



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

NICAELY MARIA DE OLIVEIRA PEREIRA

**MICROALGA *Haematococcus pluvialis* NA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA:
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E NANOENCAPSULAMENTO DOS EXTRATOS
PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE**

FORTALEZA

2023

NICAELY MARIA DE OLIVEIRA PEREIRA

MICROALGA *Haematococcus pluvialis* NA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA:
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E NANOENCAPSULAMENTO DOS EXTRATOS PARA
AUMENTO DA ESTABILIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P493m Pereira, Nicaely Maria de Oliveira.

Microalga *Haematococcus pluvialis* na produção de astaxantina : otimização da produção e nanoencapsulamento dos extratos para aumento da estabilidade / Nicaely Maria de Oliveira Pereira. – 2023.
70 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

1. *Haematococcus pluvialis*. 2. Astaxantina. 3. Cenoura. 4. Nanoencapsulamento. I. Título.
CDD 540

NICAELY MARIA DE OLIVEIRA PEREIRA

MICROALGA *Haematococcus pluvialis* NA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA:
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E NANOENCAPSULAMENTO DOS EXTRATOS PARA
AUMENTO DA ESTABILIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 29/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Lillian Maria Uchôa Dutra
4WBiotech Pesquisa, Serviços e Desenvolvimento de Produtos LTDA

A Deus.

Aos meus pais, Érica e Antonio.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a professora Dra. Maria da Conceição por me aceitar como orientanda, pela confiança e principalmente, por me mostrar que a química não se restringe apenas a pesquisa, que é possível utilizá-la para empreender e melhorar a vida das pessoas.

Ao Dr. Rossi Lelis por estabelecer parceria com o Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) e por todo auxílio durante a realização desse projeto.

A professora Dra. Kelma Pires por ter me acolhido e permitido a realização do cultivo da microalga no laboratório de Planctologia e a todos os alunos deste laboratório, principalmente o Danilo Cavalcante, pela ajuda durante a condução dos experimentos com as culturas da microalga.

A Dra. Lillian Dutra e seu orientando, Aldenor Oliveira, por permitir a utilização dos equipamentos do Grupo de Materiais Avançados (GQMAT) e por me ajudar no preparo e caracterização das nanocápsulas do extrato e da fração da microalga *Haematococcus pluvialis*.

Ao aluno Thiago Moura pela obtenção das imagens das nanocápsulas via microscopia de força atômica (AFM).

Ao Dr. Licarion Pinto, docente na Universidade Estadual do Rio de Janeiro, pelas contribuições no tratamento estatísticos dos dados e na obtenção das imagens dos cromatogramas 2D e 3D.

Agradeço aos professores participantes da banca examinadora Dra. Maria da Conceição, Dr. Marcos Mattos, Dra. Otília Pessoa e Dra. Lillian Dutra por aceitarem contribuir na avaliação do trabalho, com sugestões e críticas.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) pelo apoio financeiro.

A minha amiga Maria Daiane por todos os conselhos, pela torcida e por tornar o ambiente de laboratório mais divertido.

Aos meus pais Érica Oliveira e Antonio Pereira pela compreensão e por sempre acreditarem no meu potencial.

E em especial, agradeço ao meu namorado Lucas Coutinho por sempre estar ao meu lado me apoiando, ajudando e tornando meus dias melhores. Sem ele não conseguiria ter chegado até aqui.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, um menino colocado à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratassem!”

Marie Curie.

RESUMO

Haematococcus pluvialis é uma microalga de alto valor comercial por ser a maior fonte de astaxantina, um forte antioxidante natural. Assim, o desenvolvimento de processos que visem otimizar a produção da astaxantina pela microalga é um desafio biotecnológico. Este trabalho propõe uma nova estratégia para potencializar a produção de astaxantina e aumentar a biomassa de *H. pluvialis* empregando-se suco de cenoura no meio de cultura. Foram realizados três experimentos de cultivos da microalga, sendo dois deles com os meios suplementados com suco de cenoura (SC) em etapas distintas de crescimento da microalga [experimento 1: início da fase vegetativa (dia 1); experimento 2: no pico de crescimento celular (dia 26)] e o experimento controle (sem SC). A análise da morfologia celular mostrou que as células tratadas com SC (1,62 g.mL) diferenciam-se das células do controle pelo desenvolvimento de vacúolos, que estão associados ao armazenamento de metabólitos secundários. Quanto à produção de biomassa, observou-se que ambos os experimentos produzem valores superiores ao controle. Além disso, o teor de astaxantina também variou com a introdução de SC, resultando num teor de 4,79, 8,54 e 7,71 ppm nos experimentos controle, 1 e 2, respectivamente. Outra temática abordada neste trabalho, consiste no desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas dos extratos e frações de *H. pluvialis* visando melhorar a estabilidade da astaxantina e potencializar seu emprego como corante e composto bioativo em uma aplicação cosmética. Desta forma, após o preparo e fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da microalga *H. pluvialis* (**EEMHP**), investigou-se o potencial antioxidante e fotoprotetor de **EEMHP** e das frações diclorometano/metanol 5%_1 (**FDM5%_1**) e metanol (**FMeOH**). Por exibir resultados satisfatórios em ambas as atividades, nanocápsulas de Pluronic F127-bPEI contendo os ativos **EEMHP** e **FDM5%_1** foram sintetizadas através da reticulação polimérica ou *crosslinking*, empregando como estratégia metodológica o processo de nanoemulsão. A caracterização das nanocápsulas (**NC**) quanto aos parâmetros de tamanho de partícula e potencial zeta revelaram que **NC-FDM5%_1** apresenta maior estabilidade frente ao tempo de estocagem e variação de pH em relação a **NC-EEMHP**. Em resumo, este trabalho é o primeiro relato da utilização da cenoura como fonte de metabólitos secundários da astaxantina biossintetizada por *H. pluvialis* e do uso de nanocápsulas de Pluronic F127-bPEI para nanoencapsulamento de extratos e frações provenientes da microalga em estudo.

Palavras-chave: *Haematococcus pluvialis*; astaxantina; cenoura; nanoencapsulamento.

ABSTRACT

Haematococcus pluvialis is a microalga of high commercial value because it is the greatest source of astaxanthin, a strong natural antioxidant. Thus, the development of processes aimed at optimizing the production of astaxanthin by microalgae is a biotechnological challenge. This work proposes a new strategy to enhance the production of astaxanthin and increase the biomass of *H. pluvialis* using carrot juice in the culture medium. Three experiments of microalgae cultivation were carried out, two of them with media supplemented with carrot juice (SC) in different stages of microalgae growth [experiment 1: beginning of the vegetative phase (day 1); experiment 2: at the peak of cell growth (day 26)] and the control experiment (without SC). Analysis of cell morphology showed that cells treated with SC (1.62 g.mL) differ from control cells by the development of vacuoles, which are associated with the storage of secondary metabolites. As for the biomass production, it was observed that both experiments produce higher values than the control. Furthermore, the astaxanthin content also varied with the introduction of SC, resulting in a content of 4.79, 8.54 and 7.71 ppm in control experiments, 1 and 2, respectively. Another topic addressed in this work is the development of polymeric nanocapsules from extracts and fractions of *H. pluvialis*, aiming to improve the stability of astaxanthin and enhance its use as a dye and bioactive compound in a cosmetic application. Thus, after preparation and chromatographic fractionation of the ethanolic extract of the microalgae *H. pluvialis* (**EEMHP**), the antioxidative and photoprotective potential of **EEMHP** and the dichloromethane/methanol 5%_1 (**FDM5%_1**) and methanol (**FMeOH**) fractions were investigated. By showing satisfactory results in both activities, nanocapsules of Pluronic F127-bPEI containing the active **EEMHP** and **FDM5%_1** were synthesized through polymeric reticulation or crosslinking, using the nanoemulsion process as a methodological strategy. The characterization of the nanocapsules (**NC**) regarding the parameters of particle size and zeta potential revealed that **NC-FDM5%_1** presents greater stability against storage time and pH variation in relation to **NC-EEMHP**. In summary, this work is the first report on the use of carrots as a source of secondary metabolites of astaxanthin biosynthesized by *H. pluvialis* and the use of Pluronic F127-bPEI nanocapsules for nanoencapsulation of extracts and fractions from the microalgae under study.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; carrot; nanoencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura da astaxantina	18
Figura 2	– Ciclo de vida de <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Figura 3	– Estrutura dos estereoisômeros da astaxantina	26
Figura 4	– Biossíntese da astaxantina em <i>H. pluvialis</i>	28
Figura 5	– Cultivo de <i>H. pluvialis</i> em mesa de vidro adaptada	29
Figura 6	– Replicatas do cultivo de <i>H. pluvialis</i> para estudo cinético	33
Figura 7	– Curvas de crescimento de <i>H. pluvialis</i> obtidas por contagem do número de células e pela leitura da absorbância em 600 nm	34
Figura 8	– Replicatas do cultivo de <i>H. pluvialis</i> para estudo cinético	35
Figura 9	– <i>Box plot</i> da absorbância registrada em 600 nm para C , E1 e E2	36
Figura 10	– Fotos de frascos Erlenmeyer de uma replicata de cada um dos experimentos (E1 , C e E2) no pico de crescimento (dia 26) da microalga	37
Figura 11	– Imagens microscópicas da célula no estado vegetativo (a) e encistada (b) da microalga <i>H. pluvialis</i> preservadas em lugol	37
Figura 12	– <i>Box plot</i> do número de células dos dias 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 26, 27, 28 e 29 .	38
Figura 13	– Fotos comparativas das células vegetativas do controle (a) e do experimento 1 (b) preservadas em lugol	38
Figura 14	<i>Box plot</i> da biomassa para controle, experimento 1 e experimento 2	40
Figura 15	– Foto das placas de Petri contendo as biomassas dos experimentos controle, 1 e 2 na 1ª coleta	40
Figura 16	– Teor de astaxantina (ppm) nos extratos etanólicos (EEMHP) das biomassas geradas nos experimentos controle, 1 e 2	41
Figura 17	– Espectros de <i>fingerprint</i> HPLC-DAD da sobreposição de cromatogramas 2D de extratos etanólicos de C , E1 e E2 para cada coleta, SC e padrão de β -caroteno. E os cromatogramas 3D individuais do EEMHP de C , E1 e E2 da 1ª, 2ª e 3ª coleta	42

Figura 18	– Espectros de <i>fingerprint</i> HPLC-DAD da sobreposição de cromatogramas 2D de extratos etanólicos de C , E1 e E2 para cada coleta	43
Figura 19	– Espectros de <i>fingerprint</i> HPLC-DAD da sobreposição de cromatogramas 2D de padrão SC e β -caroteno. E os cromatogramas 3D individuais do padrão β -caroteno e SC	43
Figura 20	– Reação de captura de hidrogênio presente na substância oxidante (AH) pela molécula de DPPH	49
Figura 21	– Representação da síntese das nanocápsulas	52
Figura 22	– Espectro comparativo na região do infravermelho, entre as nanocápsulas sintetizadas (NC-EEMHP e FDM5%_1), o copolímero surfactante F127COOH e polímero bPEI	58
Figura 23	– Representação da reação de reticulação do F127COOH	59
Figura 24	– Gráfico de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios de partículas das nanocápsulas sintetizadas	61
Figura 25	– Imagens topográficas (a; c) e de fase (b; d) obtidas com o AFM das nanocápsulas NC-EEMHP (a; b) e NC-FDM5%_1 (c; d)	62
Figura 26	– Gráfico de varredura de EEMHP e FDM5%_1	64
Figura 27	– Curva de calibração de EEMHP e FDM5%_1	65
Figura 28	– Gráfico de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios das partículas de NC-FDM5%_1 frente a variação de pH	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais metabólitos relatados na literatura para <i>Haematococcus pluviialis</i> em função da sua fase de desenvolvimento	23
Tabela 2 – Estruturas dos compostos relatados na literatura para <i>H. pluviialis</i>	24
Tabela 3 – Dados do fracionamento cromatográfico de EEMHP (C _F)	48
Tabela 4 – Dados de CI ₅₀ para EEMHP , FDM5%_1 , FMeOH e dos controles positivos	56
Tabela 5 – Valores de FPS para EEMHP , FDM5%_1 e FMeOH	57
Tabela 6 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para NC-EEMHP , NC-FDM5%_1 , F127COOH e bPEI	58
Tabela 7 – Estabilidade das nanocápsulas NC-EEMHP e NC-FDM5%_1 com a variação dos dias	61
Tabela 8 – Teor de sólidos das nanocápsulas	63
Tabela 9 – Estabilidade das nanocápsulas NC-FDM5%_1 frente a variação de pH	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
BBM	<i>Bold's Basal Medium</i>
BKT	β -caroteno cetolase
CrtR-b	β -caroteno hidroxilase
DMAPP	Dimetilalildifosfato
EEMHP	Extrato etanólico da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GA-3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GGPS	Geranilgeranil pirofosfato sintase
HDR	4-hidroxi-3-metilbut-2-enildifosfato redutase
IPI	Isopentenilpirofosfato isomerase
IPP	Isopentenil pirofosfato
LCY-b	Licopeno β -ciclase
LCY-e	Licopeno ϵ -ciclase
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
PDI	Índice de polidispersividade
PDS	Fitoenodessaturases
PSY	Gene fitoeno sintase
SC	Suco de cenoura
TAGs	Triacilgliceróis
ZDS	ζ -caroteno dessaturase

LISTA DE SÍMBOLOS

Λ	Comprimento de onda
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{\textcircled{R}}$	Marca Registrada
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	CAPÍTULO 1 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA PELA MICROALGA <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
3.1	Revisão bibliográfica	21
3.1.1	<i>Considerações sobre a espécie <i>Haematococcus pluvialis</i></i>	21
3.1.2	<i>Carotenóides</i>	22
3.1.3	<i>Composição química de <i>Haematococcus pluvialis</i></i>	23
3.1.3.1	<i>Astaxantina</i>	25
3.1.3.2	<i>Biossíntese da astaxantina</i>	27
3.2	Materiais e métodos	29
3.2.1	<i>Otimização do cultivo de <i>H. pluvialis</i></i>	29
3.2.1.1	<i>Cepa e cultivo de <i>H. pluvialis</i></i>	29
3.2.1.2	<i>Preparação de suco de cenoura liofilizado</i>	30
3.2.1.3	<i>Tratamento do cultivo de <i>H. pluvialis</i> com suco de cenoura liofilizado</i>	30
3.2.1.4	<i>Avaliação da cinética de crescimento de <i>H. pluvialis</i></i>	30
3.2.1.5	<i>Quantificação do teor de astaxantina</i>	31
3.2.1.6	<i>Análise via HPLC</i>	31
3.2.1.7	<i>Análise dos dados estatísticos</i>	32
3.3	Resultados e discussão	33
3.3.1	<i>Otimização do cultivo de <i>H. pluvialis</i></i>	33
3.3.1.1	<i>Efeito do SC no crescimento da microalga <i>H. pluvialis</i></i>	33
3.3.1.2	<i>Efeito do SC no acúmulo de astaxantina</i>	41
4	CAPÍTULO 2 - NANOENCAPSULAMENTO DOS EXTRATOS PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE DA ASTAXANTINA	45
4.1	Revisão bibliográfica	45
4.1.1	<i>Encapsulamento da astaxantina</i>	45
4.1.2	<i>Envelhecimento da pele e as atividades antioxidante e fotoprotetora</i>	46
4.2	Materiais e métodos	48

4.2.1	<i>Preparação das nanocápsulas poliméricas</i>	48
4.2.1.1	<i>Obtenção do extrato etanólico da microalga H. pluvialis (EEMHP) para nanoencapsulamento</i>	48
4.2.1.2	<i>Fracionamento do extrato etanólico da microalga H. pluvialis</i>	48
4.2.1.3	<i>Ensaio biológico</i>	49
4.2.1.3.1	Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH	49
4.2.1.3.2	Fator de Proteção Solar	50
4.2.1.4	<i>Nanoencapsulamento do EEMHP e FDM5%_1</i>	51
4.2.1.4.1	Síntese das nanocápsulas via nanoemulsão	51
4.2.1.5	<i>Caracterização</i>	52
4.2.1.5.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	52
4.2.1.5.2	Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta	53
4.2.1.5.3	Microscopia de Força Atômica (AFM)	53
4.2.1.6	<i>Teor de sólidos</i>	53
4.2.1.7	<i>Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos ativos</i>	54
4.2.1.8	<i>Estudo da estabilidade de NC-FDM5%_1 frente a variação de pH</i>	55
4.3	Resultados e discussão	56
4.3.1	<i>Ensaio biológico</i>	56
4.3.1.1	<i>Análise da atividade antioxidante</i>	56
4.3.1.2	<i>Fator de Proteção Solar (FPS)</i>	56
4.3.2	<i>Caracterizações das nanocápsulas sintetizadas</i>	57
4.3.2.1	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)</i>	57
4.3.2.2	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta</i>	59
4.3.2.3	<i>Análise morfológica via AFM</i>	61
4.3.3	<i>Teor de sólidos</i>	63
4.3.4	<i>Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos ativos</i>	64
4.3.5	<i>Avaliação da estabilidade de NC-FDM5%_1 frente a variação de pH</i>	65
5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

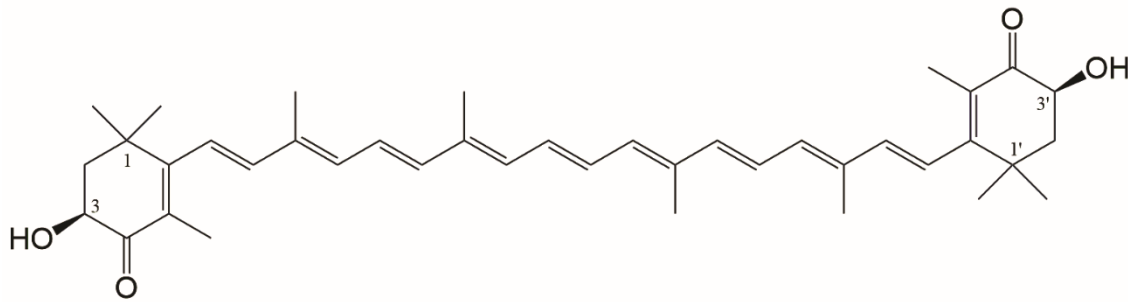
1 INTRODUÇÃO

As microalgas são biofábricas naturais, caracterizadas pela versatilidade e sustentabilidade de suas aplicações (MUTANDA *et al.*, 2020). Estes micro-organismos atuam, principalmente, como fonte de compostos bioativos de alto valor agregado para as indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e nutracêutica e na mitigação das mudanças climáticas globais por meio da fixação de carbono (ONORATO; RÖSCH, 2020; MUTANDA *et al.*, 2020). Dentre as microalgas comercialmente relevantes, *Haematococcus pluvialis* se destaca por ser a maior fonte de astaxantina natural, correspondendo a aproximadamente 5% de seu peso seco (NISHSHANKA *et al.*, 2022; FAYAAZUDDIN *et al.*, 2023).

A astaxantina (3,3'-di-hidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona, Figura 1, p. 18) é um carotenóide xantofila conhecido por ser um forte antioxidante com propriedades anti-envelhecimento, anticancerígenas, de aumento da imunidade e anti-inflamatórias (NISHSHANKA *et al.*, 2022; JANNEL *et al.*, 2020). Tais benefícios proporcionados à saúde humana, justificam o interesse da NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) em investigar o potencial deste pigmento na melhoria da saúde e da performance dos astronautas durante explorações espaciais de longa duração (NASA, 2023). Conseqüentemente, o mercado mundial da astaxantina está em constante desenvolvimento, sendo avaliado em aproximadamente US \$600 milhões, com estimativa de crescimento entre os anos de 2019 e 2026 acima de 3,5% por ano (MOTA *et al.*, 2022). Apesar das vantagens apresentadas, a astaxantina possui grande instabilidade química, baixa biodisponibilidade e hidrofobicidade (ARIZA HERNÁNDEZ; GARZÓN PULIDO; CAMACHO KURMEN, 2022). Uma alternativa para minimizar essas problemáticas consiste no processo de nanoencapsulamento da astaxantina (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; CALVO; GÓMEZ-ESTACA, 2020).

A encapsulação envolve o revestimento de um material puro ou uma mistura, denominado de composto ativo, em outro material intitulado de cápsula. Desta forma, ela atua como uma barreira física entre o composto central e o meio circundante, possibilitando diversas aplicações nos setores alimentício, agroquímico e farmacêutico. Além disso, cápsulas com tamanho nano podem promover o aumento da funcionalidade, atividade biológica ou permitir a liberação de compostos em taxas controladas. Portanto, a utilização desta técnica surge como alternativa para superar as problemáticas atreladas a astaxantina e os extratos lipídicos que contém essa substância (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; CALVO; GÓMEZ-ESTACA, 2020; VIEIRA; DERNER; LEMOS-SENNA, 2021).

Figura 1. Estrutura da astaxantina.



Fonte: Elaborada pela autora.

A produção em larga escala de *H. pluvialis* é realizada em sistema de cultivo em duas etapas, denominadas fase vegetativa e fase encistada. Durante a fase vegetativa, as condições ideais de crescimento promovem o aumento da proliferação celular. E na fase encistada, a indução de estressores, como alta incidência de luz, adição de sal ou falta de nutrientes, geram hiperacumulação de astaxantina na forma cística de *H. pluvialis* (TELLI; SELÇUK, 2022). Os maiores desafios associados à produção comercial de *H. pluvialis* como fonte de astaxantina consiste na taxa lenta de crescimento e na concentração baixa de biomassa (TELLI; SELÇUK, 2022; YANG *et al.* 2021).

Portanto, novas estratégias estão sendo investigadas para otimizar o cultivo da microalga *H. pluvialis* visando aumentar a produção de astaxantina. Por exemplo, VO *et al.* (2016) propuseram a aplicação do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor de etileno, na fase vegetativa para aumentar a produção de biomassa e no início do estágio encistado para estimular a biossíntese de astaxantina. A aplicação em dois estágios de ACC ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) aumentou o teor de astaxantina em 2 vezes quando comparado com o experimento controle. KIM *et al.* (2018) observaram que a aplicação periódica de corrente elétrica nos cultivos de *H. pluvialis* gera um aumento de 1,2 vezes na densidade celular e de 10% no teor de astaxantina em comparação com controles não tratados. WANG *et al.* (2022) descobriram que o tratamento de culturas de *H. pluvialis* com $1 \mu\text{M}$ de *rac*-GR24, um análogo sintético de estrigolactonas, no início do estágio macrozoóide aumenta significativamente a biomassa (até um peso máximo de células secas de $0,53 \text{ g.L}^{-1}$) durante a fase macrozoóide e a produção de astaxantina (de 0,63 a 5,32% do peso celular seco) no estágio hematocisto. Porém, nenhuma dessas abordagens introduz no meio de cultura de *H. pluvialis* um precursor biossintético da astaxantina visando potencializar a sua produção.

Os precursores biossintéticos participam do início da via metabólica como compostos relacionados ou intermediários de um metabólito secundário (TWAJJ; HASAN,

2022). Como exemplo de estudos que empregaram precursores biossintéticos como estratégia de potencializar a biossíntese de metabólitos secundários, tem-se a adição de fenilalanina no cultivo das espécies vegetais *Salvia officinallis* e *Taxus* sp. para aumentar a produção de ácido rosmarínico e taxol, respectivamente (TWAJJ; HASAN, 2022). Culturas em suspensão celular de *S. officinallis* suplementadas com 0,1 g.L⁻¹ de fenilalanina produziram teores elevados de ácido rosmarínico (concentração de 10 vezes), chegando a 6,4 g.L⁻¹ (HIPPOLYTE *et al.*, 1992). Quando a mesma estratégia foi aplicada aos calos de *Taxus* sp. suplementado com 0,1 mM de fenilalanina, observou-se que o rendimento de taxol dobrou quando comparado ao controle (FETT-NETO *et al.*, 1993). Vale ressaltar que esse aminoácido é um precursor do ácido de winterstein, um composto intermediário envolvido na biossíntese da cadeia lateral da molécula do taxol. Baseando-se nessa estratégia e pela ausência de estudos similares com *H. pluvialis*, resolveu-se investigar a cenoura como fonte de metabólitos secundários precursores da astaxantina. Este vegetal é rico em β -caroteno e zeaxantina, que correspondem, respectivamente, a um precursor e intermediário da biossíntese de astaxantina (PURKIEWICZ, *et al.* 2020).

Em face do exposto, esse trabalho descreve o estudo da utilização do suco de cenoura no cultivo da microalga *H. pluvialis* visando o aumento da produção de astaxantina. Como o acúmulo gradual de astaxantina ocorre durante a transição da fase verde de *H. pluvialis* para a fase vermelha, foram investigados os efeitos do suco de cenoura quando suplementado na fase inicial e no pico de crescimento celular desta microalga. Leituras de absorvância, contagem do número de células, análise da morfologia celular, medição da biomassa seca, quantificação do teor de astaxantina e análise de carotenóides foram cuidadosamente realizadas e utilizadas para estabelecer um comparativo entre as células não tratadas e tratadas com suco de cenoura. Além disso, o presente trabalho se propõe a desenvolver nanocapsulas poliméricas do extrato e frações da microalga *Haematococcus pluvialis* que apresentem tanto atividade antioxidante quanto fator de proteção solar elevado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar a produção de astaxantina no cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* e melhorar a estabilidade da astaxantina.

2.2 Objetivos específicos

- Empregar suco de cenoura como suplemento no cultivo da microalga;
- Realizar um estudo cinético do crescimento da microalga;
- Otimizar a extração da astaxantina do meio de cultura;
- Avaliar os parâmetros indicadores de viabilidade do experimento: quantidade de biomassa produzida; verificação da densidade celular; aferição do teor de astaxantina; análise da morfologia e contagem do número de células;
- Avaliar a atividade antioxidante pelo método DPPH do **EEMHP** e das frações obtidas a partir do seu tratamento cromatográfico;
- Determinar o fator de proteção solar (FPS) através da análise espectrofotométrica do **EEMHP** e das frações provenientes do seu tratamento cromatográfico;
- Preparar nanocápsulas poliméricas do **EEMHP** e da fração que apresentar tanto atividade antioxidante quanto um valor elevado de FPS;
- Caracterizar as nanocápsulas poliméricas quanto aos parâmetros de tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia.

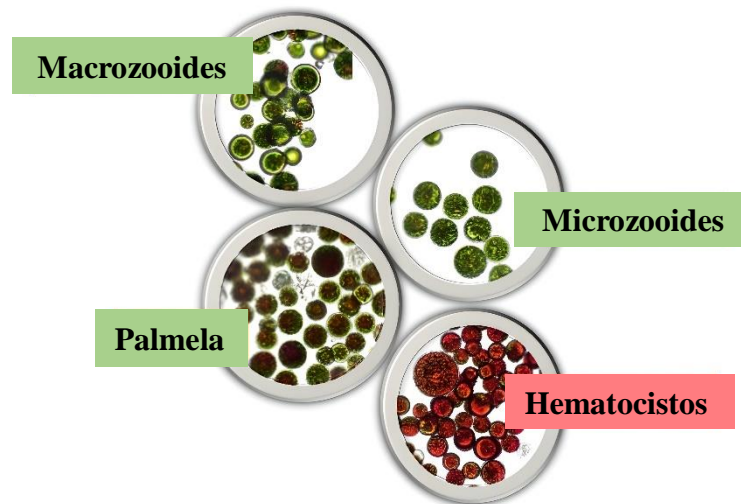
3 CAPÍTULO 1 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA PELA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Considerações sobre a espécie *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis, também denominada de *Haematococcus lacustris* ou *Sphaerella lacustris*, é uma microalga verde biflagelada unicelular de água doce pertencente à classe Chlorophyceae, ordem Volvocales e família Haematococcaceae. Ela é amplamente distribuída em diversos *habitats* e comumente encontrada em pequenos corpos de água doce intermitentes (SHAH *et al.*, 2016). O ciclo de vida de *H. pluvialis* (Figura 2) é complexo e apresenta quatro tipos de morfologias celulares distinguíveis: macrozooides (ou zoosporos), microzooides, palmela e hematocistos (ou aplanósporos). Os estágios macrozooides, microzooides e palmela são denominados de fase vegetativa verde, e o estágio hematocisto é denominado de fase encistada vermelha (ARIZA HERNÁNDEZ; GARZÓN PULIDO; CAMACHO KURMEN, 2022).

Figura 2. Ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis*



Fonte: Elaborada pela autora.

Os macrozooides são células flageladas de crescimento rápido, que predominam em condições de cultivo favoráveis e caracterizam-se por serem células esféricas, elipsoidais ou em formato de pera, com tamanho que varia entre 8 e 20 μm . Quando as condições de cultura se tornam desfavoráveis, os macrozooides perdem os flagelos e expandem seu

tamanho celular formando os microzooides. Em seguida surgem multicamadas amorfas nas regiões internas da matriz extracelular ou da parede celular primária, as células se tornam estáticas e passam para a fase de palmela. Quando o estresse ambiental permanece contínuo, ocorre a cessação da divisão celular e a palmela se transforma em aplanósporo, conhecido por ter uma parede celular espessa e rígida. Nesta fase, há o aumento da capacidade de acumular grandes quantidades de carotenóides, principalmente da astaxantina, conferindo a cor vermelha à célula (SHAH *et al.*, 2016).

3.1.2 Carotenóides

Os carotenóides pertencem a série dos terpenos e são compostos poli-insaturados apolares solúveis em gordura, que podem ser divididos em duas classes: (i) carotenos, que são hidrocarbonetos apolares; (ii) xantofilas, que são resultantes da oxidação de carotenos e contêm grupos oxigenados em seus anéis terminais, conferindo maior polaridade (KAULMANN; BOHN, 2014). Eles também podem ser classificados, de acordo com as funções que desempenham, em primários ou secundários. Os carotenóides primários são componentes estruturais e funcionais do aparelho fotossintético que atuam como pigmentos coletores de luz (ex.: β -caroteno, luteína e zeaxantina). Já os carotenóides secundários desempenham um papel importante na proteção celular, sendo produzidos em grandes quantidades sob condições de estresse abiótico (Ex.: astaxantina e cantaxantina) (SAINI; KEUM, 2019).

Em relação à biossíntese dos carotenóides, apenas as plantas e micro-organismos podem realizá-la. Portanto, para os seres humanos se beneficiarem com as suas propriedades antioxidantes e se protegerem de doenças relacionadas ao envelhecimento (câncer, catarata, doenças cardiovasculares e degenerativas), devem incluir os vegetais produtores de carotenóides na alimentação (KAULMANN; BOHN, 2014; SAINI; KEUM, 2019). A estrutura da maioria dos carotenóides dispõem de 40 átomos de carbono, que formam uma cadeia de polieno com anéis de cicloexano ou resíduos de isoprenóides alifáticos nas extremidades, ou seja, possuem um sistema de elétrons π altamente deslocalizados. Tal característica confere a propriedade antioxidante desses compostos porque as espécies que reagem com o oxigênio interagem preferencialmente com moléculas que contêm mais de 10 ligações duplas C=C conjugadas. Assim, quanto maior o número de insaturações na estrutura dos carotenóides, maior sua eficácia antioxidante. Além disso, essas características estruturais fazem com que os carotenóides atuem como filtros naturais de luz visível de alta

energia, absorvendo de forma efetiva a luz na faixa espectral violeta-verde (DARVIN *et al.*, 2022).

3.1.3 Composição química de *H. pluvialis*

A composição química da microalga *H. pluvialis* varia de acordo com o seu ciclo de vida, sendo a fase encistada vermelha a que apresenta o maior teor de carotenóides (GRUJIĆ *et al.*, 2022). Na fase vegetativa verde observa-se a presença, principalmente, de luteína (75-80%), β -caroteno (10-20%) e outros carotenóides primários, como zeaxantina, neoxantina e violaxantina. E em relação a fase encistada vermelha, nota-se a substituição dos carotenóides primários pelos secundários, onde a astaxantina corresponde a substância majoritária (80-99%). É válido ressaltar que, esse percentual inclui os ésteres de ácidos graxos de astaxantina, correspondendo a 70% de monoésteres e 25% de diésteres de ácidos palmítico (16:0), oléico (18:1) ou linoléico (18:2). Dessa forma, apenas 5% da astaxantina livre está presente nas células encistadas vermelhas (GRUJIĆ *et al.*, 2022; SHAH *et al.*, 2016). A Tabela 1 agrupa os principais compostos relatados na literatura para as fases verde e encistada vermelha da *H. pluvialis* e a Tabela 2 (p. 24) ilustra as suas respectivas estruturas.

Tabela 1. Principais metabólitos relatados na literatura para *Haematococcus pluvialis* em função da sua fase de desenvolvimento.

	Metabólito	Referências
Fase vegetativa verde	Anteraxantina β -caroteno Clorofila a Clorofila b Echinenona	GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016
Fase vegetativa verde e encistada vermelha	Adonixantina Astaxantina Luteína Neoxantina Violaxantina Zeaxantina	GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016
Fase encistada vermelha	Ácidos graxos Adonirubina Cantaxantina Ésteres de astaxantina Estigmasterol	GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 GRUJIĆ <i>et al.</i> , 2022; SHAH <i>et al.</i> , 2016 WU <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2. Estruturas dos compostos relatados na literatura para *H. pluvialis* (continua)

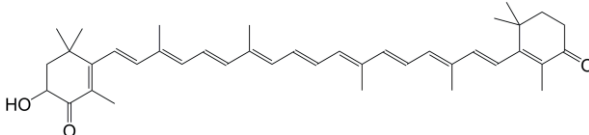
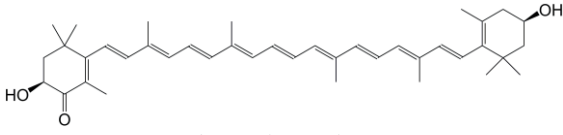
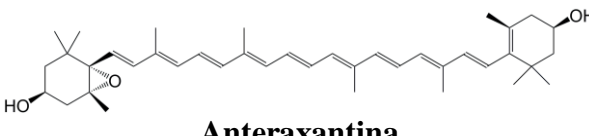
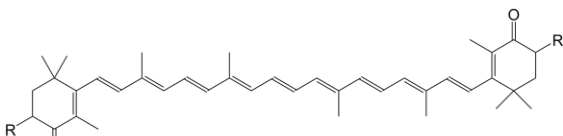
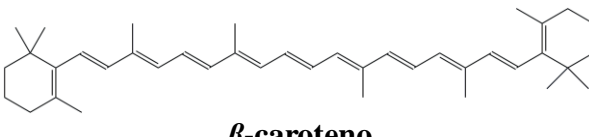
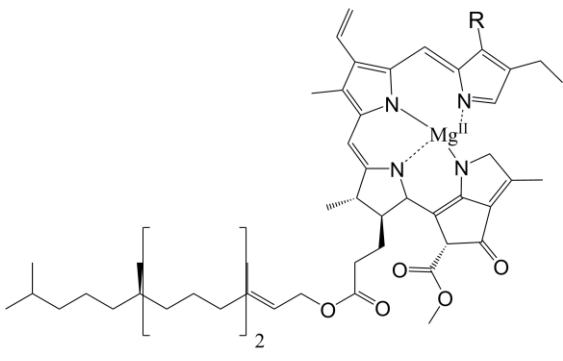
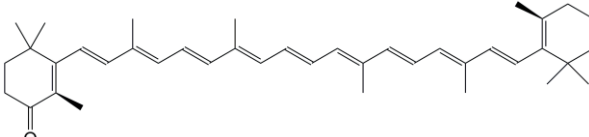
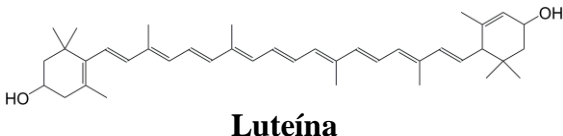
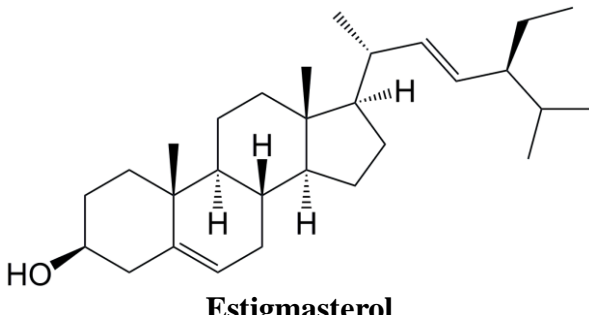
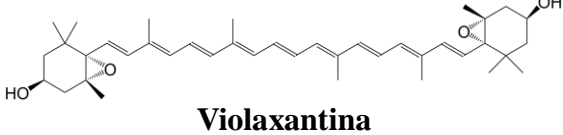
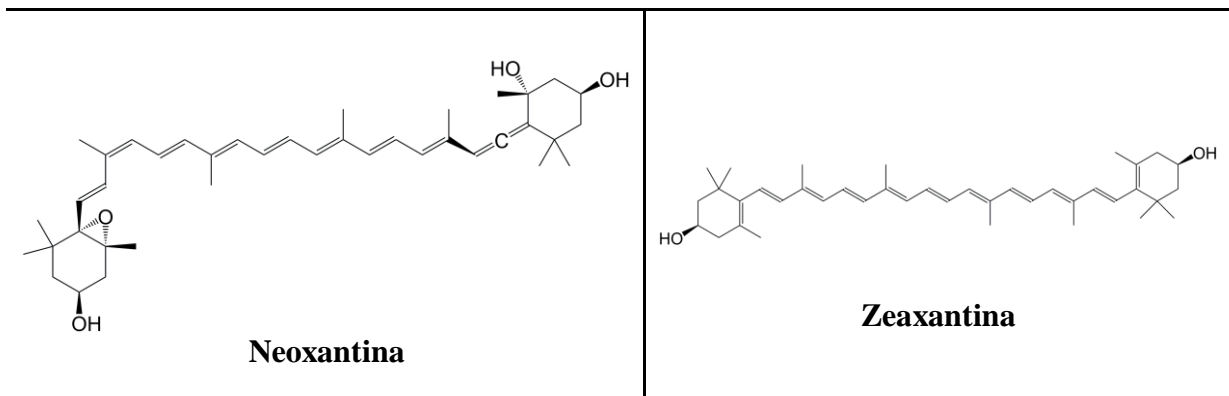
 <p>Adonirubina</p>	 <p>Adonixantina</p>
 <p>Anteraxantina</p>	 <p>R = OH (astaxantina); R = H (cantaxantina)</p>
 <p>β-caroteno</p>	 <p>R = CH₃ (Clorofila a); R = -CHO (Clorofila b)</p>
 <p>Echinenona</p>	 <p>Luteína</p>
 <p>Estigmasterol</p>	 <p>Violaxantina</p>

Tabela 2. Estruturas dos compostos relatados na literatura para *H. pluvialis* (conclusão)



Fonte: elaborado pela autora.

3.1.3.1 Astaxantina

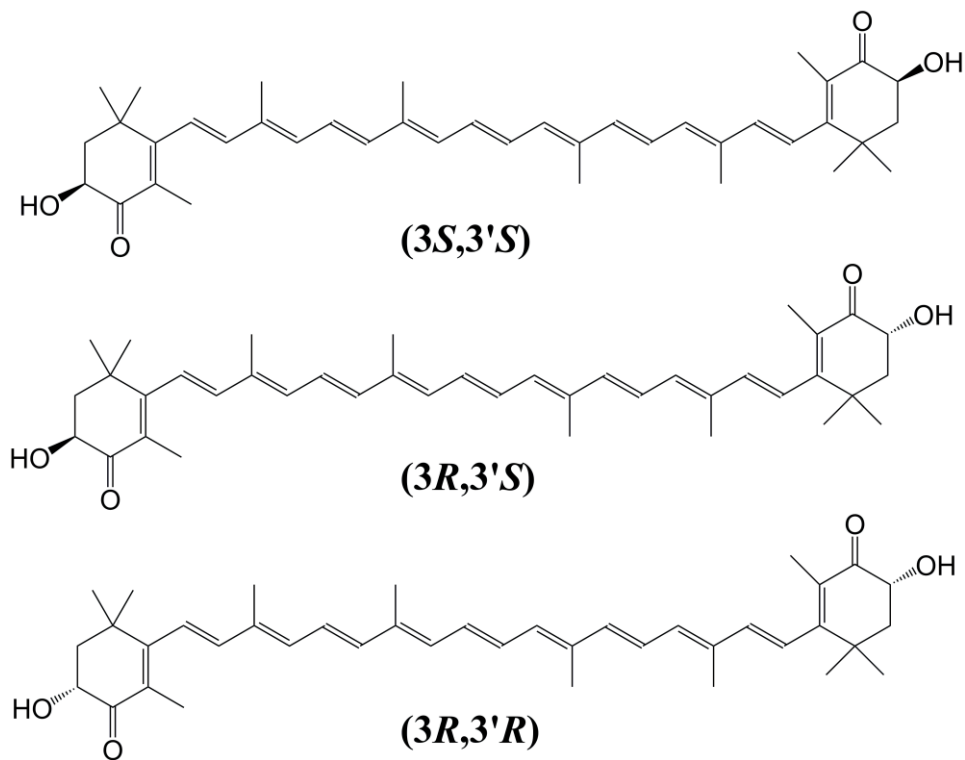
A astaxantina ou 3,3'-di-hidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona (Figura 1, p. 15) é um carotenóide secundário de coloração vermelho brilhante, biossintetizado por algumas espécies de microalgas, plantas, leveduras e bactérias. Ela é descrita como um antioxidante natural 65 vezes mais potente que a vitamina C, 54 vezes mais eficaz que o β -caroteno e 100 vezes mais potente que o α -tocoferol. Apresenta propriedades anti-envelhecimento, anticancerígenas, anti-inflamatórias e de aumento da imunidade, que justificam sua ampla aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética, aquícola, nutracêutica e farmacêutica (KHOO *et al.*, 2019).

Em relação ao mercado, as principais variedades de astaxantina incluem: (i) a natural, proveniente de fontes microbianas; (ii) a sintética, que é uma mistura de todos os estereoisômeros da astaxantina. Apesar da astaxantina sintética possuir maior disponibilidade, menores preços em relação a astaxantina natural e deter 95% da quota de mercado, ela apresenta menor capacidade antioxidante e elevada toxicidade (NISHSHANKA *et al.*, 2022). É válido ressaltar que, dentre os produtos ricos em astaxantina natural, disponibilizados no mercado, apenas os produzidos por *H. pluvialis* obtiveram aprovação da agência norte-americana FDA (*Food and drug administration*) para consumo humano (JANNEL *et al.*, 2020). Estes produtos tratam-se de suplementos alimentares constituídos por extratos de *H. pluvialis*, ou seja, suas formulações não apresentam astaxantina na sua forma pura.

A estrutura química da astaxantina é composta por dois anéis terminais ligados por uma cadeia poliênica que contém grupamentos hidroxila (-OH) e carbonila de cetona (C=O). A presença do grupo OH nas posições 3 e 3' dos anéis β -ionona permite a formação de dois carbonos estereogênicos e, conseqüentemente, três estereoisômeros: dois enantiômeros

[(3*S*,3'*S*) e (3*R*,3'*R*)] e um composto meso (3*S*,3'*R*) (Figura 3, p. 26). Quando sintetizada, o produto obtido trata-se da mistura desses três estereoisômeros, na proporção de 1:1:2, respectivamente. Por outro lado, a biossíntese da astaxantina pela microalga *H. pluvialis* produz, predominantemente, o enantiômero com configuração 3*S*,3'*S* (SHAH *et al.*, 2016). Além disso, a cadeia poliênica com múltiplas ligações duplas permite a existência de isômeros configuracionais *Z* ou *E*. Devido à instabilidade termodinâmica das estruturas com configuração *Z*, a astaxantina (natural e sintética) possui todas as ligações duplas da cadeia poliênica com configuração *E* (RESTRØM *et al.*, 1981).

Figura 3. Estrutura dos estereoisômeros da astaxantina.



Fonte: Elaborada pela autora.

A astaxantina livre é muito sensível à oxidação, desta forma, é comum encontrar na natureza este carotenóide conjugado com proteínas ou na forma de ésteres de ácidos graxos. A esterificação ocorre após a biossíntese da astaxantina, quando as hidroxilas reagem com uma cadeia de ácido graxo, podendo formar os mono-éster ou di-éster. O objetivo desta transformação química é aumentar a estabilidade e solubilidade da astaxantina nos lipídeos celulares no citoplasma. Em *H. pluvialis*, esse carotenóide aparece esterificado, principalmente, com o ácido oléico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), nonadecanoico (C19:0) e araquídico (C20:0) (RESTRØM *et al.*, 1981).

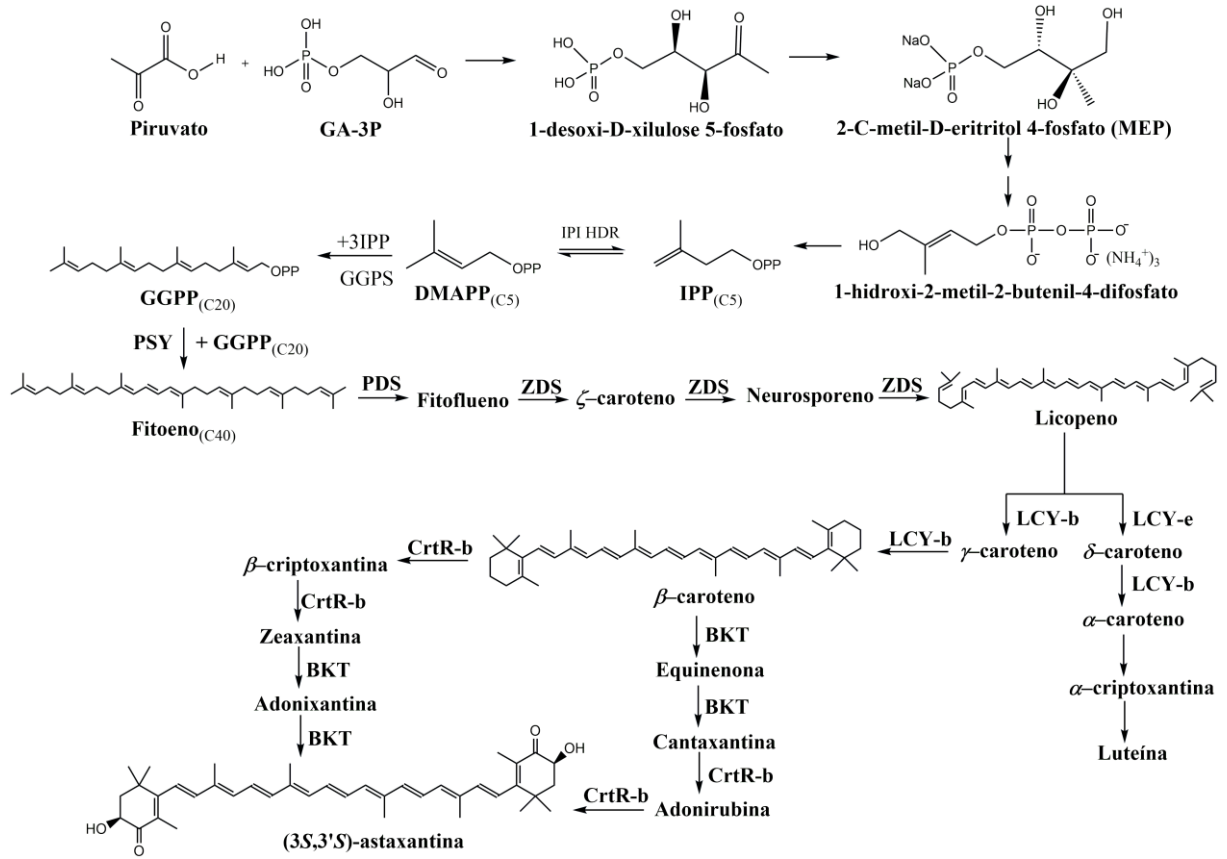
3.1.3.2 Biossíntese da Astaxantina

A biossíntese da astaxantina (Figura 4, p. 28) é um processo complexo, que coincide com o acúmulo de triacilgliceróis (TAGs). Inicia-se nos cloroplastos de *H. pluvialis*, com a conversão dos produtos da fotossíntese, piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (GA-3P), no intermediário chave na síntese de carotenóides, o isopentenil pirofosfato (IPP). Esta etapa ocorre através da via DOXP, também denominada de via não-mevalonato (MEP) (EISENREICH; ROHDICH; BACHER, 2001; LICHTENTHALER, 1999). O IPP, via um processo de catálise pelas enzimas isopentenilpirofosfato isomerase (IPI) ou 4-hidroxi-3-metilbut-2-enildifosfato redutase (HDR), sofre isomerização a dimetilalildifosfato (DMAPP) (GWAK *et al.*, 2014). A molécula de DMAPP, via catálise pela enzima geranilgeranil pirofosfato sintase (GGPS), passa por uma adição linear de três moléculas de IPP, dando início ao alongamento da cadeia isoprenóide com a formação de um composto C₂₀, o geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (CUNNINGHAM; GANTT, 1998).

Ao provocar o estresse luminoso no meio de cultura de *H. pluvialis* ocorre a expressão do gene fitoeno sintase (PSY), responsável pela condensação das caudas de duas moléculas de GGPP e formação do composto C₄₀, o fitoeno, que atua como precursor da astaxantina e outros carotenóides (GWAK *et al.*, 2014). Depois de quatro etapas de dessaturação, catalisadas por duas fitoenodessaturases (PDS) e uma ζ -caroteno dessaturase (ZDS), é formado o licopeno, um composto altamente insaturado, cujas extremidades sofrem ciclização ao serem catalisadas por licopeno ciclases (LCY-e e LCY-b) (NAWROCKI *et al.*, 2015).

Na maioria dos organismos, a etapa de ciclização é um ponto de ramificação da síntese de carotenóides, no qual pode ser formado o α -caroteno (precursor da luteína) ou o β -caroteno (precursor da astaxantina). Em relação a microalga *H. pluvialis*, sob condições de estresse, observa-se um grande fluxo de carbono direcionado para a obtenção do β -caroteno e altos níveis de transcritos de LCY-b (GWAK *et al.*, 2014). Por fim, as duas etapas de oxigenação são catalisadas por β -caroteno cetolase (BKT) e β -caroteno hidroxilase (CrtR-b), que consistem nas etapas limitantes da síntese de astaxantina (VIDHYAVATHI *et al.*, 2008). Apesar dessas enzimas poderem atuar em qualquer ordem, a maior afinidade da enzima BKT pelo β -caroteno, em relação à zeaxantina, favorece a adição inicial do grupo carbonila na molécula antes que a enzima CrtR-b catalise a hidroxilação enantiosseletiva da cantaxantina em astaxantina (LOTAN; HIRSCHBERG, 1995).

Figura 4. Biossíntese da astaxantina em *H. pluvialis*



Fonte: adaptado de Shah *et al.* (2016)

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Otimização do cultivo de *H. pluvialis*

3.2.1.1 Cepa e cultivo de *H. pluvialis*

A cepa de *H. pluvialis* foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Bioecologia da Universidade Federal do Ceará. As células foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 500 mL de meio BBM estéril (GÄRTNER, 1996), composto de NaNO₃ 2,94 mM; CaCl₂.2H₂O 0,17 mM; MgSO₄.7H₂O 0,30 mM; K₂HPO₄ 0,43mM; KH₂PO₄ 1,29mM; NaCl 0,43mM; elementos traços: EDTA 8,5 µM; FeSO₄.7H₂O 0,9 µM; H₃BO₃ 9,0 µM; ZnSO₄.7H₂O 1,50 µM; MnCl₄.4H₂O 0,36 µM; MoO₃ 0,26 µM; CuSO₄.5H₂O 0,31 µM; Co(NO₃)₂.6H₂O 0,084 µM. As culturas foram mantidas em mesa de vidro adaptada (Figura 5) sob intensidade luminosa contínua de 3000 lux durante a fase macrozóide (dias 1-25) e 5000 lux durante a fase de hematocisto (dias 26-29), com aeração constante a uma temperatura de aproximadamente 24°C. Em cada cultura foram inoculados 50 mL de cultura estoque de *H. pluvialis*, com densidade celular de 69×10^4 células.mL⁻¹.

Figura 5. Cultivo de *H. pluvialis* em mesa de vidro adaptada.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.1.2 Preparação de suco de cenoura liofilizado

As cenouras (1 Kg) foram adquiridas em um mercado local de Maracanaú (Ceará). Após serem limpas, lavadas e descascadas, foram introduzidas em uma centrífuga de alimentos (Centrífuga de Alimentos Juicer 1000 800W Britânia, Brasil) para obtenção do suco de cenoura. Posteriormente, 300 mL de suco de cenoura foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados (Liofilizador 1101 liotop, Brasil) por 48 horas, obtendo-se um pó laranja (48,684 g), denominado suco de cenoura liofilizado (SC).

3.2.1.3 Tratamento do cultivo de *H. pluvialis* com suco de cenoura liofilizado

Foram realizados dois experimentos suplementados com SC (experimentos 1 e 2) e um experimento controle (sem adição de SC no meio de cultura). Os experimentos contendo SC (1 e 2) foram suplementados com 1 mL de uma solução de SC (concentração de 1,62 g.mL⁻¹). No experimento 1, a solução foi adicionada aos cultivos de *H. pluvialis* no início da fase macrozoóide (dia 1). No experimento 2, a solução foi introduzida nas culturas de *H. pluvialis* no pico de crescimento celular (dia 26). Todos os experimentos foram feitos com quinze replicatas. Para avaliação do efeito de SC, as células tratadas foram coletadas em três pontos: início do estresse luminoso (dia 26); 24 h após o estresse luminoso (dia 27); e quando metade das células de *H. pluvialis* encontravam-se no estágio de hematocisto (dia 29). Em cada ponto de coleta, 5 frascos Erlenmeyer contendo culturas de *H. pluvialis* foram recolhidos do experimento controle, experimento 1 e experimento 2.

3.2.1.4 Avaliação da cinética de crescimento de *H. pluvialis*

O estudo da cinética de crescimento de *H. pluvialis* foi realizado de três formas distintas: leitura de absorbância a 600 nm, contagem do número de células e medição de biomassa. As leituras de absorbância foram feitas durante todos os dias de cultivo (dias 1-29), usando um medidor de densidade celular (WPA CO 8000 Cell Density Meter). As contagens do número de células foram realizadas nos dias 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 26, 27, 28 e 29, usando um hemocitômetro Neubauer sob um microscópio óptico (microscópio Olympus CX31). A medição da biomassa foi realizada nos três pontos de coleta (dias 26, 27 e 29), por meio de pesagem em balança analítica. A biomassa seca foi obtida pela centrifugação das culturas de *H. pluvialis* a 10.000 rpm por 10 min e secagem em estufa a 40 °C por 12 horas.

3.2.1.5 Quantificação do teor de astaxantina

O procedimento empregado na quantificação da astaxantina no extrato da biomassa da microalga foi realizado seguindo a literatura (VO *et al.*, 2016). A biomassa seca, obtida das culturas de *H. pluvialis*, foi dispersa em etanol na proporção de 500 mg de biomassa para 25 mL de etanol. A mistura foi tratada por 10 min (2s *on* e 2s *off*) em ultrassom (Sonicador sonics vibra-cell VCX 500 – VCX 750) com amplitude de 50% a 60°C e então centrifugada a 3500 rpm por 10 min. O solvente do sobrenadante resultante foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se assim os extratos da microalga (**EEMHP**). A quantificação do teor de astaxantina foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini-1240). Uma amostra de 1 mg de cada extrato **EEMHP** foi dissolvida em 90% de acetona e as amostras foram analisadas com base na densidade óptica no comprimento de onda de 474 nm (DO_{474}). Em seguida, o teor de astaxantina foi determinado empregando-se a Equação 1 relatada por VO *et al.* (2016):

$$\text{Astaxantina (mg.L}^{-1}\text{)} = (DO_{474} \times 7,0881) - 0,5904 \text{ (Equação 1)}$$

3.2.1.6 Análise via HPLC

A composição de carotenóides (β -caroteno, astaxantina e análogos) nos extratos etanólicos das 1^a, 2^a e 3^a coletas nos experimentos controle (C), 1 (E1) e 2 (E2) foi determinada usando uma amostra de cada um desses extratos. Inicialmente, soluções (1 mg.mL⁻¹) das amostras (extratos etanólicos, padrão de β -caroteno da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) e suco de cenoura) foram preparadas e filtradas através de um filtro de membrana de PTFE, 0,22 μ m (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). Os extratos de etanol foram dissolvidos em metanol grau HPLC (Dinâmica, São Paulo, Brasil), enquanto o β -caroteno e o suco de cenoura foram dissolvidos em acetona grau HPLC (Dinâmica). O suco de cenoura foi previamente submetido à extração líquido-líquido com uma mistura 1:3 de diclorometano e água. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um cromatógrafo Shimadzu modelo LC solução 20A (Kyoto, Japão) equipado com uma coluna de fase reversa Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ) da Phenomenex® (Califórnia, EUA). O forno foi regulado a 40 °C, o volume de injeção de 20 μ L e o detector de UV a 400 nm. Os eluentes foram (A) acetona e (B) metanol:H₂O (9:1 v/v). A coluna foi eluída a um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ com um programa de concentração gradiente para B de 80 a 20% por

25 min, 20% por 10 min e 20 a 80% por 5 min. Por fim, os dados resultantes do HPLC-DAD foram exportados como um arquivo do *Microsoft Excel* e, em seguida, foram construídos gráficos tridimensionais no MATLAB versões R2010a para avaliar a composição das amostras.

3.2.1.7 Análise dos dados estatísticos

Box plots foram usados para analisar os experimentos realizados. Os *box plots* fornecem uma melhor visualização dos dados, permitindo avaliar as semelhanças e diferenças dos experimentos em uma única variável, como produção de biomassa e contagem de células, analisadas neste trabalho. Para a avaliação de cada experimento sobre o crescimento da biomassa de *H. pluvialis*, foi realizado um *box plot* para a massa ponderada após o término do experimento e para os valores de absorvância registrados em 600 nm durante todos os dias de cultivo. E para avaliar a influência dos diferentes experimentos na contagem de células, foram construídos *box plots* englobando todas as morfologias celulares e diferenciando as células vegetativas das células encistadas presentes nos cultivos de *H. pluvialis*. Os *box plots* também foram separados por dia de análise para melhor avaliar a cinética dos experimentos. Todas as análises foram realizadas em ambiente R 4.3.0 utilizando o aplicativo de manipulação de dados (DARZÉ *et al.*, 2022), que está disponível gratuitamente no github <https://github.com/Leams-UERJ-apps>.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Otimização do cultivo de *H. pluviialis*

3.3.1.1 Efeito do SC no crescimento da microalga *H. pluviialis*

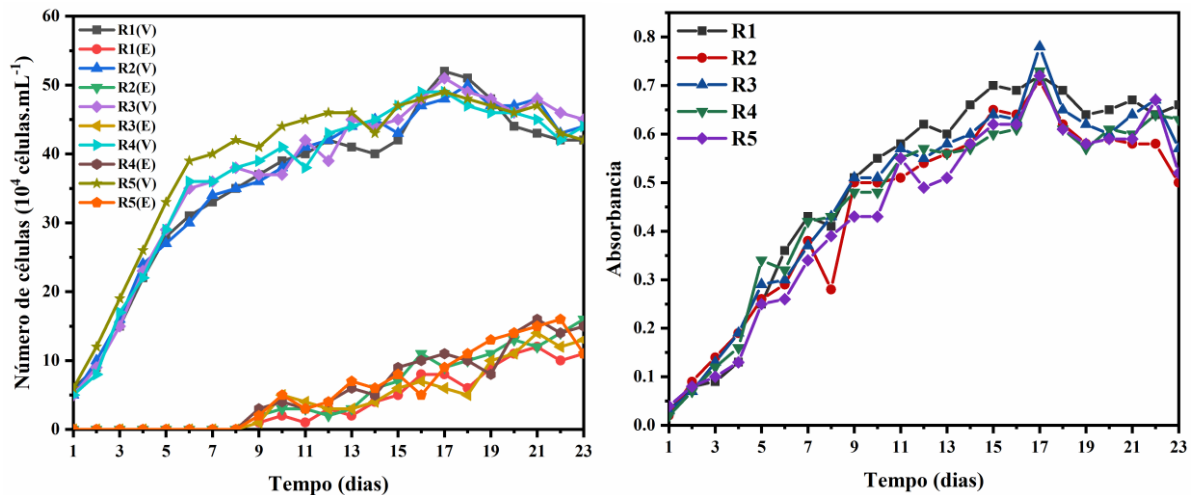
Para determinar as condições experimentais do tratamento de *H. pluviialis* com SC, realizou-se um cultivo inicial com 5 replicatas, em frascos Erlenmayer de 2 L dispostos em estante vertical (Figura 6). Neste experimento, também foi comparado a eficácia das metodologias de obtenção da densidade celular por contagem direta do número de células empregando um hemocítmetro Neubauer, sob um microscópio óptico, e a leitura da absorbância em 600 nm utilizando densímetro celular. Os perfis das curvas de crescimento obtidas (Figura 7, p. 34), revelaram que os dados de ambas as metodologias apresentam boa correlação. A interpretação dessas curvas mostra que o pico de crescimento das células no estágio vegetativo ocorre em aproximadamente 17 dias, com absorbância média de 0,73 e densidade média de células vegetativas e encistadas de 49×10^4 e 8×10^4 células.mL⁻¹, respectivamente.

Figura 6. Replicatas do cultivo de *H. pluviialis* para estudo cinético. Da esquerda para a direita observa-se a cultura estoque, reator 2 (R2), reator 3 (R3), reator 5 (R5), reator 4 (R4) e reator 1 (R1).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7. Curvas de crescimento de *H. pluvialis* obtidas por contagem do número de células (esquerda) e pela leitura da absorbância em 600 nm (direita). Na contagem das células realizada no microscópio pode-se distinguir a sua morfologia no decorrer dos dias, desta forma, para cada reator (R) curvas distintas foram traçadas para as células vegetativas (V) e encistadas (E).

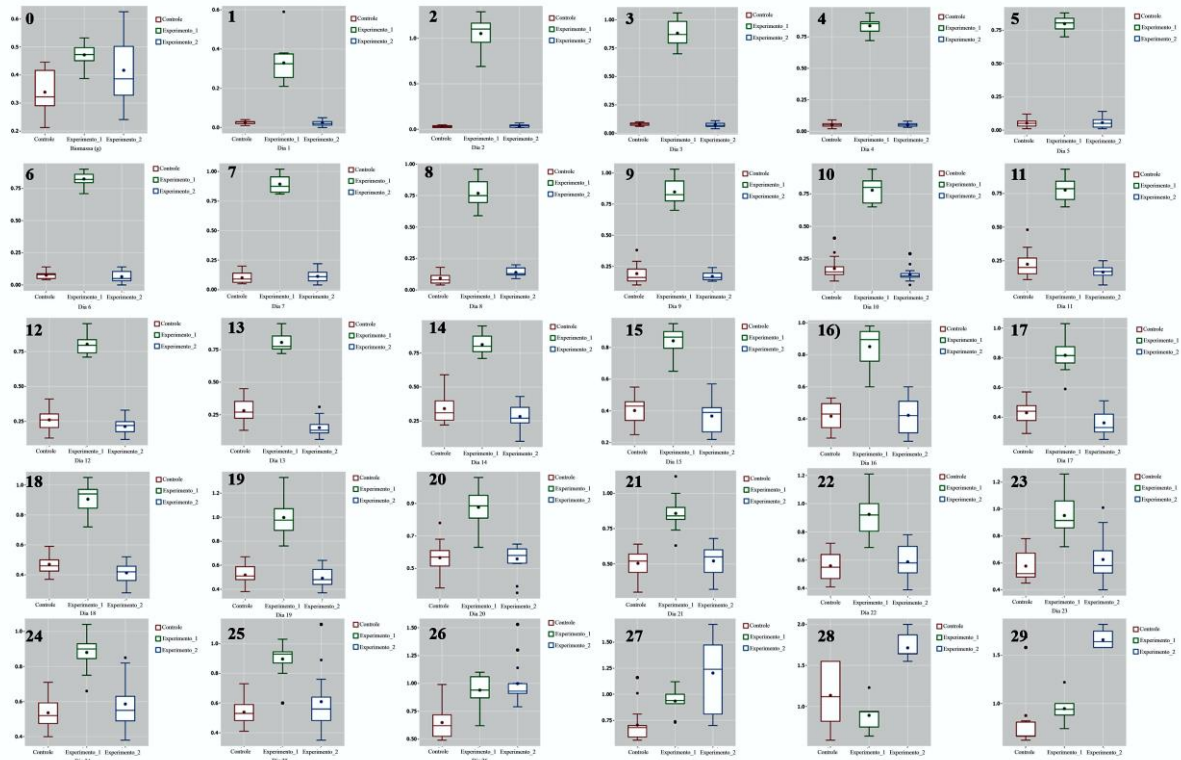


Fonte: Elaborada pela autora.

Tendo como base os dados obtidos do estudo cinético, foi possível determinar os parâmetros de análise e estimar o momento ideal para a introdução de SC no experimento 2. É válido salientar que, o aumento do número de reatores inviabilizou o cultivo de *H. pluvialis* nas estantes verticais, tendo sido necessária a adaptação de uma mesa de vidro para homogeneizar as condições de cultivo para os 45 reatores. No entanto, esta modificação refletiu no crescimento celular de *H. pluvialis*, onde as células expostas ao novo ambiente passaram por um período de aclimação, alterando assim, o dia em que os cultivos atingiram o seu pico de crescimento. Desta forma, a introdução de SC no experimento 2 foi realizada quando a média da absorbância das células do experimento controle atingiram valores próximos a 0,73.

Para avaliar a distribuição dos valores de absorbância dos experimentos controle (C), 1 (E1) e 2 (E2) durante os 29 dias de cultivo, utilizou-se a análise gráfica *box plot* (Figura 8, p. 35). Nesta análise, os gráficos apresentam formas de caixas, das quais podem ser obtidas informações sobre mediana, primeiro e terceiro quartis dos dados. Já as linhas verticais expressam o maior e o menor valor esperado dos resultados e os pontos isolados, denominados *outliers*, representam os possíveis valores discrepantes. Além disso, a largura da caixa permite avaliar a dispersão dos dados obtidos.

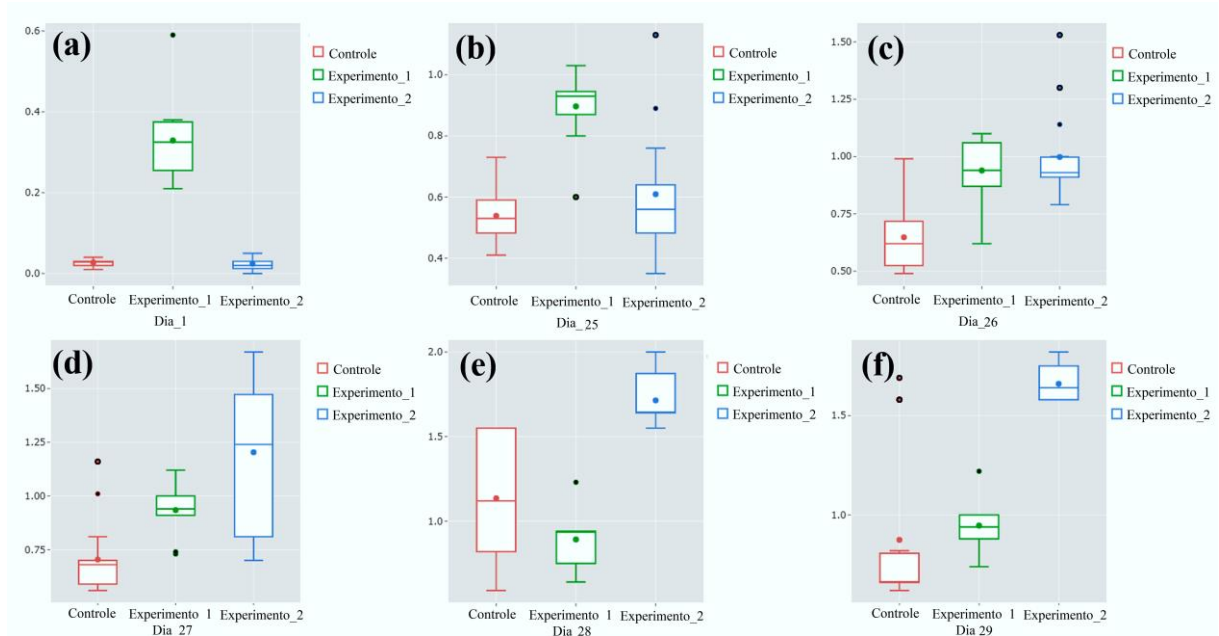
Figura 8. *Box plot* da absorvância registrada em 600 nm para controle, experimento 1 e experimento 2, respectivamente em vermelho, verde e azul. Os dias registrados são destacados na figura e zero é o *box plot* para a biomassa ponderada.



Fonte: Elaborada pela autora.

As análises dos gráficos *box plot* para as leituras de absorvância do primeiro dia de cultivo (Figura 9a, p. 36) mostram que as amostras submetidas ao **E1** possuem os maiores valores de absorvância, quando comparadas a **C** e **E2**. Este comportamento é esperado, visto que o SC foi introduzido no meio de cultura de tais amostras. A partir do segundo dia de cultivo, observa-se que os valores de absorvância para **E1** atingem um máximo e permanecem aproximadamente constantes até o dia 26 (Figura 9c, p. 36). Os valores de absorvância para os reatores dos experimentos **C** e **E2** crescem gradualmente no decorrer dos dias e exibem perfis análogos até o dia 25 (Figura 9b, p. 36), passando a se diferenciar a partir do dia 26 quando o experimento 2 é iniciado através da adição de SC nos 15 frascos Erlenmeyer destinados ao seu cultivo. É válido ressaltar que, esta data marca o início do estresse luminoso, parâmetro adotado para estimular a transição das células do estágio vegetativo para o estágio de hematocisto e, conseqüente, produção de astaxantina. A Figura 10 (p. 37) mostra o perfil das culturas de *H. pluvialis* para os experimentos **C**, **E1** e **E2** no dia 26.

Figura 9. *Box plot* da absorvância registrada em 600 nm para os experimentos controle (**C**), 1 (**E1**) e 2 (**E2**), respectivamente, em vermelho, verde e azul, para os dias 1 (a), 25 (b), 26 (c), 27 (d), 28 (e) e 29 (f).

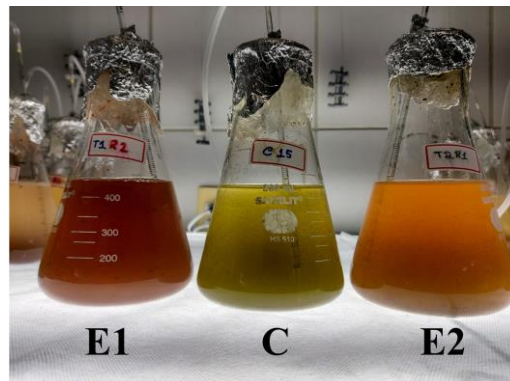


Fonte: Elaborada pela autora.

A comparação dos gráficos para os dias 26 (Figura 9c) e 27 (Figura 9d) revela as modificações causadas pelo estresse luminoso. Apesar do aumento no valor de absorvância, nota-se que cada experimento exibiu um comportamento distinto frente à incidência luminosa. A principal diferença encontra-se no grau de dispersão dos dados de absorvância dos cultivos, no qual a largura dos *box plots* de **C** e **E1** mostram uma redução e de **E2** um aumento acentuado. A maior dispersão dos dados de **E2** sugere que os cultivos estão passando por um processo de transição para maiores valores de absorvância, indicando que a abundância nutricional promovida pela introdução de SC influencia o crescimento da microalga.

Por fim, os gráficos dos dias 28 (Figura 9e) e 29 (Figura 9f) refletem as absorvâncias dos cultivos quando aproximadamente metade das células atingem o estágio encistado. Os dados revelam que, no último dia de cultivo (dia 29) os valores de absorvância dos experimentos 1 e 2 são superiores ao do experimento controle, indicando que a introdução de SC influencia o crescimento da microalga *H. pluvialis* e é independente da etapa em que são introduzidos no meio de cultura. No entanto, ao comparar os resultados dos experimentos 1 e 2 observa-se que **E2** se destaca por atingir maiores valores de absorvância, sendo um indício de que a introdução de SC no pico de crescimento causa maior acúmulo de biomassa.

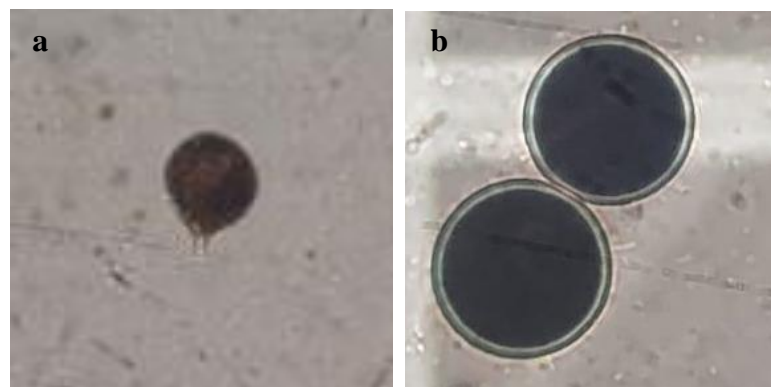
Figura 10. Fotos de frascos Erlenmeyer de uma replicata de cada um dos experimentos (**E1**, **C** e **E2**) no pico de crescimento (dia 26) da microalga.



Fonte: Elaborada pela autora.

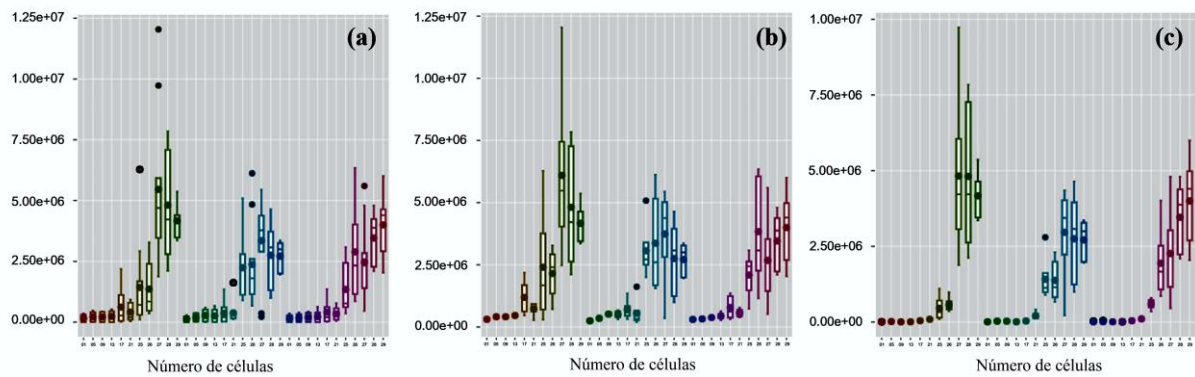
A diferenciação da morfologia e contagem do número de células no estágio vegetativo (Figura 11a) e encistado (Figura 11b) de *H. pluvialis* foi realizada através das análises em microscópio óptico de alíquotas de 1 mL preservadas em lugol e recolhidas nos dias 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 26, 27, 28 e 29 dos experimentos controle, 1 e 2. As células no estágio encistado diferenciam-se das células no estágio vegetativo por terem a forma arredondada, ausência dos dois flagelos e presença de uma parede celular espessa. Os dados da contagem do número de células totais, vegetativas e encistadas de **C**, **E1** e **E2** foram esboçados em gráficos *box plots* (Figura 12, p. 38). O perfil desses gráficos (Figuras 14b e 14c, p. 43) nos revelam que a população de células encistadas aumentam a partir do dia 26 em todos os cultivos, confirmando a eficiência do estresse luminoso na transição das células do estágio vegetativo para o estágio de hematocisto.

Figura 11. Imagens microscópicas da célula no estado vegetativo (a) e encistada (b) da microalga *H. pluvialis* preservadas em lugol.



Fonte: Elaborada pela autora.

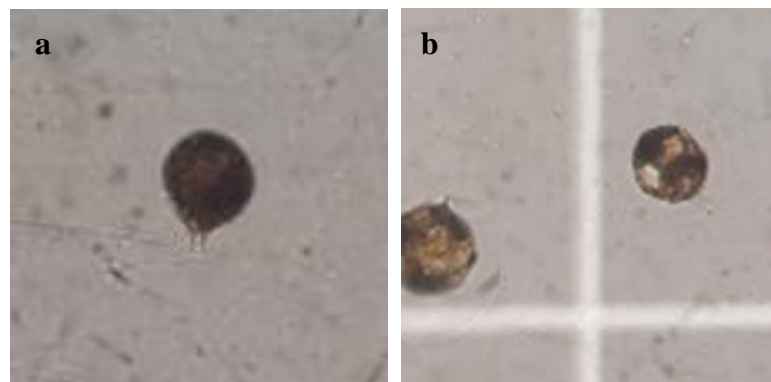
Figura 12. *Box plot* do número de células dos dias 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 26, 27, 28 e 29. Os primeiros onze *box plots* são os resultados para controle, seguidos por onze *box plots* para o experimento 1 e por onze *box plots* para o experimento 2. Em (a) os *box plots* foram construídos com células vegetativas e células encistadas; Em (b) incluem apenas as células vegetativas; Em (c) incluem apenas as células encistadas.



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise dos gráficos da Figura 12 revela que os controles possuem o maior número de células durante o experimento, com exceção do dia 29, cujos cultivos do experimento 2 excedem o seu valor. Este resultado nos permite concluir que o aumento do número de células não é o principal fator responsável pelo aumento dos valores de absorvância para **E1** e **E2**. Isto é confirmado pela comparação da morfologia das células do controle com as células tratadas com SC, onde as células vegetativas de **E1** diferenciam-se das células vegetativas do controle por desenvolverem vacúolos em seu citoplasma (Figura 13).

Figura 13. Fotos comparativas das células vegetativas do controle (a) e do experimento 1 (b) preservadas em lugol.



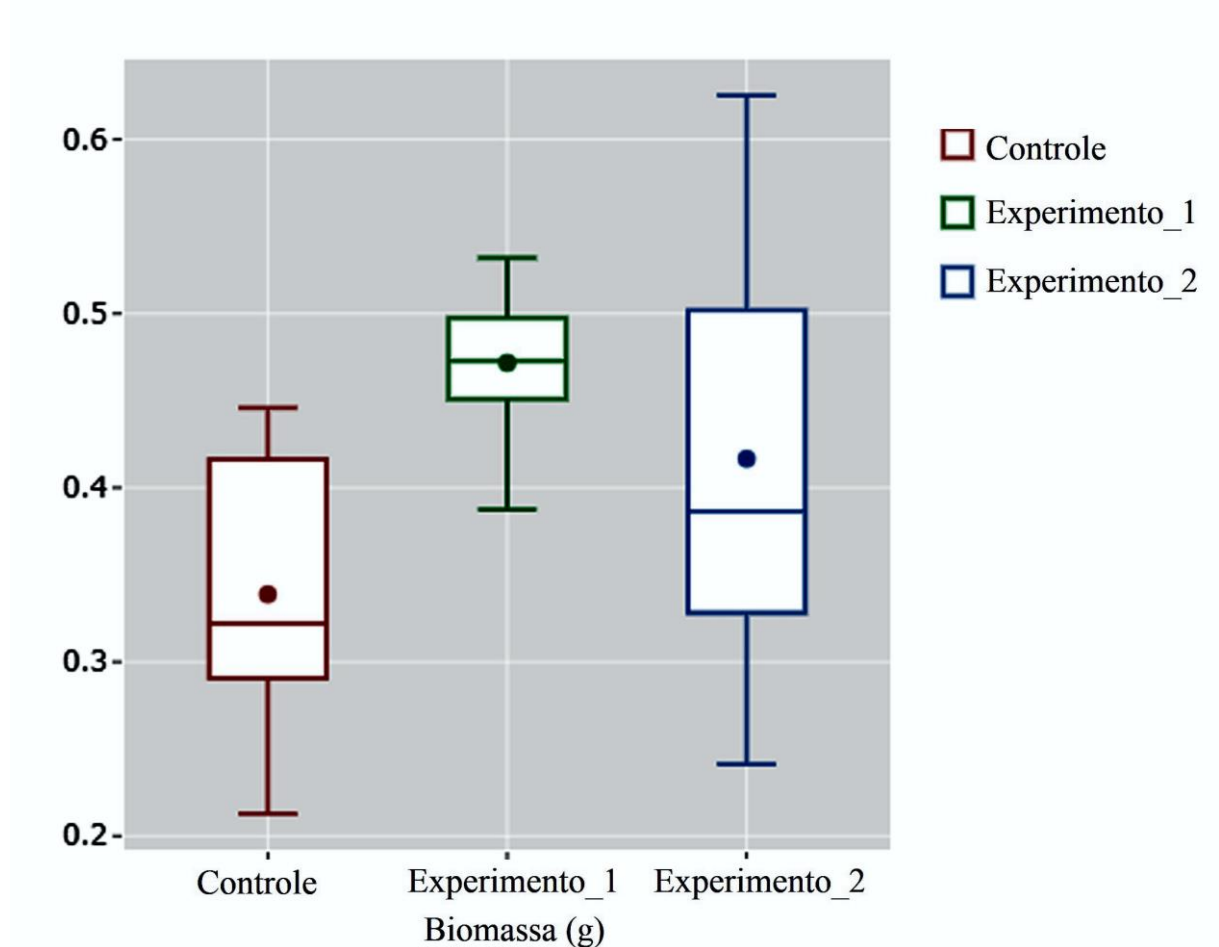
Fonte: Elaborada pela autora.

O processo de vacuolização influencia nos valores de absorvância por causar um aumento da área de superfície por unidade do citoplasma, ou seja, a presença do vacúolo promove um aumento do tamanho das células e maior distorção do seu formato aproximadamente esférico (RAVEN, 1987). Além disso, sob condições de saturação de recursos, o processo de vacuolização promove uma redução da taxa de crescimento específica máxima, motivo que explica a diferença do número de células presentes nos cultivos **E1** e **E2** em relação ao **C** (RAVEN, 1987).

O dinamismo dos vacúolos confere benefícios às células, englobando tanto o acúmulo vacuolar de metabólitos secundários que auxiliam na sua adaptação a estresses ambientais, quanto a sua participação ativa em processos biossintéticos como local de biossíntese de metabólitos especializados (SHITAN; YAZAKI, 2019). Estas características estão associadas aos resultados obtidos para os valores de biomassa e teor de astaxantina dos experimentos **C**, **E1** e **E2**.

A aferição da biomassa seca para os cultivos em **C**, **E1** e **E2**, nos três pontos de coleta, foram expressos na forma de gráficos *box plots* (Figura 14, p. 40). Os dados das massas agrupadas estão em concordância com a discussão realizada para os valores de absorvância obtidos nos dias 26, 27 e 29, que correspondem, respectivamente, à 1^a, 2^a e 3^a coleta. Nota-se que, dentre os três experimentos, o gráfico para **E1** revela um menor valor esperado próximo a 0,4 g, contrastando com os gráficos de **C** e **E2**, os quais possuem valores esperados menores (próximos a 0,2 g). Este dado indica que na 1^a coleta, os valores de biomassa para as células do experimento 1 foram superiores aos de **C** e **E2**. A Figura 15 (p. 40) mostra a coloração das biomassas dos experimentos na 1^a coleta. Sugere-se que a coloração avermelhada observada em **E1** deve-se ao acúmulo de metabólitos secundários do SC nos vacúolos das suas células vegetativas, pois existem mais células no estágio vegetativo do que hematocisto no dia 26 (Figura 12b e 12c, p. 38). Outra informação importante está vinculada à menor largura do gráfico de **E1**, que é um indicativo de que o grau de dispersão foi pequeno, ou seja, não ocorreu um aumento significativo no valor da biomassa após o estresse luminoso. Em contrapartida, os gráficos de **C** e **E2** apresentam larguras elevadas, conseqüentemente, maiores dispersões e aumentos significativos nos valores de biomassa entre as coletas. Ao comparar os maiores valores esperados dos gráficos de **E1** e **E2**, observa-se que ambos os experimentos atingem valores superiores ao controle, porém **E2** se destaca por exibir uma biomassa superior a 0,6 g.

Figura 14. *Box plot* da biomassa (em gramas) para controle, experimento 1 e experimento 2, respectivamente em vermelho, verde e azul.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15. Foto das placas de Petri contendo as biomassas dos experimentos controle, 1 e 2 na 1ª coleta.

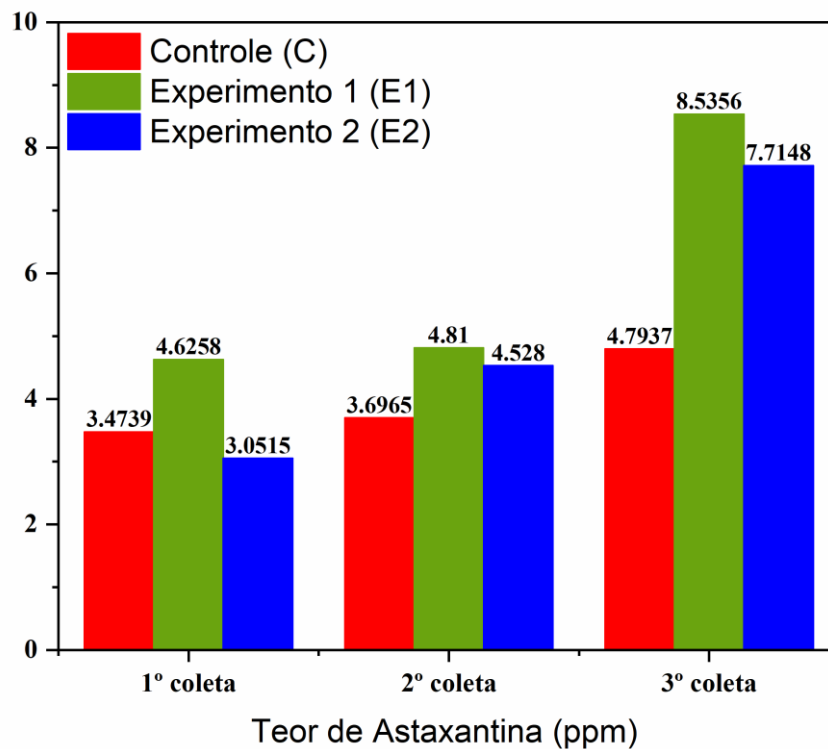


Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.1.2 Efeito do SC no acúmulo de astaxantina

Para comparar o acúmulo de astaxantina nas células da microalga *H. pluvialis* entre os cultivos de **C**, **E1** e **E2**, quantificou-se o teor de astaxantina e obteve-se o *fingerprint* dos extratos etanólicos. A partir dos extratos etanólicos (**EEMHP**) provenientes da biomassa seca dos 45 frascos Erlenmeyer, foi possível determinar o teor de astaxantina das células de *H. pluvialis* empregando-se a metodologia descrita na literatura (VO *et al.*, 2016). A média do teor de astaxantina dos experimentos controle, 1 e 2, para cada coleta, foram agrupados no gráfico de barras ilustrado na Figura 16.

Figura 16. Teor de astaxantina (ppm) nos extratos etanólicos (**EEMHP**) das biomassas geradas nos experimentos controle, 1 e 2.



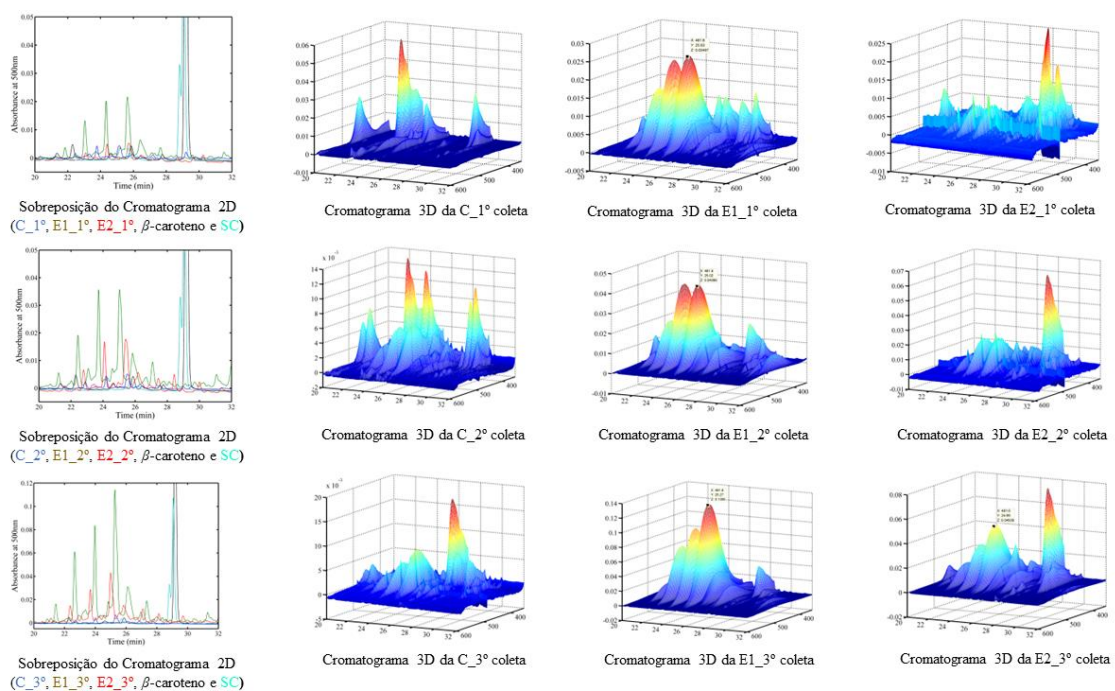
Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados deste gráfico mostram que a suplementação do meio de cultura da microalga com SC aumenta o teor de astaxantina, independentemente do momento em que é adicionado. Quando comparados com a média do controle na terceira coleta, os experimentos 1 e 2 resultaram num acréscimo de 78,1 e 60,9% no teor de astaxantina, respectivamente.

Visando uma análise mais apurada da composição dos carotenóides (β -caroteno, astaxantina e análogos), foram obtidos *fingerprints* para um padrão de β -caroteno, SC e

extratos etanólicos nos três pontos de coleta usando a metodologia descrita na seção 4.1.6. *Fingerprint* é uma metodologia analítica que utiliza impressões digitais instrumentais para obter informações sobre uma característica de um material ligada à sua composição química (CUADROS-RODRÍGEZ *et al.*, 2021). Para uma melhor visualização e conseqüentemente uma melhor comparação entre os espectros de *fingerprint* HPLC-DAD, selecionou-se o comprimento de onda de absorção de 350-600 nm para os cromatogramas 3D e 500 nm para os cromatogramas 2D e o intervalo de tempo de retenção de 20-32 min, por ser uma região que possui maior variação no perfil e maior variância, conforme mostra a Figura 17. Os comprimentos de onda escolhidos são próximos aos de maior absorção tanto para astaxantina (489 nm) (HU *et al.*, 2019) quanto para o padrão de β -caroteno (454 nm) (SONG; LU, 2023). Os cromatogramas 2D na faixa de 0-40 min podem ser vistos na Figura 18 (p. 43).

Figura 17. Espectros de *fingerprint* HPLC-DAD da sobreposição de cromatogramas 2D de extratos etanólicos de **C**, **E1** e **E2** para cada coleta, **SC** e padrão de β -caroteno. E os cromatogramas 3D individuais do **EEMHP** de **C**, **E1** e **E2** da 1^a, 2^a e 3^a coleta.

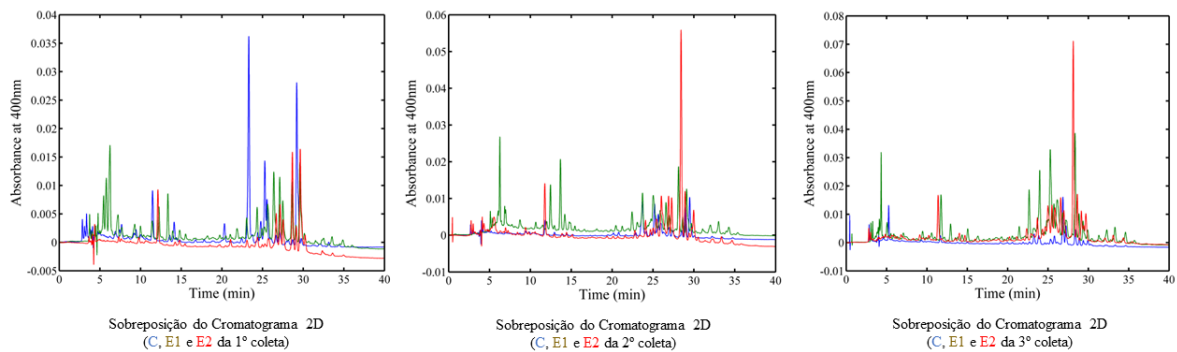


Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com PURKIEWICZ *et al.* (2020), o suco de cenoura da variedade laranja é composto pelos carotenóides: luteína, zeaxantina, α -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno e β -caroteno. Dentre os precursores biossintéticos da astaxantina (zeaxantina e β -caroteno), o β -

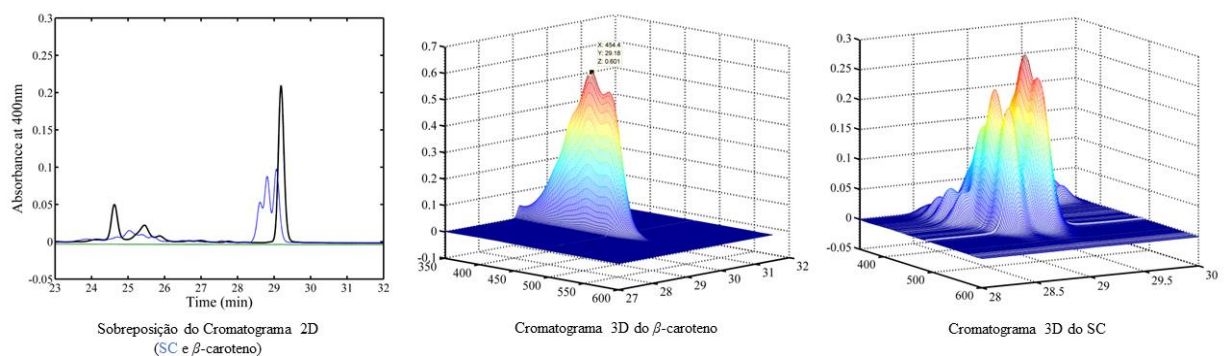
caroteno está presente de forma majoritária (55-56%). Assim, para comprovar a presença de β -caroteno no SC utilizado neste trabalho, foi realizada uma comparação dos espectros de *fingerprint* HPLC-DAD das respectivas amostras (Figura 19). A sobreposição dos cromatogramas 2D revelaram a presença de um pico em SC com alta intensidade no mesmo tempo de retenção do padrão de β -caroteno (29,18 min) e o perfil exibido pelos cromatogramas 3D para cada amostra mostrou que esse pico possui um espectro de absorção UV-vis semelhante à do padrão de β -caroteno, cujo perfil exibido está em concordância com o espectro de absorção UV-vis do β -caroteno relatado na literatura (SONG; LU, 2023). Tais resultados confirmam a presença de β -caroteno em SC.

Figura 18. Espectros de *fingerprint* HPLC-DAD da sobreposição de cromatogramas 2D de extratos etanólicos de **C**, **E1** e **E2** para cada coleta no intervalo de 0-40 min.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19. Espectros de *fingerprint* HPLC-DAD da sobreposição de cromatogramas 2D de padrão SC e β -caroteno. E os cromatogramas 3D individuais do padrão β -caroteno e SC.



Fonte: Elaborada pela autora.

A presença de β -caroteno em culturas de *H. pluvialis* foi analisada pela sobreposição de cromatogramas 2D dos extratos etanólicos da 1ª, 2ª e 3ª coleta de **C**, **E1** e **E2**,

SC e padrão de β -caroteno (Figura 17, p. 42). Os resultados obtidos mostram que a presença de β -caroteno nos extratos etanólicos é muito pequena, sugerindo uma alta velocidade de conversão de β -caroteno em seus produtos biossintéticos (Figura 4, p. 28).

Em relação aos cromatogramas 3D do **EEMHP** para as 1^a, 2^a e 3^a coletas de **C**, **E1** e **E2**, a presença de astaxantina e seus análogos pode ser detectada pela presença de picos com espectro de absorção UV-vis semelhante ao da astaxantina relatado na literatura (HU *et al.*, 2019) (Figura 17, p. 42). Os cromatogramas 3D da 1^a coleta mostram que apenas **E1** apresenta picos (24,92 min; 25,29 min; 25,63 min) com espectro de absorção UV-vis semelhante ao da astaxantina relatado na literatura, ou seja, a adição de SC no início do cultivo e a subsequente formação de vacúolos dentro das células de *H. pluvialis* fez com que as células dessa microalga iniciassem a produção de astaxantina e análogos antes do estresse luminoso. Embora esta característica possa estar associada a uma redução no número total de células (Figura 12, p. 38), ela não gera impactos negativos no valor da biomassa de **E1** (Figura 14, p. 40).

Os cromatogramas 3D da 2^a coleta revelam a presença de picos em **E1** (22,43 min; 23,71 min; 25,02 min) e **E2** (22,78 min; 24,08 min; 25,40 min) com espectro UV-vis semelhante ao da astaxantina relatado na literatura. A presença de bandas características de astaxantina em **E2** sugere que a adição de SC no início do estresse luminoso acelera e aumenta a produção de astaxantina, uma vez que o perfil cromatográfico de **E2** difere de **C**. E por fim, nos cromatogramas 3D do 3^a coleta é possível observar a presença de picos com espectros de absorção UV-vis semelhantes ao da astaxantina descrito na literatura em todos os experimentos (**C**: 22,67 min; 24,18 min; 25,18 min, **E1**: 22,65 min; 23,96 min; 25,27 min e **E2**: 22,36 min; 23,68 min; 24,99 min). Porém, quando analisamos a sobreposição dos cromatogramas 2D para os experimentos da 3^a coleta, a variação na intensidade desses picos se torna evidente.

A intensidade do pico é diretamente proporcional à quantidade de uma substância em uma amostra, desta forma, a ordem crescente dos experimentos em relação à maior composição de astaxantina e seus análogos na 1^a coleta corresponde a $C \approx E2 < E1$ e na 2^a e 3^a coletas equivalem a $C < E2 < E1$. Comparando esses resultados com os valores do teor de astaxantina obtidos por espectroscopia (Figura 16, p. 41), eles seguem a mesma tendência, ou seja, as metodologias apresentam uma boa correlação e mostram que a adição de SC nas culturas de *H. pluvialis* aumenta o acúmulo de astaxantina nas células, principalmente quando adicionada no início da cultura.

4 CAPÍTULO 2 - NANOENCAPSULAMENTO DOS EXTRATOS PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE

4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1.1 Encapsulamento da astaxantina

Todas as técnicas que consistem no revestimento de substâncias puras ou misturas sensíveis a fatores externos (material de núcleo) por outro componente que atua como uma barreira protetora (cápsula ou material de parede) são denominadas de encapsulamento (GONZÁLEZ-PEÑA *et al.*, 2023). Por ser capaz de aprisionar dentro de matrizes poliméricas extratos sensíveis a fatores ambientais (temperatura, luz) e a condições de processamento (pH, tratamentos térmicos e interação com outras moléculas), o encapsulamento surge como estratégia viável e eficaz para proteger e liberar em condições específicas compostos bioativos provenientes de extratos de diferentes espécies vegetais e micro-organismos (FRANCO; ARAZO; BENEVIDES, 2023).

Dentre as espécies de micro-organismos existentes, a microalga *Haematococcus pluvialis* é constituída por carotenóides de alto valor agregado para as indústrias de diferentes segmentos (Capítulo 1, Tópico 3.1.3, p. 23). Porém, o uso dos carotenóides nas indústrias cosméticas e de alimentos é limitado devido à sua baixa biodisponibilidade, insolubilidade em água, altos pontos de fusão e baixa estabilidade frente a fatores ambientais (luz e calor) e **químicos** (radicais livres, oxigênio e metais) (GONZÁLEZ-PEÑA *et al.*, 2023). Neste caso, o encapsulamento pode promover melhorias na estabilidade, armazenamento, manuseio e eficácia dos carotenóides devido a sua capacidade de retardar a degradação química através da formação de uma barreira protetora que isola os carotenóides do ambiente externo, de aumentar a compatibilidade dessas moléculas fortemente hidrofóbicas com matrizes hidrofílicas e de mascarar odores e sabores desagradáveis associados aos carotenóides provenientes das microalgas (HAMED *et al.*, 2023).

Em relação ao preparo das formulações de carotenóides, as emulsões são amplamente utilizadas (GONZÁLEZ-PEÑA *et al.*, 2023). Miniemulsões, também denominadas nanoemulsões, são sistemas heterogêneos criticamente estáveis preparados por forças intensas de cisalhamento (por exemplo, alta pressão ou irradiação ultrassônica) de dois líquidos imiscíveis. Caracterizadas pela baixa polidispersividade, essas dispersões geram emulsões nanoestruturadas quando surfactantes (aniônicos, catiônicos ou não aniônicos) são

adicionados ao componente lipofílico e à fase contínua. Para formar as nanocápsulas poliméricas são realizadas reações de polimerização com espécies anfífilas na interface da nanogota. As nanocápsulas poliméricas obtidas via síntese em nanoemulsão apresentam como vantagem o elevado grau de controle sobre a microestrutura polimérica, visto que o tamanho da nanogota controla a quantidade de reagente e é alcançada pela exploração da polimerização radicalar controlada (DE OLIVEIRA; FECHINE; FECHINE, 2020).

Nos últimos anos, houve uma amplificação do uso tópico da astaxantina visando promover benefícios cosméticos e sanar problemas dermatológicos, como: inibição da síntese de melanina, fotooxidação, fotoenvelhecimento, supressão da hiperpigmentação e proteção contra o câncer de pele (GU *et al.*, 2023). Entretanto, a insolubilidade em água e a baixa biodisponibilidade podem restringir a absorção pela pele da astaxantina. Associado a isto, à estrutura altamente insaturada dessa molécula facilita o seu processo de degradação durante o armazenamento e processamento. Uma alternativa para resolver essa problemática consiste no processo de nanoencapsulamento da astaxantina (GU *et al.*, 2023). A análise da literatura sobre este tópico sugere que as tecnologias de encapsulamento apresentam elevado potencial para melhorar a funcionalidade da astaxantina e dos extratos lipídicos que a contém, seja como um bioativo ou um ingrediente tecno-funcional (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; CALVO; GÓMEZ-ESTACA, 2020).

4.1.2 Envelhecimento da pele e as atividades antioxidante e fotoprotetora

Um dos principais fatores responsáveis pelo envelhecimento da pele consiste na exposição à radiação solar. A radiação ultravioleta (UV) estimula a formação de radicais livres que são responsáveis pelo estresse oxidativo e estão diretamente relacionados com as mutações e o fotoenvelhecimento. O fotoenvelhecimento é um processo cumulativo influenciado pela frequência de exposição ao sol e a pigmentação da pele. Dependendo da radiação que a pele é exposta, diferentes danos podem ser causados. Por exemplo, a radiação UVA quando penetra através da epiderme até a derme danifica o tecido conjuntivo e a matriz extracelular promovendo perda de elasticidade, hidratação e firmeza da pele. Já a absorção da radiação UVB é realizada na epiderme por moléculas de aminoácidos aromáticos de DNA, RNA e proteínas, causando efeitos de maior gravidade, como danos diretos ao DNA, eritema, espessamento do estrato córneo, melanogênese e fotoimunossupressão, além disso, quando absorvida pelas bases de DNA e RNA geram várias mutações e afetam a síntese proteica celular (CÂNDIDO *et al.*, 2022).

Desta forma, proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação UV se tornou uma necessidade. Atualmente, existem diferentes formas de realizar esta atividade, porém a mais popular consiste na aplicação tópica de produtos que contenham moléculas capazes de absorver ou refletir essa radiação solar. Esta diferença no mecanismo de reação divide as moléculas em agentes inorgânicos e orgânicos, no qual, os protetores solares inorgânicos atuam refletindo e dispersando a radiação UV e visível e os orgânicos absorvem a radiação UV e reemitem energia na forma de calor ou luz. Os compostos naturais possuem benefícios que conferem proteção adicional frente as moléculas inorgânicas porque além de serem capazes de absorver tal radiação, podem exibir outras propriedades biológicas, como a atividade antioxidante (SAEWAN; JIMTAISONG, 2015).

Os antioxidantes são substâncias de origem natural ou sintética capazes de prevenir ou retardar o dano oxidativo celular. No qual, os recentes esforços para o desenvolvimento de produtos ecologicamente corretos, não tóxicos e de origem natural favorece a busca e obtenção de antioxidantes naturais que possam substituir os de fonte sintética. Em relação as fontes naturais dessas substâncias, as microalgas apresentam maior capacidade de produção quando comparadas as plantas, onde uma única espécie é capaz de produzir uma grande variedade de antioxidantes, como clorofila, vitaminas, flavonóides, polifenóis, esteróis e carotenóides (MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2022).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Preparação das nanocápsulas poliméricas

4.2.1.1 Obtenção do extrato etanólico da microalga *H. pluvialis* (EEMHP) para nanoencapsulamento

O preparo de **EEMHP** para posterior nanoencapsulamento foi realizado empregando 10,1309 g da biomassa seca de *H. pluvialis*. A biomassa foi dispersada em 500 mL de etanol, homogeneizada por 5 min em um banho sonicador e submetida ao processo de ultrassom de sonda. O equipamento de ultrassom foi ajustado para um tempo de 15 min (pulso 5s *on* e 5s *off*), amplitude de 40% e termopar com 50 °C (temperatura máxima). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 min e após coleta do sobrenadante, o solvente do mesmo foi removido por um rotaevaporador, sendo obtido 1,5784 g de **EEMHP**, perfazendo um rendimento de 15,6%.

4.2.1.2 Fracionamento do extrato etanólico da microalga *H. pluvialis*

Uma alíquota de **EEMHP** (181,8 mg) foi submetida a um tratamento cromatográfico em uma coluna sob média pressão (flash) denominada C_F (L = 14,0 cm e Φ = 2,0 cm), utilizando 15,9754 g de gel de sílica como adsorvente e diclorometano, diclorometano:metanol (95:5) e metanol como eluentes, que foram evaporados em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após analisar as frações coletadas por cromatografia em camada delgada (CCD) foram obtidas 5 frações reunidas, cujos dados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados do fracionamento cromatográfico de EEMHP (C_F)

<i>Frações</i>	<i>Código</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
Diclorometano 1	FD1	200	14,0	7,7
Diclorometano 2	FD2	100	7,9	4,3
Diclorometano:Metanol (95:5)_1	FDM5%_1	150	53,3	29,3
Diclorometano:Metanol (95:5)_2	FDM5%_2	50	1,9	1,0
Metanol	FMeOH	150	100,0	55,0
Total			177,1	97,3

Fonte: Elaborada pela autora.

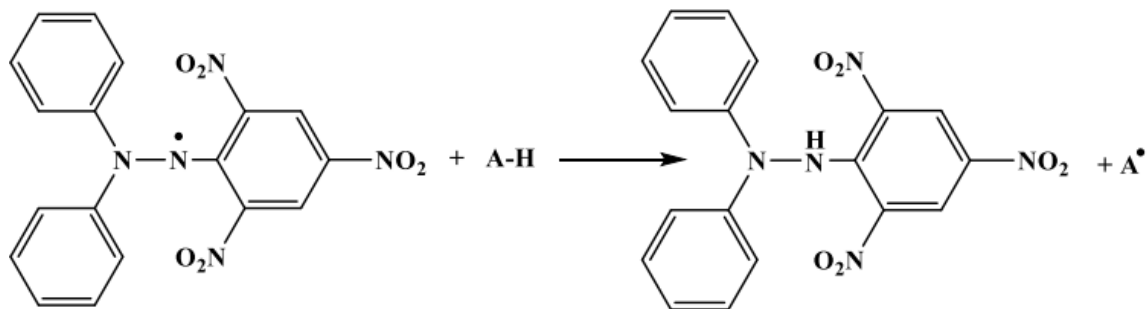
Por apresentarem os maiores rendimentos as frações diclorometano:metanol (95:5)₁ e metanol foram selecionadas para realização dos ensaios biológicos.

4.2.1.3 Ensaios biológicos

4.2.1.3.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH

A capacidade antioxidante dos compostos foi avaliada através do método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), descrito por BRAND-WILLIAMS (1995), com modificações de HEGAZI (2002). A reação baseia-se na captura de hidrogênio presente na substância oxidante pela molécula DPPH, produzindo um composto estável (Figura 20).

Figura 20. Reação de captura de hidrogênio presente na substância oxidante (AH) pela molécula de DPPH.



Fonte: Elaborada pela autora.

Partindo de uma solução metanólica de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ das amostras **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH**, preparou-se, através de diluições sucessivas, soluções com concentrações variando de $0,01563$ a $0,0002439 \text{ mg.mL}^{-1}$. Após aferir a absorbância das mesmas (Ab_{amostra}) adicionou-se DPPH $60 \mu\text{M}$ em cada solução. A reação foi incubada sob ausência de luz, em temperatura ambiente, durante 30 min. Em seguida, cada solução foi transferida individualmente para uma cubeta de quartzo e realizou-se as leituras de absorbância em um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV mini-1240. Previamente, o equipamento foi calibrado com metanol PA da marca Synth®, ajustado para um comprimento de onda (λ) em 515 nm e a medida da absorbância do branco (Ab_{branco}) foi realizada com a mistura de 2 mL de metanol e 2 mL da solução de DPPH. Realizou-se todo procedimento em triplicata utilizando ácido cafeico e o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) como padrões positivos. E a porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a Equação 2.

$$AA\% = \left[1 - \left(\frac{Abs_{branco}}{Abs_{DPPH} - Abs_{amostra}} \right) \right] \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Por fim, os valores de CI_{50} (concentração do antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH) tanto das amostras como do Trolox foram determinados através da análise da regressão linear das curvas de concentração em $mg.mL^{-1}$ versus porcentagem da atividade antioxidante.

4.2.1.3.2 Fator de Proteção Solar (FPS)

A metodologia para determinação do fator de proteção solar (FPS) de **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH** foi adaptada de MBANGA *et al.* (2014) e tem como base a análise espectrofotométrica (espectrofotometria no ultravioleta) de soluções diluídas. Partindo de uma solução mãe com concentração de $0,2 mg.mL^{-1}$ de **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH** preparou-se por diluições sucessivas nove soluções etanólicas com concentração variando de $0,035$ a $0,024 mg.mL^{-1}$. Em seguida, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV mini-1240) utilizando uma célula de quartzo de 1 cm e etanol como branco. Os dados obtidos permitiram determinar o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de cada amostra e utilizando a lei de Lambert-Beer (Equação 3) pode-se calcular as absorções de 190 a 1100 nm para a concentração de $0,2 mg.mL^{-1}$ de **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH**.

$$A = \epsilon bc \text{ (Equação 3)}$$

Em que, ϵ : coeficiente de absorvidade molar, b : comprimento do caminho óptico (distância que a luz percorre a solução) e c : concentração do analito.

Por fim, selecionou-se os dados de absorção na faixa de 290 a 320 nm, com intervalo de 5 nm, para serem aplicados na equação de Mansur (Equação 4), cujo resultado corresponde ao FPS para o extrato e frações analisadas. Os valores de $EE \times I$ utilizados nesta equação são constantes e foram pré-determinados por SAYRE *et al.*, 1979.

$$FPS_{Espectrofotométrico} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \text{ (Equação 4)}$$

Onde CF: fator de correção (=10); EE: espectro de efeito eritematoso; I: espectro de intensidade solar e Abs: absorvância da amostra.

4.2.1.4 Nanoencapsulamento do EEMHP e FDM5%_1

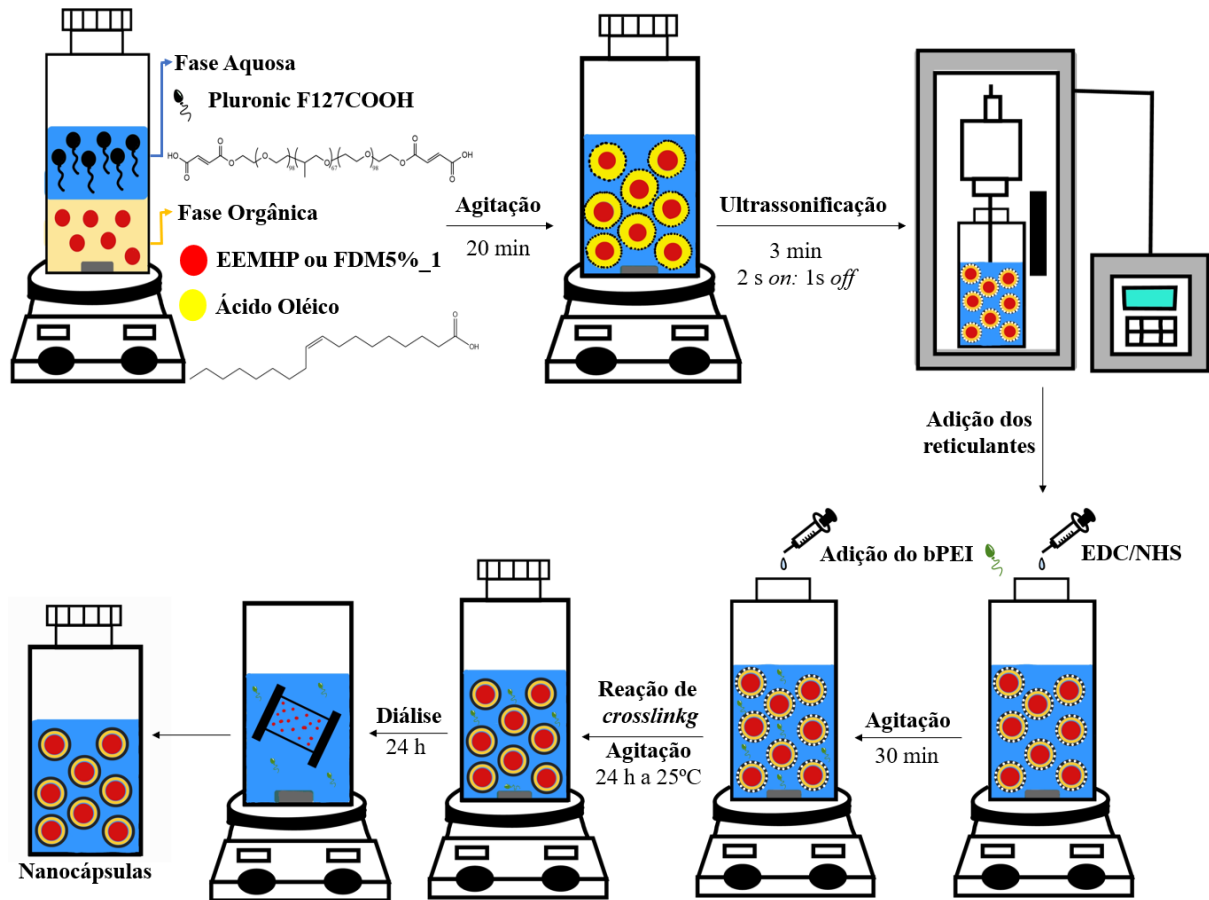
4.2.1.4.1 Síntese das nanocápsulas via nanoemulsão

As nanocápsulas de Pluronic F127-bPEI foram sintetizadas através da reticulação polimérica ou *crosslinking*, empregando como estratégia metodológica o processo de nanoemulsão, adaptado de ZHANG *et al.*, (2010) e ilustrado na Figura 21 (p. 52). Primeiramente, a fase orgânica (FO) foi preparada com 5 mg de ativo hidrofóbico, **EEMHP** e **FDM5%_1**, dissolvido em 400 μ L e 300 μ L de acetona, respectivamente, seguido da adição em 1 mL de ácido oléico, no qual foi introduzido em banho ultrassônico por 30 min a 25 °C. A fase aquosa (FA) foi preparada pela solubilização de 108 mg do surfactante Pluronic F127COOH (copolímero tribloco carboxilado F127) (0,0084 mmol) em 19 mL de água destilada, acompanhada por agitação magnética durante 20 min a 25 °C. Decorrido o preparo das duas fases imiscíveis, a FA foi vertida na FO, no qual o sistema foi submetido a pré-homogeneização sob agitação magnética por 20 min. Finalizado este procedimento a emulsão foi submetida ao processo de ultrassonicação de sonda utilizando banho de gelo e com regime de pulso de 2 s *on* e 1 s *off* durante 3 min, amplitude de 50% e temperatura máxima de 90°C.

Após à irradiação ultrassônica, 4,83 mg de EDC (Cloridrato de (3-Dimetilamino-propil)-etil-carbodiimida) (0,0252 mmol) e 5,80 mg de NHS (*N*-hidroxissuccinimida) (0,0504 mmol), dois agentes reticulantes, foram dissolvidos em 1 mL de água e adicionados na nanoemulsão sob agitação por 30 min. Em seguida, para ocorrer o *crosslinking* foram adicionados gota a gota na nanoemulsão a solução preparada pela dissolução de 210,00 mg de b-PEI (polietilenoimina) em 4 mL de água. Visando a completa reticulação polimérica, e consequente formação das nanocápsulas, **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1**, o sistema foi mantido sob agitação magnética por 24 h a 25 °C.

Por fim, ambas as nanocápsulas foram purificadas para remoção do EDC e resíduos de polímero não reticulado, onde alíquotas de 4 mL de cada material foram dialisadas empregando uma membrana de 50kDa imersa em aproximadamente 2L de água destilada. Este procedimento teve duração de 24h, com a troca da água destilada decorrido 3h para **NC-EEMHP** e 12h para **NC-FDM5%_1**. É válido salientar que as nanocápsulas foram protegidas da luz e armazenadas em frascos âmbar a temperatura ambiente.

Figura 21. Representação da síntese das nanocápsulas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a obtenção das formulações, caracterizou-se as nanocápsulas, **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1**, pelo tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta através da técnica de espalhamento de luz hidrodinâmico (DLS); e pela análise estrutural por meio da Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR); análise da morfologia via Microscopia de Força Atômica (AFM); além disso, realizou-se a determinação do teor de sólidos (%TS).

4.2.1.5 Caracterização

4.2.1.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em um equipamento Perkin Elmer, modelo 16 PC, no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. As amostras foram maceradas em um almofariz de ágata e prensadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) sob pressão de 8 t e os espectros foram registrados no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} em uma

resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.1.5.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta

A distribuição de tamanho das partículas e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (ECF) e o potencial zeta por anometria laser Doppler, utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern®) do laboratório de materiais funcionais avançados (LAMFA), localizado no departamento de física da UFC. Ambos os procedimentos foram realizados em triplicata a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e as amostras, **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1** foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q) na proporção 1:100 V/V e 1:200 V/V, respectivamente. Visando a determinação do diâmetro médio e PDI, transferiu-se cada amostra para uma cubeta de poliestireno e as medidas efetuadas com ângulo fixo de detecção a 90° . Em relação as análises do potencial zeta as amostras foram depositadas em uma cubeta potencial zeta. É válido ressaltar, que os valores obtidos para cada análise correspondem à média \pm desvio padrão de dez medidas da formulação das nanocápsulas.

4.2.1.5.3 Microscopia de força atômica (AFM)

A morfologia das nanocápsulas foi observada utilizando o microscópio da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, Asylum MFP 3D Bio, operando em modo *tapping*, equipado com pontas de silício fabricadas pela NanoWorld, com frequência de ressonância de 350 MHz e constante de força de 42 N/m. As amostras foram preparadas, diluindo-se as nanocápsulas dispersas em água MiliQ na proporção (1:400) (NC:água MiliQ) (v/v) sendo posteriormente depositadas sobre um substrato de silício e secas à temperatura ambiente.

4.2.1.6 Teor de sólidos

Para determinar a concentração das nanocápsulas, **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1**, presentes em g/g de solução antes e depois da diálise foi realizado o cálculo do teor de sólidos através da Equação 5 (p. 54). O procedimento foi feito da seguinte forma: inicialmente pesou-se um Eppendorf® vazio (m_1), em seguida, pesou-se o mesmo Eppendorf® contendo 1 mL da solução (m_2), por fim, as amostras foram congeladas, liofilizadas e o Eppendorf® foi pesado novamente (m_3).

$$\%TS = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

4.2.1.7 Eficiência de encapsulamento e capacidade de carreamento dos ativos

A eficiência de encapsulamento (%EE) permite avaliar quantitativamente a eficácia da síntese das nanocápsulas, através da obtenção dos valores de ativo encapsulado em termos de concentração. Inicialmente **EEMHP** e **FDM5%_1** foram submetidos a uma varredura no espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini-1240) visando determinar os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) dos ativos presentes nas amostras encapsuladas. Em seguida, uma curva de calibração foi determinada para cada amostra, na qual as leituras das absorvâncias das soluções com concentração de 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 e 0,003125 mg.mL⁻¹ no $\lambda_{\text{máx}}$ permitiram a obtenção de ambas as equações da reta.

Para quantificação dos valores de %EE de **NC-EEMHP** e de **NC-FDM5%_1**, as respectivas dispersões das nanocápsulas foram centrifugadas a 5100 rpm durante 60 min em temperatura ambiente. Após a coleta dos sobrenadantes, os mesmos foram liofilizados e solubilizados em metanol para as subseqüentes leituras de absorvância em triplicata. O cálculo de %EE foi realizado utilizando a Equação 6.

$$\%EE = \frac{[Ativo_{total}] - [Ativo_{sobrenadante}]}{[Ativo_{total}]} \times 100\% \text{ (Equação 6)}$$

Onde [Ativo_{total}] é a concentração de ativos na dispersão de nanocápsulas e [Ativo_{sobrenadante}] é a concentração de ativos no sobrenadante.

O cálculo da capacidade de carreamento (CC) foi feito empregando a Equação 7 levando em consideração a massa de **EEMHP** e **FDM5%_1** encapsulado e massa de polímero (bPEI) utilizada na formulação da síntese.

$$\%CC = \frac{\text{Massa de ativo encapsulado (mg)}}{\text{Massa de polímero (mg)}} \times 100\% \text{ (Equação 7)}$$

4.2.1.8 Estudo da estabilidade de NC-FDM5%_1 frente a variação de pH

A estabilidade de **NC-FDM5%_1** foi avaliada empregando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern®) através da obtenção dos valores do diâmetro médio das partículas, do índice de polidispersividade e do potencial zeta. Desta forma, soluções de NaOH e HCl com pH variando de 2 a 12 foram preparadas e utilizadas para diluir a solução de **NC-FDM5%_1** na proporção de 1:100 V/V. As soluções obtidas foram analisadas de acordo com o procedimento descrito no tópico 4.2.1.5.2.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Ensaios biológicos

4.3.1.1 Análise da atividade antioxidante

Os valores de CI_{50} obtidos na determinação da atividade antioxidante para **EEMHP**, **FDM5%_1**, **FMeOH** e dos controles positivos encontram-se agrupados na Tabela 4. Para interpretar os dados dessa tabela deve-se ter o conhecimento de que quanto menor o valor de CI_{50} mais poderosa é a atividade antioxidante. Desta forma, a comparação dos valores de CI_{50} entre os padrões e as amostras testadas revelam se **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH** apresentam potencial sequestrador de radical. Portanto, pode-se concluir que as amostras analisadas possuem compostos que inibem ou retardam a oxidação por inativação de radicais livres, pois quando comparadas com o ácido caféico, **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH**, exibiram um valor de CI_{50} inferior, ou seja, possuem uma atividade antioxidante superior à dessa substância. E em relação ao trolox, a **FMeOH** apresentou maior proximidade com o valor de CI_{50} deste padrão positivo, com uma variação de 35,9%. Além disso, os resultados obtidos foram consistentes com o valor de CI_{50} de 5,15 ppm relatado por AL-TARIFI *et al.* (2020) para a astaxantina extraída da microalga *H. pluvialis* com metanol.

Tabela 4. Dados de CI_{50} para **EEMHP**, **FDM5%_1**, **FMeOH** e dos controles positivos

<i>Amostra</i>	<i>CI_{50} (ppm)</i>	<i>Desvio Padrão</i>
EEMHP	5,386	± 1,0771
FDM5%_1	6,812	± 0,6188
FMeOH	3,536	± 0,7272
Trolox	2,602	± 0,2033
Ácido caféico*	8,000	± 0,0003

*HEGAZI, A. H.; ABD EL HADY, F. K., 2002.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1.2 Fator de Proteção Solar (FPS)

Os valores de FPS para **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH** foram agrupados na Tabela 5 (p. 57). Nota-se que dentre as amostras testadas, **FDM5%_1** e **EEMHP** possuem os valores de FPS mais elevados indicando o potencial da incorporação dessa fração e extrato em formulações cosméticas, pois quanto maior o FPS, maior será a proteção contra os efeitos nocivos dos raios UV. Trabalhos como o de ZAKARIA, ZAMZURIE E HARITH (2021)

mostram que a incorporação em creme protetor solar de 0,5 e 1% do pigmento astaxantina extraído da microalga *H. pluvialis* melhoram significativamente o valor de FPS do produto cosmético.

Tabela 5. Valores de FPS para **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH**

<i>Amostra</i>	<i>FPS</i>
<i>EEMHP</i>	28,1
<i>FDM5%_1</i>	44,1
<i>FMeOH</i>	13,4

/Fonte: Elaborada pela autora.

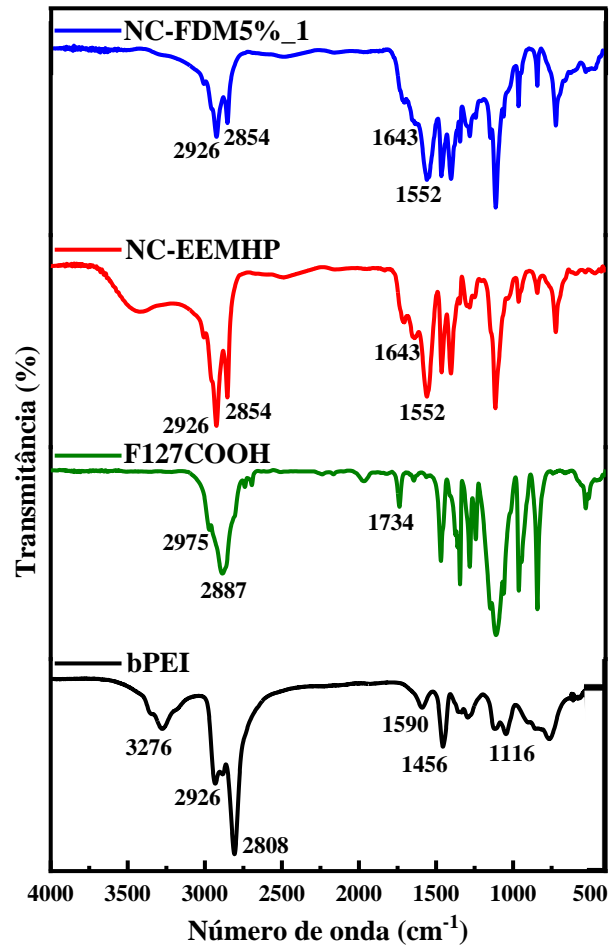
4.3.2 Caracterizações das nanocápsulas sintetizadas

4.3.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Utilizou-se a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) para investigar quimicamente a formação e composição das nanocápsulas através da análise da modificação no perfil espectral do F127COOH, antes e depois da reação de reticulação que ocorre entre os grupos C=O do éster-NHS presente no surfactante ativado, com grupamentos NH₂ advindos das moléculas de bPEI. Os perfis espectrais das amostras estão ilustrados na Figura 22 (p. 58).

No espectro FTIR das nanocápsulas observa-se bandas em superposição de deformação axial de C=O em 1643 cm⁻¹ com bandas de deformação angular de N-H em 1552 cm⁻¹ de amidas II. A presença dessas bandas, confirmam a ocorrência da reação de reticulação (Figura 23, p. 59) entre os grupos C=O do F127COOH após ser ativado pelo EDC/NHS, com grupamentos de aminas I das moléculas de bPEI, cuja banda de deformação angular encontra-se em 1590 cm⁻¹. Nota-se que nos espectros das nanocápsulas, as bandas de amida II em 1552 cm⁻¹ são bastante aparentes indicando que na reação de reticulação entre bPEI e Pluronic F127COOH ativado ocorreu a conversão de grupos de amina primária (NH₂) para secundária (NH). Além disso, a ausência da banda de deformação axial C=O (1734 cm⁻¹) no espectro FTIR das nanocápsulas é um indício de que todos os terminais carboxila do F127COOH formaram uma ligação amida com o bPEI. As principais regiões observadas nos espectro de FTIR, bem como suas respectivas atribuições estão esboçadas na Tabela 6 (p.58).

Figura 22. Espectro comparativo na região do infravermelho, entre as nanocápsulas sintetizadas (NC-EEMHP e FDM5%_1), o copolímero surfactante F127COOH e polímero bPEI.



Fonte: Elaborada pela autora.

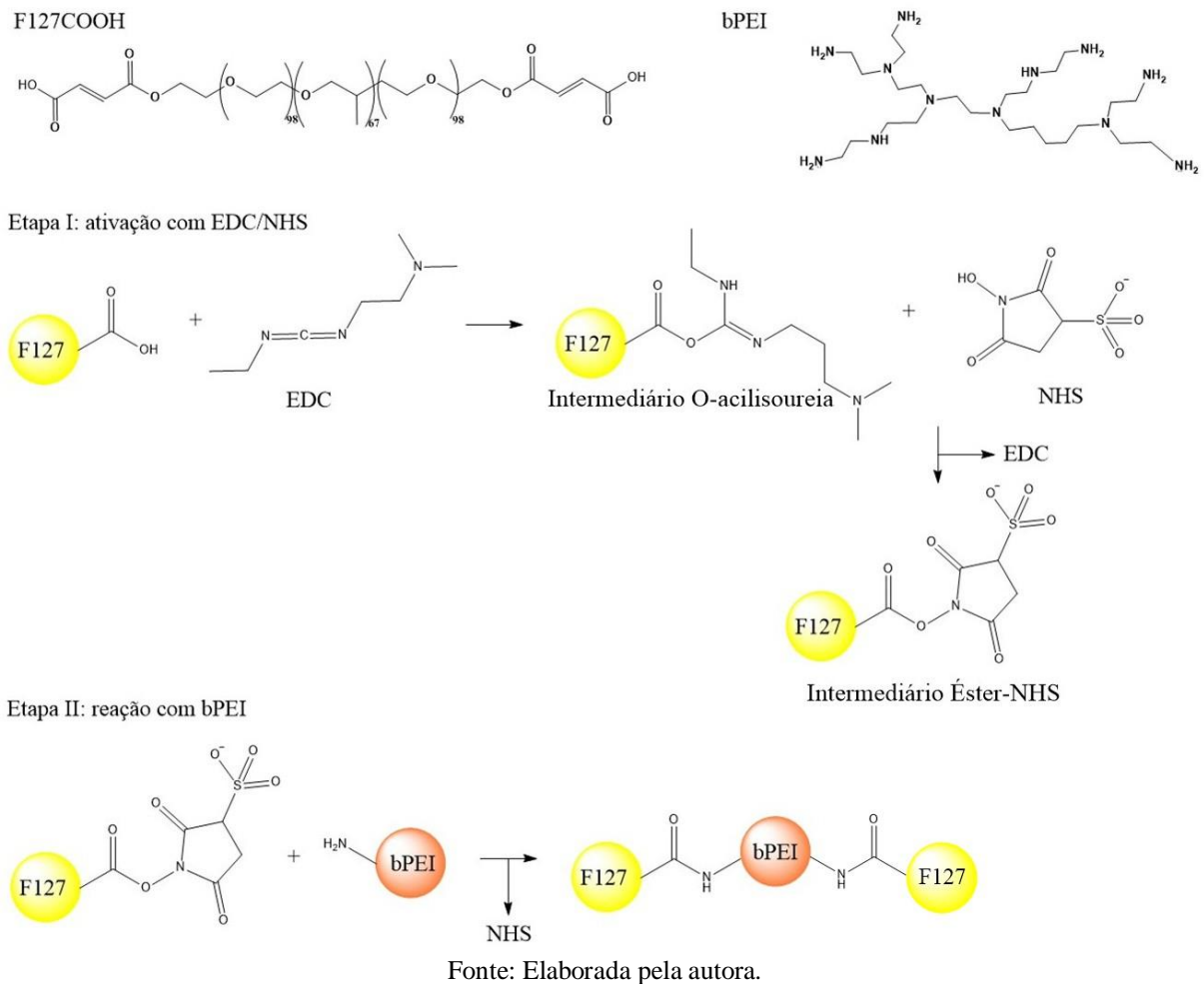
Tabela 6. Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para NC-EEMHP, NC-FDM5%_1, F127COOH e bPEI.

<i>Bandas</i> <i>cm⁻¹</i>	<i>Atribuições</i> <i>nanocápsulas</i>	<i>Bandas</i> <i>cm⁻¹</i>	<i>Atribuições</i> <i>F127COOH</i>	<i>Bandas</i> <i>cm⁻¹</i>	<i>Atribuições</i> <i>bPEI</i>
1552	δ -NH-	1734	δ C=O	1116	ν C-N
1643	δ C=O	2887	δ C-H	1456	δ NH ₂
2854	δ C-H	2975	δ C-H	1590	δ -NH-
2926	δ C-H			2808	δ C-H
				2926	δ C-H
				3276	ν N-H

δ = deformação; ν = estiramento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23. Representação da reação de reticulação do F127COOH



4.3.2.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta

A técnica do espalhamento de luz hidrodinâmico (DLS) é amplamente utilizada para promover a caracterização do dimensionamento de partículas em dispersão, sendo capaz de determinar o diâmetro hidrodinâmico e avaliar a polidispersividade dos sistemas de estudo (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019). Estes parâmetros são importantes, pois o tamanho das partículas reflete a estabilidade cinética das nanocápsulas que quando obtidas pelo processo de nanoemulsão devem possuir diâmetros que variam na escala de 50 a 500 nm (ARTUSIO *et al.*, 2018). E o índice de polidispersividade (PDI) indica o grau de heterogeneidade do tamanho do diâmetro hidrodinâmico das partículas, que em sistemas nanoestruturados os valores encontram-se na faixa de 0-0,4. Sistemas contendo partículas com valores de PDI entre 0-0,1 são classificados como monodispersos; 0,1-0,4 moderadamente dispersos e $> 0,4$ polidispersos (SHARMA *et al.*, 2018). Por sua vez, o potencial zeta (ζ) permite avaliar as interações elétricas entre partículas carregadas presentes em sistemas

coloidais. Essa medida é influenciada pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em virtude da dissolução de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Ele também fornece uma medida da carga líquida na superfície da partícula e da distribuição de potencial elétrico na interface, atuando como parâmetro de estabilidade, no qual valores acima de ± 30 mV indicam sistemas com elevada resistência à agregação de partículas (RAVIADARAN *et al.*, 2018).

Desta forma, os nanossistemas foram avaliados quanto ao tamanho em função do tempo de estocagem e os resultados obtidos para os diâmetros médios das partículas (*Z*-médio) PDI e potencial zeta estão esboçados na Tabela 7 (p. 61). Analisando os dados desta tabela, observa-se que os valores de *Z*-médio para ambas as nanocápsulas pertencem a escala nanométrica e os valores de PDI, considerando os dois sistemas, variam entre $0,183 \pm 0,014$ e $0,332 \pm 0,013$, evidenciando que as formulações sintetizadas apresentam comportamento moderadamente polidisperso frente a distribuição das partículas, como ilustrado no gráfico de distribuição dimensional (Figura 24, p. 61). Em relação ao potencial zeta, observa-se que a análise do dia 22 de outubro de 2022 das nanocápsulas sintetizadas apresentam valores positivos, resultado esperado vista que os átomos de *N* dos grupamentos amina presentes na molécula de bPEI são protonados. O valor elevado do potencial Zeta confere alta estabilidade físico-química das suspensões coloidais das nanocápsulas, pois indica maior repulsão entre as partículas do sistema e conseqüentemente, menor risco de ocorrer aglomeração.

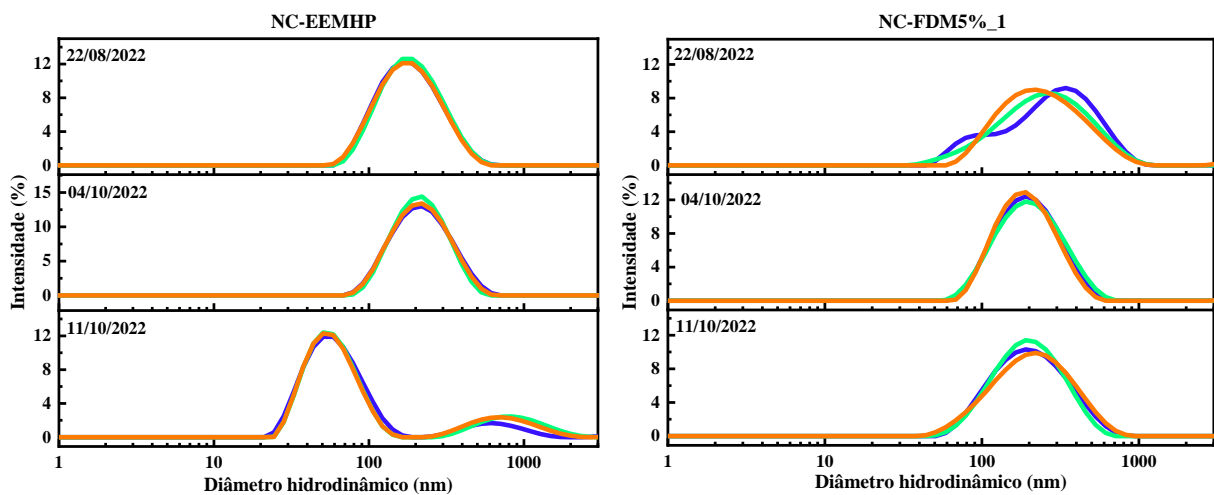
Nota-se que a amostra **NC-FDM5%_1** possui maior estabilidade cinética quando comparada a **NC-EEMHP** porque não apresentou variação significativa nos tamanhos das partículas e nos valores de PDI com o decorrer do tempo. A análise do potencial zeta das nanocápsulas de **NC-EEMHP** mostram que desde a sua formulação o valor de seu potencial é inferior a + 30 e vai decrescendo no decorrer dos dias indicando menor estabilidade e maior probabilidade de agregação das partículas. Além disso, macroscopicamente, após 50 dias de armazenamento, era possível observar a presença de grumos nas paredes do frasco de acondicionamento da suspensão de **NC-EEMHP**, fator que corrobora com a confirmação do processo de degradação da amostra. Além disso, a diminuição do valor de *Z*-médio indica que as partículas maiores precipitaram e apenas as menores permaneceram em solução nesse sistema. Como foi empregado a mesma metodologia de preparo para **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1**, supõe-se que tais diferenças estejam relacionadas com a variação do tempo de troca da água durante o processo de diálise.

Tabela 7. Estabilidade das nanocápsulas **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1** com a variação dos dias.

<i>Dias</i>	<i>Amostras</i>	<i>Z-médio (d, nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
22/08/2022	NC-FDM5%_1	167,3 ± 1,5950	0,183 ± 0,014	34,40 ± 0,379
	NC-EEMHP	219,2 ± 2,3640	0,328 ± 0,041	16,40 ± 0,819
04/10/2022	NC-FDM5%_1	182,1 ± 0,6506	0,194 ± 0,018	38,00 ± 0,361
	NC-EEMHP	176,8 ± 4,0550	0,227 ± 0,006	-3,36 ± 0,699
11/10/2022	NC-FDM5%_1	178,7 ± 1,7690	0,218 ± 0,010	51,7 ± 3,57
	NC-EEMHP	65,74 ± 0,9322	0,332 ± 0,013	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24. Gráfico de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios de partículas das nanocápsulas sintetizadas.

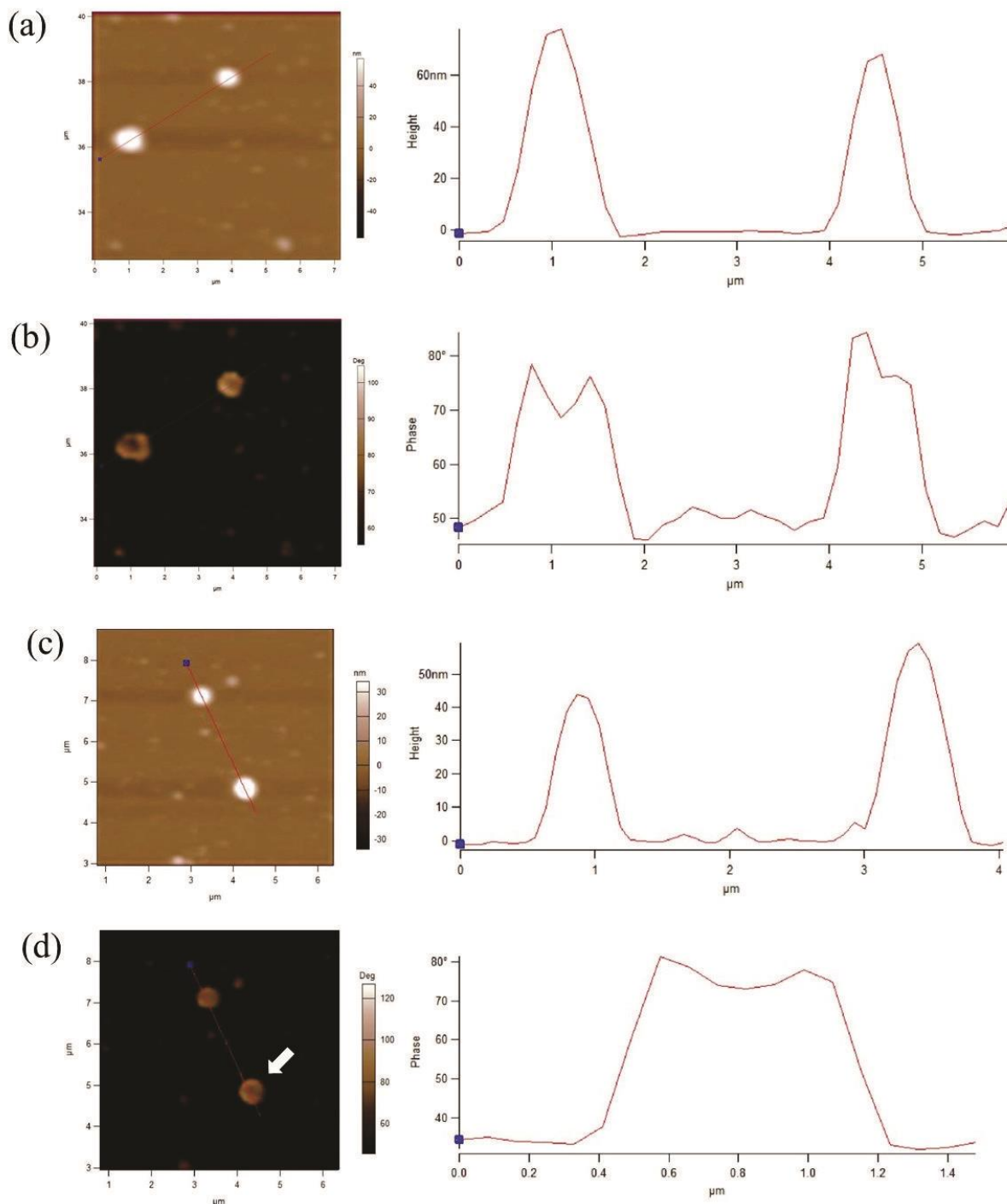


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2.3 Análise morfológica via AFM

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica importante para caracterizar interfaces, devido a sua capacidade de fornecer informações sobre as forças de interação de superfície em escala nanométrica e a imagem da topografia de superfície micro/nanoestruturada em diferentes condições ambientais (HO; ABIK; MIKKONEN, 2022; SITTERBERG *et al.*, 2010). Desta forma, o AFM permitiu obter uma visão geral do tamanho e caracterizar a forma e a estrutura da superfície de **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1**. Os resultados são mostrados na Figura 25 (p. 62).

Figura 25. Imagens topográficas (a; c) e de fase (b; d) obtidas com o AFM das nanocápsulas NC-EEMHP (a; b) e NC-FDM5%_1 (c; d). Coluna da esquerda: imagens 2D e coluna da direita: perfis de altura (a; c) e de fase (b; d).



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise das imagens topográficas (Figura 25a e 25c) revelam que **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1** possuem geometria esférica e a variação do valor máximo indicado no eixo

vertical para cada uma das partículas nos gráficos do perfil de altura confirmam que as distribuições das partículas desses sistemas são moderadamente polidispersas.

A imagem de fase permite detectar as variações na composição e realizar um mapeamento das alterações das propriedades da superfície da amostra (EMAM-DJOMEH; PURE; PURE, 2020). As imagens e os gráficos de fase ilustrados na Figura 25b e 25d (p. 62) confirmam a reação de *crosslinking*, pois a variação dos sinais dos picos nos gráficos de fase e a mudança de coloração nas extremidades das partículas de **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1**, evidenciam uma diferença em sua constituição, ou seja, indicam que as extremidades das partículas apresentam uma composição diferente do material presente no seu interior.

4.3.3 Teor de sólidos

O teor de sólidos (%TS) é uma técnica gravimétrica utilizada para avaliar quantitativamente a massa de materiais sólidos. A mensuração deste parâmetro é realizada em função da razão entre a massa de sólidos presentes na solução por massa da solução em (g/g). Neste trabalho as massas de sólidos referem-se à quantidade de nanocápsulas presentes na solução antes e após a etapa de diálise do material obtidas depois do processo de liofilização, cujos percentuais calculados para os sistemas analisados foram agrupados na Tabela 8.

Tabela 8. Teor de sólidos das nanocápsulas.

<i>Amostras</i>	<i>Teor de sólidos (%)</i>	
	Antes da diálise	Após diálise
NC-EEMHP	2,7011	2,2380
NC-FDM5%_1	2,4396	2,2725

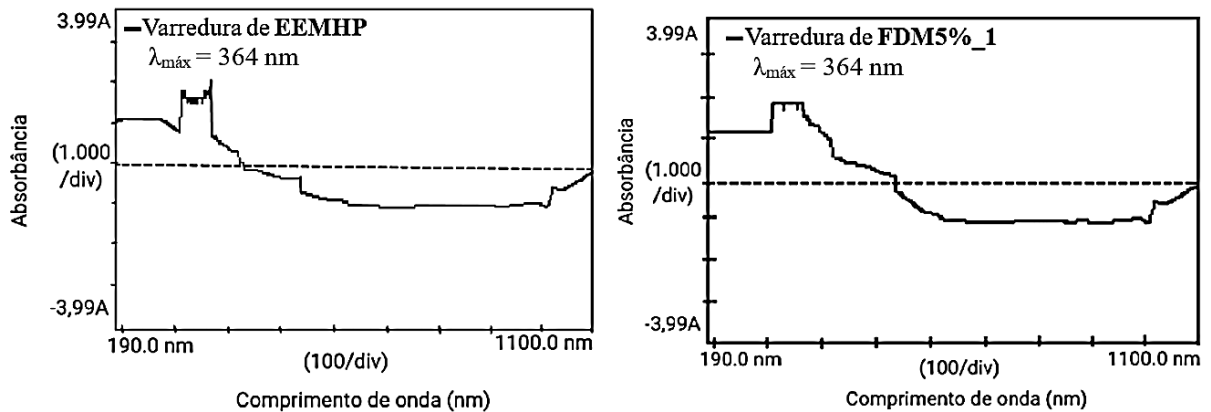
Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a Tabela 8 nota-se que a percentagem do teor de sólidos das nanocápsulas **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1** antes da diálise foram superiores comparados aos valores obtidos após a diálise. Este resultado indica que este processo em ambos os sistemas foi eficiente, pois a redução do seu valor após a diálise reflete a capacidade de eliminar o excesso de EDC e resíduos de polímero não reticulados. Além disso, por denotar a concentração de nanocápsulas sintetizadas em função da massa da solução, o resultado obtido é importante porque a concentração de nanocarreadores está diretamente relacionada com a probabilidade de o sistema apresentar respostas eficientes frente as atividades biológicas investigadas.

4.3.4 Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos ativos

O espectro de varredura de **EEMHP** e **FDM5%_1** (Figura 26) utilizando o solvente metanol revelou que o $\lambda_{\text{máx}}$ para ambas as amostras correspondem a 364 nm.

Figura 26. Gráfico de varredura de **EEMHP** e **FDM5%_1**



Fonte: Elaborada pela autora.

O $\lambda_{\text{máx}}$ obtido foi utilizado para construir as curvas de calibração esboçadas na Figura 27 (p. 65). Para **EEMHP** e **FDM5%_1** as expressões geradas pelas curvas correspondem respectivamente a:

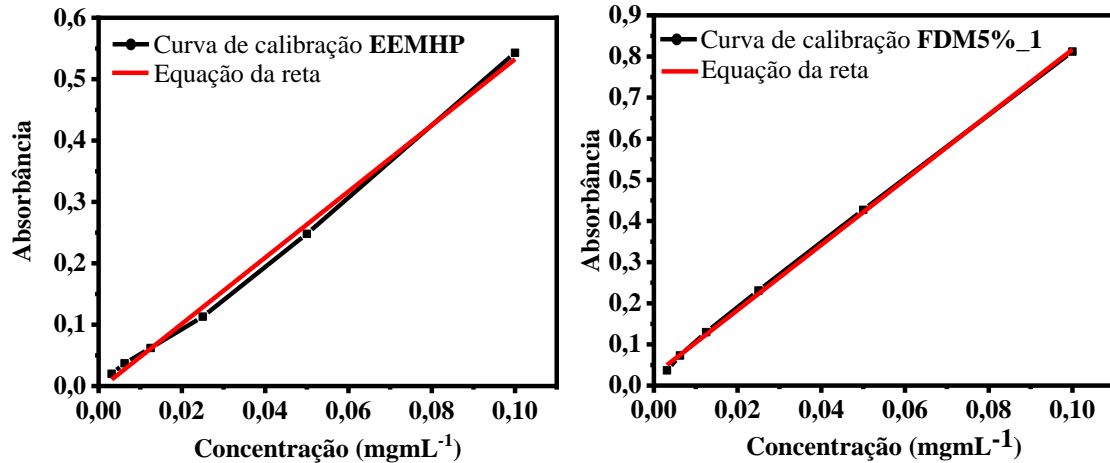
$$A_{\text{EEMHP}} = 5,3895[\text{EEMHP}] - 0,0063 \text{ com } R^2 = 0,9962$$

$$A_{\text{FDM5\%}_1} = 7,9202[\text{FDM5\%}_1] + 0,0251 \text{ com } R^2 = 0,9992$$

Empregando as expressões acima pode-se quantificar **EEMHP** e **FDM5%_1** presentes nas nanocápsulas sintetizadas. Desta forma, verificou-se que **NC-EEMHP** e **NC-FDM5%_1** possuem %EE de $78,50 \pm 3,99\%$ e $80,22 \pm 0,55\%$, respectivamente. Além disso, foi possível mensurar a capacidade de carregamento dos sistemas obtendo-se os valores de 1,82% e 1,77% de %CC para as formulações **NC-EEMHP** e de **NC-FDM5%_1**, respectivamente. Uma hipótese para justificar os valores obtidos para a eficiência de encapsulamento consiste nas atrações intermoleculares existentes entre algum constituinte hidrossolúvel presente no extrato **EEMHP** ou na fração **FDM5%_1** com a fase aquosa, que seria responsável por transportá-lo para a fase externa e conseqüentemente diminuir a eficiência do sistema. Em relação a capacidade de carregamento, observa-se que **NC-**

EEMHP e **NC-FDM5%_1** possuem valores próximos, denotando aos dois sistemas potencialidade para aplicações no campo farmacêutico.

Figura 27. Curva de calibração de **EEMHP** e **FDM5%_1**



Fonte: Elaborada pela autora.

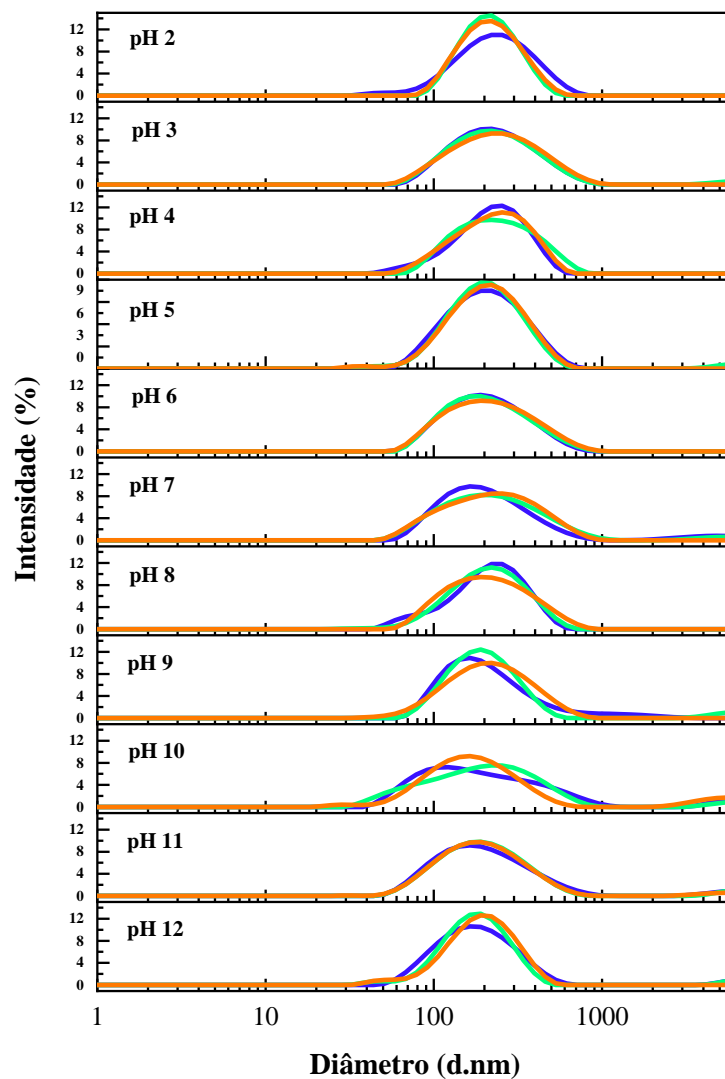
4.3.5 Avaliação da estabilidade de **NC-FDM5%_1** frente a variação de pH

Devido a sua maior estabilidade frente ao tempo de estocagem, o nanossistema **NC-FDM5%_1** também foi avaliado em função da variação de pH. A análise da Tabela 9 (p. 66) permite concluir que os valores de *Z*-médio continuaram dentro da faixa nanométrica, os valores de PDI permaneceram moderadamente polidispersos e ambos os parâmetros apresentaram pequena variação frente a mudança de pH (Figura 28, p. 66). Em relação ao potencial Zeta, nota-se uma inversão do sinal positivo para o negativo a partir do pH 10. Do ponto de vista estrutural, especula-se que a inversão de potencial na interface das nanocápsulas está relacionada com a desprotonação da cadeia policatiônica contendo nitrogênio (grupamentos amina presentes na molécula de bPEI) pelo excesso de íons hidroxila presentes na solução. Estes resultados evidenciam que o nanossistema **NC-FDM5%_1** possui elevada estabilidade frente a variação de pH, pois a alteração na estrutura da interface das nanocápsulas deste sistema ocorre apenas em meios básicos com $\text{pH} \geq 10$.

Tabela 9. Estabilidade das nanocápsulas **NC-FDM5%_1** frente a variação de pH

pH	Z-médio (d, nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
2	200,4 ± 2,307	0,200 ± 0,009	16,8 ± 2,09
3	201,5 ± 0,529	0,226 ± 0,010	25,4 ± 1,50
4	246,9 ± 2,384	0,344 ± 0,020	3,74 ± 0,805
5	181,5 ± 1,229	0,205 ± 0,018	46,5 ± 1,87
6	181,8 ± 2,444	0,210 ± 0,014	29,7 ± 0,737
7	186,3 ± 3,194	0,259 ± 0,008	13,0 ± 0,493
8	181,6 ± 1,550	0,203 ± 0,006	43,8 ± 0,416
9	181,8 ± 2,120	0,220 ± 0,006	24,8 ± 0,950
10	156,1 ± 3,386	0,379 ± 0,022	-0,141 ± 0,0486
11	171,2 ± 1,493	0,260 ± 0,012	-39,7 ± 0,819
12	165,1 ± 1,457	0,215 ± 0,030	-26,0 ± 1,01

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28. Gráfico de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios das partículas de **NC-FDM5%_1** frente a variação de pH.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÃO

A utilização de SC como fonte de metabólitos secundários precursores de *H. pluvialis* revelou ser uma estratégia promissora para potencializar a produção de astaxantina e aumentar a sua biomassa, independentemente da etapa em que é adicionada no meio de cultura. A introdução de SC foi capaz de elevar o teor de astaxantina em 78,1 e 60,9% nos cultivos dos experimentos 1 e 2, respectivamente. Tais efeitos foram atribuídos ao surgimento de vacúolos nas células submetidas ao SC, que além de acumular os metabólitos secundários provenientes da cenoura no interior celular de *H. pluvialis*, gera distorções no formato aproximadamente esférico e aumento do tamanho das células, fatores que influenciam diretamente os valores de absorbância obtidos ao longo do experimento. Os resultados são melhores em relação aos descritos na literatura envolvendo outras estratégias de aumento da produção de astaxantina por *H. pluvialis*.

A atividade antioxidante do extrato **EEMHP** e das frações **FDM5%_1** e **FMeOH** pelo método de sequestro do radical livre DPPH, revelou que todas as amostras possuem compostos que inibem ou retardam a oxidação por inativação de radicais livres. E o fator de proteção solar (FPS), obtido por metodologia baseada na análise espectrofotométrica de soluções diluídas, das amostras **EEMHP**, **FDM5%_1** e **FMeOH**, mostrou que **FDM5%_1** e **EEMHP** possuem maior potencial para a sua incorporação em formulações cosméticas devido aos valores de FPS elevados. Por exibir resultados satisfatórios em ambas as atividades, **EEMHP** e **FDM5%_1** foram selecionados para serem os ativos das nanocápsulas de Pluronic F127-bPEI.

A síntese de **NC-FDM5%_1** e **NC-EEMHP** foi realizada através da reticulação polimérica ou *crosslinking*, empregando como estratégia metodológica o processo de nanoemulsão. Através da caracterização por FTIR a ocorrência da reação de reticulação entre os grupos C=O do F127COOH com grupamentos de amins I das moléculas de bPEI foi confirmada. Os parâmetros de tamanho de partícula e potencial zeta revelaram que **NC-FDM5%_1** apresenta maior estabilidade frente ao tempo de estocagem e variação de pH em relação a **NC-EEMHP**. Os valores para a eficiência de encapsulamento permitem concluir a presença de algum composto no extrato e na fração com afinidade pela água, responsável por reduzir a eficiência da síntese. E que a capacidade de carregamento dos ativos são próximas, ou seja, ambas as formulações apresentariam comportamento semelhante quando utilizadas em aplicações no campo farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- AL-TARIFI, B. Y. *et al.* Comparison of different organic solvents on antioxidant activity of astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis* using colorimetric and non-colorimetric methods. **Oriental journal of chemistry**, v. 36, n. 3, p. 466-473, 2020.
- ARIZA HERNÁNDEZ, V.; GARZÓN PULIDO, M. C.; CAMACHO KURMEN, J. E. Revisión del estado actual de las formulaciones y aplicaciones de astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis*. **Revista Mutis**, v. 13, n. 1, p. 1–27, 2022.
- ARTUSIO, F. *et al.* Polymeric nanocapsules via interfacial cationic photopolymerization in miniemulsion. **Polymer**, v. 139, p. 155–162, 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CÂNDIDO, T. M. *et al.* Dietary supplements and the skin: focus on photoprotection and antioxidant activity – A review. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p. 1248, 2022.
- CUADROS-RODRÍGEZ, L. *et al.* Chromatographic fingerprinting and food identity/quality: potentials and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 1428-1434, 2021.
- CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 557-583, 1998.
- DARVIN, M. E. *et al.* Carotenoids in human skin in vivo: antioxidant and photo-protectant role against external and internal stressors. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1451, 2022.
- DARZÉ, B. C. *et al.* Chemometrics web app part 1: Data handling. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 231, p. 104696, 2022.
- DE OLIVEIRA, A. S.; FECHINE, L. M. U.; FECHINE, P. B. A. Nanopartículas poliméricas. *In*: FECHINE, P. B. A. Avanços no desenvolvimento de nanomateriais. Fortaleza: **Imprensa Universitária**, 2020. p. 271 – 289.
- EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 78–84, 2001.
- EMAM-DJOMEH, Z.; PURE, A. E.; PURE, M. E. Atomic force microscopy (AFM) of nanoencapsulated food ingredients. *In*: JAFARI, S. M. In nanoencapsulation in the food industry, characterization of nanoencapsulated food ingredients, **Academic Press**, v. 4, p. 159-188, 2020.
- FAYAAZUDDIN, T. *et al.* Commercial astaxanthin production from green alga *Haematococcus pluvialis*. *In*: Amaresan, N., Dharumadurai, D., Babalola, O.O. (eds) **Food Microbiology Based Entrepreneurship**. Springer: Singapore, 2023.
- FETT-NETO, A. G. *et al.* Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidate* by medium composition modification. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 731-734,

1993.

FRANCO, W.; ARAZO, M. C. R.; BENEVIDES, S. 8 - Recent advances in the encapsulation of marine phenolic compounds. *In: PÉREZ-CORREA, J. R.; MATEOS, R.; DOMÍNGUEZ, H. Marine Phenolic Compounds. Elsevier, 2023. p. 239-264.*

GÄRTNER, G. Soil Algae. *In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds) Methods in Soil Biology. Springer, Berlin: Heidelberg. 1996.*

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 561, p. 244–264, 2019.

GONZÁLEZ-PEÑA. *et al.* Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids – A review. **Plants**, v. 12, n. 313, p. 1-22, 2023.

GRUJIĆ, V. J. *et al.* Diversity and content of carotenoids and other pigments in the transition from the green to the red stage of *Haematococcus pluvialis* microalgae identified by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS. **Plants**, v. 11, n. 8, 2022.

GU, L. *et al.* Preparation and in vitro characterization studies of astaxanthin-loaded nanostructures lipid carriers with antioxidant properties. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 0, n. 0, p. 1-10, 2023.

GWAK, Y. *et al.* Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 15, p. 4317–4334, 2014.

HAMED, I. *et al.* Encapsulation of microalgal-based carotenoids: Recent advances in stability and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 138, p. 382-398, 2023.

HEGAZI, A. G.; ABD EL HADY, F. K. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, p. 395-402, 2002.

HIPPOLYTE, I., MARIN, B., BACCOU, J. C., JONARD, R. Growth and rosmarinic acid productions in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 109-112, 1992.

HO, T. M., ABIK, F., MIKKONEN, K. S. An overview of nanoemulsion characterization via atomic force microscopy. **Food science and nutrition**, v. 62, n. 18, p. 4908-4928, 2022.

HU, J. *et al.* Extraction and purification of astaxanthin from shrimp shells and the effects of different treatments on its content. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 29, p. 24-29, 2019.

JANNEL, S. *et al.* Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, n. 10, p. 789, 2020.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n.1, p. 47-65, 1999.

KAULMANN A, BOHN T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition research**. v. 34, n. 11, p. 907-929, 2014.

KIM, J. Y. *et al.* Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. **Bioresource technology**, v. 268, p. 815-819, 2018.

KHOO, K. S. *et al.* Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource technology**, v. 288, n. 121606, 2019.

LOTAN, T.; HIRSCHBERG, J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding fl-C-4-oxygenase, that converts fl-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS letters journal**, v. 364, n. 2, p. 125-128, 1995.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, Ó.; CALVO, M. M.; GÓMEZ-ESTACA, J. Recent advances in astaxanthin micro/nanoencapsulation to improve its stability and functionality as a food ingredient. **Marine Drugs**, v.18, p. 406, 2020.

MARTÍNEZ-RUIZ, M. *et al.* Microalgae bioactive compounds to topical applications products – a review. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3512, 2022.

MBANGA, L. *et al.* Sun protection factor (SPF) determination of cosmetic formulations made in Kinshasa (DR Congo) by in-vitro method using UV-vis spectrophotometer. **Journal of Physical and Chemical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2014.

MOTA, G. C. P. *et al.* Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 598-609, 2022.

MUTANDA, T. *et al.* Biotechnological applications of microalgal oleaginous compounds: current trends on microalgal bioprocessing of products. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, 2020.

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION. Microalgae protocols. Disponível em:

https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/microalgaeprotocols_508.pdf Acesso em: 09 fev. 2023.

NAWROCKI, W. J. *et al.* The plastid terminal oxidase: its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 49–74, 2015.

NISHSHANKA, G. K. S. H. *et al.* *Haematococcus pluvialis*: a potential feedstock for multiple-product biorefining. **Journal of Cleaner Production**, v. 344, p. 131103, 2022.

ONORATO, C.; RÖSCH, C. Comparative life cycle assessment of astaxanthin production with *Haematococcus pluvialis* in different photobioreactor technologies. **Algal Research**, v. 50, p. 102005, 2020.

- PURKIEWICZ, A. *et al.* The impact of the method extraction and different carrot variety on the carotenoid profile, total phenolic content and antioxidant properties of juices. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1–13, 2020.
- RAVEN, J. A. The Vacuole: a Cost-Benefit Analysis. **Advances in Botanical Research**, v. 25, p. 59-86, 1997.
- RAVIADARAN, R. *et al.* Optimization of palm oil in water nano-emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 96, n. 2, p. 58-65, 2018.
- RESTRØM, B. *et al.* Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 11, p. 2561-2564, 1981.
- SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Natural products as photoprotection. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 14, n. 1, p. 47-63, 2015.
- SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 657-674, 2019.
- SAYRE, R. M. *et al.* Comparison of in vivo and in vitro testing of sun screening formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n. 3, p. 559-566, 1979.
- SHAH, M. M. R. *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 531, 2016.
- SHARMA, S. K. *et al.* **Handbook of Materials Characterization**. Cham,Switzerland: © Springer International Publishing AG, 2018.
- SHITAN, N.; YAZAKI K. Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants. **Biochim biophys acta biomembr**, v. 1862, n. 12, p. 183127, 1862.
- SITTERBERG, J. *et al.* Utilising atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 1, p. 2-13, 2012.
- SONG, Y., LU, L. Exploring the relaxation dynamics of β -carotene in different polar solvent by absorption spectra and simulation. **Journal of Luminescence**, v. 257, p. 119677, 2023.
- TELLI, M., SELÇUK, Ü. E. Biomass and astaxanthin production enhancement for *Haematococcus pluvialis*. **Research square**, v. 1, p. 1-22, 2022.
- TWAIJ, B. M.; HASAN, M. N. Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. **International journal of plant biology**, v. 13, n. 1, p. 4–14, 2022.
- VIDHYAVATHI, R. *et al.* Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and

carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 6, p. 1409–1418, 2008.

VIEIRA, M. V.; DERNER, R. B.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of *Haematococcus pluvialis* carotenoid-loaded PLGA nanocapsules in a gel system with antioxidant properties for topical application. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 61, p. 102099, 2021.

VO, T.T. *et al.* Effect of the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on different growth stages of *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource technology**. v. 220, p. 85–93, 2016.

WANG, X. *et al.* Supplementation with rac-gr24 facilitates the accumulation of biomass and astaxanthin in two successive stages of *Haematococcus pluvialis* cultivation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 15, p. 4677–4689, 2022.

WU, H. *et al.* Two ethoxyquinoline metabolites from the alga *Haematococcus pluvialis*. **Chemistry of natural compounds**, v. 50, n. 3, p. 578-580, 2014.

YANG, S. *et al.* Improving astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* by an efficient fed-batch strategy in a photobioreactor. **Algae Research**. v. 60, p. 102539, 2021.

ZAKARIA, N. N.; ZAMZURIE, N. A.; HARITH, Z. T. Evaluation of sunscreen cream incorporated with astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in different storage conditions. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 756, p. 012078, 2021.

ZHANG, *et al.* Synthesis and characterization of thermally responsive pluronic F127-Chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules. **ACS NANO**, v. 4, n. 11, p. 6747–6759, 2010.