



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

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

FRANCISCO R. DA S. MACHADO JR.

**Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador**

**Profª. Drª. Janaína F. de Medeiros Burkert
Coorientadora**

**RIO GRANDE-RS
JUNHO, 2014**

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

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

Engº. de Alimentos Francisco Roberto da Silva Machado Junior

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

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

**RIO GRANDE-RS
JUNHO, 2014**

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

Bernardinho.

Nunca, jamais desanimes, embora venham ventos contrários.

Santa Paulina.

Dedico este trabalho aos meus pais.
iv

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À FURG e UFSC pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho.

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

SUMÁRIO

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

APÊNDICE A

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

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

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

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

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

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

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

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

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

3.2 *Haematococcus pluvialis*

3.2.1 Características gerais

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

Tabela 1 - Classificação da microalga *H. pluvialis*

Divisão	Chlorophyta
Classe	Chlorophyceae
Ordem	Volvocales
Família	Haematococcaceae
Gênero	Haematococcus
Espécie	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Sinonímia	<i>Haematococcus lacustris</i> , <i>Spharella lacustris</i>

Fonte: CAVALHEIRO et al. (1999)

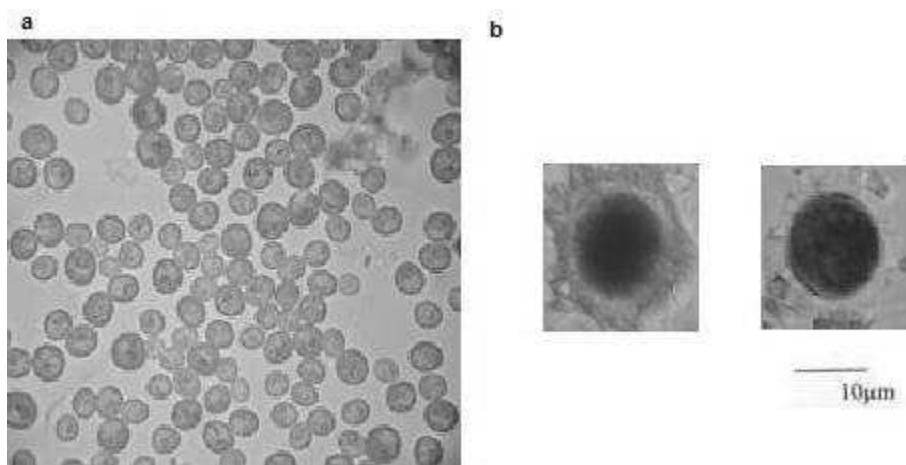
Caracteriza-se por ser unicelular, flagelada e produzir cistos, os quais são considerados geralmente como uma resposta às condições desfavoráveis do meio onde se desenvolvem. A formação de cistos é frequente e acompanhada por uma mudança da cor verde para alaranjada ou vermelha (GOODWIN; JAMIKORN, 1953). Seu habitat natural são cavidades rochosas periodicamente preenchidas com água da chuva. Este habitat é típico em banhos de pássaros, outros ornamentos de jardim e recipientes contendo água da chuva. Pode ser encontrada também em piscinas rochosas, mas é pouco tolerante a altas salinidades. Ocasionalmente, a microalga *H. pluvialis* ocorre em grande quantidade em rios ou às margens de lagos, quando a seca expõe grandes áreas de rochas ricas em fissuras (CANTER-LUND; LUND, 1995).

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

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

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

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



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

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

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

3.2.2 Condições de cultivo de *H. pluvialis*

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

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

3.2.3 Cultivos em fotobiorreator

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

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

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

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

3.2.4 Intensidade de luz

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

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

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

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

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

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

3.2.5 Temperatura

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

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

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

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

3.2.6 pH

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

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

3.3 Métodos de ruptura celular

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3.1 Métodos mecânicos de ruptura celular

3.3.1.1 Abrasivos

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

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

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

3.3.1.2 Homogeneização sob alta pressão

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

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

3.3.1.3 Ondas ultrassônicas

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

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

3.3.2 Métodos não mecânicos de ruptura celular

3.3.2.1 Químicos

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

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

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

3.3.2.2 Enzimáticos

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

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

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

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

3.4 Carotenoides

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

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

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

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

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

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

3.4.1 Micro-organismos produtores de carotenoides

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

Tabela 2 - Micro-organismos produtores de carotenoides

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

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

3.4.2 Biosíntese de carotenoides

A biosíntese de carotenoides ocorre a partir da via de terpenoides ou isoprenoides, a qual também é utilizada para a produção de uma ampla variedade de compostos. Em organismos fotossintetizantes, as reações de biossíntese ocorrem no cloroplasto, a partir de CO₂, via acetil-coenzima A e ácido mevalônico, mecanismo conhecido como via mevalônica (MISAWA, 1997). Tetraterpenos são sintetizados através de reações de condensação de duas moléculas de C₂₀ geranilgeranil pirofosfato catalisadas pela enzima fitoeno sintase. Reações similares de condensação a partir de C₁₅ farnesil pirofosfato levam à formação de triterpenoides. O sistema de duplas ligações conjugadas desses carotenoides é estendido sequencialmente, integrando uma das duplas ligações isoladas a cada instante.

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

3.4.3 Funções e propriedades dos carotenoides

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

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

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

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

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

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

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

3.5 Astaxantina

3.5.1 Características gerais

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

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

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

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

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

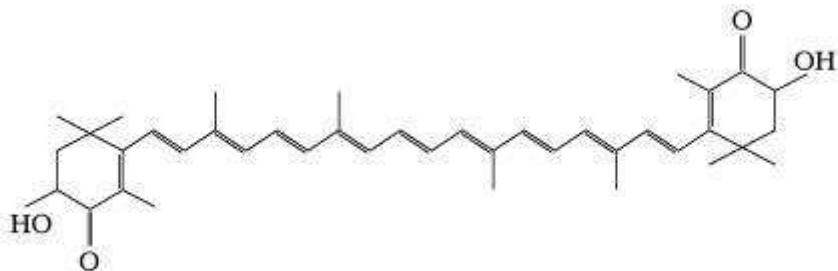
Segundo MORTENSEN et al. (1997), citados por GUERIN, HUNTLEY, OLAIZOLA (2003), a astaxantina constitui um potente antioxidante biológico capaz de exercer forte atividade na eliminação de radicais livres, prevenindo que moléculas ou tecidos possam ser danificados.

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

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

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

Figura 2 - Estrutura da astaxantina

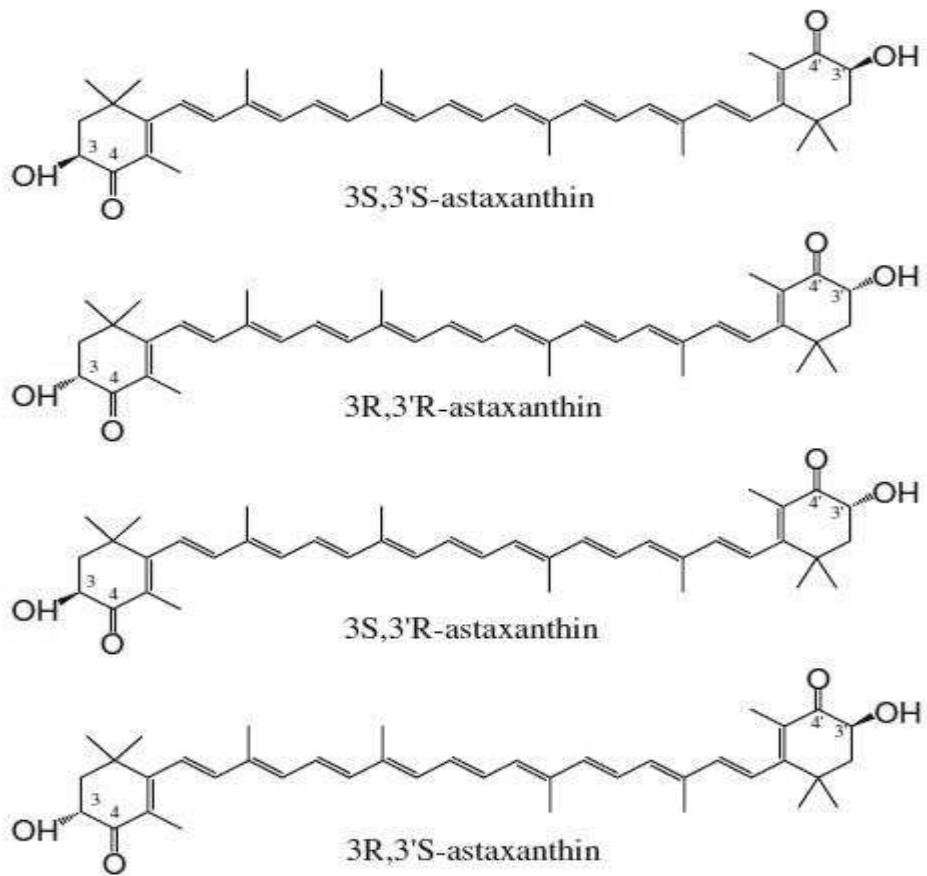


Fonte: RICHMOND (2004)

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

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

Figura 3 - Isômeros configuracionais da astaxantina



Fonte: SCHMIDT et al. (2010)

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

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

3.5.2 Produção de astaxantina

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

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

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

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

3.5.3 Extração da astaxantina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5.4 Encapsulamento de astaxantina

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

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

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

3.6 Nanoencapsulamento

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

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

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

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

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

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

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

3.7 Emprego de fluidos supercríticos em encapsulamento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

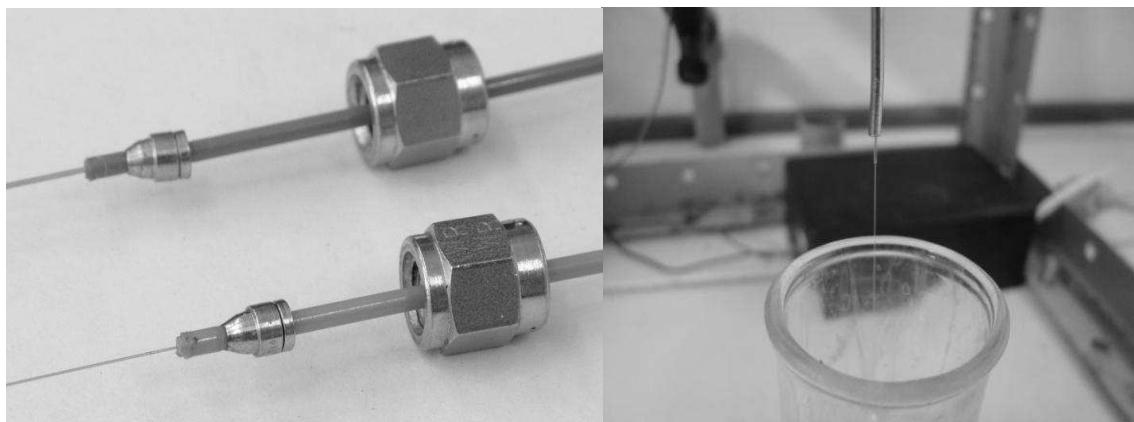
Já de acordo com WEIDNER (2009), embora existam poucos trabalhos nesta área referentes a alimentos ou ingredientes alimentícios (dextransa, β -caroteno, lecitina, sacarose), os processos que utilizam fluidos pressurizados como antissolvente têm demonstrado grande potencial industrial, não somente para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

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

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

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

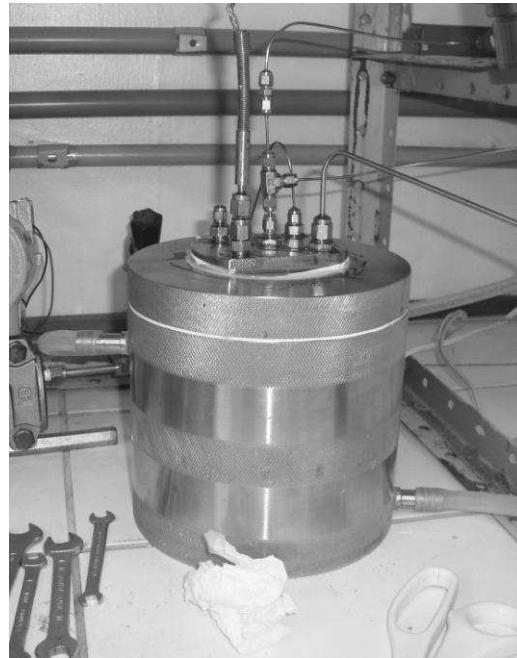
Figura 4 - Capilar aspersor



Fonte: do autor

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

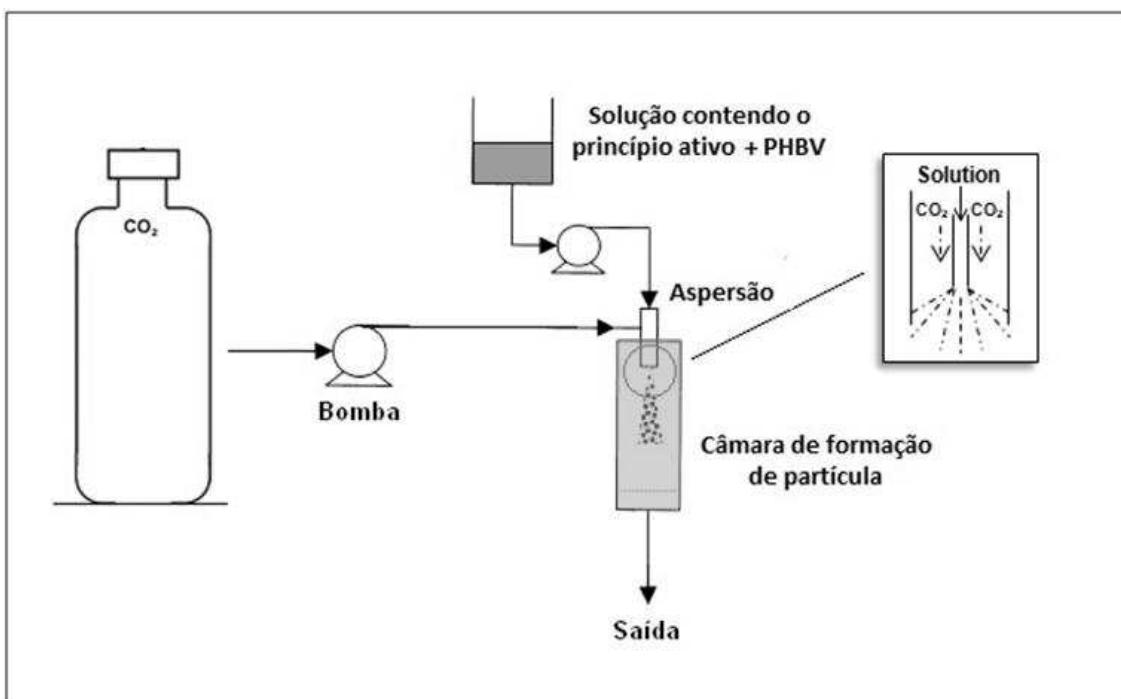
Figura 5 - Câmara de precipitação



Fonte: do autor

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

Figura 6 - Esquema do aparato experimental utilizado na técnica SEDS



Fonte: adaptado de FRANCESCHI (2009)

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

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

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4. MATERIAL E MÉTODOS

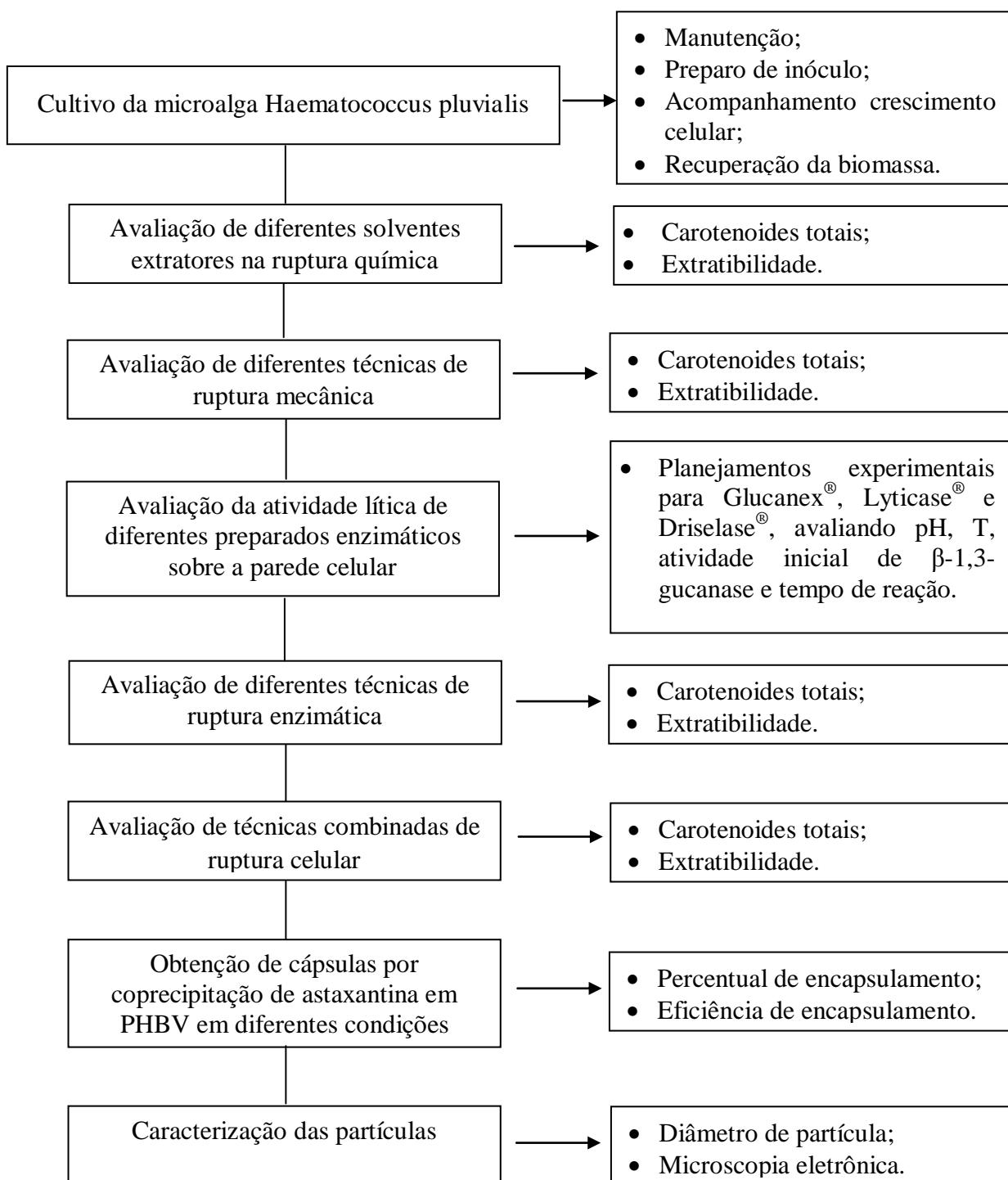
Na primeira missão de estudos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica – LATESC, dentro do projeto “Encapsulamento de Agentes Bioativos e Imobilização de Enzimas em Nanoestruturas via Tecnologia Supercrítica” (Edital FAPERGS/CNPq 008/2009,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

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

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

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

Figura 7 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho



4.1 Infraestrutura

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

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

4.2 Micro-organismo

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

4.3 Manutenção dos micro-organismos

Os cultivos estoques foram mantidos em fotobioreatores de 1 L a 25 ± 1 °C, sob constante iluminância de $111 \mu\text{mol fótons.m}^{-2.\text{s}^{-1}}$ em meio de cultivo Bold Basal Medium (BBM), cuja composição é apresentada na Tabela 3.

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

Componente	BBM (mg.L^{-1})	BBM e acetato de sódio (mg.L^{-1})
KH_2PO_4	175	175
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	25	25
K_2HPO_4	75	75
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	75	75
NaNO_3	250	250
NaCl	25	25
H_3BO_3	115	115
$\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	4,9	4,9
EDTA.Na_2	10	10
CH_3COONa	-	2000

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

4.4 Cultivo da microalga

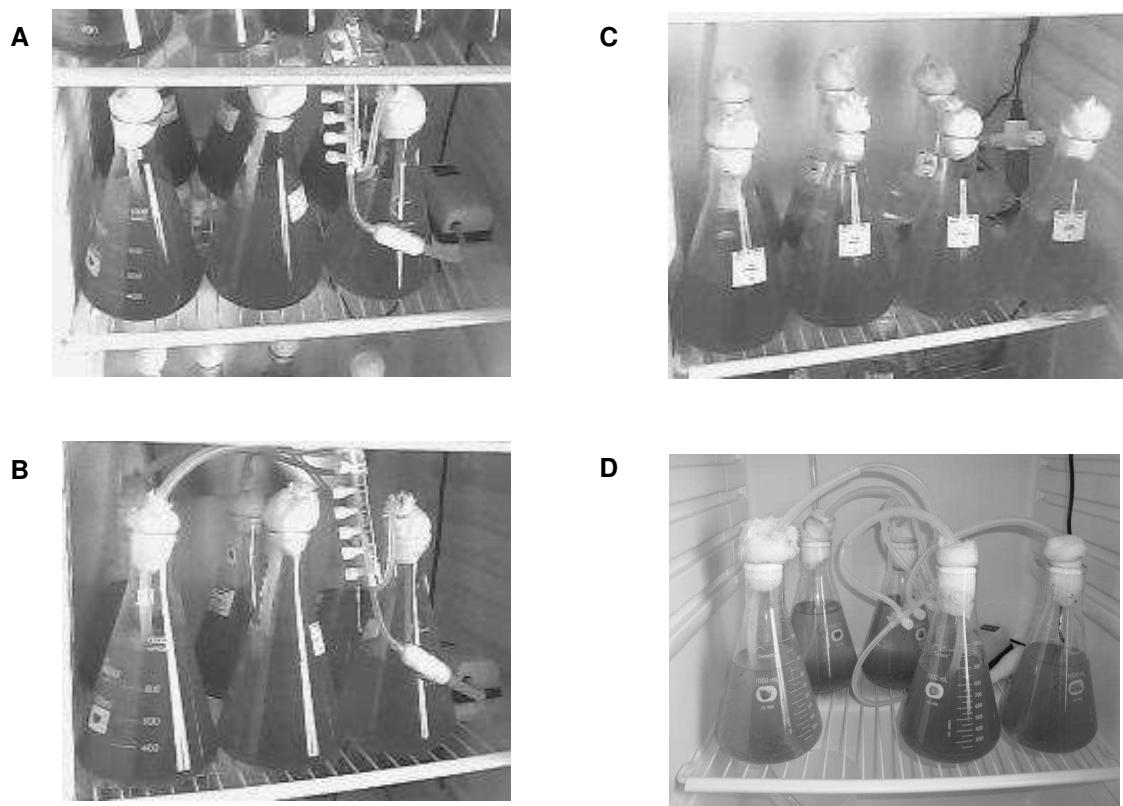
Utilizando os inóculos previamente preparados, foi realizada a produção da biomassa de *H. pluvialis*, conforme ilustrado na Figura 8.

Os cultivos foram conduzidos à temperatura constante de 25 ± 1 °C em fotobiorreatores de 1 L com aeração por borbulhamento de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, agitação manual diária e sob iluminância constante de $444 \mu\text{mol fôtons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 15 dias.

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

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

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

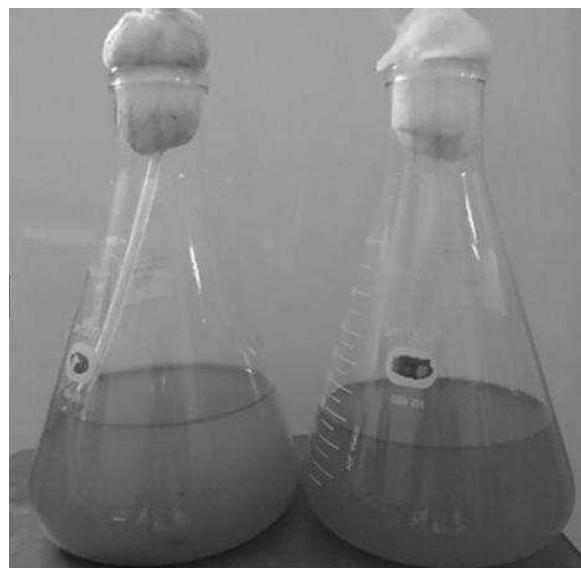


Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG

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

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

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



Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG

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



Fonte: do autor – ENGEBIO, FURG

4.5 Ruptura química com DMSO e extração com diferentes solventes

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

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

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

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

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

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

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

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

4.6 Estudo de diferentes técnicas de ruptura celular

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

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

4.6.1 Técnicas mecânicas de ruptura celular

4.6.1.1 Ondas ultrassônicas

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

4.6.1.2 Maceração com terra diatomácea

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

4.6.1.3 Abrasão com pérolas de vidro

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

4.6.1.4 Imersão em nitrogênio líquido

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

4.6.1.5 Ruptor ultrassônico

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

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

4.6.2.1 Preparados enzimáticos comerciais

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

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

4.6.2.2 Caracterização dos preparados enzimáticos

Atividade enzimática de β -1,3-glucanase

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

Atividade enzimática de protease

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

Atividade enzimática de xilanase

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

4.6.2.3 Planejamentos experimentais fracionários

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

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

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

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

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

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

4.6.3 Técnicas enzimáticas de ruptura celular

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

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

4.6.4 Técnicas combinadas de ruptura celular

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

4.6.5 Determinação de carotenoides totais

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

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

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

4.6.6 Determinação da extratibilidade de carotenoides

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

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

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

4.6.7 Análise estatística

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

4.7 Tecnologia supercrítica para obtenção de nanocápsulas contendo astaxantina

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

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



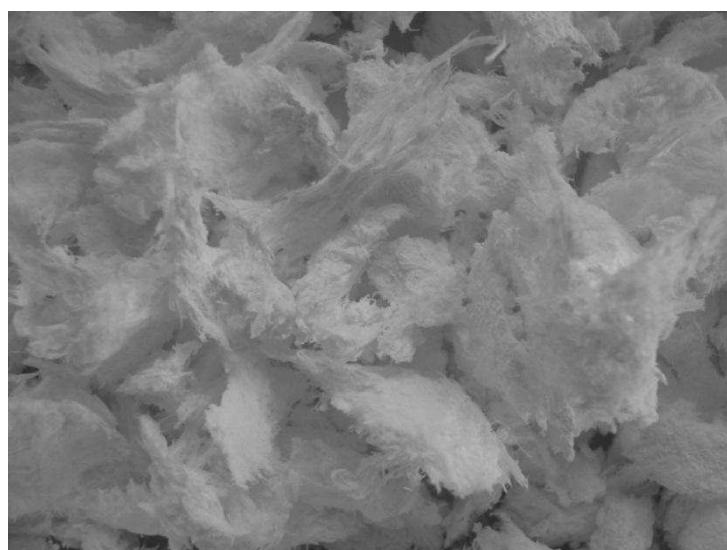
Fonte: do autor – LATESC, UFSC

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

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

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

Figura 12 - Copolímero PHBV purificado



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

4.7.1 Condições experimentais de precipitação

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

Figura 13 - Solução orgânica contendo o princípio ativo + PHBV

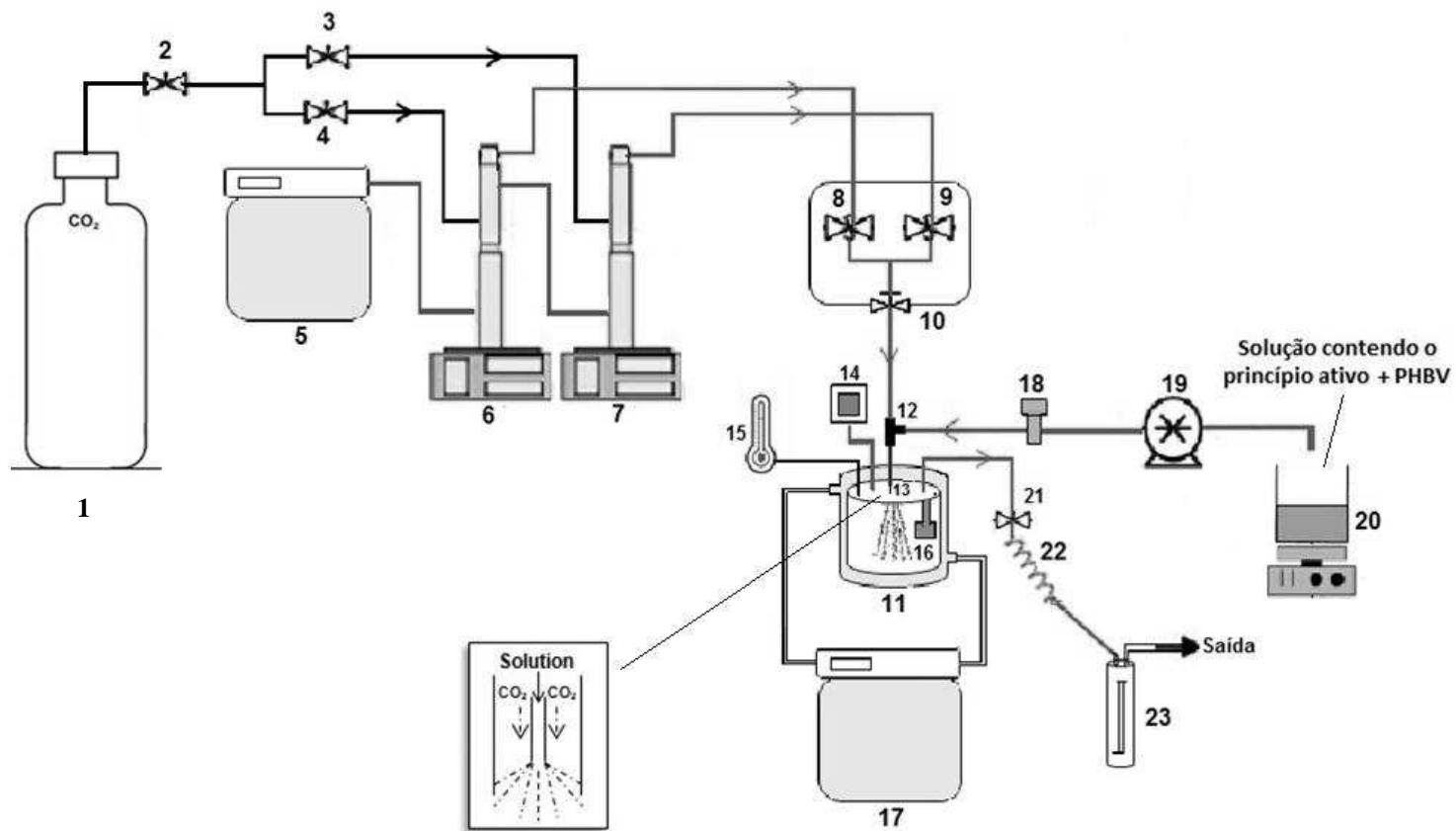


Fonte: do autor – LATESC, UFSC

4.7.2 Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento

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

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



Fonte: adaptado de BOSCHETTO (2013)

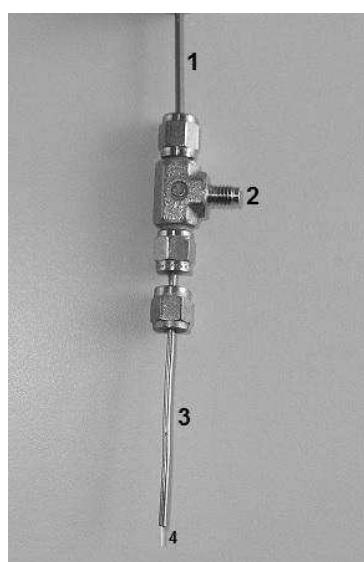
Como apresentado na Figura 14, o aparato experimental de precipitação e encapsulamento tem como principais componentes:

- (1) Cilindro para armazenamento do dióxido de carbono (CO₂) (White Martins, Brasil);
- (2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (Check-Valve Marca HIP, Modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar, Estados Unidos);
- (3) e (4) Válvulas tipo esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente para as bombas de alta pressão (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar à temperatura ambiente, Estados Unidos);
- (5) Banho ultratermostático de recirculação que mantém constante a temperatura nos cilindros das bombas de alta pressão (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D, Brasil);
- (6) e (7) Bombas de alta pressão que possuem um cilindro que tem a capacidade de 506 mL (Marca ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL·min⁻¹, Estados Unidos). Para manter o fluxo de antissolvente sempre constante no sistema são utilizadas duas destas bombas, sendo que também através destas é pressurizado o CO₂ e monitorada a vazão no display de controle da unidade;
- (8) e (9) Válvulas tipo esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente pressurizado das bombas para a câmara de precipitação (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar à temperatura ambiente, Estados Unidos). Sempre são utilizadas alternadamente, dependendo da bomba que está deslocando o antissolvente para a câmara;
- (10) Válvula métrica tipo agulha para controlar o fluxo e vazão de antissolvente das bombas de alta pressão para câmara de precipitação (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar, Estados Unidos);
- (11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm). Ela é constituída de cinco entradas na tampa: uma central e quatro periféricas, onde uma permanece selada. A Figura 5 (p. 34) apresenta a vista da câmara de precipitação e a tampa com as cinco entradas.
- (12) Entrada central coaxial – conexão tipo T (Marca Swagelok, Estados Unidos) à qual estão conectadas a linha de antissolvente e a linha de solução, que são injetados simultaneamente. Até esta conexão o antissolvente e a solução orgânica fluem por

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

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

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



Fonte: BOSCHETTO (2013)

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

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

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

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



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

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

(18) Válvula de regulagem de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (Back Pressute Regulator, Marca GO-Regulador, Série BP-66, Modelo 1A11QE151). Ela permite a regulagem da pressão independentemente da vazão, permitindo uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela;

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

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

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

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

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

4.7.3 Funcionamento da Unidade Experimental de Precipitação e Encapsulamento

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

Em seguida, carregou-se ambas as bombas de alta pressão **(6 e 7)** com CO₂ proveniente do cilindro. Neste estudo foram utilizadas duas bombas de alta pressão, pois como o CO₂ precisa estar em fluxo contínuo, quando uma bomba está deslocando CO₂ para a câmara de precipitação a outra está sendo preenchida novamente pelo fluido.

O deslocamento do fluido do cilindro para a câmara interna de cada bomba se dá mantendo as válvulas **(1 a 4)** abertas. Apesar da pressão de vapor do CO₂ ser alta na temperatura ambiente (64 bar em 25 °C), a simples abertura da válvula do cilindro não é suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO₂ para a câmara das bombas. Desta maneira, para liquefazer a maior quantidade de CO₂ possível, a temperatura da camisa do cilindro das bombas foi ajustada em 7 °C com o auxílio do banho de recirculação **(5)** e o reservatório de CO₂ foi deixado aberto por um tempo variando de

30 min a 1 h. Nestas condições, geralmente era possível armazenar cerca de 500 mL de CO₂ no estado líquido dentro da câmara das bombas.

Enquanto ocorre a liquefação do CO₂ nas bombas, é realizada a montagem da câmara de precipitação. Assim, são montados cuidadosamente os sistemas de filtros de retenção, que têm a função de evitar que durante o experimento haja um deslocamento e posterior arraste do material precipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, foi colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade, servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. A tampa da câmara era fechada com auxílio de uma morsa e de uma chave feita especialmente para este fim (Figura 17), para posteriormente as outras conexões serem colocadas.

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



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

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

Por fim, foram conectados, à tampa da câmara de precipitação, a linha de entrada de CO₂ e da solução, o sensor de temperatura e a linha de saída. Na sequência, a câmara foi conectada ao banho termostático (**17**). Após a montagem da câmara, a válvula (**10**) foi gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO₂ na sua pressão de vapor em temperatura ambiente, mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Quando a câmara de precipitação estava preenchida com CO₂, a válvula (**10**) foi fechada e acionado o sistema de aquecimento, controlado pelo banho de recirculação (**17**). O valor da temperatura desejada dentro da câmara foi ajustado pelo sensor (termopar), sendo esta monitorada pelo display de controle de temperatura.

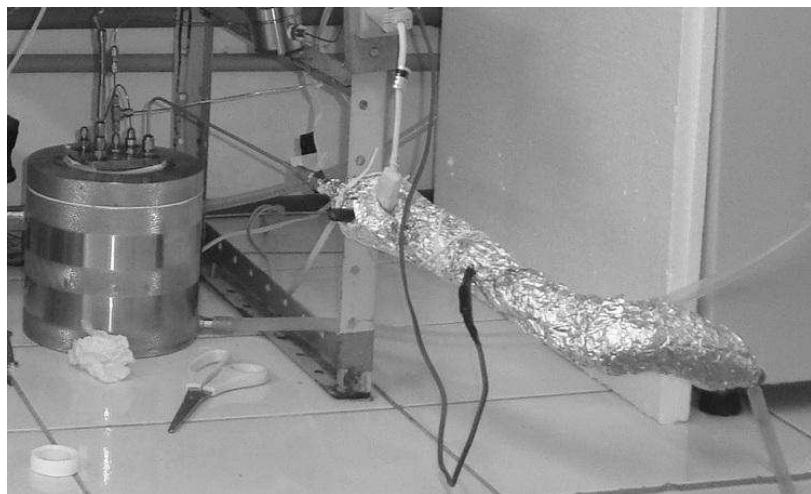
Ao longo do período de estabilização da temperatura no valor estipulado para o experimento, a válvula do reservatório de CO₂ e as válvulas (**1 a 4**) foram fechadas e a pressão elevada nas bombas pelo deslocamento do cilindro interno destas, pressurizando-se toda a linha desde as válvulas (**1 e 2**) até a válvula (**10**) na pressão de 200 bar, ou seja, entre as bombas e a câmara de precipitação. Este valor de pressão nas bombas foi estipulado para manter um alto diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de precipitação. Este diferencial de pressão teve como objetivo evitar possível refluxo da câmara de precipitação para as linhas, podendo causar precipitação do composto utilizado ou do polímero no interior das linhas e também para fazer com que o CO₂ entre em alta velocidade na câmara de precipitação, intensificando a dispersão do jato de solução durante os experimentos de precipitação (FRANCESCHI, 2009, citado por BOSCHETTO, 2013).

No momento em que a temperatura atingia o valor fixado para o experimento, a válvula (**10**) era novamente aberta, de forma gradual, de modo a permitir o fluxo de CO₂ para dentro da câmara até a obtenção da pressão experimental desejada. Uma vez que a pressão na câmara atingisse o valor desejado, a válvula (**21**) era gradualmente aberta, mantendo-se a válvula (**10**) ainda aberta, no sentido de ajustar o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. Neste momento também era possível regular a vazão de CO₂, que era mantida constante durante todo experimento.

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

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

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



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

Quando a temperatura e pressão estavam constantes o CO₂ era deixado fluir até alcançar o estado estacionário. O tempo necessário para alcançar este estado variou de 5 a 10 min dependendo da pressão e temperatura de precipitação. A partir do momento em que o fluxo de CO₂ entrava em regime estacionário se iniciava então a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação.

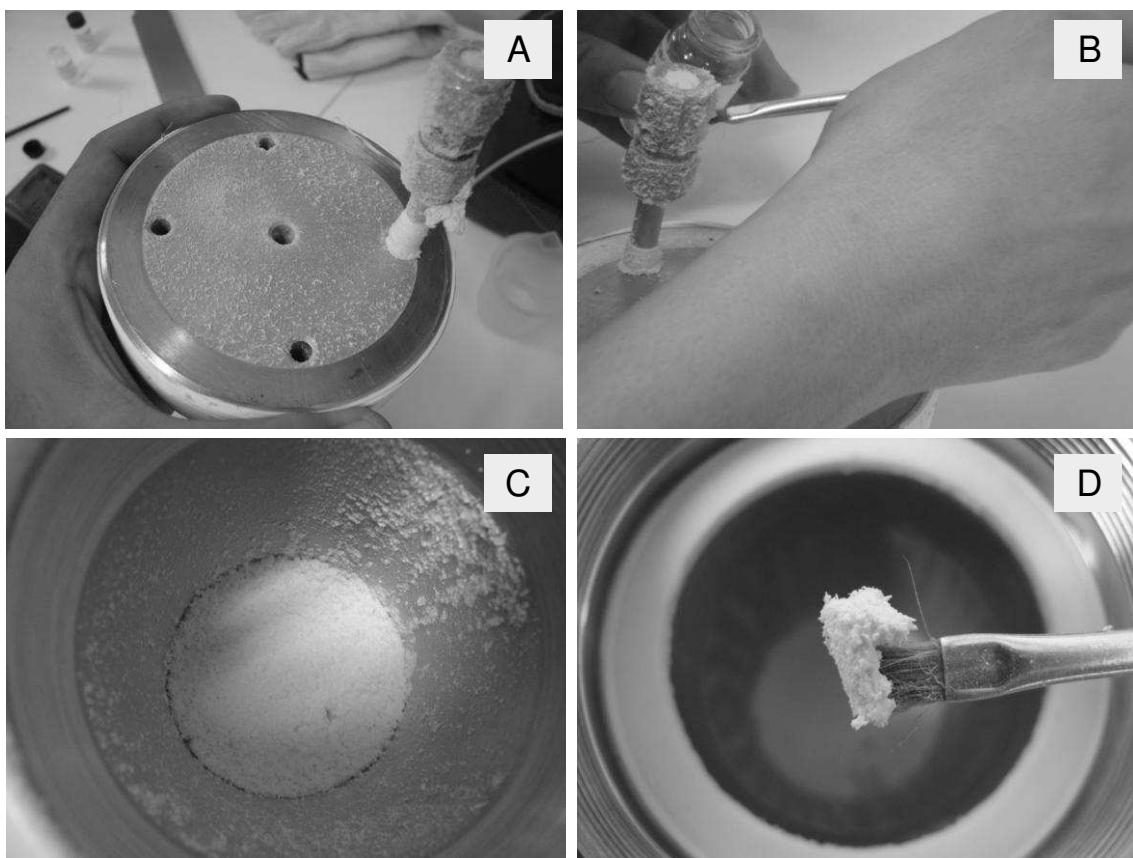
Em cada experimento o volume de solução orgânica adicionado à câmara foi de 45 mL. O volume foi fixado neste valor assumindo que a quantidade de sólido a ser precipitado era suficiente para a realização das análises de caracterização e eficiência de encapsulamento.

Após injetado o volume especificado da solução orgânica, a bomba de HPLC era desligada e o fluxo da solução interrompido. Neste momento, com a finalidade de “secar” as partículas precipitadas e retirar o solvente residual, o fluxo de CO₂ era mantido constante em 20 mL·min⁻¹ por aproximadamente 120 min, baseado em trabalhos na literatura que reportam tempos de secagem variando entre 30 e 120 min (KIM et al., 2007; KANG et al., 2008; HONG et al., 2009). Logo depois de realizada a “secagem” das partículas, o fluxo de CO₂ era interrompido pela válvula (10), que era

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

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

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



Fonte: do autor – LATESC, UFSC

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

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

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

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

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

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

4.7.5 Análise e caracterização das partículas obtidas

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

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ruptura química com DMSO e extração com diferentes solventes

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 7 – Carotenoides totais obtidos com diferentes solventes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2 Estudo de diferentes técnicas de ruptura celular

5.2.1 Técnicas mecânicas de ruptura celular

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

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

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

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

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

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

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

5.2.2 Caracterização dos preparados enzimáticos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2.4 Lise enzimática assistida por ultrassom

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2.5 Técnicas combinadas de ruptura celular

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

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

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

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

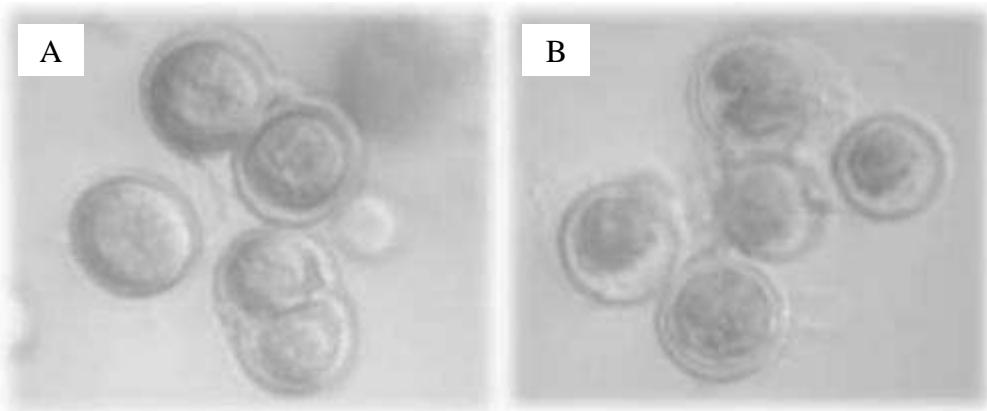
Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p>0,05$). EC: Extratibilidade de carotenoides; CT: carotenoides totais.

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

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

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

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



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

5.3 Tecnologia supercrítica para obtenção de nanocápsulas contendo astaxantina

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

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

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

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

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

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

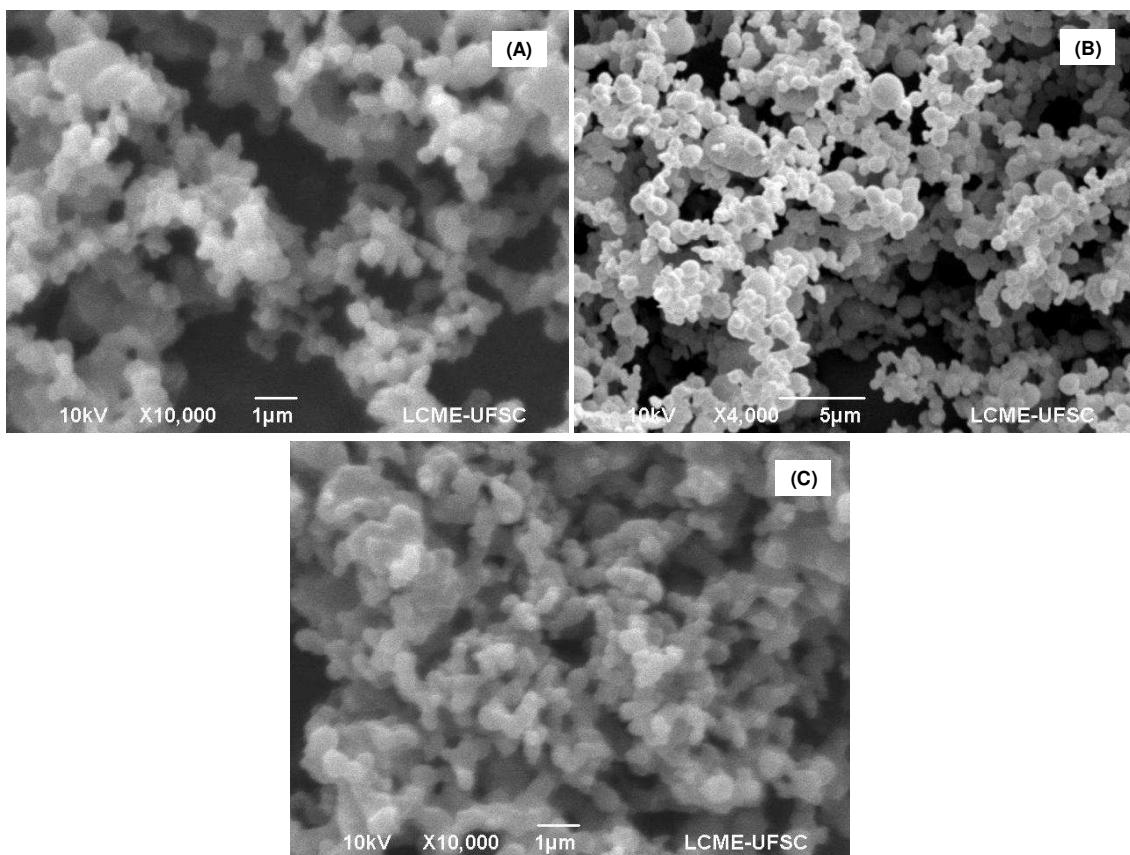
Condições experimentais: 35 °C, vazão de solução a 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, vazão de antissolvente a 20 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano: experimentos 1 e 4 (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), experimentos 2 e 5 (8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),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

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

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

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

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



Fonte: do autor – LCME, UFSC

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

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

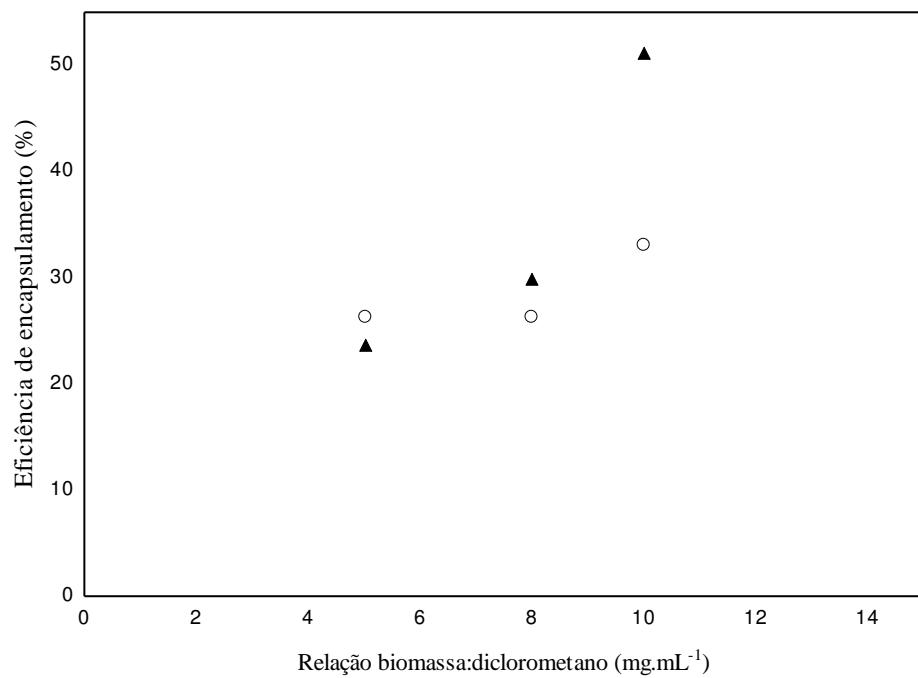
No que refere ao percentual de encapsulamento (PE%) e a eficiência de encapsulamento (EE%), verificou-se que o melhor resultado foi obtido com pressão de 80 bar e relação biomassa contendo astaxantina:diclorometano de 10 mg.mL^{-1} , atingindo 17,06% e 51,21%, respectivamente (Tabela 16). Estes valores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

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

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

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

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



6. CONCLUSÕES

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

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

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

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

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 527-537, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CORAZZA, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. High pressure phase equilibria of the related substances in the limonene oxidation in supercritical CO₂. **Journal of Chemical and Engineering**, v. 48, p. 354-358, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FÉLIX, V. L. **Extraccion supercrítica de astaxantina de biodesechos de jaiba (*Callinectes sapidus*) con CO₂/etanol y su microencapsulado con quitosano.** Dissertaçao (Mestrado). Centro de Investigación em Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México, 1999.

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

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

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

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C. U.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β-carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008a.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656-663, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HAGEN, C; SIEGMUND, S; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, p. 217-226, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LI, J.; ZHU, D.; NIU, J.; SHEN, S.; WANG, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of Haematococcus pluvialis. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 568-574, 2011.

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

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

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

MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from Haematococcus pluvialis in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 623–627, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A

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

Uma discussão detalhada destes resultados pode ser encontrada no artigo:

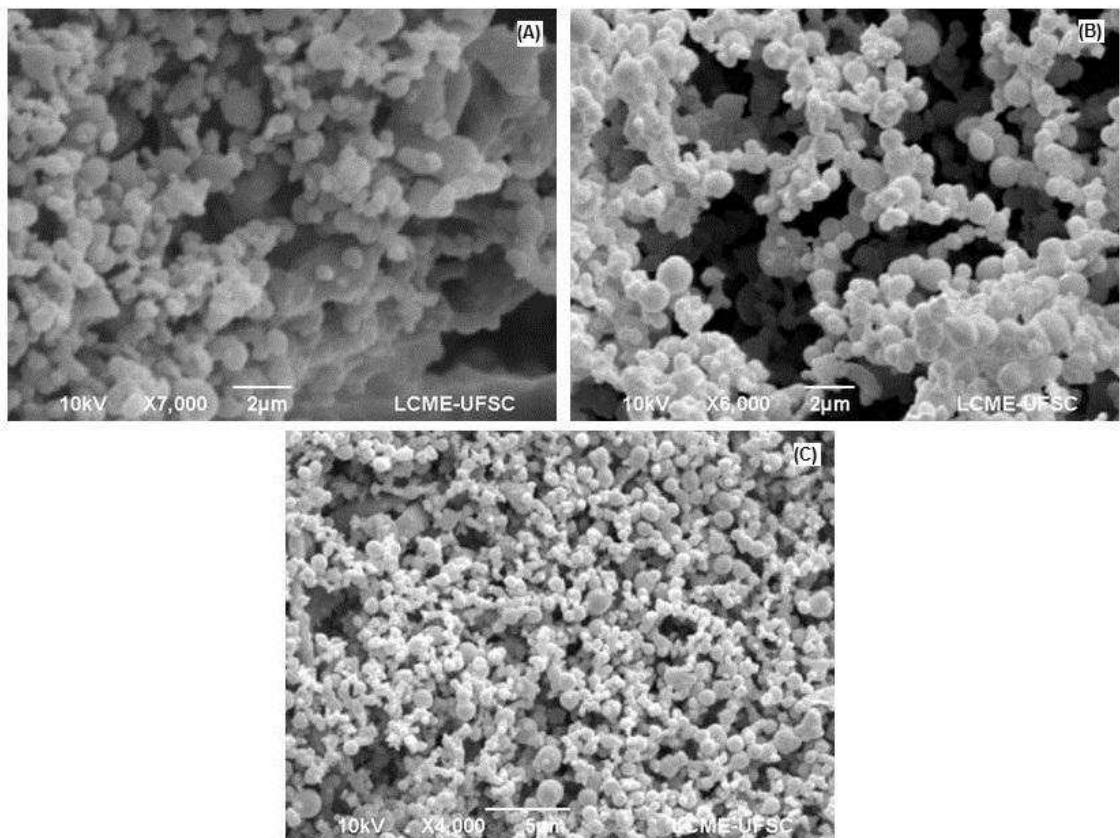
MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

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

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

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

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



Fonte: do autor – LCME, UFSC

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

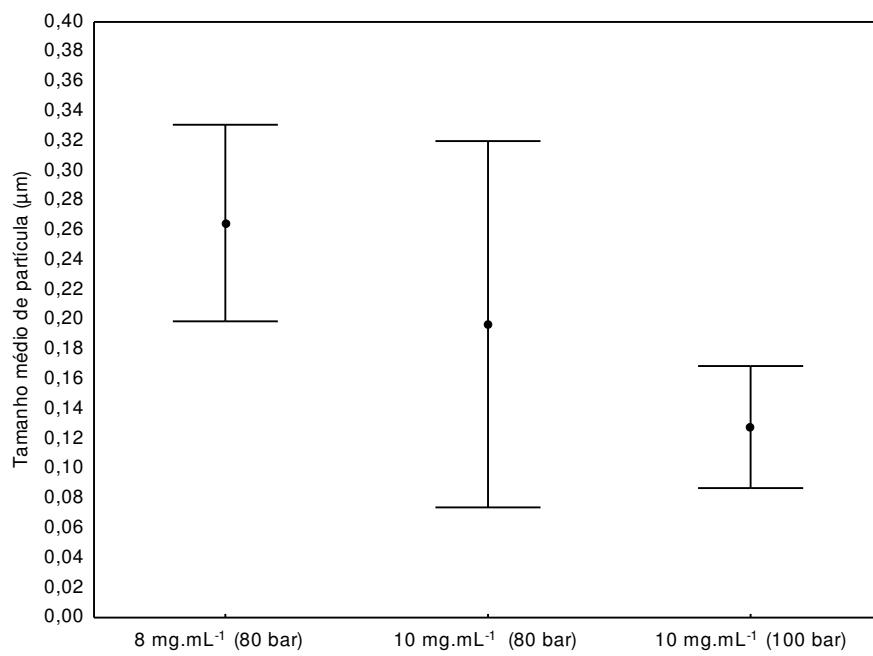
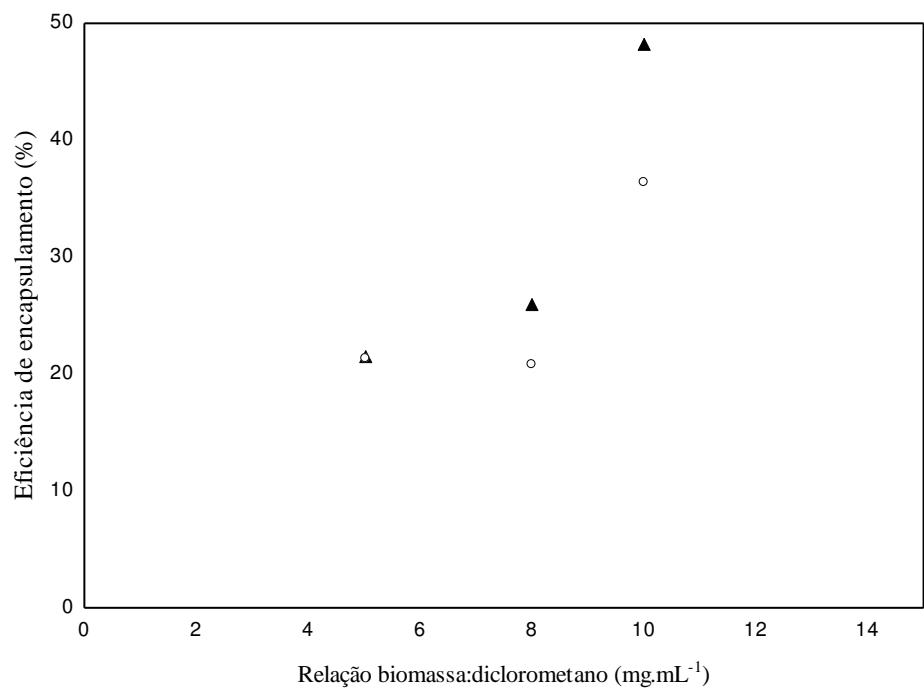


Figura 3A - Influência da relação biomassa contendo astaxantina sobre a eficiência de encapsulamento (EE%). ▲ 80 bar; ○ 100 bar (As outras condições experimentais são mostradas na Tabela 1)



MOIRA CIOFFI and MICHAEL G. WOLFERSBERGER

ISOLATION OF SEPARATE APICAL, LATERAL AND BASAL PLASMA MEMBRANE FROM CELLS OF AN INSECT EPITHELIUM. A PROCEDURE BASED ON TISSUE ORGANIZATION AND ULTRASTRUCTURE

Key words: Insect midgut, tissue fractionation, ultrasound, ultrastructure, plasma membrane vesicles.

ABSTRACT. The tissue used in this study was the midgut of the tobacco hornworm larva, *Manduca sexta*. The midgut epithelium is a single layer of cells resting on a thin basal lamina and underlying discontinuous muscle layer. The epithelial cells are of two main types, goblet and columnar cells, joined together by the septate junctions characteristic of insect epithelia. From this tissue we were able to isolate four distinct plasma membrane fractions; the lateral membranes, the columnar cell apical membrane, the goblet cell apical membrane and a preparation of basal membranes from both cell types. The lateral membranes were isolated by density gradient centrifugation following gentle homogenization of the midgut hypotonic medium, which caused the cells to rupture at their apical and basal surfaces, releasing long segments of lateral membranes still joined by their septate junctions. For isolation of apical and basal membranes the tissue was disrupted by ultrasound, based on the light microscopic observation that carefully controlled ultrasound can be used to disrupt each cell in layers starting at the apical surface. The top layer contained the columnar cell apical membrane, which consists of microvilli forming a brush border covering the luminal surface of the epithelium. The second layer contained the goblet cell apical membrane, which is invaginated to form a cavity occupying the apical half of the cell, and the third layer contained the basal membranes. As each layer was stripped off the epithelium it was collected and the plasma membrane purified by differential or density gradient centrifugation. For all four membrane fractions, the isolation procedure was designed to preserve the original structure of the membrane as far as possible. This allowed electron microscopy to be used to follow each step in the isolation procedure, and to identify the constituents of each subcellular preparation. Although developed specifically for *M. sexta* midgut, these techniques could readily be modified for use on other epithelia.

Introduction

Cell fractionation has played an important role in our understanding of cellular processes and membrane biochemistry in vertebrates. However, relatively little is known about invertebrate membrane biochemistry, and insect membranes in particular have received almost no attention, despite the importance of insects as agricultural pests and vectors of disease (Burges, 1981; Harvey, 1982). For this reason we began a study involving the isolation and purification of plasma membranes from an insect epithelium

for biochemical analysis. We chose as our experimental tissue the midgut epithelium of the tobacco hornworm larva, *Manduca sexta*, mainly because the physiology (review by Wolfersberger *et al*, 1982) and the structure (Cioffi, 1979) of this tissue have been studied extensively, and also because the larvae are readily available, and large enough to provide a reasonable amount of starting material.

Our first attempts at fractionation of the midgut quickly revealed that the methods which had been successfully used to isolate plasma membranes from vertebrate tissues could not be applied to insects, perhaps because of differences in cell structure or tissue organization (Berridge and Oschman, 1972). It therefore became necessary to

Department of Biology, Temple University, Philadelphia, PA 19122.

Received 9 February 1983.

Revised 22 June 1983.

devise new procedures which would allow us to reproducibly isolate pure plasma membranes from an insect epithelium, and which would provide a reasonable yield of material in a condition suitable for biochemical analysis. As in the development of classical methods for vertebrate tissue fractionation

(deDuve, 1971), the methods we developed were dependent on microscopy to identify the products of each step in the fractionation procedure.

The techniques we will be describing are based, at least in part, on the observation that carefully controlled ultrasonication or

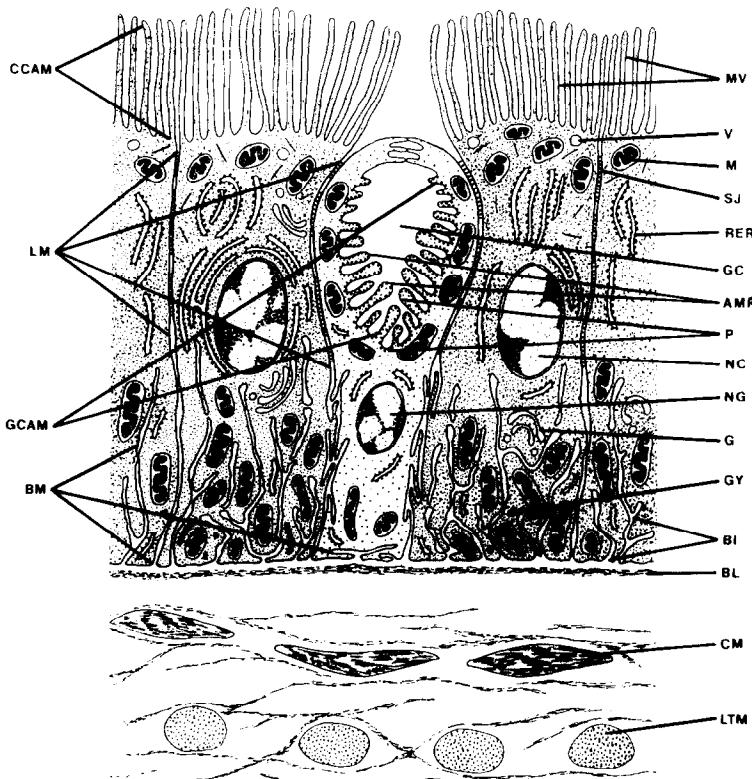


Fig. 1. A diagrammatic representation of a transverse section through the posterior region of the midgut, showing a goblet cell and two columnar cells. The columnar cells have an apical brush border of microvilli (MV), and the apical cytoplasm contains mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi complexes (G) and numerous small vesicles (V). The columnar cell nucleus (NC) is located near the center of the cell, and infoldings (BI) of the basal plasma membrane penetrate the cell to the level of the nucleus. Mitochondria are closely associated with these basal infoldings, and rough endoplasmic reticulum and glycogen granules (GY) are present in the basal cytoplasm. The goblet cells have a large apically located cavity (GC), surrounded by a thin layer of cytoplasm filled with mitochondria. The goblet cavity is produced by infolding of the apical plasma membrane, which is further elaborated into numerous projections (AMP) which form a dense layer lining the inside of the cavity. The cytoplasmic side of this membrane is studded with small particles called portasomes (P). The nucleus (NG) is located in the basal part of the cell, which consists of a narrow stalk of cytoplasm. Infoldings of the basal plasma membrane are shorter and less numerous than in the columnar cell, and tend to run parallel to the basal membrane rather than perpendicular to it. The lateral membranes of adjacent midgut cells are joined along their apical half to two-thirds by septate junctions (SJ). The cells rest on a thin basal lamina (BL) and discontinuous layers of circular (CM) and longitudinal (LTM) muscles. Also indicated on this diagram are the four types of plasma membrane which were isolated: columnar cell apical membrane (CCAM), lateral membrane (LM), goblet cell apical membrane (GCAM) and basal membrane (BM).

homogenization can be used to preferentially disrupt certain parts of an intact epithelium or subcellular preparation while leaving others intact. For this reason, a knowledge of the structure of *M. sexta* midgut is essential to an understanding of the methods we used, and although it has been described in detail elsewhere (Cioffi, 1979), it will be briefly reviewed here. The midgut epithelium is a single layer of cells resting on a basal lamina and discontinuous circular and longitudinal muscle layers. The epithelial cells are of two main types, goblet cells and columnar cells. Both are found along the entire length of the midgut, but because of structural variations between cells from the anterior and posterior regions of the midgut (Cioffi, 1979) only the posterior region, the organization of which is illustrated in Fig. 1, was used in these experiments.

From the posterior region of the midgut we were able to isolate the columnar cell apical membrane (CCAM), the goblet cell apical membrane (GCAM), the lateral membranes (LM) which join the columnar cells to each other and to the goblet cells, and a preparation of basal membranes (BM) from both goblet and columnar cells. Each of these four parts of the plasma membrane has a distinctive ultrastructural appearance in the intact epithelium (see Fig. 1), and our methods were designed to preserve this appearance throughout the isolation procedure. In subcellular preparations, the CCAM is recognizable as long thin microvilli, the GCAM by the fact that it tends to remain intact after tissue disruption, appearing in cross-section as a large rosette-like structure about 10 μm in diameter, and additionally by the presence of small (10–12 nm) particles called portosomes (Harvey, 1980), which are present on the cytoplasmic side of this membrane. The BM could be recognized by the remains of the numerous infoldings present along this membrane, and the LM by the septate junctions which remain intact between adjacent membranes during processing. These distinct ultrastructural characteristics allowed us to use electron microscopy (EM) to follow each step in the isolation procedure for the different parts of the plasma membrane, and to estimate the final purity of each fraction. In general, the contaminant most difficult to remove tended to be mitochondria, so assays for succinate dehydrogenase

(SDH) were carried out for each fraction as a double check for purity, and to ensure that small fragments of mitochondrial inner membrane were not present in the preparation. Each of the final membrane preparations had negligible SDH activity and, as estimated by EM, was better than 95% pure.

To our knowledge, this is the first time that different parts of the plasma membrane have been isolated in pure form from cells of an invertebrate epithelium, and also the first time that basal and lateral membranes have been separated from each other in any epithelium.

Materials and Methods

Third instar *M. sexta* larvae were purchased from Carolina Biological Supply Co. and reared on the artificial diet provided. Throughout the entire dissection and membrane isolation procedure, care was taken to keep all solutions and equipment at 0–4°C. Centrifugations were carried out using either

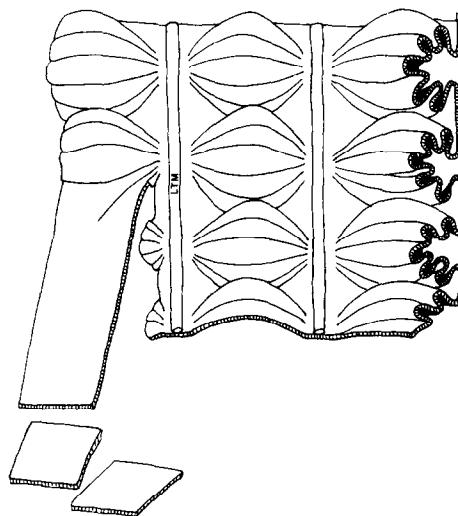


Fig. 2. The dissection procedure used to prepare midgut tissue for sonication. A portion of the midgut is shown from the blood side, with three of the six strips of folded tissue which run parallel to each other along the entire length of the midgut. The folded strips are separated from each other, and the folds held in position by thin strips of unfolded tissue, along each of which runs a large longitudinal muscle (LTM). The epithelium is cut along both sides of the muscle, so that the folds can then be opened out to form a flat strip, which is cut into small pieces of approximately equal size.

a Sorvall RC2-B refrigerated superspeed centrifuge or a Beckman L2-65B ultracentrifuge.

Dissection of midgut

M. sexta larvae were used on the second to third day after molting to fifth instar, when they had reached a weight of 4–6 g. Each larva was immobilized by chilling in crushed ice for at least 20 min. The posterior region of the midgut was then isolated, opened longitudinally, and the peritrophic membrane and gut contents removed (Cioffi and Harvey, 1980). The midgut was turned over to expose the blood side, and the Malpighian tubules removed with forceps. The preparation of lateral membranes did not require further dissection, but for the other three membranes it was necessary to follow the procedure illustrated in Fig. 2. The midgut has a complex morphological organization consisting of six longitudinal strips of folded tissue separated by narrow unfolded strips along each of which runs a large longitudinal muscle. The folds were opened out by cutting through the epithelium on either side of this muscle, which was discarded, stretching out the folded strips and cutting them into small pieces of approximately equal size.

Tissue disruption

For the LM preparation, the tissue was disrupted by homogenization. Posterior midguts from ten or more larvae were rinsed with freshly prepared 1 mM NaHCO₃ solution (pH 7.5), blotted and weighed. Two-gram batches of tissue pieces were homogenized in 8 ml of bicarbonate solution using a Potter-Elvehjem type tissue grinder (Kontes, K-886000, size 23). The pestle was motor driven at approximately 800 rev/min, and eight excursions up and down the tube were completed.

For CCAM, GCAM and BM preparations, the tissue was disrupted by ultrasonication. Posterior midguts from up to 12 larvae were rinsed with buffer containing 0.25 M sucrose, 5 mM EDTA and 5 mM Tris-HCl at pH 8.1 (SET buffer). They were then cut into small pieces as described earlier and transferred to 15 ml plastic tubes containing 5 ml of SET buffer. Tissue pieces from three midguts were combined in one tube, and if more animals were required additional tubes were used. Sonication was carried out using a

Branson S-75 sonifier on its lowest setting, with a semi-micro probe. Following sonication, the tissue could be further disrupted using the more gentle technique of drawing it in and out of a Pasteur pipet. In this way we were effectively able to disrupt each cell in layers, staring at the apical surface. Different stages in this process, which have for convenience been labelled I–VI, are illustrated in Fig. 3. As the tissue pieces break down, their appearance to the naked eye changes, and with practice can be related to their corresponding microscopic appearance. At first the tissue is yellowish-brown in color, and sinks immediately to the bottom of the tube. As the tissue pieces pass through stages II–VI they become more white in color, then translucent and by stage VI transparent, also taking increasingly longer to sink to the bottom of the tube after being suspended.

Isolation of lateral membranes

The following methods, shown in Fig. 4, are modified from a standard procedure developed for isolation of plasma membrane fragments from vertebrate liver (Emmelot, 1974). Batches of homogenate were combined in a beaker, diluted with 3 volumes of 1 mM sodium bicarbonate solution and stirred vigorously with a glass rod for 2 min. The mixture was then filtered through a single layer followed by a double layer of wet surgical gauze, and the residue discarded. The filtrate was distributed among the required number of tubes and centrifuged at 1500 g for 10 min. The supernatant (S₁) was discarded, and each pellet (P₁) was resuspended in 2–3 ml of bicarbonate solution. The pooled P₁ suspension was diluted to 0.6 original filtrate volume with bicarbonate solution and centrifuged in two stages: first for 5 min at 100 g, after which the rotor was accelerated to 1000 g for an additional 10 min, yielding a double-layered pellet P₂. As much of the supernatant (S₂) was aspirated from each tube as could be done without disturbing the pellet, and 2 ml of bicarbonate solution was carefully added along the wall of each tube while it was held at an angle. Then with careful observation, each tube was gently swirled by hand in order to resuspend only the light fluffy upper layer of each P₂ pellet without disturbing the lower layer. The upper layer suspensions were then combined, diluted to 0.4 filtrate volume with

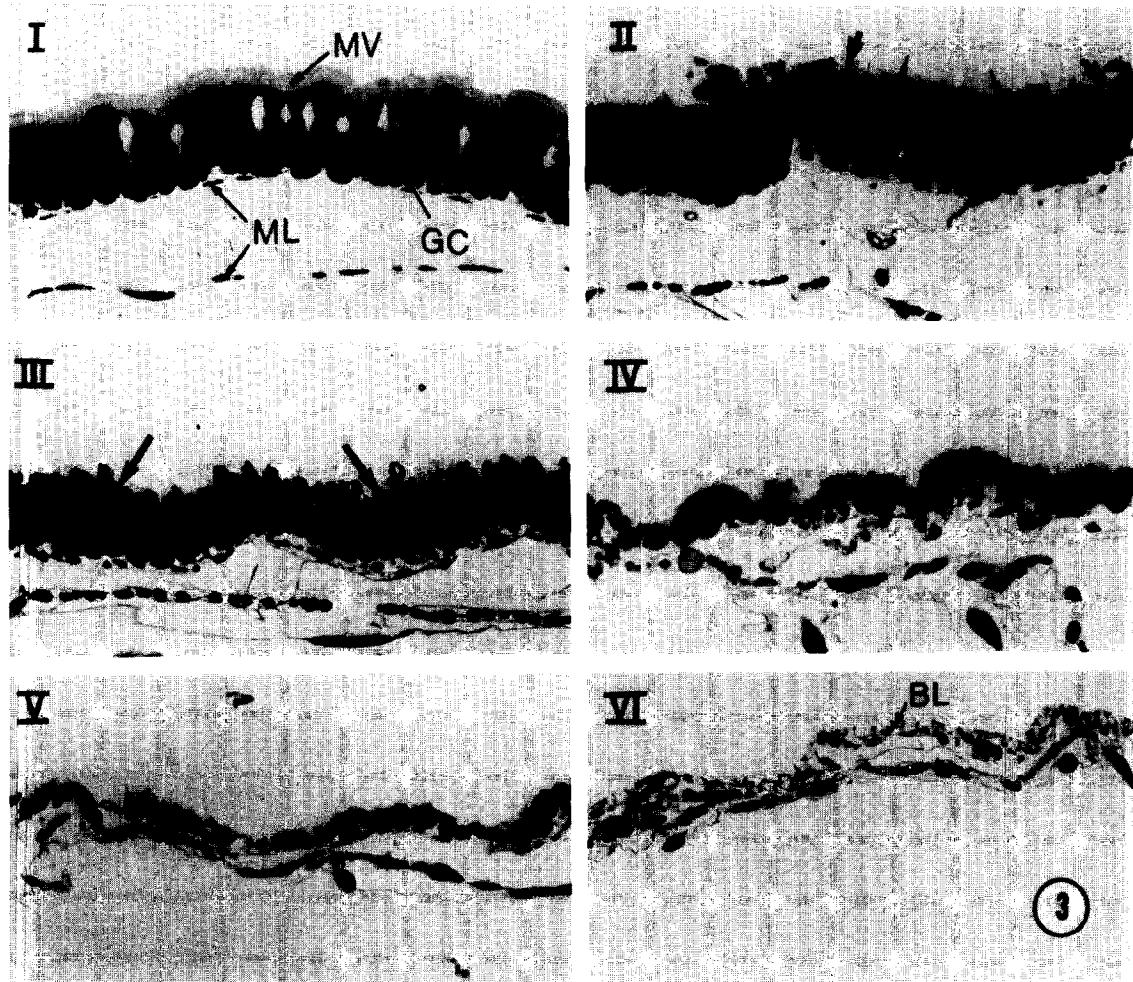


Fig. 3. Stages in the disruption of midgut epithelium by sonication. The procedure breaks down each cell in layers, beginning at the apical surface. The sections are shown under low magnification to demonstrate that the disruption occurs evenly across each tissue piece, and is not limited to particular areas or groups of cells. Stage I: The intact epithelium and underlying muscle layer (ML). The brush border of microvilli (MV) covers the entire apical surface of the epithelium, but the microvilli originate from the columnar cells only (see Fig. 1). The goblet cells can be recognized by their large cavity (GC), which occupies most of the apical half of the cell. Stage II: Areas of the brush border have been broken off (large arrows) while other areas remain intact (small arrows). Where the microvilli have been removed, the contents of the columnar cells are beginning to spill out. Stage III: The microvilli have been completely removed, and much of the columnar cell apical cytoplasm has been lost, leaving the goblet cells exposed. The GCAM tends to collapse (arrows), obliterating the cavity. Stage IV: The exposed GCAM has been broken off, together with additional material from the apical portion of the columnar cells. The basal portion of both goblet and columnar cells remains intact. Stage V: Most of the basal cytoplasm has been removed, leaving the BM and a small amount of cytoplasm. Stage VI: The BM has been removed, leaving only the basal lamina (BL) and muscle layer. $\times 150$.

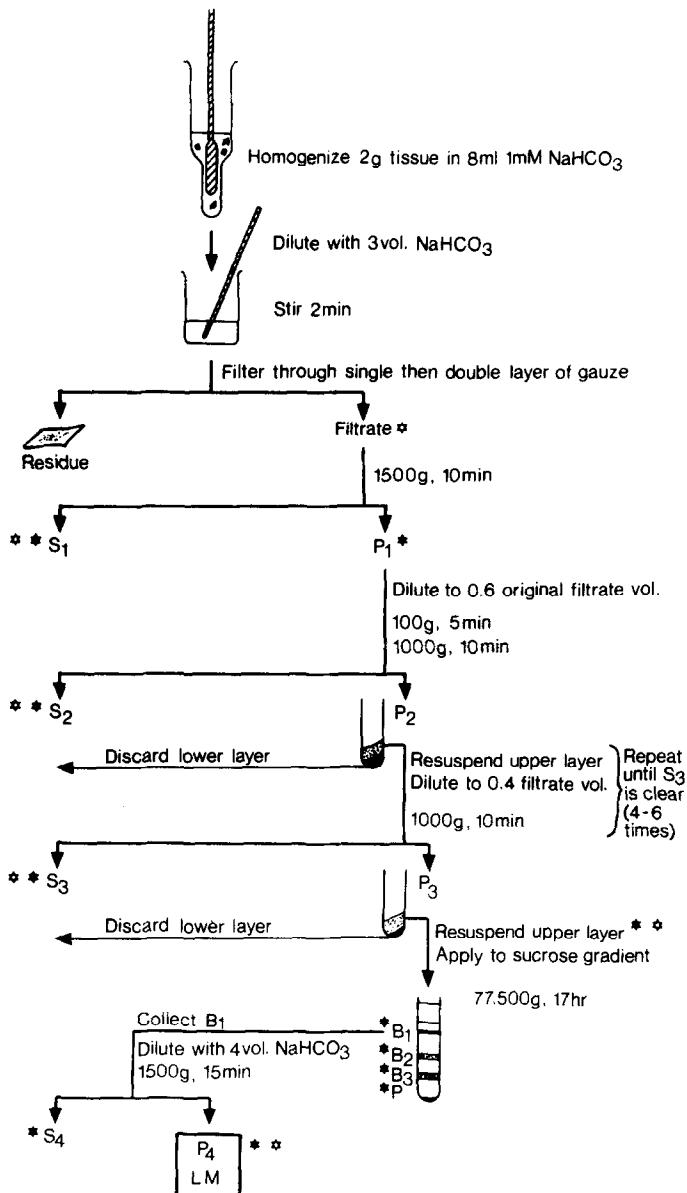


Fig. 4. Isolation of lateral plasma membranes. ★ indicates fractions examined by microscopy, while * indicates those assayed for SDH activity. P, pellet; S, supernatant; B, band.

bicarbonate solution and centrifuged at 1000 g for 10 min. This step was repeated until the supernatants (S₃) were no longer turbid (four to six repetitions), each time taking care not to resuspend the very bottom portion of each pellet. The pellets (P₃)

resulting from the final 1000 g centrifugation were resuspended in sufficient bicarbonate solution so that the material resulting from about 4 g of tissue was contained in 1 ml of suspension. 0.5 ml samples of P₃ suspension were layered over continuous 35–45% (w/w)

linear sucrose gradients contained in cellulose nitrate centrifuge tubes, which were then filled to the top with bicarbonate solution. Using a Beckman SW40 rotor, the tubes were spun at 25,000 rev/min (77,000 g_{av} , 110,900 g_{max}) for 17 hr. Three bands were observed on each gradient, a thin white band (B_1) just below the sample-gradient interphase, and two tan-colored bands (B_2 , B_3) further into the gradient. By means of a syringe fitted with a blunt tipped 15 gauge needle, the upper B_1 band was collected from each gradient, pooled, and the suspension diluted with 4 volumes of bicarbonate solution. Centrifugation at 1500 g for 15 min yielded the LM pellet P_4 .

Isolation of columnar cell apical membrane

The posterior midgut from three or six larvae was cut into small pieces as described above, suspended in SET buffer, and the procedure shown in Fig. 5 was followed. The tissue

pieces were sonicated for about 5 sec, or until the buffer first appeared cloudy. This brought the tissue from stage I to stage II (Fig. 3), at which about 25% of the microvilli had been dislodged. The suspension was filtered through four layers of wet surgical gauze and the residue discarded. The filtrate was centrifuged at 6000 g for 15 min, then the supernatant (S_1) decanted to another tube and recentrifuged at 6000 g for 15 min. The resulting supernatant (S_2) was then centrifuged at 10,000 g for 30 min to pellet the CCAM (P_3).

Isolation of goblet cell apical membrane

The procedure for GCAM isolation is illustrated in Fig. 6. Tissue pieces from 12 posterior midguts were sonicated for about 10 sec to bring them from stage I to stage III (Fig. 3), at which most of the microvilli had been removed, leaving the GCAM exposed. The tissue pieces were washed by allowing

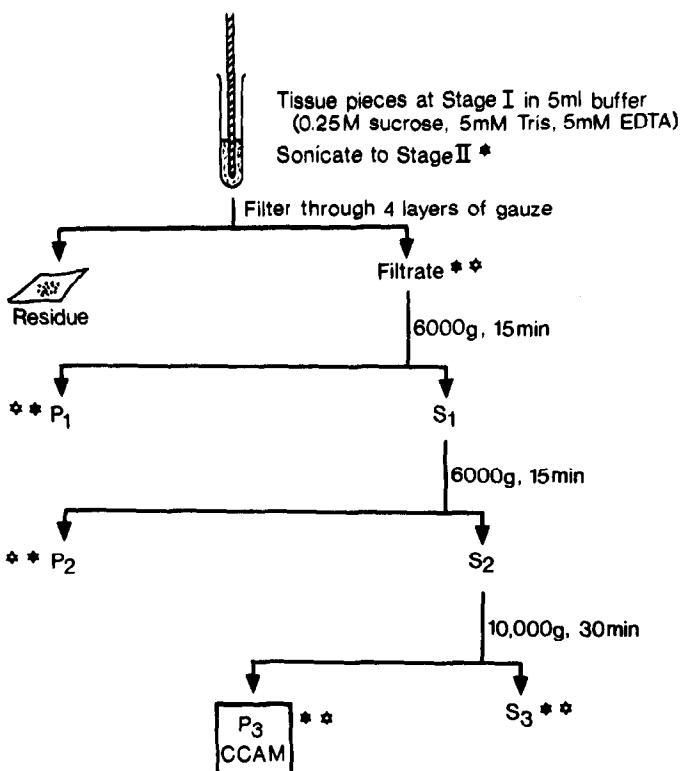


Fig. 5. Isolation of columnar cell apical membrane. ★ indicates fractions examined by microscopy, while * indicates those assayed for SDH activity. P, pellet; S, supernatant.

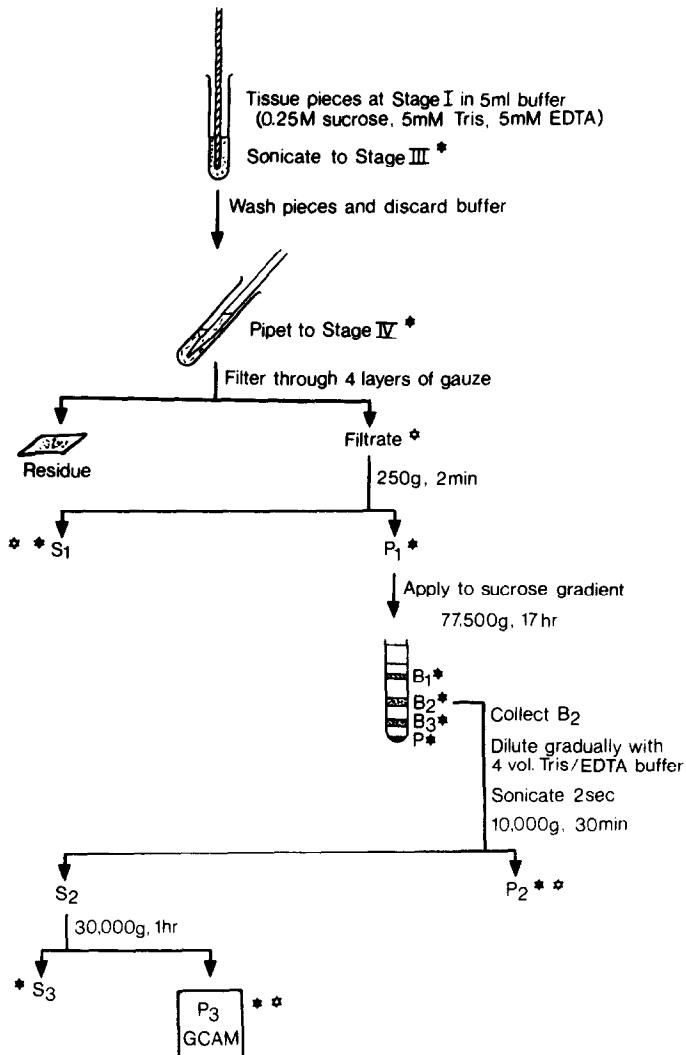


Fig. 6. Isolation of goblet cell apical membrane. ★ indicates fractions examined by microscopy, while * indicates those assayed for SDH activity. P, pellet; S, supernatant; B, band.

them to sink to the bottom of the tube, aspirating the buffer and replacing it with fresh medium. This was repeated until the buffer appeared clear (three to four times). The tissue pieces were then drawn in and out of a Pasteur pipet from 10 to 20 times, bringing them to stage IV. The suspension was filtered through four layers of wet surgical gauze, the residue discarded, and without delay the filtrate centrifuged at 250 g for 2 min. The supernatant (S_1) was then

decanted as quickly as possible and the pellet (P_1) resuspended so that 0.5 ml contained material from about 800 mg of tissue (three to four midguts). 0.5 ml samples were layered on to continuous 37–45% (w/w) linear sucrose gradients, and centrifuged at 25,000 rev/min for 17 hr using a Beckman SW40 rotor. Three bands appeared on the gradient, of which the middle one (B_2) was collected, diluted gradually with 4 volumes of buffer, and sonicated for 2 sec. This suspen-

sion was then centrifuged at 10,000 g for 30 min, the supernatant (S_2) decanted and spun at 30,000 g for 1 hr to pellet the GCAM (P_3). To increase the yield of GCAM, we

usually resuspended the 10,000 g pellet (P_2) in fresh buffer, sonicated the suspension for an additional 2 sec, then proceeded as before. This step could be repeated two or three

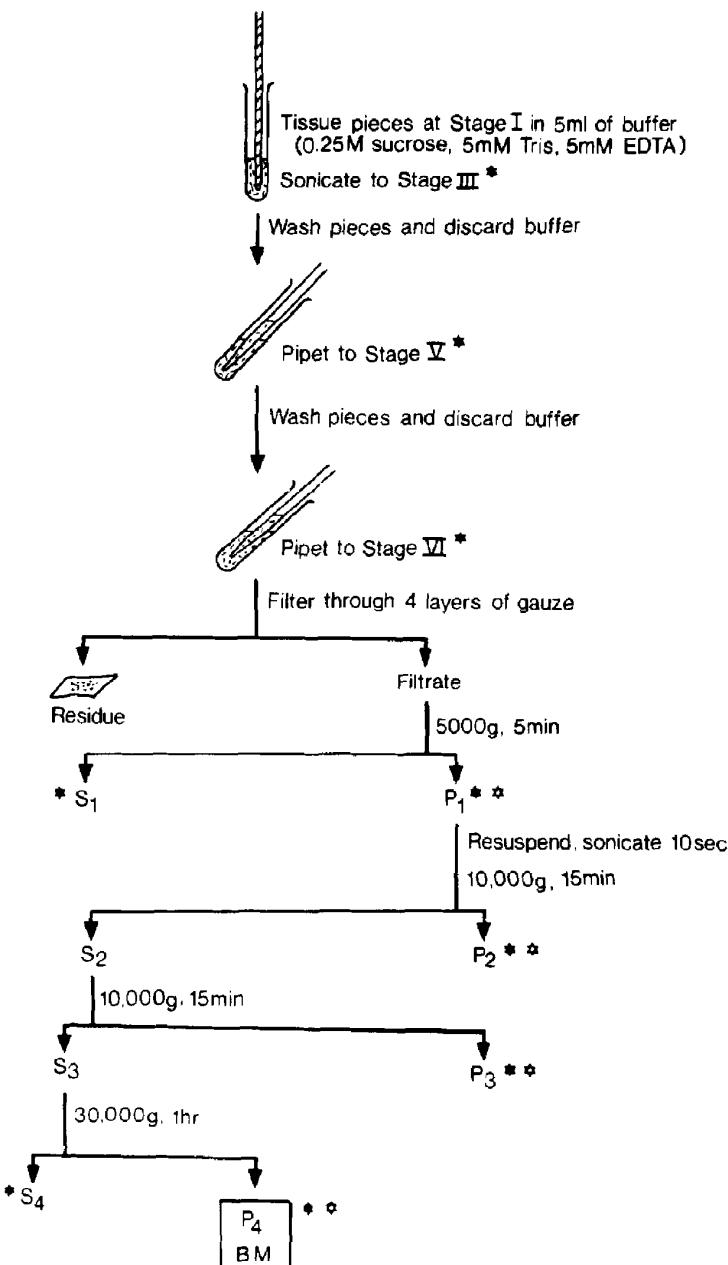


Fig. 7. Isolation of basal plasma membrane. ★ indicates fractions examined by microscopy, while * indicates those assayed for SDH activity. P, pellet; S, supernatant.

times, approximately doubling the yield of GCAM without decreasing the purity of the final preparation.

Isolation of basal membrane

The procedure followed for basal membrane isolation is illustrated in Fig. 7. Tissue pieces from six or nine posterior midguts were sonicated to stage III (Fig. 3), washed several times, then brought to stage V by drawing them in and out of a Pasteur pipet 20–30 times. The pieces were washed again until the buffer appeared clear, then pipetted an additional 10–20 times to bring them to stage VI. The suspension was poured through four layers of wet surgical gauze, the residue discarded and the filtrate centrifuged at 5000 g for 5 min. The supernatant (S_1) was decanted, the pellet (P_1) resuspended in fresh SET buffer and sonicated for 10 sec. This suspension was then centrifuged at 10,000 g for 15 min, the supernatant (S_2) poured into another tube and centrifuged again 10,000 g for 15 min, yielding a pellet (P_3) and supernatant (S_3). S_3 was then centrifuged at 30,000 g for 1 hr to pellet the basal membranes (P_4).

Microscopy

Samples of the fractions indicated in Figs. 4–7 were fixed for microscopic examination in half-strength Karnovsky fixative in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.3 (Karnovsky, 1965). Tissue pieces were placed directly into ice-cold fixative for 1 hr, while pellets were fixed by quickly and carefully aspirating the supernatant and replacing it with fixative. Bands collected from the gradients were diluted to bring the sucrose concentration to approximately 0.25 M and pelleted by centrifugation at 10,000 g for 10 min. Any supernatants which were to be examined were spun at 100,000 g for 1 hr, and if a pellet was obtained it was fixed for EM as described above. After 3–4 hr in fixative, the pellets were detached from the centrifuge tube by sliding a thin metal strip between the pellet and the tube, which usually allowed the pellet to be removed in one piece and transferred intact to a vial for processing. All samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Araldite (Cioffi, 1979). Sectioning was carried out using an LKB Huxley ultramicrotome. Tissue pieces were cross-

sectioned for light microscopy at a thickness of 1 μm , stained in 1% toluidine blue in 1% borax and photographed using a Zeiss photomicroscope II. All pellets were sectioned through the center in a plane perpendicular to their flattened surface. This ensured that each section included the top, bottom, middle and edge of the pellet, so that any layering or differences in composition between the middle and edge of the pellet were easily recognizable. The pellets were sectioned for both light and electron microscopy. Thick sections were stained as described above, whereas thin sections were stained in saturated uranyl acetate for 3 min and lead citrate (Venable and Coggeshall, 1965) for 5 min, then examined using a Philips EM 300 electron microscope.

Protein and SDH assays

The protein content of the tissue fractions indicated in Figs. 4–7 was determined by the method of Lowry *et al.* (1951). The SDH activity of these fractions was determined according to the method of Ackrell *et al.* (1978). All measurements of optical absorbance were made using a Cary model 14 recording spectrophotometer.

Results

Lateral membranes

The disruption procedure used to fractionate the midgut for preparation of LM combines osmotic and mechanical forces, producing large fragments of plasma membrane which were collected by low speed centrifugation (P_1 in Fig. 4). The epithelial cells tend to rupture at the apical and basal surfaces, leaving the lateral membranes of adjacent cells still joined together by their septate junctions. These LM fragments could clearly be seen in P_1 , together with large fragments of goblet and columnar cell apical membrane, basal membrane, nuclei and cell debris. The two stage centrifugation followed by the washing procedure removed most of the nuclei and cell debris, so that the material which was finally placed on the sucrose gradient (P_3) consisted of large fragments of plasma membrane. EM examination of the three bands which appeared on the gradient showed that the first band (B_1) was almost entirely made up of lateral membranes, the second band (B_2) was a mixture of basal

membrane fragments and goblet cell apical membrane, and the third band (B_3) was enriched in columnar cell apical membrane. Mitochondrial contamination of this preparation was never a problem, and from Table 1 it can be seen that the material which was placed on the gradient was free of SDH activity. The main contaminant of the LM band (B_1) was small vesicles derived from fragments of GCAM and BM which had broken up while on the gradient. The lateral membranes, however, had maintained their original organization throughout the isolation procedure, and were collected by centrifuging B_1 at 1500 g, leaving the lighter contaminants in the supernatant. The pure LM preparation is shown in Figs. 8b and c, and for comparison the appearance of lateral membranes in the intact epithelium is also shown (Fig. 8a). The low power micrograph (Fig. 8b) illustrates the homogeneity of the preparation, with the isolated lateral membranes recognizable as long rope-like strands. At higher magnification (Fig. 8c) the septate junctions between adjacent membranes are clearly visible (cf. Figs. 8a, c).

As far as the other bands on the gradient were concerned, further separation of GCAM and BM from the second band proved impossible. Pure CCAM could probably have been isolated from B_3 , but was more conveniently obtained by using ultraso- nication to disrupt the tissue, followed by differential centrifugation.

Columnar cell apical membrane

The preparation of CCAM is illustrated in Fig. 9. The appearance of the tissue before (Fig. 9b) and after (Fig. 9c) brief sonication confirms that only parts of the CCAM were broken off, leaving the rest of the epithelium intact. No attempt was made to remove more of the microvilli, because while further sonication would have stripped off more of the CCAM it would also have reduced those microvilli already in suspension into very small fragments, making them more difficult to identify by EM. Additionally, further sonication would have increased contamination because, of course, once the CCAM is removed, mitochondria and other organelles present in the apical cytoplasm of the

Table 1. *SDH activity of subcellular fractions*

Preparation	Fraction	Specific SDH activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)	% Total activity
LM ($n=3$)	Filtrate	4.9 ± 0.5	100
	$S_1 + S_2 + S_3$	5.2 ± 0.1	75 ± 1
	P_3	0.1 ± 0.2	0 ± 0
	P_4	0.0 ± 0.1	0 ± 0
CCAM ($n=5$)	Filtrate	3.1 ± 0.6	100
	$P_1 + P_2$	11.5 ± 1.6	102 ± 5
	P_3	0.1 ± 0.2	0 ± 0
	S_3	0.4 ± 0.3	0 ± 0
GCAM ($n=3$)	Filtrate	9.1 ± 1.3	100
	S_1	10.1 ± 2.4	77 ± 13
	P_2	18.8 ± 3.6	4 ± 1
	P_3	0.0 ± 1.3	0 ± 0
BM ($n=3$)	P_1	18.2 ± 1.9	100
	$P_2 + P_3$	30.3 ± 1.6	101 ± 10
	P_4	0.7 ± 1.9	0 ± 1

n refers to the number of times each membrane was prepared for SDH assays.

The fraction numbers correspond to those used in Figs. 4-7.

All values are presented as means \pm s.e.

columnar cells are now free to escape into the medium. The 6000 g centrifugations (see Fig. 5) were carried out to remove any contaminating mitochondria, and in general we found that two 15 min centrifugations were more effective than one 30 min centrifugation. EM examination of the resulting pellets showed that P_1 consisted of a bottom layer of mitochondria covered by a thin surface layer of microvilli. P_2 was always much smaller than P_1 , containing any mitochondria not pelleted during the first centrifugation, and like P_1 there was also a surface layer of microvilli. Following removal of all mitochondria, the microvilli still in suspension were collected by centrifuging the P_2 supernatant (S_2) at 10,000 g. A portion of the resulting P_3 , which was composed of short lengths of isolated microvilli, is shown in Fig. 9d, and for comparison the fine structure of the CCAM in the intact epithelium is shown in Fig. 9a. The P_3 pellet was completely homogeneous, and EM examination so rarely revealed any contaminants that the preparation was estimated as being better than 99% pure CCAM. Analysis of SDH activity (Table 1) confirms the removal of all

mitochondria from the CCAM preparation, since all the SDH activity is found in the 6000 g pellets P_1 and P_2 , while in P_3 and in the S_3 supernatant the activity was zero within experimental error. By centrifuging S_3 at 100,000 g a pellet could be obtained for EM examination. This contained rough endoplasmic reticulum, other small vesicles and also some small fragments of CCAM.

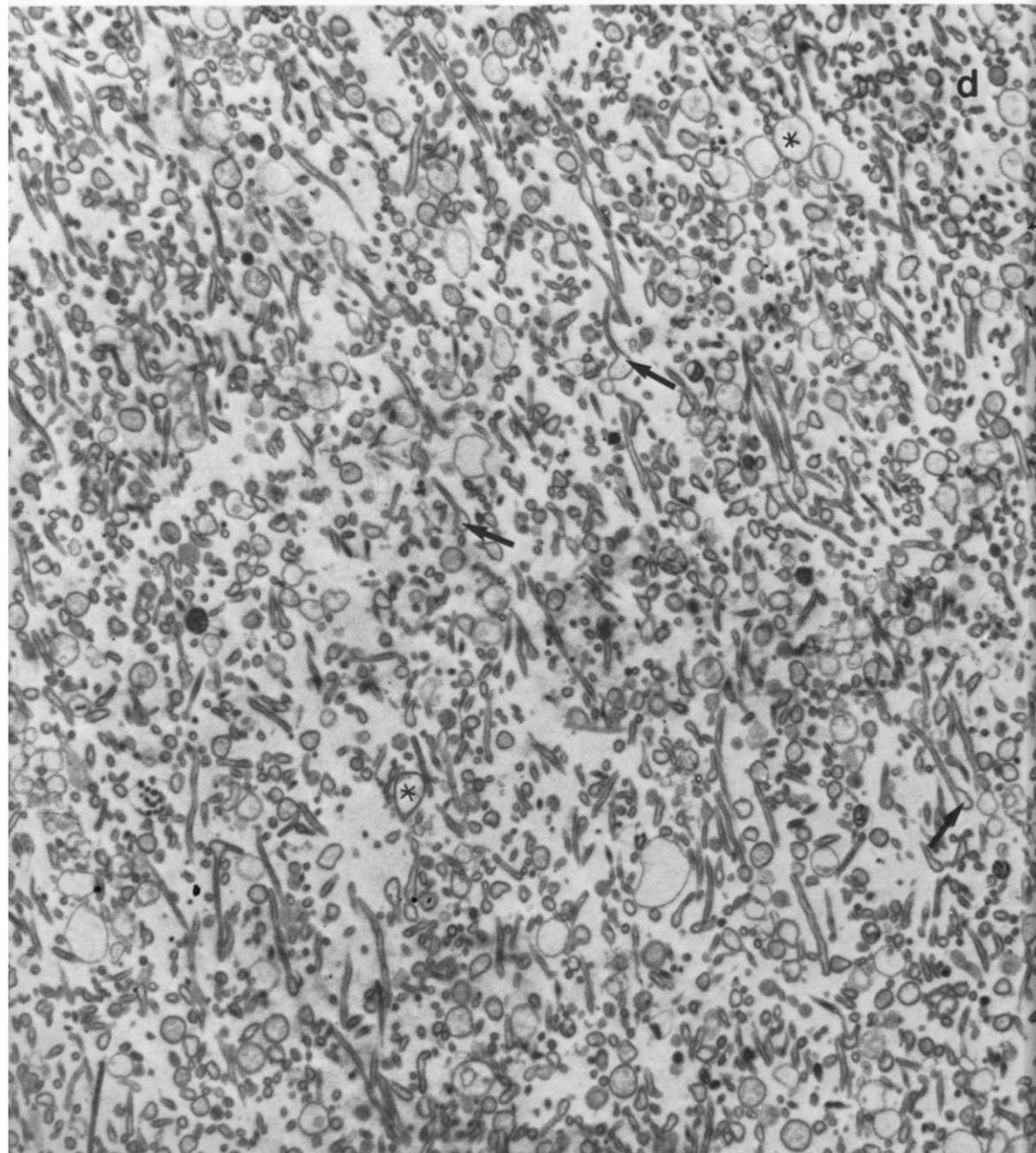
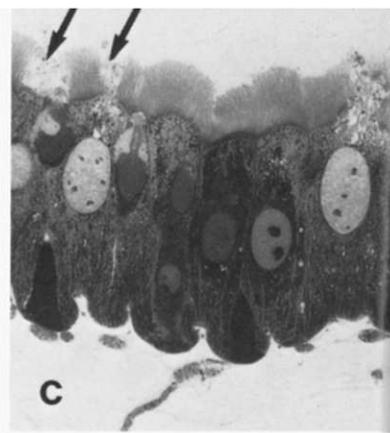
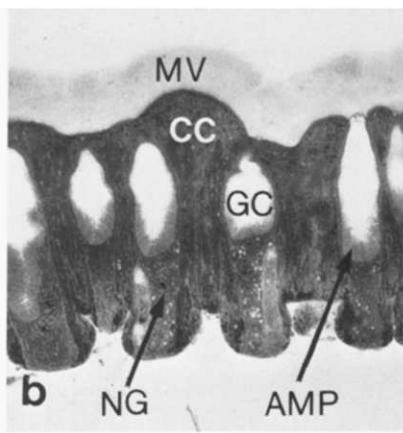
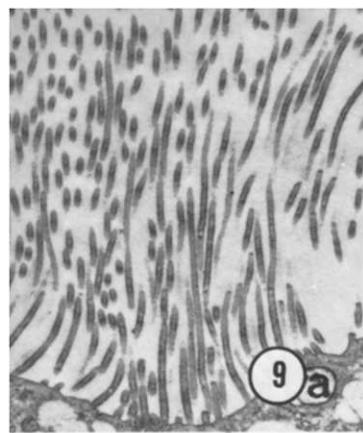
Despite the fact that a large proportion of the CCAM is wasted in this preparation, we were still able to collect 200–300 µg of pure CCAM protein per midgut. Since the yield was so high and there was no shortage of starting material, we consider this waste to be acceptable, since it enables us to obtain a preparation with such a high degree of purity.

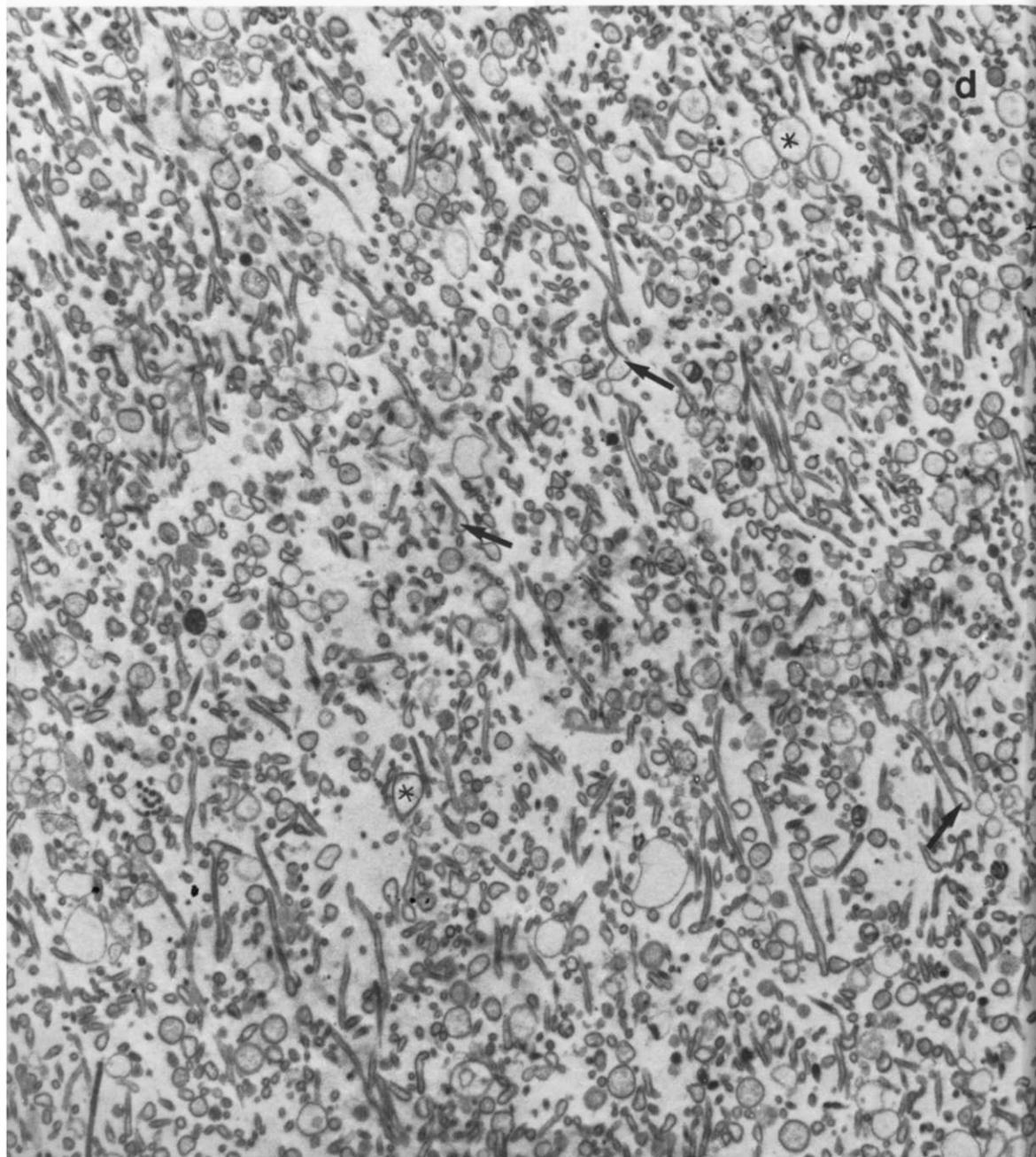
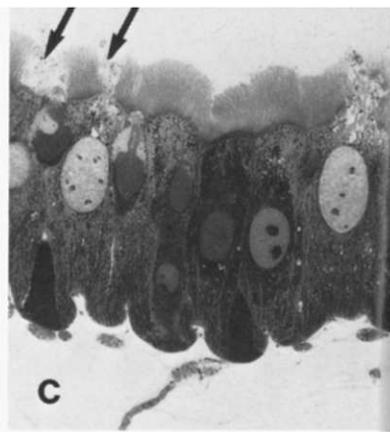
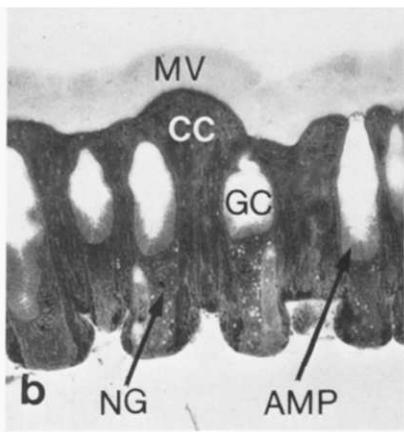
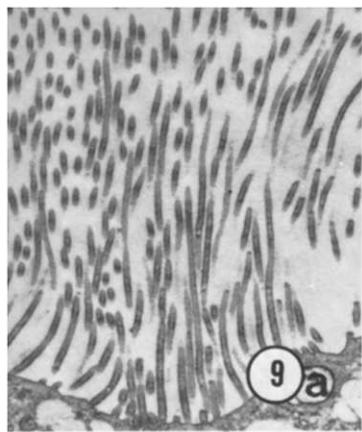
Goblet cell apical membrane

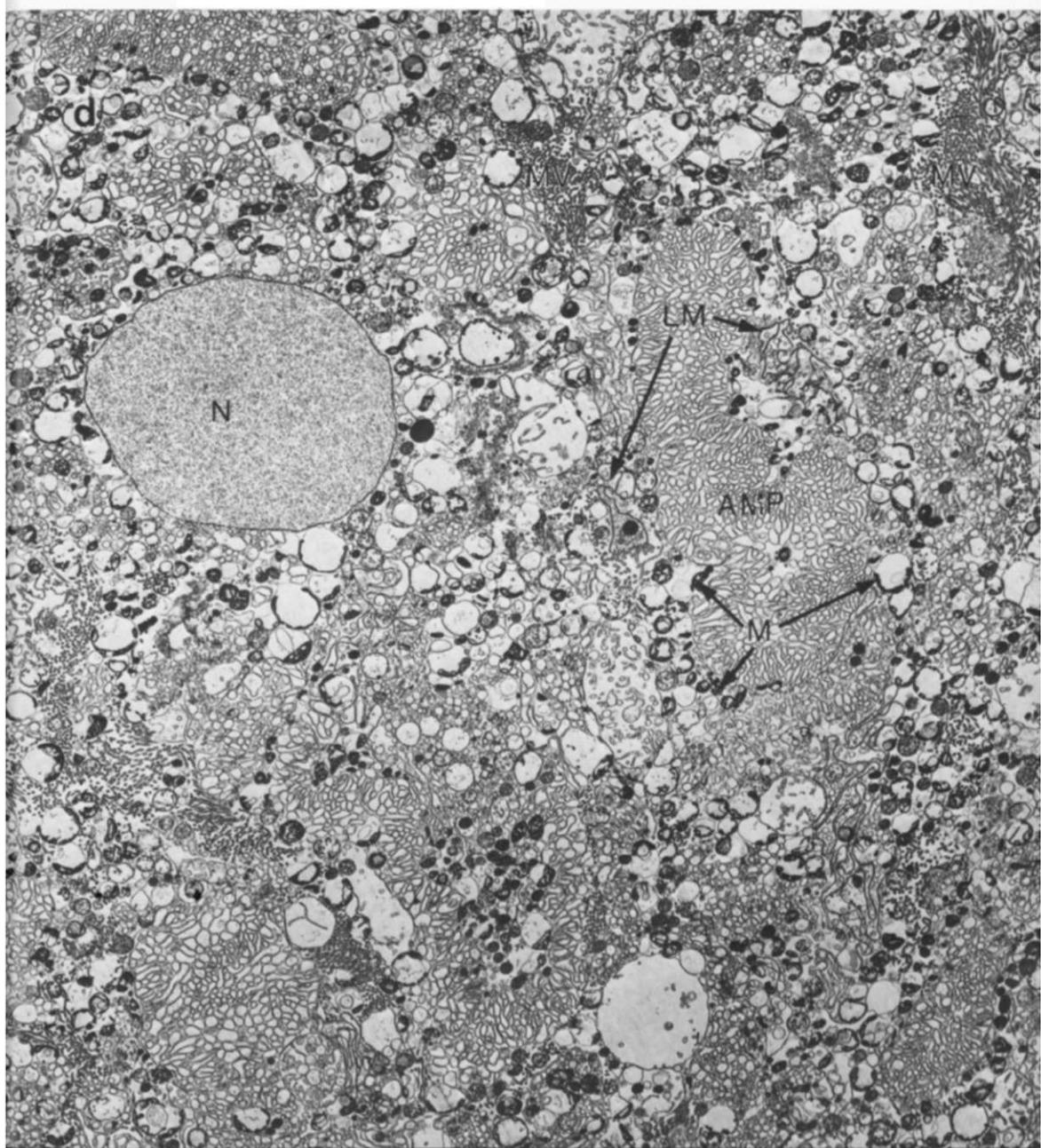
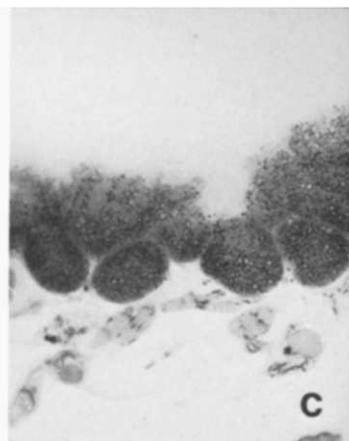
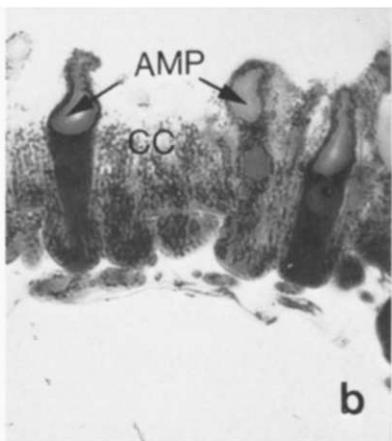
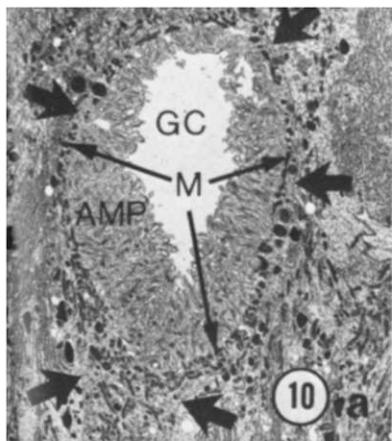
Stages in the preparation of GCAM are illustrated in Fig. 10, and shown diagrammatically in Fig. 11. During the early parts of this procedure, the GCAM can be readily identified by its gross morphology, while in the last steps the portasomes provide a useful marker, and also indicate the orientation of the membrane vesicles.

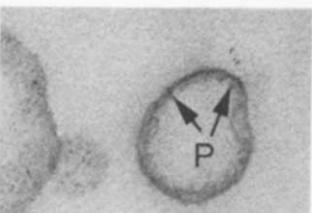
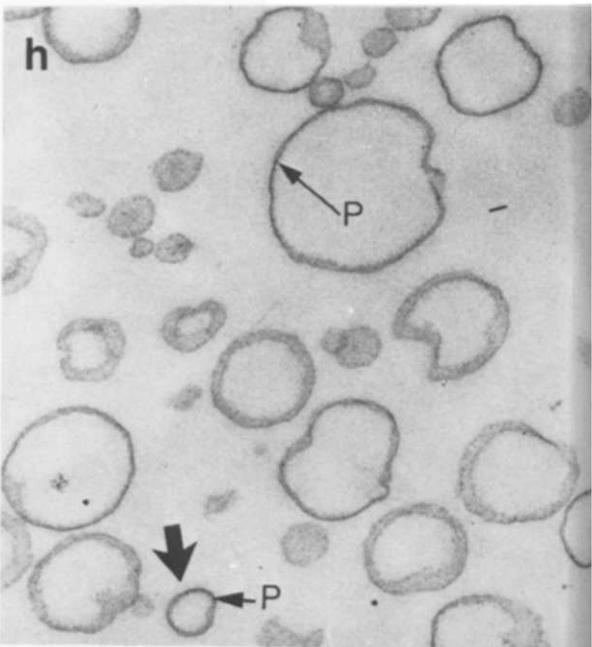
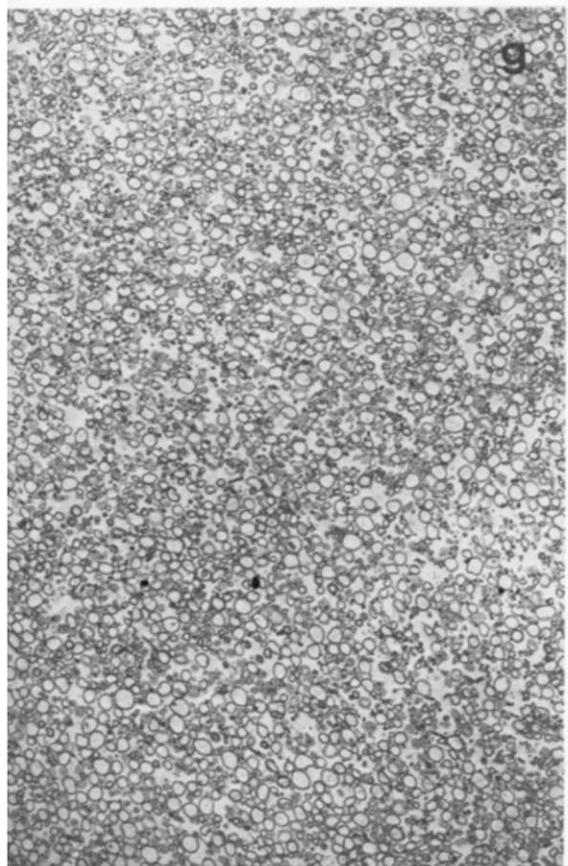
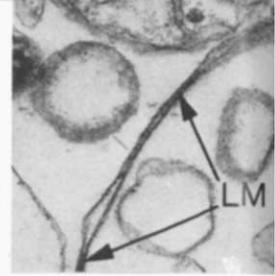
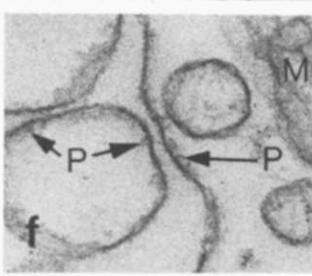
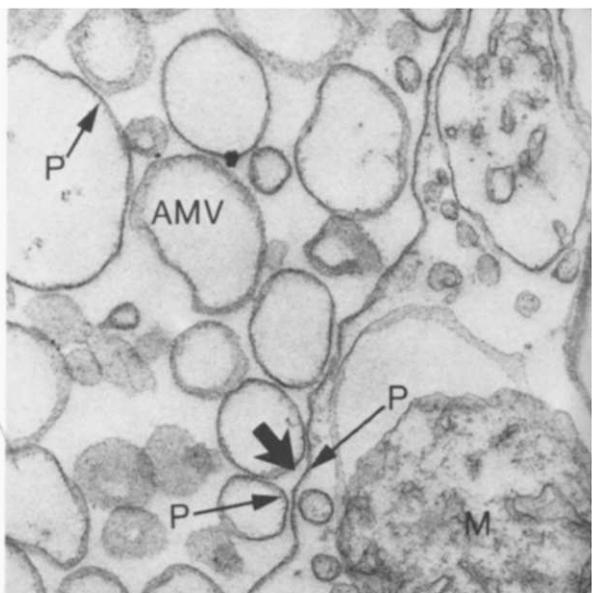
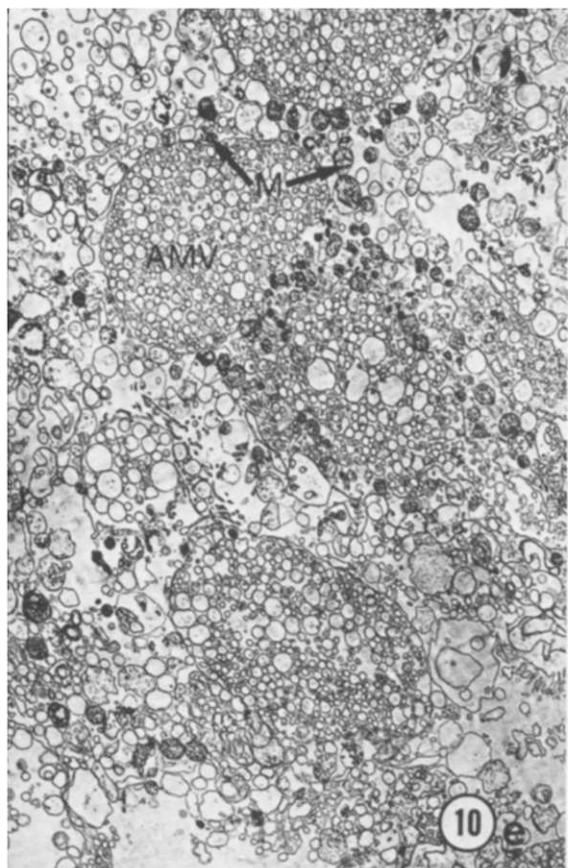
Fig. 8. Preparation of lateral plasma membranes. (a) Lateral membranes as they appear in the intact epithelium, showing the septate junctions (arrows) between adjacent membranes. The paired membranes are quite folded, and form several loops and branches. (b) A pure preparation of lateral membranes shown at low magnification to demonstrate the homogeneity of the pellet. Adjacent membranes remain joined together throughout the isolation procedure. They do not form vesicles, but remain as loosely folded sheets, giving them a rope-like appearance in cross section. (c) Folds of isolated lateral membranes shown at higher magnification to demonstrate the septate junctions (arrows and inset) still present between adjacent membranes. (a) $\times 72,000$; (b) $\times 4600$; (c) $\times 64,000$; inset, $\times 113,000$.

Fig. 9. Preparation of columnar cell apical membrane. (a) The CCAM as it appears in an electron micrograph of the intact epithelium, showing individual microvilli. Because microvilli are long narrow filaments which tend to curve in different directions, the plane of section rarely passes through their entire length, and many show a circular or oval profile where they have been cut in cross section. (b) A portion of the stage I (intact) epithelium from Fig. 3 shown at higher magnification. MV, microvilli; CC, columnar cell; GC, goblet cavity; NG, nucleus of goblet cell; AMP, projections of GCAM. (c) A portion of the stage II epithelium from Fig. 3, shown at higher magnification. Brief sonication has removed some of the microvilli (arrows). (d) A portion of the P_3 pellet of pure CCAM, shown at the same magnification used for (a) to facilitate comparison between intact and isolated CCAM; the preparation is homogeneous and lacks mitochondrial and other contamination. In the pellet the microvilli have a random orientation, with the result that some have been sectioned longitudinally and appear as long narrow filaments, while others have been sectioned obliquely or transversely and have an oval or circular profile. During the isolation procedure the tips of the microvilli frequently become swollen (arrows), and in cross section appear as large irregularly shaped vesicles (asterisks). (a, d) $\times 2400$; (b, c) $\times 400$.









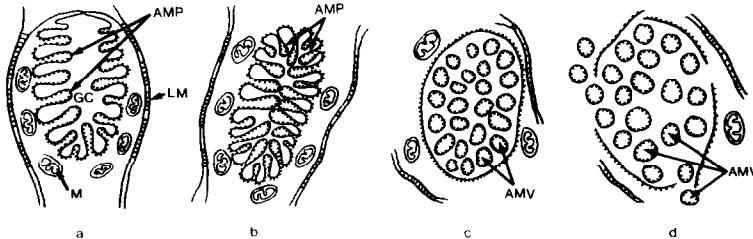


Fig. 11. Diagrammatic representation of the ultrastructural changes observed during isolation of the GCAM and shown in Fig. 10. (a) The GCAM in the intact tissue (cf. Fig. 10a). The isolated GCAM as it appears in the 250 g pellet P_1 (cf. Fig. 10d). The cavity is collapsed, but the GCAM is more or less intact and mitochondria and fragments of LM remain attached to it. The GCAM projections are still obvious. (c) The GCAM collected after density gradient centrifugation (cf. Fig. 10e, f). The apical membrane projections have pinched off to form vesicles surrounded by an outer limiting membrane to which mitochondria and LM fragments remain attached. (d) Brief sonication is used to rupture the outer membrane and release the vesicles. GC, goblet cavity; AMP, apical membrane projections; M, mitochondrion; AMV, apical membrane vesicles.

Sonication of intact tissue pieces was used to strip away as much of the CCAM as possible, while leaving the invaginated, and therefore protected, GCAM intact. With removal of the CCAM, much of the columnar

cell apical cytoplasm was also lost, leaving the GCAM exposed, and often protruding from the surface of the tissue piece (Fig. 10b). The CCAM and other material present in suspension were removed by thorough washing of

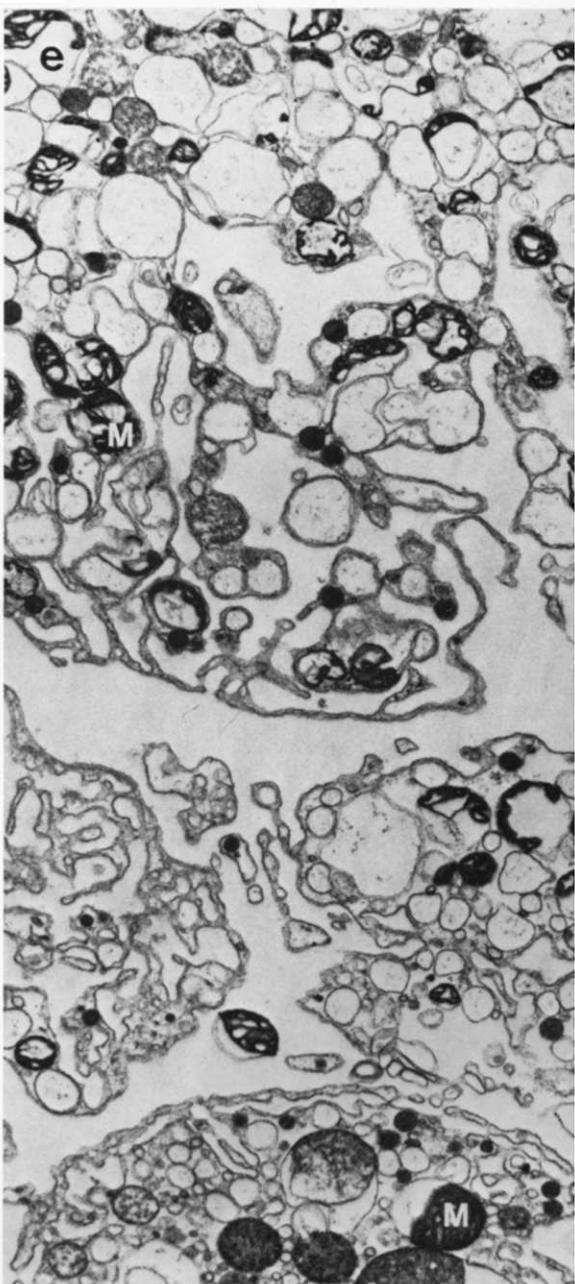
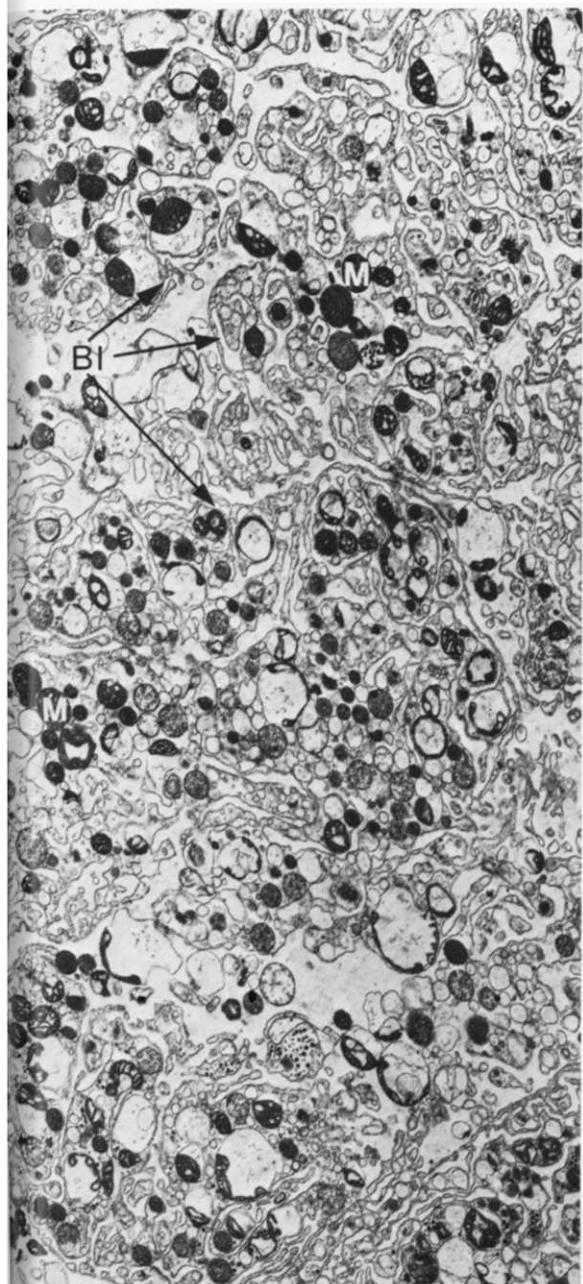
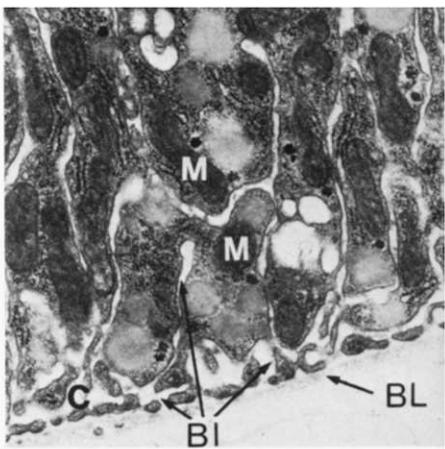
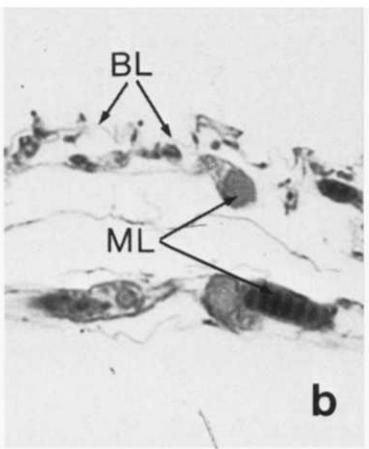
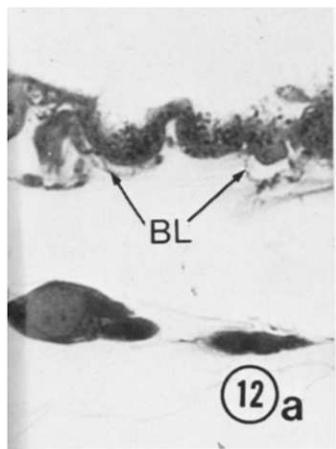
Fig. 10. Preparation of goblet cell apical membrane. (a) The GCAM as it appears in an electron micrograph of the intact epithelium. The projections (AMP) of the invaginated GCAM line the inside of the cavity, and the thin layer of cytoplasm surrounding the cavity is filled with mitochondria (M). Large arrows indicate the lateral membranes which form the boundary between the goblet cell and adjacent columnar cells. (b) A portion of the stage III epithelium from Fig. 3 shown at higher magnification. Sonication has removed the microvilli and much of the apical cytoplasm of the columnar cells (CC), leaving the GCAM exposed. The goblet cavity has collapsed and is almost completely filled by the projections (AMP) of the GCAM. (c) A portion of the stage IV epithelium from Fig. 3 shown at higher magnification. The GCAM has now been broken off, leaving only the basal portion of both goblet and columnar cells still attached. The portasomes (P) which characterize GCAM can be seen on the inner surface of the isolated GCAM has been collected. The GCAM tends to break off from the stage III epithelium in one intact piece (see Fig. 11b), and although the cavity is no longer present the GCAM projections (AMP) are still obvious and closely resemble those seen in the intact cell (a). Mitochondria (M) and fragments of lateral membrane (LM) remain attached to the outside of the isolated GCAM. Other contaminants in the P_1 pellet include nuclei (N) and large fragments of CCAM which can be seen as clusters of microvilli (MV). (e, f) GCAM purified by density gradient centrifugation of P_1 shown at low (e) and high (f) magnification. The apical membrane projections shown in (d) have pinched off to form numerous small vesicles (AMV) enclosed within one large one (see Fig. 11c), to which mitochondria (M) and fragments of LM are still attached. The portasomes (P) which characterize GCAM can be seen on the inner surface of the vesicles and on the outer surface of the surrounding membrane (see Fig. 11c). This organization can be seen more clearly in the inset, which shows the area indicated by the large arrow at higher magnification. (g, h) A portion of the pellet P_3 , which is a pure preparation of GCAM vesicles, shown at low (g) and high (h) magnification. The vesicle indicated by the large arrow is shown at still higher magnification in the inset, to demonstrate the portasomes (P) present on the inner surface of the vesicle. Brief sonication of the material shown in Figs. e and f released the GCAM vesicles from the outer limiting membrane (see Fig. 11d). The vesicles were then purified by differential centrifugation. (a) $\times 2200$; (b, c) $\times 400$; (d) $\times 3100$; (e, g) $\times 2700$; (f, h) $\times 32,000$; insets, $\times 80,000$.

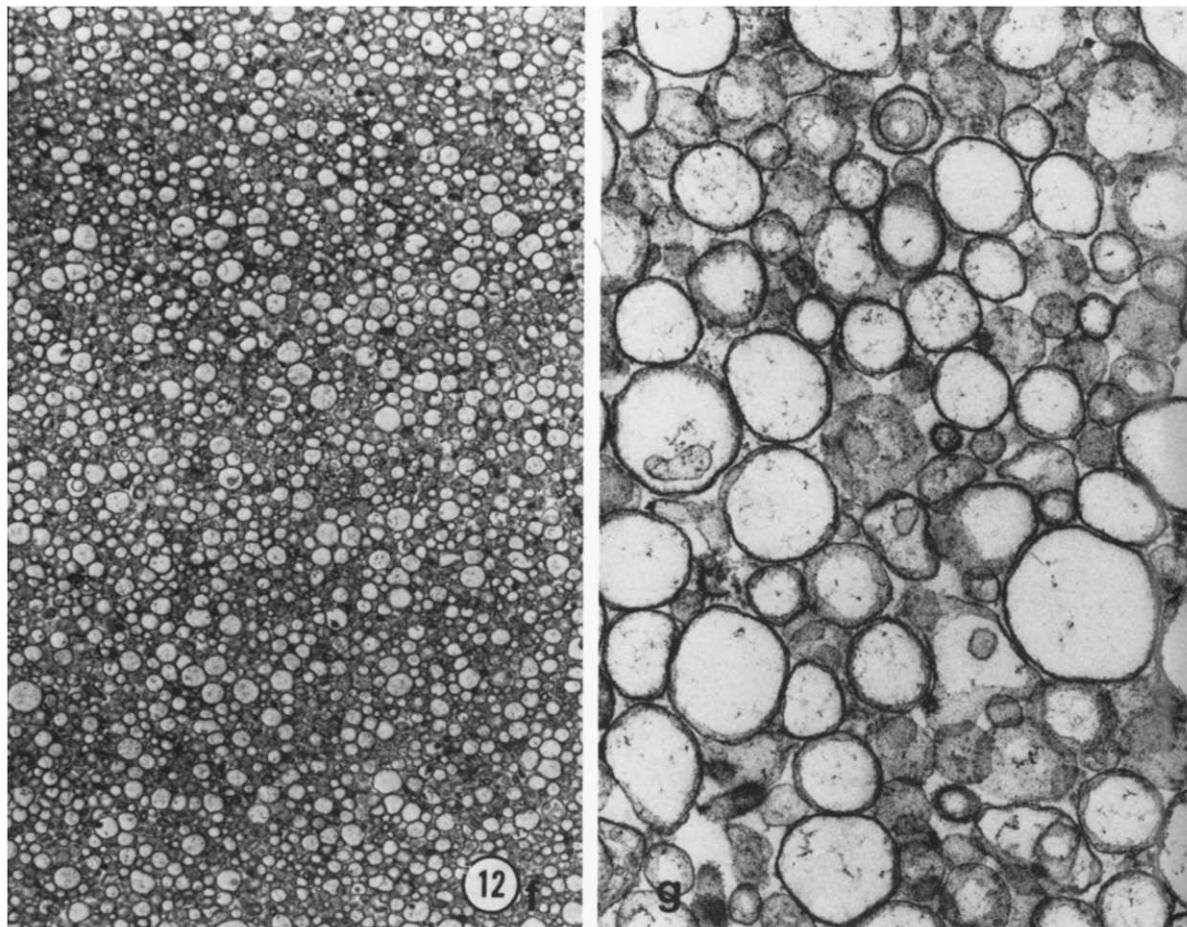
the tissue pieces. The GCAM, usually still associated with its mitochondria and fragments of lateral membrane, was then broken off in a more or less intact condition by gently drawing the tissue in and out of a Pasteur pipet, leaving behind the basal parts of the cells (Fig. 10c) which could be removed by filtration through gauze. The intact GCAMs were then recovered from the filtrate by a brief 250 g centrifugation (P_1 in Fig. 6). At such low speed, the main contaminants were columnar cell nuclei, and any CCAM not completely removed by sonication, although as a result of the more gentle procedure of pipetting, these now appeared as large clusters of microvilli rather than isolated segments. A portion of the 250 g pellet (P_1) in which all of these components can be recognized is shown in Fig. 10d, and for comparison the fine structure of the GCAM in the intact epithelium is also shown (Fig. 10a).

It was mentioned in the Methods section that the 250 g centrifugation had to be accomplished as quickly as possible; the reason is that once the GCAM is exposed there seems to be a tendency for free mitochondria to associate with this membrane, not only increasing contamination, but apparently decreasing its specific gravity, so that any delay at this stage reduces the amount of material which can be pelleted at 250 g.

Density gradient centrifugation of the 250 g pellet (P_1) produced three bands; an upper band (B_1) containing fragments of lateral membrane plus numerous vesicles, most of which could not be positively identified, a middle band (B_2) containing GCAM and a lower band (B_3) enriched in CCAM. The nuclei present in P_1 were never recovered, even from the debris at the bottom of the tube, and probably had disintegrated completely. An interesting change in the organization of the GCAM also occurred during its passage through the gradient. The folds of the membrane which normally project into the goblet cavity had pinched off to form numerous small vesicles, while the rest of the membrane had become sealed off forming a large sac enclosing these vesicles (Figs. 10e, f, 11c). The mitochondria and lateral membrane fragments originally associated with the GCAM were still present, attached to the outer surface of the membrane forming the sac. A brief burst of ultrasound was sufficient to rupture this membrane and release the small vesicles enclosed by it (Fig. 11d). The large membrane fragments with their attached mitochondria were pelleted by centrifugation at 10,000 g together with any unbroken GCAMs. The small GCAM vesicles present in the supernatant could then be collected by centrifugation at 30,000 g. A portion of this pellet (P_3 in Fig. 6) is shown in Figs. 10g and

Fig. 12. Preparation of basal membranes. (a) A portion of the stage V epithelium from Fig. 3, shown at higher magnification. Only the basal portions of the cells remain attached to the basal lamina (BL). (b) A portion of the stage VI epithelium from Fig. 3, shown at higher magnification. The basal part of the cells has been completely stripped off, leaving only the basal lamina and underlying muscle layer (ML). (c) The basal region of a columnar cell, as it appears in an electron micrograph of the intact epithelium. The basal cytoplasm contains numerous mitochondria (M), which are closely associated with the infoldings (BI) of the basal plasma membrane. The basal lamina (BL) can be seen as an amorphous layer beneath the basal membrane. (d, e) A portion of the P_1 pellet, in which the basal parts of the epithelial cells have been collected, after being stripped away from the basal lamina. At both low (d) and high (e) magnification the basal infoldings (BI) and their associated mitochondria (M) can be clearly seen, and the organization of the isolated basal plasma membrane closely resembles that of the intact cell (cf. c and e). (f, g) A portion of the pellet P_4 , which is a pure preparation of basal plasma membrane shown at low (f) and high (g) magnification. Sonication of the material shown in (d) and (e) converted the large membrane fragments into small vesicles, which were then separated from their associated mitochondria and other contaminants by differential centrifugation. (a, b) $\times 500$; (c, e) $\times 19,000$; (d) $\times 5200$; (f) $\times 6400$; (g) $\times 43,000$.





h. It consisted entirely of small GCAM vesicles mostly orientated with their portosomes on the inside, and according to both EM observations and SDH analysis (Table 1) was entirely free of mitochondria.

Basal membranes

Stages in the preparation of basal membranes are shown in Fig. 12. The stage V tissue pieces (Fig. 12a) were washed carefully to remove all other membrane fragments present in suspension, leaving only the basal portion of the cells still attached to the basal lamina. Gentle pipetting released the remains of the cells into suspension, and filtration through gauze removed the stage

VI pieces which consisted of the basal lamina and muscle layer (Fig. 12b). Centrifugation of the filtrate at 5000 g gave a pellet (P_1 in Fig. 7) which consisted of a lower layer of large fragments of basal membrane with their associated mitochondria and other cell organelles (Fig. 12d, e), plus an upper layer of free mitochondria. EM examination of the pellet obtained by centrifuging the supernatant (S_1) at 100,000 g revealed that free mitochondria were also present in S_1 together with lighter contaminants such as rough endoplasmic reticulum and glycogen granules. Comparison of Figs. 12c and e shows the close resemblance between the isolated membrane fragments (Fig. 12e) and the basal

part of the intact cell (Fig. 12c), confirming that P_1 was composed of basal plasma membrane. Sonication of P_1 converted the membrane into small vesicles, and released the mitochondria and other organelles. The mitochondria were removed by centrifuging at 10,000 g, together with any large BM fragments not broken by sonication. The BM vesicles were then collected by centrifugation at 30,000 g (P_4), leaving the lighter contaminants such as endoplasmic reticulum in the supernatant. Analysis of SDH activity (Table 1) confirms that all mitochondria are removed at 10,000 g, and that the preparation of basal membrane, shown in Figs. 12f and g, is free of mitochondrial contamination.

Discussion

The tissue fractionation procedures we have described in this paper are somewhat unconventional, but they have enabled us simply and reproducibly to separate apical, lateral and basal plasma membrane from epithelial cells, and this has never been done by conventional techniques.

The isolation of lateral membranes was mostly serendipitous, and this was the first pure fraction we obtained when we began this study using published procedures. We attempted to separate whole tissue homogenates on sucrose gradients, and at the position where we expected to find the plasma membranes (Aronson and Touster, 1974) there was a band in which goblet cell apical membrane and basal membranes had become concentrated. However, EM examination of the other bands on the gradient revealed that the first band was an almost pure preparation of lateral membranes. The isolation of lateral membranes free of basal membrane is possible with insect cells because of the septate junctions characteristic of insect epithelia (Satir and Gilula, 1973; Noirot-Timothée and Noirot, 1980). Vertebrate epithelial cells are joined only at their apical surface, so that when the tissue is homogenized the plasma membrane tends to break into apical and basolateral fragments. In contrast, the septate junctions of insect cells extend over long segments of adjacent lateral membranes, and appear to be very resistant to mechanical and osmotic disruption, remaining intact during homogenization and causing the plasma membrane to

split into distinct apical, lateral and basal fragments.

The presence of lateral membranes in a separate band so near the top of the gradient perhaps reflects an unusually high lipid to protein ratio, or some other difference in composition which distinguishes them from other parts of the plasma membrane. The mixture of GCAM and BM in the second band of the gradient could probably have been separated using special techniques such as free-flow electrophoresis (Heidrich *et al.*, 1972), but all our attempts at separation by more commonly available means were unsuccessful. For this reason we were forced to try using other methods of tissue disruption, one of which was ultrasound. When we first subjected an intact piece of midgut, suspended in buffered sucrose solution, to ultrasound we noticed that the solution became turbid while the piece of tissue appeared intact to the unaided eye. Light microscopic examination revealed that the more exposed parts of the tissue, nearest the luminal surface, had been broken down while cells deep within the folds of the epithelium were completely untouched. For this reason we devised the dissection which opened out the folds of the epithelium so that all the cells were uniformly exposed. We then found that when the tissue pieces produced by this dissection were subjected to ultrasound, the basal lamina and muscle layers provided enough stability that the apical surface of the cells could be disrupted while the basal part of the cells remained intact. This observation provided the basis for our experimental procedures to separate CCAM, GCAM and BM. The techniques were successful because in each case the portion of the plasma membrane which we were attempting to isolate was essentially the *only* one present in suspension. With CCAM, only the microvilli are suspended by sonication, whereas the basal membranes are not suspended until all other parts of the plasma membrane have been washed away. Furthermore, by limiting the extent of cell damage during each stage in tissue disruption the fine structure of the plasma membrane was preserved, making it easy to distinguish different parts of the membrane by EM. This preservation of fine structure was essential since there are no established enzyme markers for different parts of the plasma

membrane of insect midgut cells. In the case of CCAM, our technique is reminiscent of that of Miller and Crane (1961), who used a glass microscope slide to scrape the brush border off vertebrate epithelial cells, and succeeded in obtaining a pure preparation of apical membrane. For isolation of different parts of the plasma membrane, this approach is obviously more reliable than the methods based on separating membrane fragments from a crude nuclear or microsomal fraction (Aronson and Touster, 1974), especially when no enzyme markers are available to detect contamination. In a recent study on Lepidopteran midgut (Hanozet *et al.*, 1980) an attempt was made to isolate CCAM following homogenization of the intact tissue. Although the final preparation was enriched in alkaline phosphatase and sucrose, which are characteristic of brush border in vertebrate tissues, contamination by other parts of the plasma membrane could not be ruled out.

Even with the use of ultrasound to disrupt the tissue, which enabled us to extract GCAM free of BM, the final purification of GCAM proved to be relatively difficult. Making use of our experience with density gradient centrifugation for the purification of lateral membranes, we readily obtained a band in which GCAM constituted the only part of the plasma membrane. However, the procedure was complicated by the fact that it was unusually difficult to isolate the membrane free of mitochondria, and this could prove to be an interesting phenomenon. The GCAM is a transporting membrane with a high energy requirement (Wolfersberger *et al.*, 1982), and the strong association between this membrane and mitochondria suggests that the GCAM may have some special mechanism for attracting mitochondria. In other epithelia mitochondria are frequently associated with the transporting membrane (see Harvey, 1980), and in some cases have even been observed to move into and out of contact with the transporting membrane as transport is stimulated or turned off (Ryerse, 1977; Bradley and Satir, 1981).

Although we were able to separate the apical membrane from both goblet and columnar cells, the technique does not allow a similar separation of basal membrane from each cell type. However, in *M. sexta* midgut the columnar cells are more numerous than

the goblet cells, and in posterior midgut the morphology of the goblet cell is such that its basal membrane occupies a smaller area than that of a columnar cell (see Fig. 1 and Cioffi, 1979). In addition, the basal membrane infoldings of the columnar cells are considerably more elaborate than those of the goblet cell, so that the final BM preparation is richer in columnar cell basal membrane than in goblet cell basal membrane.

The tissue fractionation procedures described in this paper were developed specifically for the midgut of *M. sexta*, and caution should always be used when attempting to apply methods developed for one tissue to another. Even repetition of these methods for *M. sexta* would require each new worker to individually establish the ideal experimental conditions by using microscopy to follow each step in the isolation procedure. In the same way, we believe that the general principles described here could readily be modified for use on other epithelia. The procedure for isolation of lateral membranes is obviously suitable only for invertebrate epithelia in which septate junctions are present. However, ultrasound could be used to separate parts of the plasma membrane of both vertebrate and invertebrate epithelia. The technique is ideally suited to a simple epithelium which is supported by an underlying connective tissue or muscle layer, but it could also perhaps be used to successively strip layers of cells from a multilayered epithelium such as the frog skin.

The isolation of plasma membranes is important not only in the study of their properties such as composition and biochemistry, but can also lead to a better understanding of the physiology of the epithelium as a whole. For example, in the case of *M. sexta* midgut, the isolated GCAM vesicles are suitable for a study of potassium transport in a cell-free system, while the lateral membranes provide an excellent preparation from which to examine the properties of septate junctions and their role in cell adhesion and tissue permeability.

Acknowledgement

Our special thanks go to Dr W. R. Harvey for his many helpful suggestions and discussions during both the course of this study and the preparation of the manuscript. We would

also like to thank Dr S. T. Takats for allowing us to use his sonifier and high-speed centrifuge, and Dr J. A. T. Dow for his critical reading of the manuscript. This research was supported in part by a research grant (AI-09503) from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, U.S. Public Health Service.

References

- Ackrell, B., Kearney, E. and Singer, T. 1978. Mammalian succinate dehydrogenase. In *Methods in Enzymology* (eds. S. Fleischer and L. Packer), Vol. 53, pp. 466–483. Academic Press, New York.
- Aronson, N. and Touster, O. 1974. Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. In *Methods in Enzymology* (eds. S. Fleischer and L. Packer), Vol. 31A, pp. 90–102. Academic Press, New York.
- Berridge, M. J. and Oschman, J. L. 1972. *Transporting Epithelia*. Academic Press, New York.
- Bradley, T. J. and Satir, P. 1981. 5-Hydroxytryptamine-stimulated mitochondrial movement and microvillar growth in the lower Malpighian tubule of the insect, *Rhodnius prolixus*. *J. Cell Sci.*, **49**, 139–161.
- Burges, H. D. (ed.) 1981. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. Academic Press, New York.
- Cioffi, M. 1979. The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue & Cell*, **11**, 467–479.
- Cioffi, M. and Harvey, W. R. 1980. Comparison of potassium transport in three structurally distinct regions of the insect midgut. *J. exp. Biol.*, **91**, 103–116.
- deDuve, C. 1971. Tissue fractionation past and present. *J. Cell Biol.*, **50**, 20D–55D.
- Emmelot, P., Bos, C., van Hoeven, R. and van Blitterswijk, W. 1974. Isolation of plasma membranes from rat and mouse livers and hepatomas. In *Methods in Enzymology* (eds. S. Fleischer and L. Packer), Vol. 31A, pp. 75–90. Academic Press, New York.
- Hanozet, G. M., Giordana, B. and Sacchi, V. F. 1980. K⁺-dependent phenylalanine uptake in membrane vesicles isolated from the midgut of *Philosamia cynthia* larvae. *Biochim. biophys. Acta*, **596**, 481–486.
- Harvey, W. R. 1980. Water and ions in the gut. In *Insect Biology in the Future* (eds. M. Locke and D. S. Smith), pp. 105–124. Academic Press, New York.
- Harvey, W. R. 1982. Membrane physiology of insects. In *Membrane Physiology of Invertebrates* (ed. R. Podesta), pp. 495–566. Marcel Dekker, New York.
- Heidrich, H., Kinne, R., Kinne-Saffran, E. and Hannig, K. 1972. The polarity of the proximal tubule cells in rat kidney. *J. Cell Biol.*, **54**, 232–245.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **27**, 137A.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 263–275.
- Miller, D. and Crane, R. K. 1961. The digestive function of the epithelium of the small intestine. *Biochim. biophys. Acta*, **52**, 293–298.
- Noirot-Timothee, C. and Noirot, C. 1980. Septate and scalariform junctions in arthropods. *Int. Rev. Cytol.*, **63**, 97–140.
- Ryerse, J. S. 1977. Control of mitochondrial movement during development of insect Malpighian tubules. *Proc. Microsc. Soc. Can.*, **4**, 48–49.
- Satir, P. and Gilula, N. B. 1973. The fine structure of membranes and intercellular communication in insects. *Ann. Rev. Ent.*, **18**, 143–166.
- Venable, J. H. and Coggeshall, U. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **25**, 407.
- Wolfersberger, M. G., Harvey, W. R. and Cioffi, M. 1982. Transepithelial potassium ion transport in insect midgut by an electrogenic alkali metal ion pump. In *Current Topics in Membranes and Transport* (eds. A. Kleinzeller and F. Bronner), pp. 109–133. Academic Press, New York.