano (filtrado); $m_{amostra}$ = biomassa seca (g); 2100=absortividade específica do diclorometano (MENDES-PINTO, CHOUBERT; MORAIS, 2004).

4.6.6 Determinação da extratibilidade de carotenoides

A extratibilidade de carotenoides foi calculada pela Equação 4 (XIÃO et al., 2009).

$$Extratibilidade \quad (\%) = \frac{CA}{CT} \quad *100 \tag{4}$$

Onde, CA = concentração de carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$) contido na célula e obtida pela técnica de ruptura celular em estudo; CT = concentração dos carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$) contidos nas células de *H. pluvialis* e obtida usando ruptura celular com DMSO como padrão (XIÃO et al., 2009).

4.6.7 Análise estatística

Os ensaios de ruptura celular foram realizados em triplicatas, e os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, quando foi detectado diferenças significativas entre as técnicas empregadas ao nível de significância 5% ($p<0,05$), ao teste de *Tukey*.

4.7 Tecnologia supercrítica para obtenção de nanocápsulas contendo astaxantina

Nesta etapa do estudo foi investigada a eficácia do dióxido de carbono supercrítico como antissolvente para o encapsulamento de astaxantina a partir de *H. pluvialis* no copolímero poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato) (PHBV) com diclorometano como solvente orgânico utilizando a técnica SEDS *(Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids)*, empregando a Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento mostrada na Figura 11.

Figura 11 - Vista geral do aparato experimental utilizado (LATESC – UFSC)

Fonte: do autor – LATESC, UFSC

O copolímero poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato) (PHBV) vem se destacando em diversas áreas por ser um polímero biodegradável, com boa bio-compatibilidade, tornando-se uma alternativa como agente encapsulante (FRANCESCHI et al., 2008a) de biocompostos, como os carotenoides. Neste sentido, e baseado em trabalho anterior do grupo (FRANCESCHI, 2009), o PHBV foi o polímero utilizado neste estudo para o encapsulamento de astaxantina a partir de *H. pluvialis*.

Para os experimentos de precipitação e encapsulamento o diclorometano utilizado (DCM 99,5%) foi adquirido junto a Merck (Alemanha). Já o dióxido de carbono (99,9% na fase líquida) foi fornecido pela White Martins S.A. (Brasil). Estes materiais foram utilizados como recebidos, sem qualquer tratamento prévio e foram armazenados de forma adequada evitando o contato com a luz, calor e umidade.

O copolímero com massa molar (M_w) de 196.000 e índice de polidispersão de 1,85 foi gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A (Serrana – SP, Brasil) e foi submetido a uma pré-purificação (Figura 12), pela sua dissolução em clorofórmio P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) e posterior precipitação em heptano P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) para remoção de impurezas.

Figura 12 - Copolímero PHBV purificado

Fonte: do autor – LATESC, UFSC

4.7.1 Condições experimentais de precipitação

Para os experimentos de coprecipitação do carotenoide em PHBV os parâmetros testados foram as pressões de precipitação de 80 bar e 100 bar, a relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano (5, 8 e 10 $mg.mL^{-1}$) na etapa de extração de carotenoides, mantendo-se constante a concentração de PHBV em 20 $mg.mL^{-1}$ em solução orgânica (Figura 13), a 35 ºC, o fluxo de solução a 1 $mL.min^{-1}$ e o fluxo de antissolvente a 20 $mL.min^{-1}$ (FRANCESCHI et al., 2008a,b).

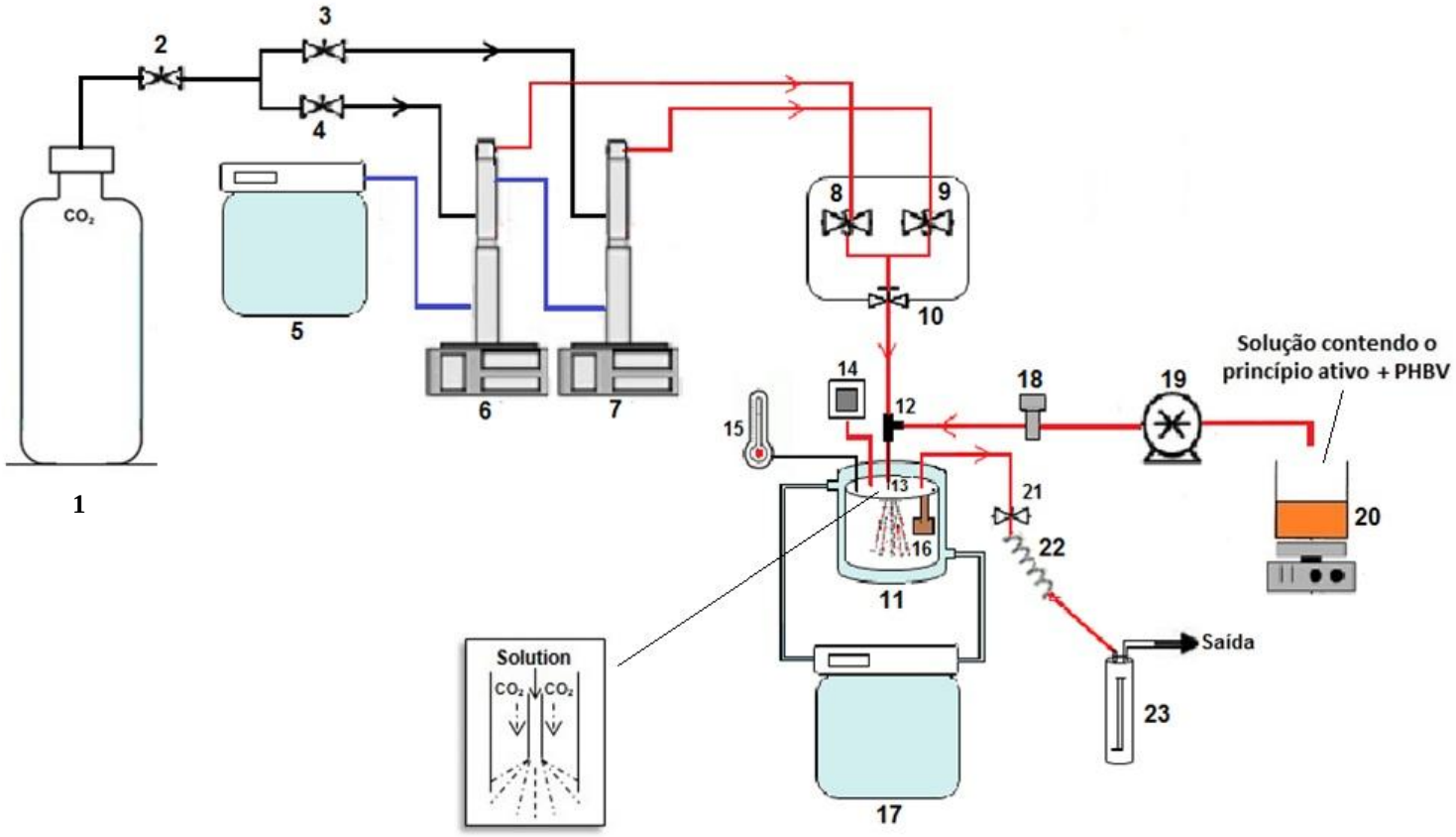
Figura 13 - Solução orgânica contendo o princípio ativo + PHBV

Fonte: do autor – LATESC, UFSC

4.7.2 Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento

A unidade experimental e o procedimento adotado para a precipitação e o encapsulamento do extrato contendo astaxantina extraído da microalga *H. pluvialis* em PHBV foram baseados nos trabalhos de FRANCESCHI (2009), FRANCESCHI et al. (2008a,b, 2009), PRIAMO et al. (2010) (β-caroteno) e BOSCHETTO (2013) (extrato de semente de uva), que estudaram precipitação e encapsulamento dos respectivos princípios ativos em PHBV. O aparato experimental foi fundamentado na técnica que emprega fluidos pressurizados como antissolventes baseada no método *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS). A Figura 14 apresenta o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

Figura 14 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para a precipitação e encapsulamento de astaxantina produzida por *H. pluvialis*



Fonte: adaptado de BOSCHETTO (2013)

Como apresentado na Figura 14, o aparato experimental de precipitação e encapsulamento tem como principais componentes:

(1) Cilindro para armazenamento do dióxido de carbono (CO_2) (White Martins, Brasil);

(2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (*Check-Valve* Marca HIP, Modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar, Estados Unidos);

(3) e (4) Válvulas tipo esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente para as bombas de alta pressão (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar à temperatura ambiente, Estados Unidos);

(5) Banho ultratermostático de recirculação que mantém constante a temperatura nos cilindros das bombas de alta pressão (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D, Brasil);

(6) e (7) Bombas de alta pressão que possuem um cilindro que tem a capacidade de 506 mL (Marca ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 $mL.min^{-1}$, Estados Unidos). Para manter o fluxo de antissolvente sempre constante no sistema são utilizadas duas destas bombas, sendo que também através destas é pressurizado o CO_2 e monitorada a vazão no *display* de controle da unidade;

(8) e (9) Válvulas tipo esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente pressurizado das bombas para a câmara de precipitação (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar à temperatura ambiente, Estados Unidos). Sempre são utilizadas alternadamente, dependendo da bomba que está deslocando o antissolvente para a câmara;

(10) Válvula métrica tipo agulha para controlar o fluxo e vazão de antissolvente das bombas de alta pressão para câmara de precipitação (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar, Estados Unidos);

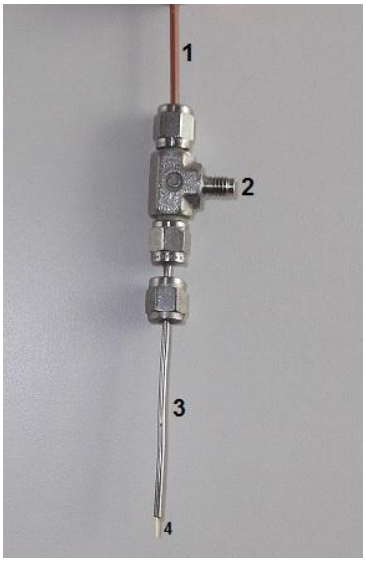
(11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm). Ela é constituída de cinco entradas na tampa: uma central e quatro periféricas, onde uma permanece selada. A Figura 5 (p. 34) apresenta a vista da câmara de precipitação e a tampa com as cinco entradas.

(12) Entrada central coaxial – conexão tipo T (Marca Swagelok, Estados Unidos) à qual estão conectadas a linha de antissolvente e a linha de solução, que são injetados simultaneamente. Até esta conexão o antissolvente e a solução orgânica fluem por

linhas separadas e a partir dela até a câmara de precipitação seguem pela mesma linha. Entretanto, a solução escoa por dentro do tubo capilar **(13)** e o antissolvente escoa por fora do tubo capilar e internamente a um tubo de aço inox com diâmetro de 1,58 mm;

(13) Tubo capilar de sílica fundida que faz com que ocorra a dispersão do jato da solução orgânica dentro da câmara de precipitação. Ele passa por dentro de um *PEEK Tubing* (diâmetro interno de 0,254 mm) ao qual está conectado em uma extremidade da união T **(12)** por um sistema de anilhas. Sua montagem requer extremo cuidado ao apertá-lo, de modo que seja o suficiente para não cair e também para não impedir (estrangular) a vazão da solução. Neste trabalho foi utilizado um capilar com diâmetro interno de 100 µm. A Figura 13 apresenta a conexão tipo T montada com o tubo capilar e *PEEK Tubing*.

Figura 15 - Sistema de montagem do capilar: (1) *PEEK Tubing* anilhado com o capilar; (2) Conexão tipo T; (3) Tubo inox por onde escoa o antissolvente; (4) Capilar de sílica fundida por onde escoa a solução orgânica



Fonte: BOSCHETTO (2013)

(14) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Ele está conectado à linha entre a válvula **(10)** e a câmara de precipitação (Transdutor absoluto – 0 a 250 bar, Marca SMAR, Modelo LD 301, Brasil);

(15) Entrada periférica onde está conectado um sensor de temperatura (termopar) ligado a um *display* de temperatura (Universal, Marca NOVUS, Modelo N 1500, Brasil);

(16) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, localizado na saída da câmara, para retenção das partículas precipitadas no seu interior, permitindo apenas o fluxo do antissolvente e solvente orgânico. Um filtro apresenta porosidade de 1 µm, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm que serve de base para o outro filtro membrana de porosidade 0,22 µm, espessura de 150 µm e mesmo diâmetro que o primeiro. A Figura 16 mostra a tampa da câmara de precipitação com o suporte de filtros.

Figura 16 - Tampa da câmara de precipitação mostrando o suporte onde o filtro é inserido

Fonte: do autor – LATESC, UFSC

(17) Banho ultratermostático de recirculação (Marca Nova Ética, Modelo 512/2D, Brasil), utilizado para controlar a temperatura da câmara de precipitação, através da sua ligação com a camisa da câmara;

(18) Válvula de regulagem de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (*Back Pressute Regulator*, Marca GO-Regulador, Série BP-66, Modelo 1A11QEQ151). Ela permite a regulagem da pressão independentemente da vazão, permitindo uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela;

(19) Bomba de HPLC digital Série III (Marca Acuflow), que é utilizada para deslocar a solução orgânica para a câmara de precipitação. Esta bomba possui um único pistão que permite operar em fluxo constante;

(20) Recipiente com a solução orgânica contendo o princípio ativo e o PHBV;

(21) Válvula métrica tipo agulha (Marca HOKE, Modelo 1315G2Y, Estados Unidos) que fica na saída da câmara de precipitação. Através desta válvula é possível controlar o fluxo de saída da câmara de precipitação, juntamente com a válvula **(10)**. A válvula **(21)** possui abertura um pouco maior que a válvula **(10)** para compensar o fluxo de entrada da solução, mantendo assim a pressão constante dentro da câmara de precipitação;

(22) Fita de aquecimento (200 W de potência, Marca FISATON, Modelo 5, Brasil) que envolve a válvula **(21)**. Sua utilização foi necessária em função do efeito Joule-Tomphson ser pronunciado pela expansão do antissolvente após esta válvula, congelando-a. Foi utilizada a temperatura de 200 °C na fita de aquecimento, impedindo, desta maneira, o congelamento da válvula e permitindo o controle do fluxo;

(23) *Trap* de segurança, preenchido com algodão, o que permitia observar a ocorrência de arraste dos princípios ativos quando o algodão apresentava alguma coloração. Do *trap* de segurança o antissolvente e o solvente orgânico se deslocavam para saída.

4.7.3 Funcionamento da Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento

O procedimento experimental utilizado para a precipitação e encapsulamento do extrato contendo astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV foi baseado no trabalho de FRANCESCHI (2009). O primeiro passo é o preparo da solução orgânica contendo o extrato carotenogênico e o polímero (PHBV), solubilizados em diclorometano como solvente orgânico nas proporções desejadas.

Em seguida, carregou-se ambas as bombas de alta pressão **(6 e 7)** com CO_2 proveniente do cilindro. Neste estudo foram utilizadas duas bombas de alta pressão, pois como o CO_2 precisa estar em fluxo contínuo, quando uma bomba está deslocando CO_2 para a câmara de precipitação a outra está sendo preenchida novamente pelo fluido.

O deslocamento do fluido do cilindro para a câmara interna de cada bomba se dá mantendo as válvulas **(1 a 4)** abertas. Apesar da pressão de vapor do CO_2 ser alta na temperatura ambiente (64 bar em 25 °C), a simples abertura da válvula do cilindro não é suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO_2 para a câmara das bombas. Desta maneira, para liquefazer a maior quantidade de CO_2 possível, a temperatura da camisa do cilindro das bombas foi ajustada em 7 °C com o auxilio do banho de recirculação **(5)** e o reservatório de CO_2 foi deixado aberto por um tempo variando de

30 min a 1 h. Nestas condições, geralmente era possível armazenar cerca de 500 mL de CO_2 no estado líquido dentro da câmara das bombas.

Enquanto ocorre a liquefação do CO_2 nas bombas, é realizada a montagem da câmara de precipitação. Assim, são montados cuidadosamente os sistemas de filtros de retenção, que têm a função de evitar que durante o experimento haja um deslocamento e posterior arraste do material precipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, foi colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade, servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. A tampa da câmara era fechada com auxílio de uma morsa e de uma chave feita especialmente para este fim (Figura 17), para posteriormente as outras conexões serem colocadas.

Figura 17 - Aparato utilizado na abertura/fechamento da câmara de precipitação

Fonte: do autor – LATESC, UFSC

Antes de conectar todas as entradas na câmara, outro passo importante realizado foi o ajuste da vazão e pressão da solução na bomba de HPLC. Nesta etapa, assim como também para limpeza da bomba após os experimentos, utilizou-se apenas diclorometano puro, evitando gastos desnecessários com solução contendo o princípio ativo. O ajuste da vazão da solução foi realizado diretamente no controlador da bomba. Já a pressão foi ajustada manuseando-se a válvula *Back pressure* **(18),** de modo a restringir a passagem do fluxo, aumentando a pressão até o valor de 2900 psi (200 bar) para evitar qualquer possibilidade de refluxo do antissolvente pela linha da solução. Após estabilizada pressão e vazão, a bomba de HPLC foi desligada para montagem da câmara.

Por fim, foram conectados, à tampa da câmara de precipitação, a linha de entrada de CO_2 e da solução, o sensor de temperatura e a linha de saída. Na sequência, a câmara foi conectada ao banho termostático **(17)**. Após a montagem da câmara, a válvula **(10)** foi gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO_2 na sua pressão de vapor em temperatura ambiente, mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Quando a câmara de precipitação estava preenchida com CO_2, a válvula **(10)** foi fechada e acionado o sistema de aquecimento, controlado pelo banho de recirculação **(17)**. O valor da temperatura desejada dentro da câmara foi ajustado pelo sensor (termopar), sendo esta monitorada pelo *display* de controle de temperatura.

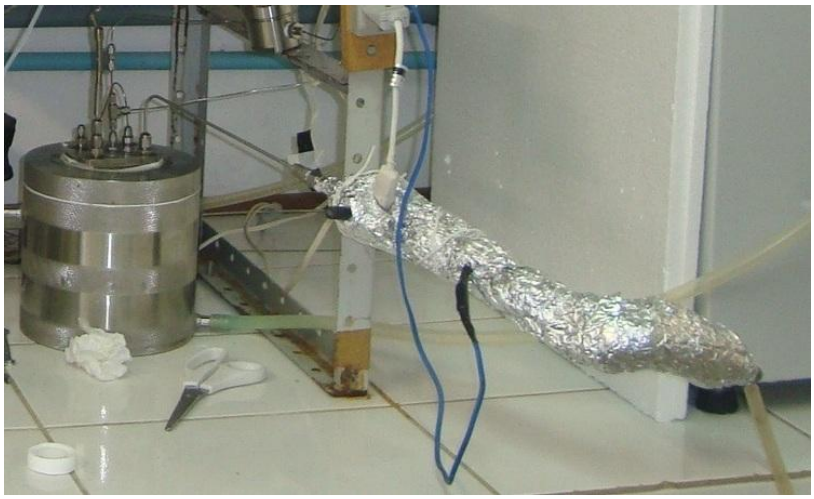
Ao longo do período de estabilização da temperatura no valor estipulado para o experimento, a válvula do reservatório de CO_2 e as válvulas **(1 a 4)** foram fechadas e a pressão elevada nas bombas pelo deslocamento do cilindro interno destas, pressurizando-se toda a linha desde as válvulas **(1 e 2)** até a válvula **(10)** na pressão de 200 bar, ou seja, entre as bombas e a câmara de precipitação. Este valor de pressão nas bombas foi estipulado para manter um alto diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de precipitação. Este diferencial de pressão teve como objetivo evitar possível refluxo da câmara de precipitação para as linhas, podendo causar precipitação do composto utilizado ou do polímero no interior das linhas e também para fazer com que o CO_2 entre em alta velocidade na câmara de precipitação, intensificando a dispersão do jato de solução durante os experimentos de precipitação (FRANCESCHI, 2009, citado por BOSCHETTO, 2013).

No momento em que a temperatura atingia o valor fixado para o experimento, a válvula **(10)** era novamente aberta, de forma gradual, de modo a permitir o fluxo de CO_2 para dentro da câmara até a obtenção da pressão experimental desejada. Uma vez que a pressão na câmara atingisse o valor desejado, a válvula **(21)** era gradualmente aberta, mantendo-se a válvula **(10)** ainda aberta, no sentido de ajustar o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. Neste momento também era possível regular a vazão de CO_2, que era mantida constante durante todo experimento.

Para controlar a pressão dentro da câmara foi realizado o ajuste através da válvula **(21)** e o monitoramento pelo *display* do controlador de pressão. Como dependendo da condição experimental havia um congelamento da válvula **(21)**, a

mesma foi envolta por uma fita de aquecimento e recoberta com lã de vidro e papel alumínio (Figura 18), e ligada ao controlador de temperatura. A temperatura foi mantida em 200 °C para evitar o bloqueio do fluxo neste ponto pelo congelamento.

Figura 18 - Válvula de controle da pressão interna da câmara envolta por uma fita de aquecimento e recoberta com lã de vidro e papel alumínio



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

Quando a temperatura e pressão estavam constantes o CO_2 era deixado fluir até alcançar o estado estacionário. O tempo necessário para alcançar este estado variou de 5 a 10 min dependendo da pressão e temperatura de precipitação. A partir do momento em que o fluxo de CO_2 entrava em regime estacionário se iniciava então a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação.

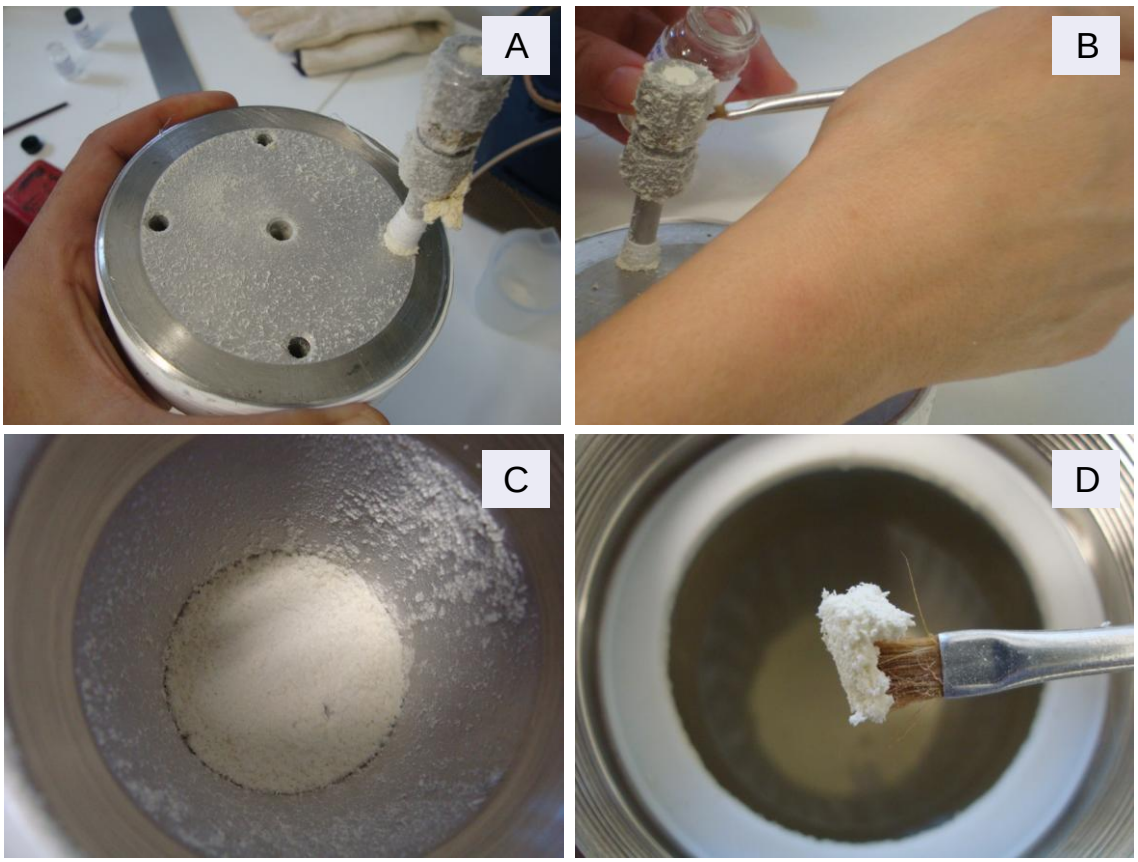
Em cada experimento o volume de solução orgânica adicionado à câmara foi de 45 mL. O volume foi fixado neste valor assumindo que a quantidade de sólido a ser precipitado era suficiente para a realização das análises de caracterização e eficiência de encapsulamento.

Após injetado o volume especificado da solução orgânica, a bomba de HPLC era desligada e o fluxo da solução interrompido. Neste momento, com a finalidade de "secar" as partículas precipitadas e retirar o solvente residual, o fluxo de CO_2 era mantido constante em 20 $mL.min^{-1}$ por aproximadamente 120 min, baseado em trabalhos na literatura que reportam tempos de secagem variando entre 30 e 120 min (KIM et al., 2007; KANG et al., 2008; HONG et al., 2009). Logo depois de realizada a "secagem" das partículas, o fluxo de CO_2 era interrompido pela válvula **(10)**, que era

mantida fechada. Iniciava-se então a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica por meio da abertura lenta da válvula **(21)**, evitando, desta maneira, o arraste de partículas. Este procedimento era realizado em torno de 40 min, mantendo-se a temperatura constante no valor estipulado.

Terminada a despressurização do sistema, a temperatura do experimento era diminuída através do banho **(17)** e em seguida eram desconectadas as linhas da câmara de precipitação. Na sequência, iniciava-se o procedimento de abertura da mesma para a retirada do material precipitado. As partículas precipitadas foram retiradas cuidadosamente e colocadas em frascos de 5 mL protegidos da luz. As amostras foram coletadas na parede, no fundo e na tampa da câmara de precipitação (Figura 19). A retirada foi realizada rapidamente para evitar ao máximo que as partículas absorvessem umidade e, posteriormente, foram armazenadas em freezer ao abrigo da luz e umidade.

Figura 19 - A – Tampa da câmara com partículas; B – Coleta; C – Partículas formadas na câmara; D – Partículas coletadas



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

4.7.4 Determinação do percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%)

Através de uma curva padrão previamente determinada do extrato contendo astaxantina na solução orgânica, foram realizados os cálculos de percentual (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%). Para uma apropriada determinação do processo de encapsulamento, as partículas foram submetidas a um processo de lavagem com a finalidade de remover algum material não encapsulado (princípio ativo), aderido na superfície externa das cápsulas, evitando desta forma que fosse contabilizado na eficiência de encapsulamento, interferindo no resultado real.

Assim, para a determinação do percentual de encapsulamento (PE%) e a eficiência de encapsulamento (EE%) uma amostra de astaxantina em PHBV (precipitada) foi pesada (entre 94 e 138 mg) utilizando uma balança analítica com uma precisão de 0,0001 g (Shimadzu, Modelo AY220, Japão) e adicionou-se 20 mL de etanol para remover o material não-encapsulado (astaxantina livre). O etanol foi usado como solvente de lavagem porque a astaxantina apresenta baixa solubilidade neste solvente, tornando possível remover o material não-encapsulado, sem provocar danos na parede do polímero (cápsulas). Os precipitados em soluções de etanol foram agitados manualmente durante cerca de 20 s, à temperatura ambiente (~25 ºC) e, em seguida, todas as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana com uma porosidade de 0,22 µm (Millipore, Modelo FGLP, Estados Unidos) em bomba de vácuo (Prismatec, Modelo 131B, Brasil).

Após a filtração, o material retido foi seco (De Leo, Modelo B5CBE, Brasil) a 35 ºC durante 24 h. Em seguida, o material seco foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, pois este tem a capacidade de dissolver a parede do polímero e liberar a solução realmente encapsulada. Esta solução foi analisada em espectrofotômetro (Femto, Modelo 800XI, Brasil) com a absorvância de 455 nm para astaxantina, que foi determinada por uma curva padrão para a solução. Comparando-se os resultados com uma curva padrão de absorvância vs concentração de astaxantina no solvente, o percentual de encapsulamento (PE%) e a eficiência de encapsulamento (EE%) de astaxantina em cada experimento foram determinados pelas Equações 5 e 6 (PRIAMO et al., 2010):

$$PE\ [\%] = \frac{massa\ de\ astaxantina\ encapsulada}{(massa\ de\ astaxantina\ +\ massa\ de\ PHBV)\ após\ filtração}\ x\ 100 \qquad (5)$$

$$EE\ [\%] = \frac{massa\ de\ astaxantina\ encapsulada}{percentual\ teórico\ de\ astaxantina\ encapsulada}\ x\ 100 \qquad (6)$$

4.7.5 Análise e caracterização das partículas obtidas

As partículas precipitadas foram analisadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME - UFSC), em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV, Estados Unidos), para determinar a forma e morfologia das partículas. O tamanho de partícula foi determinado utilizando o *software* Meter Size (versão 1.1).

Com relação às propriedades e caracterização do copolímero PHBV utilizado neste estudo, informações mais detalhadas podem ser encontradas no trabalho de FRANCESCHI (2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ruptura química com DMSO e extração com diferentes solventes

Os valores dos teores dos carotenoides totais para a biomassa de *H. pluvialis* cultivada em meio BBM e acetato de sódio, obtidos pela extração com éter de petróleo utilizando diferentes relações biomassa/DMSO, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Teores de carotenoides extraídos por éter de petróleo para diferentes relações biomassa/DMSO

Biomassa/DMSO ($g.mL^{-1}$)	Carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$)*
0,0025	$1568,13 \pm 25,48^{a}$
0,005	$1458,75 \pm 44,42^{b}$
0,015	$1447,62 \pm 6,92^{b}$
0,025	$1489,37 \pm 12,70^{b}$

* Letras minúsculas diferentes representam que há diferença significativa ($p<0,05$).

Conforme os dados da Tabela 6, a relação biomassa/DMSO de 0,0025 $g.mL^{-1}$ diferiu significativamente ($p<0,05$) das demais relações testadas, resultando na maior extração de carotenoides ($1568,13 \pm 25,48$ $\mu g.g^{-1}$), enquanto que as relações 0,005, 0,015 e 0,025 $g.mL^{-1}$ não diferiram entre si. Os resultados diferem daqueles encontrados por FONSECA et al. (2011), que testando as mesmas relações encontraram o valor de 0,025 $g.mL^{-1}$ como a melhor relação para extração de astaxantina a partir da biomassa de *Phaffia rhodozyma*.

Uma vez estabelecida a melhor relação biomassa/DMSO, foram testados diferentes solventes na extração dos carotenoides oriundos do cultivo da microalga *H. pluvialis.*

Os teores de carotenoides totais obtidos pela extração com diferentes solventes (acetona, diclorometano, éter de petróleo e hexano) usando relação biomassa/DMSO de 0,0025 $g.mL^{-1}$ estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Carotenoides totais obtidos com diferentes solventes

Solvente	Carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$)*
Acetona	1240,51 ± 7,79[d]
Diclorometano	1512,59 ± 2,70[b]
Éter de Petróleo	1568,13 ± 25,48[a]
Hexano	1343,17 ± 12,74[c]

* Letras minúsculas diferentes representam que há diferença significativa ($p<0,05$)

Através da análise dos valores da Tabela 7, pode-se observar que houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre os teores de carotenoides extraídos com diferentes solventes a partir da biomassa de *H. pluvialis.*

De acordo com os resultados, dos solventes testados, o éter de petróleo foi o solvente mais eficiente na extração dos pigmentos carotenoides da biomassa de *H. pluvialis*, obtendo-se 1568,13 ± 25,48 $\mu g.g^{-1}$ de carotenoides totais, enquanto que o diclorometano, o hexano e a acetona, que também mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si, apresentaram 1512,59 ± 2,70, 1343,17 ± 12,74 e 1298,41 ± 8,16 $\mu g.g^{-1}$ de carotenoides totais, respectivamente.

Estes resultados conferem com aqueles encontrados por FONSECA et al. (2011), que para extrair astaxantina a partir da biomassa obtida do cultivo da levedura *P. rhodozyma* também utilizaram o éter de petróleo como melhor solvente extrator.

Já OLIVEIRA et al. (2011), no estudo de diferentes solventes na extração de astaxantina e β-caroteno a partir de amostras de salmão, relataram que acetona a 80% foi o solvente mais eficiente dentre os testados.

PASSOS et al. (2007), na análise da eficiência de métodos de extração de carotenoides de fontes naturais, mencionam que os resultados encontrados demonstraram que para as biomassas das microalgas *H. pluvialis* e *Chlorella vulgaris* o método que utiliza éter de petróleo foi o mais eficiente na extração de astaxantina. Já para a extração de astaxantina a partir da biomassa da levedura *P. rhodozyma*, os autores relatam que a extração com acetona como solvente mostrou-se mais eficaz.

Apesar da extração com éter de petróleo ter resultado em maiores valores de carotenoides totais, na continuidade do trabalho optou-se por utilizar diclorometano como solvente na extração, pelo fato do PHBV utilizado no encapsulamento ser solúvel em diclorometano e, portanto, ser preparada uma solução contendo o princípio ativo e o

PHBV para a injeção na Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento (Figura 11, p. 49). O uso de outros solventes, não solubilizando o PHBV, poderia causar danos ao equipamento e comprometer a formação das nanocápsulas.

5.2 Estudo de diferentes técnicas de ruptura celular

5.2.1 Técnicas mecânicas de ruptura celular

Como pode ser observado através da análise dos dados mostrados na Tabela 8, a extratibilidade de carotenoides com a biomassa não submetida ao congelamento prévio antes da aplicação da técnica de ruptura celular não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) quando usadas as técnicas de ondas ultrassônicas (55,14%), ultrassom ruptor (56,08%) e imersão em nitrogênio líquido (51,98%). Em contrapartida, quando analisadas as concentrações de carotenoides, estas apresentaram diferenças significativas entre si ($p<0,05$), com valores de 812,14 $\mu g.g^{-1}$, 826,22 $\mu g.g^{-1}$ e 808,21 $\mu g.g^{-1}$, respectivamente, para as técnicas mencionadas.

Tabela 8 – Concentração e extratibilidade de carotenoides utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular

Técnica	Extratibilidade (%)		Carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$)	
	Congelamento			
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
1	61,55±1,54 ^{aB}	66,01±1,91 ^{aA}	906,67±4,47 ^{aB}	972,35±6,12 ^{aA}
2	47,56±1,49 ^{cA}	47,86±1,30 ^{cA}	693,25±5,46 ^{dB}	704,93±3,44 ^{eA}
3	55,14±1,71 ^{bA}	57,42±1,52 ^{bA}	812,14±6,80 ^{cB}	842,72±5,06 ^{bA}
4	56,08±0,90 ^{bA}	56,07±1,27 ^{bA}	826,22±6,13 ^{bA}	826,09±5,60 ^{cA}
5	51,98±0,38 ^{bA}	51,02±0,52 ^{cA}	808,21±0,65 ^{cA}	806,77±1,50 ^{dA}
Controle	27,53±0,34 ^{dA}	28,69±0,74 ^{dA}	405,86±4,68 ^{eB}	422,67±7,12 ^{fA}

1: Maceração com terra diatomácea; 2: Abrasão com pérolas de vidro; 3: Ondas ultrassônicas; 4: Ruptor ultrassônico; 5: Imersão em nitrogênio líquido; Controle: Extrações de carotenoides realizadas na ausência de técnicas de ruptura celular; Extratibilidade de carotenoides (EC); Carotenoides totais (CT); Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p>0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha, pelo teste t ($p>0,05$).

Já as técnicas de maceração com terra diatomácea (61,55% e 906,67 $\mu g.g^{-1}$) e abrasão com pérolas de vidro (47,56% e 693,25 $\mu g.g^{-1}$) mostraram diferenças significativas ($p<0,05$) entre si e em relação às demais técnicas estudadas, na extratibilidade e concentração de carotenoides, quando aplicadas na extração de carotenoides da biomassa não submetida ao processo de congelamento prévio.

A extração de carotenoides da biomassa submetida ao congelamento prévio antes da aplicação da técnica de ruptura celular, usando a técnica de maceração com terra diatomácea, resultou em uma elevada extratibilidade e concentração de carotenoides (66,01% e 972,35 $\mu g.g^{-1}$), diferindo estatisticamente das demais técnicas. O congelamento prévio das células para a aplicação da técnica de ruptura promoveu um aumento significativo ($p<0,05$) na concentração dos carotenoides quando usada a técnica de maceração com terra diatomácea. Este comportamento foi observado na maioria das técnicas aplicadas (maceração com terra diatomácea, abrasão com pérolas de vidro, ondas ultrassônicas), mostrando que o congelamento prévio influencia positivamente no processo de ruptura celular.

Os experimentos controle, em que a biomassa foi submetida ao processo de extração sem a etapa de ruptura celular, mostraram uma concentração de carotenoides de 405,86 e 422,67 $mg.g^{-1}$ e uma extratibilidade de carotenoides de 27,53 e 28,69%, na ausência e presença de congelamento prévio da biomassa, respectivamente. Este comportamento ocorreu provavelmente devido aos carotenoides produzidos pela microalga *H. pluvialis* terem uma forte ligação intracelular, mostrando a necessidade de um rompimento eficaz da parede das células, devido à alta rigidez da parede celular do micro-organismo do estudo.

5.2.2 Caracterização dos preparados enzimáticos

Nesta etapa foram testados 3 preparados enzimáticos comerciais, verificando as atividades das respectivas enzimas majoritárias, a fim de verificar qual enzima possuía maior atividade nos preparados comerciais, e por consequência, uma maior possibilidade de atuar na ruptura da parede celular do micro-organismo em estudo. A Tabela 9 apresenta os resultados das enzimas majoritárias presentes nos produtos enzimáticos testados.

Tabela 9 – Atividades das enzimas majoritárias presentes nos preparados enzimáticos comerciais

Preparado enzimático comercial	Enzima	Atividade enzimática ($U.g^{-1}$)
Glucanex®	β-1,3-glucanase	31,50
	Protease	27,70
Lyticase®	β-1,3-glucanase	25,65
	Protease	23,42
Driselase®	β-1,3-glucanase	28,70
	Xilanase	28,81

De acordo com os dados apresentados na Tabela 9, o preparado comercial Glucanex® apresentou a maior atividade de β-1,3-glucanase (31,50 $U.g^{-1}$) e protease (27,70 $U.g^{-1}$). Como a β-1,3-glucanase estava presente em todos os preparados enzimáticos e tem papel fundamental na lise da parede celular, foi escolhida como

referência para o estudo da atividade enzimática nos planejamentos experimentais propostos a seguir.

5.2.3 Avaliação da atividade lítica dos preparados enzimáticos utilizando planejamento experimental fracionário

A Tabela 10 mostra a matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{4-1} com três repetições no ponto central para a atividade lítica relativa nos 3 preparados enzimáticos comerciais testados.

Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{4-1} em níveis reais e codificados (entre parênteses)

Ensaio	*X1*	*X2*	*X3*	*X4*	ALR 1	ALR 2	ALR 3
1	4,5 (-1)	35 (-1)	0,2 (-1)	30 (-1)	3,21	4,12	2,16
2	8,5 (1)	35 (-1)	0,2 (-1)	90 (1)	4,27	4,91	3,76
3	4,5 (-1)	55 (1)	0,2 (-1)	90 (1)	4,61	4,70	3,29
4	8,5 (1)	55 (1)	0,2 (-1)	30 (-1)	2,83	3,90	3,97
5	4,5 (-1)	35 (-1)	0,6 (1)	90 (1)	4,75	5,13	7,98
6	8,5 (1)	35 (-1)	0,6 (1)	30 (-1)	7,29	6,81	6,74
7	4,5 (-1)	55 (1)	0,6 (1)	30 (-1)	17,73	9,94	7,16
8	8,5 (1)	55 (1)	0,6 (1)	90 (1)	10,13	9,81	4,16
9	6,5 (0)	45 (0)	0,4 (0)	60 (0)	6,48	7,96	6,12
10	6,5 (0)	45 (0)	0,4 (0)	60 (0)	6,09	7,17	6,08
11	6,5 (0)	45 (0)	0,4 (0)	60 (0)	5,78	7,36	6,10

X1: pH do meio reacional; *X2*: Temperatura (°C); *X3*: Atividade inicial de β-1,3-glucanase ($U.mL^{-1}$); *X4*: Tempo de reação (min); ALR 1 (%): Atividade lítica relativa de Glucanex®; ALR 2 (%): Atividade lítica relativa Lyticase®; ALR 3 (%): Atividade lítica relativa de Driselase®.

Como pode ser observado, a atividade lítica relativa variou de 2,83% no ensaio 4 (pH 8,5, 55 ºC, 0,2 $U.mL^{-1}$ de atividade inicial de β-1,3-glucanase e 30 min) até 17,73% no ensaio 7 (pH 4,5, 55 ºC, 0,6 $U.mL^{-1}$ de atividade inicial de β-1,3-glucanase e 30 min) quando testado o preparado enzimático comercial Glucanex®. Já quando testado o preparado enzimático comercial Lyticase®, este apresentou uma variação de 3,90% no ensaio 4 (pH 8,5, 55 ºC, 0,2 $U.mL^{-1}$ de β-1,3-glucanase e 30 min) até 9,94%

no ensaio 7 (pH 4,5, 55 ºC, 0,6 U.mL^{-1} de β-1,3-glucanase e 30 min). Com relação ao preparado enzimático Driselase®, quando este foi testado, apresentou uma variação de 2,16% no ensaio 1 (pH 4,5, 35 ºC, 0,2 U.mL^{-1} de β-1,3-glucanase e 30 min) até 7,98% no ensaio 5 (pH 4,5, 35 ºC, 0,6 U.mL^{-1} de β-1,3-glucanase e 90 min).

A Tabela 11 apresenta os efeitos das variáveis independentes sobre a atividade lítica relativa do preparado enzimático Glucanex® na lise celular da microalga *H. pluvialis.*

Tabela 11 – Efeito principal das variáveis estudadas sobre a atividade lítica relativa de Glucanex®

Variável	Efeito (%)	Erro padrão	*t* (6)	*p**
Média	6,65	0,92	7,20	<0,01
X1	-1,44	2,16	-0,66	0,52
X2	3,94	2,16	1,82	0,11
X3	6,24	2,16	2,88	0,02
X4	-1,82	2,16	-0,84	0,43

X1: pH do meio reacional; *X2:* temperatura (ºC); *X3*: atividade inicial de β-1,3-glucanase (U.mL^{-1}); *X4*: tempo de reação (min); Nível de significância: *p<0,05.

Como pode ser observado na Tabela 11, a única variável que apresentou efeito significativo (p<0,05) na atividade lítica relativa, exercendo influência na lise enzimática, foi a atividade inicial de β-1,3-glucanase, que na passagem do nível -1 (0,2 U.mL^{-1}) para o +1 (0,6 U.mL^{-1}) causou um aumento na atividade lítica relativa de 6,24 %. As demais variáveis (pH do meio reacional, temperatura e tempo de reação), ao passarem do menor para o maior nível, não exerceram efeito significativo (p>0,05) sobre a atividade lítica relativa.

A Tabela 12 apresenta os efeitos das variáveis independentes sobre a atividade lítica relativa do preparado enzimático Lyticase® na lise celular da microalga *H. pluvialis.*

Tabela 12 – Efeito principal das variáveis estudadas sobre a atividade lítica relativa de Lyticase®

Variável	Efeito (%)	Erro padrão	*t* (6)	*p**
Média	6,52	0,46	13,95	<0,01
X1	0,38	1,09	0,35	0,73
X2	1,84	1,09	1,68	0,14
X3	3,51	1,09	3,20	0,01
X4	-0,05	1,09	-0,05	0,96

X1: pH do meio reacional; *X2:* temperatura (ºC); *X3*: atividade inicial de β-1,3-glucanase ($U.mL^{-1}$); *X4*: tempo de reação (min); Nível de significância: *p<0,05.

Através da análise da Tabela 12, pode-se verificar que na passagem do nível inferior (0,2 $U.mL^{-1}$) para o superior (0,6 $U.mL^{-1}$) a única variável que mostrou efeito significativo (p<0,05) na atividade lítica relativa, exercendo influência na lise enzimática, foi a atividade inicial de β-1,3-glucanase, causando um aumento na atividade lítica relativa de 3,51% para o preparado comercial Lyticase®. A temperatura, o pH e o tempo de reação não tiveram efeito significativo (p>0,05), sendo que a mudança do menor nível para o maior não provocou alteração significativa na atividade lítica relativa.

A Tabela 13 apresenta os efeitos das variáveis independentes sobre a atividade lítica relativa de β-1,3-glucanase do preparado enzimático Driselase® na lise celular da microalga *H. pluvialis.*

Tabela 13 – Efeito principal das variáveis estudadas sobre a atividade lítica relativa de Driselase®

Variável	Efeito (%)	Erro padrão	*t* (6)	*p**
Média	5,22	0,42	12,18	<0,01
X1	-0,49	1,00	-0,48	0,64
X2	-0,51	1,00	-0,51	0,62
X3	3,21	1,00	3,19	0,01
X4	-0,21	1,00	-0,20	0,84

X1: pH do meio reacional; *X2:* temperatura (ºC); *X3*: atividade inicial de β-1,3-glucanase ($U.mL^{-1}$); *X4*: tempo de reação (min); Nível de significância: *p<0,05.

Também pela análise dos dados da Tabela 13, a passagem do nível inferior (0,2 $U.mL^{-1}$) para o superior (0,6 $U.mL^{-1}$) da atividade inicial de β-1,3-glucanase foi a única variável que apresentou efeito significativo ($p<0,05$), causando um aumento na atividade lítica relativa de 3,21% para o preparado comercial Driselase®. Já as demais variáveis não apresentaram efeito significativo ($p<0,05$) sobre a atividade lítica relativa.

A melhor condição obtida neste trabalho para lise celular foi encontrada utilizando o preparado enzimático Glucanex® a 55 °C, pH 4,5, após 30 min de reação com 0,6 $U.mL^{-1}$ de atividade inicial de β-1,3-glucanase, descrita no Ensaio 7 (Tabela 10), resultando em uma atividade lítica relativa de 17,73%. Segundo FLEURI e SATO (2005), a enzima β-1,3-glucanase proveniente do fungo *Trichoderma harzianum* tem sua temperatura ótima de atividade em 55 ºC e pH 4,5, mas a protease produzida por este micro-organismo tem a temperatura ótima de 40 ºC e pH 8,0 (MARCO; FELIX, 2002). Embora a lise enzimática ocorra por ação conjunta das enzimas protease e β-1,3-glucanase (FLEURI; SATO, 2005), a condição de pH e de temperatura para a lise da parede celular de *H. pluvialis* neste estudo corresponde ao ótimo do pH e da temperatura da enzima β-1,3-glucanase.

Nos últimos anos, a lise enzimática de microalgas vem ganhando um vasto campo de aplicação na obtenção de compostos intracelulares de alto valor. Diferentes métodos de ruptura celular, tais como lise enzimática por snailase, lise enzimática por lisozima e lise enzimática por celulase têm sido aplicados na obtenção de lípidos produzidos pela microalga *Chlorella vulgaris* (ZHENG et al., 2011).

Segundo MENDES-PINTO et al. (2001), são exemplos de produtos intracelulares de alto valor a astaxantina obtida a partir do cultivo de *H. pluvialis*, ácidos orgânicos de cadeia longa e proteínas de uma variedade de espécies que exigem técnicas de ruptura celular para que possam ser liberados (ERIKSEN, 2008; BELARBI, MOLINA; CHISTI, 2000; CERON et al., 2008; GRIMA et al., 2003).

Com a habilidade do composto enzimático comercial Glucanex® de atuar na lise enzimática da parede celular da microalga *H. pluvialis* demonstrada neste estudo, visualiza-se uma ampliação nos campos de aplicação da lise enzimática da biomassa microalgal para a obtenção de extratos carotenogênicos e outros bioprodutos de interesse comercial.

5.2.4 Lise enzimática assistida por ultrassom

A Tabela 14 apresenta o percentual de extratibilidade e os carotenoides totais empregando lise enzimática e lise enzimática assistida por ultrassom da biomassa submetida ou não ao processo térmico de congelamento.

Tabela 14 - Médias ± desvios padrões da extratibilidade (%) e de carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$), utilizando diferentes técnicas enzimáticas de ruptura celular na biomassa submetida ou não ao processo de congelamento

Ensaio	Ruptura	Congelamento	EC (%)	CT ($\mu g.g^{-1}$)
1	Lise Enzimática	Sem	$79,34 \pm 2,71^{b}$	$1173,54 \pm 6,25^{c}$
2	Lise Enzimática	Com	$81,34 \pm 1,85^{ab}$	$1198,74 \pm 3,13^{b}$
3	Lise Enzimática + Ultrassom	Sem	$83,90 \pm 1,84^{ab}$	$1235,89 \pm 5,41^{a}$
4	Lise Enzimática + Ultrassom	Com	$85,06 \pm 2,05^{a}$	$1253,26 \pm 2,52^{a}$
5	Controle	Sem	$34,20 \pm 1,65^{c}$	$503,63 \pm 16,97^{e}$
6	Controle	Com	$36,16 \pm 1,24^{c}$	$532,59 \pm 7,35^{d}$

EC: Extratibilidade de carotenoides; CT: Carotenoides totais; Controle: Extrações de carotenoides realizadas na ausência de técnicas de ruptura celular; Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p>0,05$).

Com relação às técnicas de ruptura celular da microalga *H. pluvialis* empregando lise enzimática com preparado enzimático comercial Glucanex®, observa-se na Tabela 14 que o maior valor de extratibilidade e de carotenoides totais (85,06% e 1253,26 $\mu g.g^{-1}$) foi verificado empregando a lise enzimática assistida por ondas de ultrassom na presença da etapa de congelamento da biomassa (Ensaio 4). Entretanto, este ensaio não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparado com o ensaio que não traz a etapa de congelamento (Ensaio 3).

Este mesmo comportamento foi observado na lise enzimática sem a aplicação assistida de ondas ultrassônicas, onde o congelamento prévio (Ensaio 2) não afetou a extratibilidade de carotenoides quando comparado ao mesmo ensaio sem a presença de congelamento (Ensaio 1), porém promoveu um aumento significativo de cerca de 2% nos carotenoides totais em relação ao Ensaio 1.

Já o uso de ondas ultrassônicas em conjunto com a lise enzimática sobre a biomassa não submetida ao processo de congelamento (Ensaio 3) provocou um aumento de 5% nos carotenoides totais comparado com a técnica de lise enzimática aplicada na biomassa não submetida ao congelamento (Ensaio 1). O mesmo comportamento foi

observado na biomassa submetida ao congelamento, comparando o Ensaio 4 e o Ensaio 2. Resultados semelhantes já haviam sido observados nos experimentos mecânicos de ruptura celular, onde a aplicação de ondas ultrassônicas apresentou um aumento (~3.97%) nos carotenoides totais, como pode ser observado na Tabela 8.

Resultados semelhantes também foram observados por MICHELON et al. (2012) ao estudarem a lise enzimática assistida por ultrassom da parede celular da levedura também produtora de carotenoides *P. rhodozyma*. Utilizando um preparado enzimático com atividade inicial de β-1,3-glucanase de 0,6 $U.mL^{-1}$, foi mencionado pelos autores um aumento na extratibilidade e nos carotenoides totais de cerca de 12%, quando comparado a não utilização do ultrassom durante a reação enzimática.

Portanto, a partir dos ensaios realizados com ruptura enzimática, ficou evidenciado que a operação de congelamento prévio da biomassa de *H. pluvialis* poderia ser eliminada, para fins de minimização de custos energéticos do processo, utilizando somente a aplicação de ondas ultrassônicas.

5.2.5 Técnicas combinadas de ruptura celular

Com a finalidade de aumentar a extratibilidade de carotenoides, realizou-se a ruptura da parede celular da microalga *H. pluvialis* utilizando duas técnicas combinadas, envolvendo os métodos que apresentaram os melhores resultados nas rupturas mecânica e enzimática.

A técnica combinada 1 envolveu a maceração da biomassa congelada com terra diatomácea seguida de lise enzimática. A técnica combinada 2 envolveu a associação entre a técnica de maceração com terra diatomácea combinada com lise enzimática assistida por ultrassom, e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Médias ± desvios padrões da extratibilidade (%) e de carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$), utilizando as técnicas de maceração com terra diatomácea, lise enzimática assistida por ultrassom e combinação de ambas

Técnica	EC (%)	CT ($\mu g.g^{-1}$)
Maceração com terra diatomácea	66,01±1,91 [c]	972,35±6,12 [d]
Lise Enzimática + Ultrassom	83,90±1,84 [b]	1235,89±5,41 [c]
Maceração com terra diatomácea + Lise enzimática[1]	93,83±2,39 [a]	1382,12±12,81 [b]
Maceração com terra diatomácea + Lise enzimática + Ultrassom[2]	92,71±2,61 [a]	1365,74±12,42 [b]
DMSO	-	1437,81±32,63 [a]

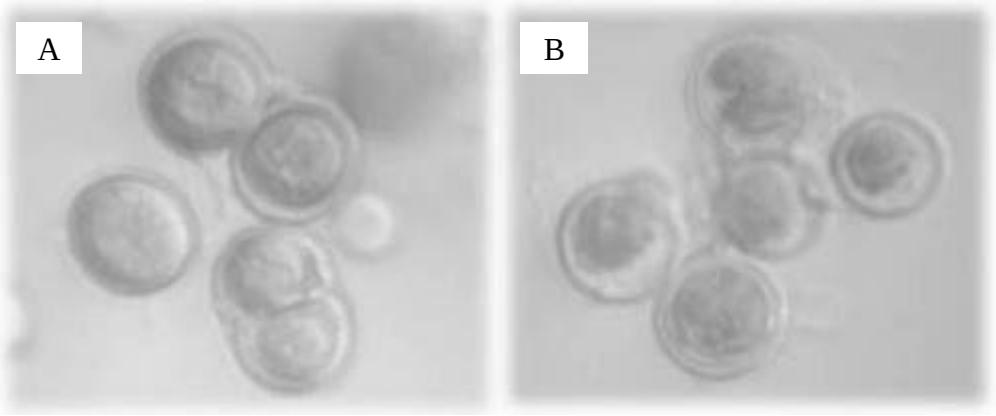
Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p>0,05$). EC: Extratibilidade de carotenoides; CT: carotenoides totais.

Como mostram os dados apresentados na Tabela 15, as técnicas combinadas 1 e 2 não apresentaram diferenças significativas entre si ($p>0,05$) no que se refere à extratibilidade e carotenoides totais, não havendo a necessidade do uso de ultrassom quando técnica mecânica e enzimática são aplicadas conjuntamente.

Desta forma, com a técnica combinada 1, envolvendo maceração com terra diatomácea e lise enzimática, atingiu-se extratibilidade de 93,83% e carotenoides totais de 1382,12 $\mu g.g^{-1}$. Por outro lado, ambas técnicas diferiram significativamente ($p<0,05$) das técnicas mecânica (maceração com terra diatomácea) e enzimática (lise enzimática assistida por ultrassom), tanto com relação à extatibilidade quanto aos carotenoides totais.

A Figura 20 apresenta as células de *H. pluvialis* antes e após a aplicação do processo de ruptura celular através da técnica combinada de maceração com terra diatomácea associada com lise enzimática. Pode-se observar que antes da aplicação da técnica de ruptura (a) as paredes das células mostram-se intactas. Por outro lado, após ser aplicado o processo de ruptura (b), pode-se notar uma clara destruição da parede celular, o que facilita a extração do composto intracelular de interesse.

Figura 20 - Microscopia óptica das células de *H. pluvialis* antes (a) e após (b) o processo de ruptura celular através da técnica combinada entre maceração com terra diatomácea associada com lise enzimática



Fonte: do autor – LEB, FURG (Aumentado 100 x)

5.3 Tecnologia supercrítica para obtenção de nanocápsulas contendo astaxantina

A Tabela 16 apresenta os resultados para o tamanho médio de partícula (X), tamanho mínimo de partícula (X_{min}), tamanho máximo de partícula (X_{max}), desvio padrão (σ), coeficiente de variação (VC), percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%) dos ensaios de coprecipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* e PHBV, obtida por lise enzimática assistida por ultrassom.

Pela análise dos dados de coprecipitação apresentados na Tabela 16, pode-se perceber uma tendência de redução do tamanho de partícula, com o aumento da pressão, passando da faixa de 0,150 a 0,800 μm (Ensaio 2) para 0,106 a 0,364 μm (Ensaio 4). Este comportamento também foi observado quando foi utilizado o extrato obtido sem ruptura da parede celular (Apêndice A), com valores de 0,164-0,380 μm (80 bar) para 0,052-0,269 μm (100 bar).

Segundo COCERO e FERRERO (2002), a expansão volumétrica da fase líquida é diretamente dependente das condições operacionais de temperatura e pressão adotadas no experimento, e uma influencia na outra de modo que exista uma expansão apropriada. Desta maneira, com valores de pressão combinados com valores de temperatura, a mistura (solvente orgânico + antissolvente) deve precipitar quando a solução se encontra na região de fase única do diagrama de fases (CORAZZA et al.,

2003), onde um aumento no valor da pressão influencia diretamente sobre o tamanho e a morfologia das partículas formadas.

Tabela 16 – Resultados do tamanho médio de partícula (X), tamanho mínimo de partícula (X_{min}), tamanho máximo de partícula (X_{max}), desvio padrão (σ), coeficiente de variação (VC), percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%) obtidos dos ensaios de precipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV

Ensaio	X (μm)	X_{min} (μm)	X_{max} (μm)	σ (μm)	CV (%)	PE (%)	EE (%)
1[a]	-	-	-	-	-	6,25	23,78
2[a]	0,396	0,150	0,800	0,012	3,03	7,28	29,97
3[a]	0,228	0,157	0,406	0,063	27,63	17,06	51,21
4[b]	0,224	0,106	0,364	0,050	22,32	5,29	26,43
5[b]	-	-	-	-	-	7,57	26,47
6[b]	-	-	-	-	-	11,05	33,14

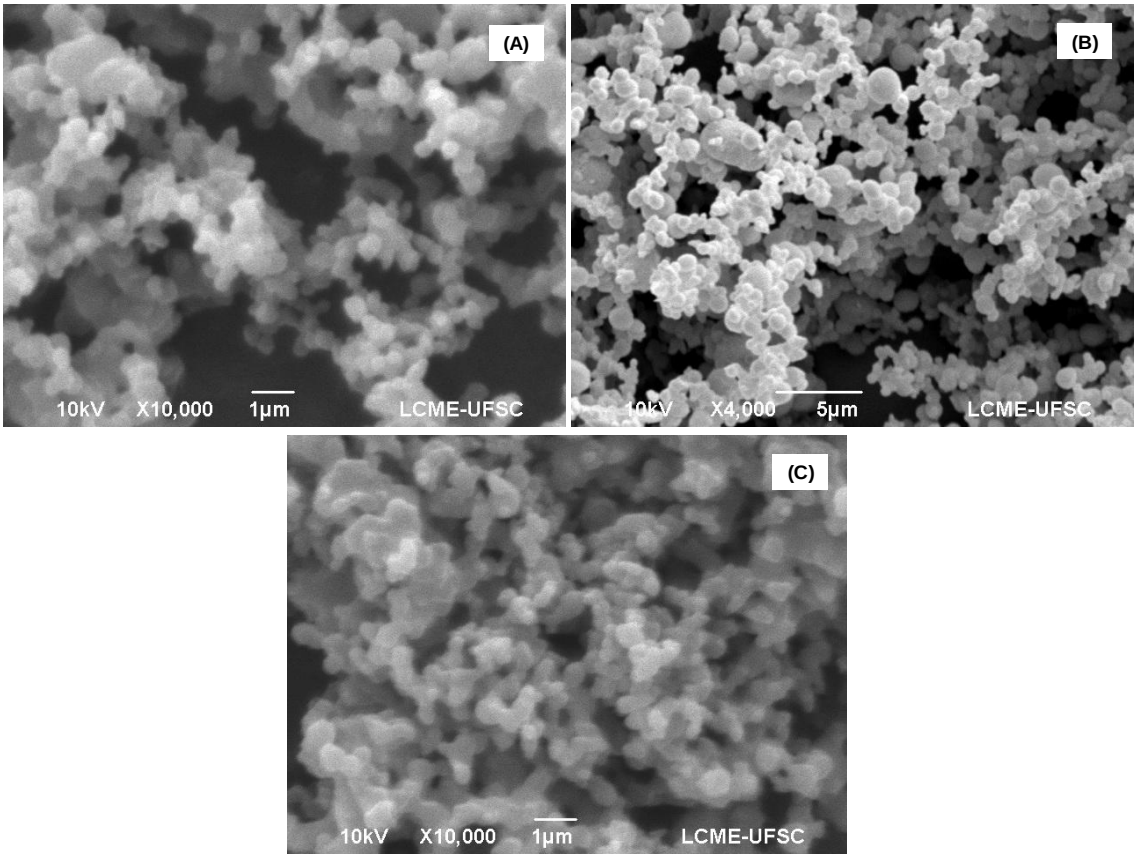
Condições experimentais: 35 ºC, vazão de solução a 1 $mL.min^{-1}$, vazão de antissolvente a 20 $mL.min^{-1}$, relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano: experimentos 1 e 4 (5 $mg.mL^{-1}$), experimentos 2 e 5 (8 $mg.mL^{-1}$), experimentos 3 e 6 (10 $mg.mL^{-1}$), concentração de PHBV na solução orgânica (20 $mg.mL^{-1}$); Experimentos 1, 5 e 6 formaram partículas, mas as partículas formadas não apresentavam formato esférico, impossibilitando a determinação do diâmetro das mesmas. [a] 80 bar; [b] 100 bar.

Os resultados para os tamanhos de partículas obtidos neste trabalho pela coprecipitação da astaxantina produzida por *H. pluvialis* e PHBV são semelhantes aos encontrados por TACHAPRUTINUM et al. (2009), que relatam tamanhos de partículas de 0,312 µm quando estudaram a prevenção da degradação térmica de astaxantina comercial encapsulada no polímero poli(óxido de etileno)-4-metoxicina tereftaloila quitosana (PCPLC), poli(vinil-álcool-co-vinil-4-methoxicinnamato) (PB4) e etilcelulose (EC). HONG et al. (2009), estudando a precipitação de astaxantina produzida por *H. pluvialis* com fluidos supercríticos, encontraram valores de tamanho de partícula entre 0,5-3 µm em condições experimentais de 200 bar e 35 ºC. HIGUERA-CIAPARA et al. (2004), ao estudarem o microencapsulamento de astaxantina em matriz de quitosana, encontraram microcápsulas com tamanhos não homogêneos e diâmetros de 5-50 µm.

A Figura 21 mostra as microscopias eletrônicas da coprecipitação de astaxantina produzida por *H. pluvialis* em PHBV, nos valores de pressão de 80 e 100

bar, mantendo-se fixo a concentração de PHBV na solução orgânica (20 $mg.mL^{-1}$), temperatura de 35 ºC, vazão de solução em 1 $mL.min^{-1}$ e vazão de antissolvente em 20 $mL.min^{-1}$.

Figura 21 - Microscopias eletrônicas de varredura da coprecipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV. (A) 80 bar e 8 $mg.mL^{-1}$ de relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano com aumento de 10.000 vezes; (B) 80 bar e 10 $mg.mL^{-1}$ relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano com aumento de 4.000 vezes, (C) 100 bar e 5 $mg.mL^{-1}$ de relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano com aumento de 10.000 vezes



Fonte: do autor – LCME, UFSC

Pode-se observar, portanto, a formação de partículas de morfologia esférica o que, segundo REVERCHON et al. (2008), representa uma vantagem, pelas amplas possibilidades de aplicação industrial deste tipo de partícula.

Com relação aos valores encontrados para o coeficiente de variação (CV), estes foram similares aos obtidos por PRIAMO et al. (2010) (25-59%), que estudaram a precipitação e o encapsulamento de β-caroteno em PHBV usando a mesma técnica.

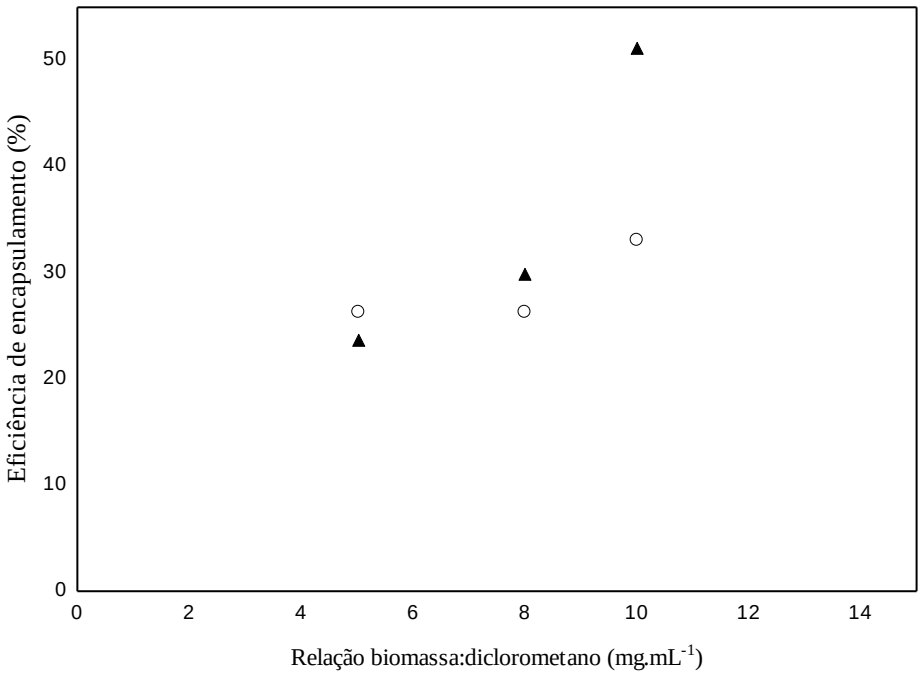
No que refere ao percentual de encapsulamento (PE%) e a eficiência de encapsulamento (EE%), verificou-se que o melhor resultado foi obtido com pressão de 80 bar e relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano de 10 $mg.mL^{-1}$, atingindo 17,06% e 51,21%, respectivamente (Tabela 16). Estes valores foram ligeiramente superiores aos encontrados quando utilizado o extrato obtido sem ruptura celular (Apêndice A), quando foram obtidos valores de 16,07% de percentual de encapsulamento e 48,25% de eficiência de encapsulamento.

MEZZOMO et al. (2012), ao estudarem o encapsulamento de astaxantina extraída de resíduos de camarão rosa, obtiveram uma eficiência de encapsulamento de 42±2% com o uso da técnica Antissolvente Supercrítico (SAS) sob condições experimentais de 120 bar e 35 ºC.

SANTOS et al. (2012) reportam o encapsulamento de caroteno e licopeno suspensos em meio aquoso e que foram produzidos por extração com solvente orgânico a partir das gotículas de uma emulsão de óleo-em-água com CO_2 supercrítico, resultando em partículas de tamanho final de 0,344–0,366 µm, e uma eficiência de encapsulamento com uma variação entre 34-89%.

A Figura 22 ilustra melhor a influência da pressão e da relação biomassa:diclorometano na eficiência de encapsulamento, podendo-se observar que o aumento da relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano resultou em aumento da eficiência de encapsulamento (EE%), para ambas as pressões, fato este também observado para o extrato obtido sem ruptura celular (Apêndice A).

Figura 22 - Influência da relação biomassa contendo astaxantina sobre a eficiência de encapsulamento (EE%), com o extrato obtido por lise enzimática assitida por ultrassom. ▲80 bar; ○100 bar (as outras condições experimentais são mostradas na Tabela 16)



6. CONCLUSÕES

Através deste estudo, que teve como objetivo geral desenvolver tecnologia para ruptura celular, extração e encapsulamento de astaxantina produzida por *H. pluvialis*, foi possível chegar as seguintes conclusões:

- Entre os solventes testados no método de ruptura química, o diclorometano foi o selecionado para a extração dos pigmentos carotenoides da biomassa de *H. pluvialis*, (1512,59 ± 2,70 $\mu g.g^{-1}$), uma vez que o tanto o princípio ativo quanto o biopolímero são solúveis neste solvente;
- Entre as técnicas mecânicas de ruptura celular testadas, a maceração da biomassa congelada com terra diatomácea foi a que apresentou os mais elevados valores de extratibilidade e carotenoides totais (66,01 ± 1,91% e 972,35 ± 6,12 $\mu g.g^{-1}$);
- Submeter a biomassa ao congelamento prévio antes da aplicação da ruptura celular tornou mais eficiente o processo de extração dos carotenoides para algumas técnicas de ruptura celular (maceração com terra diatomácea, abrasão com pérolas de vidro e ondas de ultrassom), mostrando que este procedimento pode contribuir no processo de ruptura celular;
- Na avaliação de três preparados enzimáticos comerciais (Driselase®, Glucanex® e Lyticase®), quanto à atividade lítica relativa sobre a parede celular de *H. pluvialis*, verificou-se que a única variável do processo que apresentou efeito significativo (positivo) foi a atividade inicial de β-1,3-glucanase, tendo sido observado melhor desempenho do preparado Glucanex®;
- Com o preparado enzimático comercial Glucanex®, a melhor condição de lise enzimática da parede celular da microalga *H. pluvialis* ocorreu em pH do meio reacional de 4,5 a 55 °C, com atividade inicial de β-1,3-glucanase de 0,6 $U.mL^{-1}$ durante 30 min, alcançado 17,73% de atividade lítica relativa e apresentando 81,34±1,85% de extratibilidade e 1198,74±3,13 $\mu g.g^{-1}$ de carotenoides totais;
- A lise enzimática assistida por ultrassom sem congelamento prévio da biomassa resultou em 83,90±1,84% de extratibilidade e 1235,89±5,41 $\mu g.g^{-1}$ de carotenoides totais;
- Entre as técnicas combinadas testadas, a maceração da biomassa congelada com terra diatomácea associada à lise enzimática apresentou valores de extratibilidade e carotenoides totais de, respectivamente, 93,83% e 1382,12 $\mu g.g^{-1}$;

- Nos experimentos de coprecipitação e encapsulamento ficou evidenciado que um aumento na pressão resulta na diminuição do tamanho das partículas obtidas;
- Um aumento na relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano na etapa de extração, com um correspondente aumento na concentração de astaxantina na solução orgânica, resultou num aumento do percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%), para ambas pressões testadas, atingindo-se 17,06% de percentual de encapsulamento e 51,21% de eficiência de encapsulamento, na condição de 80 bar e 10 $mg.mL^{-1}$ de relação biomassa:diclorometano. Nestas condições foram obtidas partículas com morfologia esférica e diâmetro médio de 0,228 µm (0,157 a 0,406 µm).

Com base no anteriormente exposto, tem-se como principal contribuição do presente trabalho a comprovação da habilidade de enzimas comerciais, notadamente Glucanex®, em romper a parede celular da microalga *H. pluvialis*, com a possibilidade de combinação com outras técnicas como ultrassom e maceração com terra diatomácea, bem como a comprovação de que a técnica SEDS permite a obtenção de partículas em escala nanométrica, pela coprecipitação destes extratos contendo astaxantina com PHBV. Desta forma, vislumbra-se uma aplicação destas técnicas, para obtenção de bioprodutos intracelulares de microalgas de importância comercial e seu encapsulamento.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o cultivo de *H. pluvialis* em batelada alimentada com diferentes fontes de carbono, visando aumentar a produção de astaxantina;
- Estudar outras faixas de pressão como variável nos experimentos de precipitação e encapsulamento;
- Estudar a estabilidade térmica tanto dos extratos carotenogênicos quanto das partículas precipitadas obtidas, bem como a estabilidade frente à intensidade luminosa;
- Estudar a liberação da astaxantina encapsulada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. 210 p. (Monografía n. 26). Universidade da Coruña, España, 1995.

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 & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 527-537, 2004.

AN, G. H.; SCHUMAN, D. B.; JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 116-124, 1989.

ARMSTRONG, G. A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 629-659, 1997.

AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. 20 f. (Monografia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BCC RESEARCH (2008). The global market for carotenoids (FOD025C). http://www.bccresearch.com. Acessado em 02 de março de 2014.

BELARBI, E. H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme Microbial Technology,** v. 26. p. 516–529, 2000.

BERTUCCO, A.; VETTER, G. **High pressure process technology: fundamentals and applications.** Industrial Chemistry Library. v. 9, Elsevier, Amsterdam, 2001.

BHOSALE, P.; Evironmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 63, p. 351-361, 2004.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. 157 p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BOSCHETTO, D. L. **Encapsulamento de extrato de semente de uva, astaxantina e bixina utilizando a técnica SEDS.** 142 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

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

BOUSSIBA, S.; FAN, L.; VONSHAK, A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis.* **Methods in Enzymology,** v. 213, p. 386-391, 1992.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p. 1077-1082, 1991.

BRITTON, G. General carotenoids. **Methods in Enzymology**, v. 111, p. 115-119, 1985.

CAMPOCOSÍO, A. T. Pigmentos a partir de leveduras. In: WAGNER, J. R.; RAMBALA, M. A. O.; LEGARRETA, I. G. **Las levaduras y sus productos como ingredientes en la industria de alimentos**. 1. ed. Bernal: Universidad Nacional de Quilmes Editorial, cap. 10, p. 181-193, 2008.

CANNIZZARO, C; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J.; SOTCKAR, U.V. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using 13C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. **Metabolic Engineering**. v. 6, p. 340-351, 2004.

CANTER-LUND, H.; LUND, J. W. G. **Freshwater algae: their microscopic world explored**. Bristol: Biopress Ltd., 1995. 360 p.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 61–71, 2001.

CAVALHEIRO, R.; RÖRIG, L.; FONTANA, J. D.; PESSATTI, M. Testes preliminares de crescimento com uma cepa da microalga produtora de astaxantina *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae,Volvocales). **Notas Técnicas da Facimar**, v. 3, p. 73-77, 1999.

CERON M. C.; CAMPOS, I.; SANCHEZ, J. F.; ACIEN, F. G.; MOLINA, E.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M. Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11761-11766, 2008.

CHIEN, Y. H.; PAN, C. H.; HUNTER, B. The resistance to physical stress by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. **Aquaculture**, v. 216, p. 177-191, 2003.

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

CHUMPOLKULWONG, N.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S.; NISHIO, N. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 83, n. 5, p. 429-424, 1997.

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

CHRISTOPHERSEN, A. G.; JUN, H.; JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin—quantum-yields dependence of

solvent, temperature, and wavelength of irradiation in relation to packaging and storage of carotenoid pigmented salmonoids. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v. 192, p. 433–439, 1991.

COCERO, M. J.; FERRERO, S. Crystallization of β-carotene by a GAS process in batch: effect of operating conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 237-245, 2002.

CORAZZA, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. High pressure phase equilibria of the related substances in the limonene oxidation in supercritical CO_2. **Journal of Chemical and Engineering**, v. 48, p. 354-358, 2003.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 358-362, 2009.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, cap. 2, p. 39-165, 1976.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**., v. 51, p. 2738–2749, 2010.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 249-252, 2004.

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

ELLIOT, A. M. Morphology and the life history of *Haematococcus pluvialis*. **Archive Protisten**, v. 82, p. 250-272, 1934.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 1-14, 2008.

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

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J. J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E., Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219 – 226, 2004.

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

FÉLIX, V. L. **Extraccion supercrítica de astaxantina de biodesechos de jaiba (*Callinectes sapidus*) con CO_2/etanol y su microencapsulado con quitosano**. Dissertação (Mestrado). Centro de Investigación em Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México, 1999.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.7, p.1165-1171, 2011.

FRANCESCHI, E. **Precipitação e encapsulamento de β-caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica**. 271 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C. U.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of ß-carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO_2. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008a.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β-carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO_2. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656-663, 2009.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M. H.; TRES, M. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxideas antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids,** v. 44, p. 8–20, 2008b.

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

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis.*** 178 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GOOD, B. H.; CHAPMAN, R. L. A comparison between the walls of *Haematococcus* cysts and the loricas of *Dysmorphococcus* and the possible presence of sporopollenin. **Journal of Phycology**, v. 15, p. 13-30, 1979.

GOODWIN, T. W. Functions of carotenoids. In Goodwin, T. W. (ed.). **The biochemistry of the carotenoids**. New York: Chapman and Hall, p. 77-85, 1980.

GOODWIN, T. W.; JAMIKORN, M. Studies in carotenogenesis: carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 376–381, 1953.

GREWE, C; MENGE, S; GRIEHL, C. Enatioselective separation of all-*E*-astaxanthin and its determination in microbial sources. **Journal of Chromatography A**, v. 1166, p. 97-100, 2007.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

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

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, p. 217-226, 2002.

HARKER, M.; TSAVALOS, A. J.; YOUNG, A. J. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis.* **Bioresource Technology**, v. 55, p. 207-214, 1996.

HE, P.; DUNCAN, J.; BARBER, J. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 447-451, 2007.

HE, W. Z.; SUO, Q. L.; HONG, H. L.; LI, G. M.; ZHAO, X. H.; LI, C. P.; SHAN, A. Supercritical antisolvent micronization of natural carotene by the SEDS process trough prefilming atomization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 2108-2115, 2006.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium sp*. e *Chlorella sp*.** 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 185-196, 2006.

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

HOEK, C. van den; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge University, 1995. 623 p.

HONG, H. L.; SUO, Q. L.; HAN, L. M.; LI, C. P. Study on precipitation of astaxantin in supercritical fluid. **Powder Technology**, v. 191, n. 3, p. 294-298, 2009.

HONG, L.; GUO, J. Z.; GAO, Y.; YUAN, W. K. Precipitation of microparticulate organic pigment powders by a supercritical antisolvent process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4882 – 4887, 2000.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.264-272, 2004.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology,** v. 11, p. 297-326, 1991.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p. 179-219, 2001.

KAEWPINTONG, K.; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 288–295, 2007.

KALOGIANNIS, C. G.; MICHAILOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of amixicilin in poli (L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 8738-8743, 2006.

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

KANG, Y.; YIN, G.; OUYANG, P.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X.; CHEN, A.; PU, X. Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 87–94, 2008.

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

KIM, M. S.; LEE, S.; PARK, J. S.; WOO, J. S.; HWANG, S. J. Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: effect of process parameters. **Powder Technology**, v. 177, p. 64–70, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAOMICHI, N.; NAGAI, S. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formatio in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n.1, p. 61-63, 1992.

KOBAYASHI, M.; KURIMURA, Y.; SAKAMOTO, Y.; TSUJI, Y. Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis.* **Biotechnology and Technology**, v. 11, p. 657-660, 1997.

LABABPOUR, A.; LEE, C-G. Simultaneous measurement of chlorophyll and astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by first-order derivative ultraviolet- visible spectrophotometry. **Journal of Biocience and Bioengineering**, v. 101, n. 2 p. 101-104, 2006.

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, p. 568-574, 2011.

LIU, Y. S.; WU, J. Y.; HO, K. P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 331-335, 2006.

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

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2006. 606 p.

MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO_2. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

MACHADO JR., F. R. S.; REIS, D. F.; OLIVEIRA, K. D.; TREVISOL, T. C.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. *Haematococcus pluvialis*: crescimento celular e extração de carotenoides com diferentes solventes. In: XlX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012, Búzios. **Anais...**Rio de Janeiro: UFRJ, 2012. p. 9526-9532.

MACIAS-SANCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ DE LA OSSA, E.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 245–251, 2005.

MALDONADE, I. R. **Produção de carotenoides por leveduras**. 119 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolated which controls cocoa plant witche's broom disease. **BMC Biochemistry**, v. 3, p. 1-7, 2002.

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 339–350, 2008.

MENDES-PINTO, M. M.; RAPOSO, M. F. J.; BOWEN, J.; YOUNG, A. J.; MORAIS, R. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus*

pluvialis: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 19-24, 2001.

MENDES-PINTO, M. M.; CHOUBERT, G.; MORAIS, R. Effect of dietary bile extracts on serum response of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a preliminar study. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, p. 353-357, 2004.

MEZZOMO, N.; PAZ, E.; MARASCHIN, M.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: effect of operational conditions on encapsulation efficiency, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 342-349, 2012.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n.1, p. 1-8, 2012.

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganism. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 491-551, 1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISAWA, N. Carotenoid biosynthesis at the gene level. In: OGURA, K.; SANKAWA, U. **Dynamic aspects of natural products chemistry: molecular biological approaches**. 1. ed. Tokyo: Kodansha, p. 49-94, 1997.

MONTEIRO, V. A. R.; DE SOUZA, E. F.; DE AZEVEDO, M. M. M.; GALEMBECK, F. Aluminum polyphosphate nanoparticles: preparation, particle size determination, and microchemistry. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 2, n. 217, p. 237-248, 1999.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133-148, 2010.

MORAIS, F. L. **Carotenoides: características biológicas e químicas**. 60 p. (Monografia do Curso de Qualidade em Alimentos). Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulation in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 3-19, 2001.

NALAWADE, S. P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L. P. B. M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 19–43, 2006.

NAGUIB, J. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1150-1154, 2000.

NAKAO, M.; SUMIDA, M.; KATANO, K.; FUKAMI, H. Enzymatic synthesis of astaxanthin n-octanoic acid esters. **Journal of Oleo Science**, v. 57, p. 371–374, 2008.

NOBRE, B.; MARCELO, F.; PASSOS, R. BEIRÃO, L.; PALAVRA, A.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 787-790, 2006.

OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387-2394, 1977.

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

OLIVEIRA, S. C.; CIRILO, A. T. O.; BASTOS, V. S.; AQUINO, A. C. M. S.; CASTRO, A. A.; NARAIN, N. Estudo da extração e estabilidade dos carotenoides em amostras de salmão (*Salmo salar*) cru resfriado e congelado durante o armazenamento. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-6, 2011.

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 and Biotechnology**, v. 86, p. 414–420, 2011.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 297, n. 2, p. 291-295, 1992.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xilose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.

PASSOS, R.; MORIEL, D. G.; LAGREZE, F.; GOUVEIA, L.; MARASCHIN, M.; BEIRÃO, L.H. Fontes naturais de carotenoides de interesse para a aqüicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, n. 1, p. 103-113, 2007.

PRIAMO, W. L.; CEZARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation and encapsulation of β-carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 103-109, 2010.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906 p., 2001. 906 p.

REIS, D. F. **Crescimento celular e produção de carotenoides pela microalga *Haematococcus pluvialis***. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

REVERCHON, E. Supercritical antisolvent precipitation of micro and nano-particles. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 15, p. 1–21, 1999.

REVERCHON, E.; ADAMI, R.; CAPUTO, G.; DE MARCO, I. Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: interpretation of results. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 70–84, 2008.

REVERCHON, E.; SPADA, A. Crystalline microparticles of controlled size produced by supercritical-assisted atomization. **Industrial Engineering Chemical Research**, v. 43, n. 6, p. 1460–1465, 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and Applied Phycology**. 1st Edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2004. 566 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, B. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: OMNI Research, ILSI Human Nutritional Institute, 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-SAIZ, M. R.; FUENTE, J. L.; BARRETO, J. L. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 645–658, 2010.

SAEKI, K.; IWATW, J.; YAMAZAKI, S.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification of a yeast lytic β-1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 407-412, 1994.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528-534, 2000.

SANDMANN, G. Production of carotenoid by gene combination in *Escherichia coli*. In: SHETTY, K.; PALIYATH, G.; POMETTO, A.; LEVIN, R. E. **Food biotechnology**. 2. ed. New York: CRC Press, p. 143-154, 2006.

SANTOS, D.T.; MARTÍN, A.; MEIRELES, M. A. A.; COCERO, M. J. Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 167-174, 2012.

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.

SCHMIDT, I.; SCHEWE, H.; GASSEL, S.; JIN, C.; BUCKINGHAM, J.; HUMBELIN, M.; SANDMAN, G.; SCHRADER, J. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 555-571, 2010.

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, p. 125-128, 2001.

SILVA, C. M.; BORBA. T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Carotenoids production by *Phaffia rhodozyma* using raw glicerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 4, article 18, 2012.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo.** 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

SWEENEY, J. P.; MARSH, A. C. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. **Journal of Nutrition**, v. 103, p. 20–25, 1973.

TACHAPRUTINUM, A.; UDOMSUP, T.; LUADTHONG, C.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, p. 119-124, 2009.

THAMMAKITI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; PHAESUWAN, T.; VERDUYN, C. Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 21-29, 2004.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 3-19, 2004.

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotecnologia: princípios biológicos**. Zaragoza: Acribia, 1990.

URICH, K. **Comparative animal biochemistry**. Germany: Springer, 1994. 782 p.

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

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TATSCH, P.O.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A.; LUCCIO, M.D. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 234-238, 2009b.

VENTOM, A.M.; ASENJO, J.A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 71-75, 1991.

VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. **Biomass**, v. 2, p.175-185, 1982.

WAGNER, J. R.; SCENI, P.; RAMBALA, M. A. O. Ruptura celular y fraccionamento de componentes de levadura. In: WAGNER, J. R.; RAMBALA, M. A. O.; LEGARRETA, I. G. **Las levaduras y sus productos como ingredientes en la industria de alimentos**. 1. ed. Bernal: Universidad Nacional de Quilmes Editorial, p. 215-214, 2008.

WANG, Y.; WANG, Y.; YANG, J.; PFEFFER, R.; DAVE, R.; MICHNIAK, B. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. **Powder Technology**, v. 164, p. 94-102, 2006.

WEIDNER, E. High pressure micronization for food applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 556-565, 2009.

XIÃO, A.; NI, H.; CAI, H.; LI, L.; SU, W.; YANG, Q. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2029-2034, 2009.

YUAN, J-P.; CHEN, F. Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3371-3375, 1998.

YUAN, J-P.; CHEN, F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Food Chemistry**, v. 68, p. 443-448, 2000.

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

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 1215-1224, 2011.

APÊNDICE A

A Tabela 1A, e as Figuras 1A, 2A e 3A apresentam os resultados obtidos referentes ao encapsulamento de astaxantina obtida pela extração direta com diclorometano sem ruptura celular.

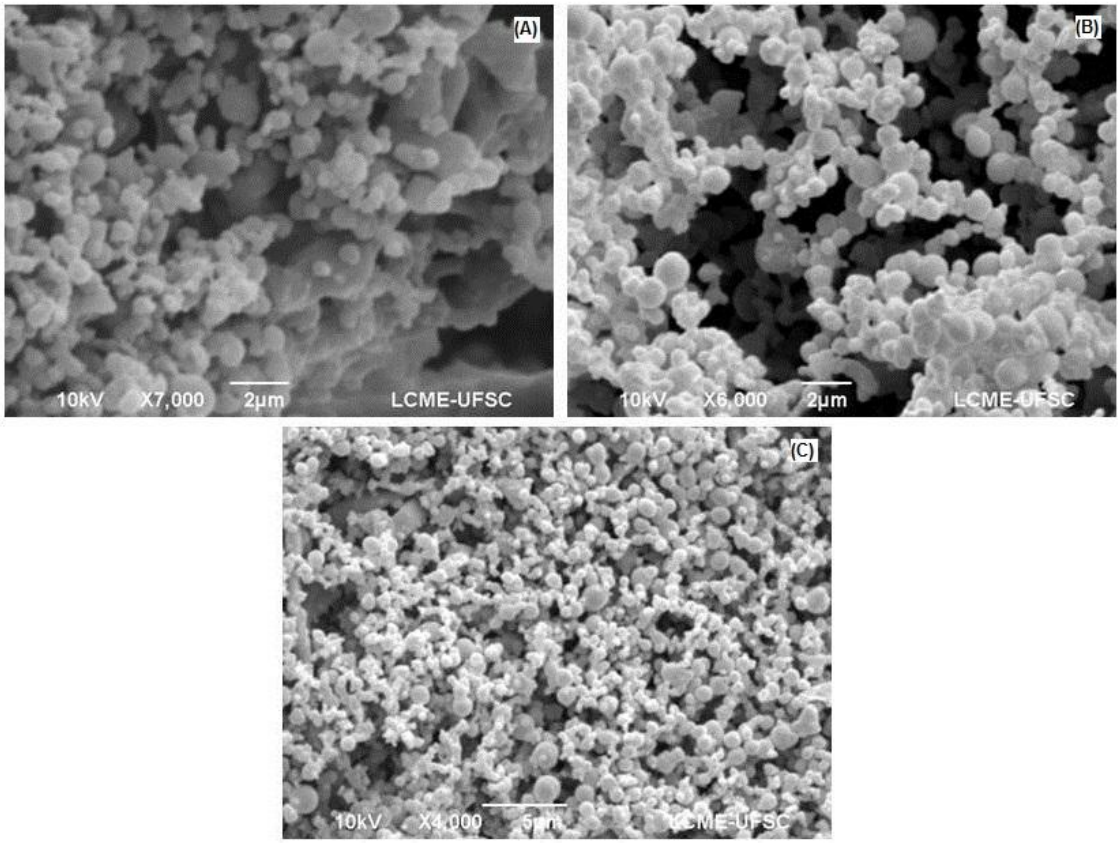
Uma discussão detalhada destes resultados pode ser encontrada no artigo: MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO_2. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

Tabela 1A - Resultados do tamanho médio de partícula (X), tamanho mínimo de partícula (X_{min}), tamanho máximo de partícula (X_{max}), desvio padrão (σ), coeficiente de variação (VC), percentual de encapsulamento (PE%) e eficiência de encapsulamento (EE%) obtidos dos ensaios de precipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV

Ensaio	X (μm)	X_{min} (μm)	X_{max} (μm)	σ (μm)	CV (%)	PE (%)	EE (%)
1[a]	-	-	-	-	-	4,31	21,55
2[a]	0,265	0,164	0,380	0,066	24,91	7,47	26,12
3[a]	0,197	0,034	0,650	0,123	62,44	16,07	48,25
4[b]	-	-	-	-	-	4,29	21,41
5[b]	0,128	0,052	0,269	0,041	32,03	5,97	20,93
6[b]	-	-	-	-	-	12,18	36,55

Condições experimentais: 35 ºC, vazão de solução a 1 $mL.min^{-1}$, vazão de antissolvente a 20 $mL.min^{-1}$, relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano: experimentos 1 e 4 (5 $mg.mL^{-1}$), experimentos 2 e 5 (8 $mg.mL^{-1}$), experimentos 3 e 6 (10 $mg.mL^{-1}$), concentração de PHBV na solução orgânica (20 $mg.mL^{-1}$); Experimentos 1, 4 e 6 formaram partículas, mas as partículas formadas não apresentavam formato esférico, impossibilitando a determinação destas partículas formadas. [a] 80 bar; [b] 100 bar.

Figura 1A - Microscopias eletrônicas de varredura da coprecipitação de astaxantina produzida pela microalga *H. pluvialis* em PHBV. (A) 80 bar e 8 mg.mL^{-1} de relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano com aumento de 7.000 vezes; (B) 80 bar e 10 mg.mL^{-1} relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano com aumento de 6.000 vezes, (C) 100 bar e 8 mg.mL^{-1} relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano com aumento de 4.000 vezes



Fonte: do autor – LCME, UFSC

Figura 2A - Efeito da pressão e da relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano no tamanho das partículas precipitadas (Condições experimentais mostradas na Tabela 1).

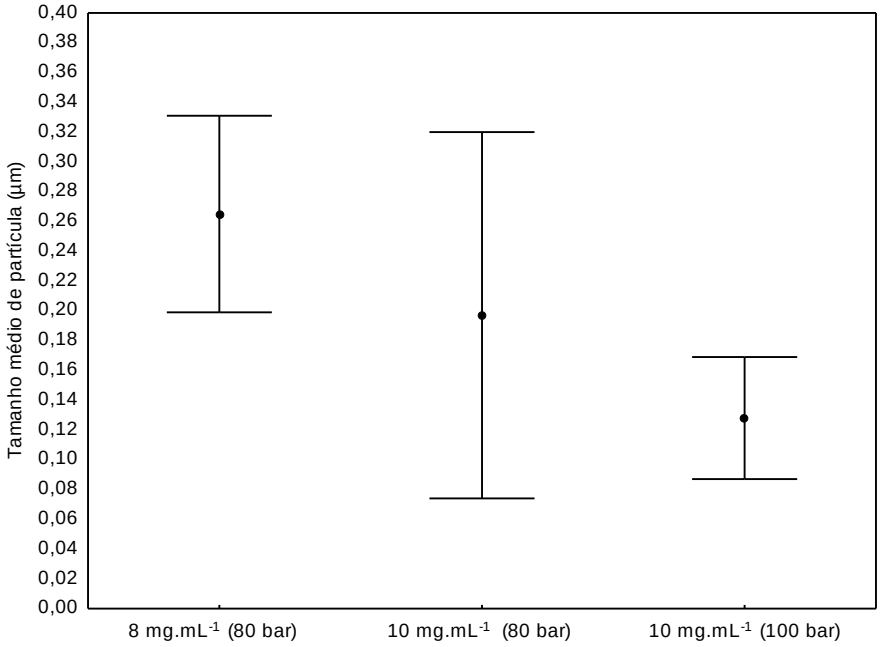
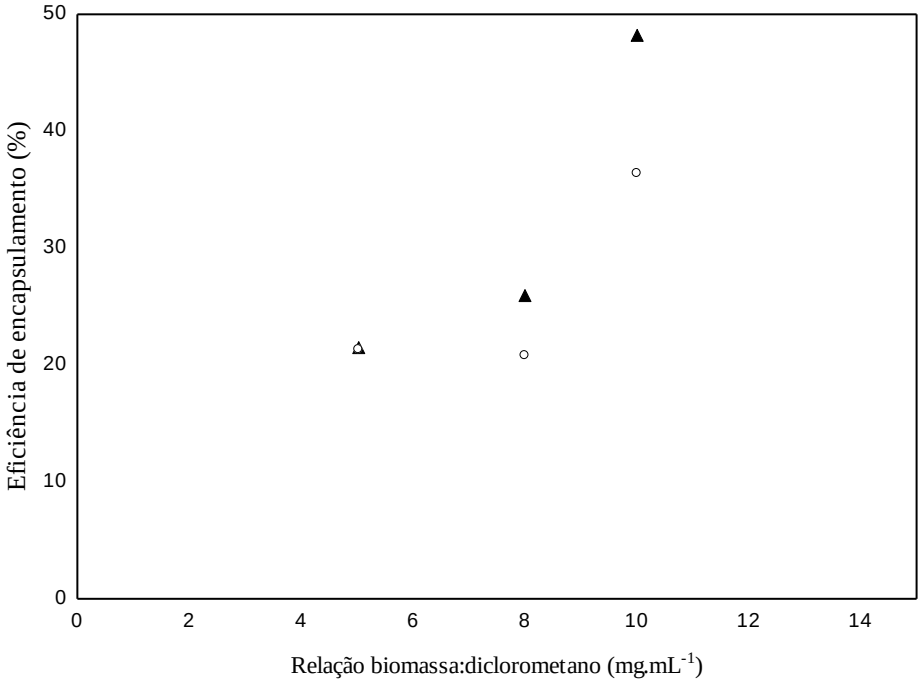



Figura 3A - Influência da relação biomassa contendo astaxantina sobre a eficiência de encapsulamento (EE%). ▲80 bar; ○100 bar (As outras condições experimentais são mostradas na Tabela 1)