

## ACTIVITATEA ANTIOXIDANT A *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* LA DIFERITE ETAPE ALE CICLULUI VITAL ÎN PREZEN A COMPU ILOR COORDINATIVI AI Co CU BAZELE SCHIFF

Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Chiriac T., Ghelbet V., Iacob Iu., \*Coropceanu E., Pisarenco M., Rudic V

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

\*Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei

### Rezumat

Sunt expuse rezultatele i analiza modific rii nivelului de productivitate i activitate antioxidant a microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* la diferite etape ale ciclului vital la ac iunea unor compu i coordinativi ai Co cu bazele Schiff. Fiecare etap de cre tere i dezvoltare a hematococului are specificul s u al activit ii biosintetice, i respectiv formeaz un r spuns individual la ac iunea compu ilor coordinativi introdu i în mediul de cultivare. Acest r spuns individual este determinat de productivitatea microalgal , con inutul de carotenoizi, precum i de activitatea antioxidant a extractelor etanolice specifice tipului corespunz tor de biomas .

*Cuvinte-cheie:* microalga verde biflagelat *Haematococcus pluvialis* – compu i coordinativi ai cobaltului cu bazele Schiff – productivitatea – activitatea antioxidant .

Depus la redacție 20 mai 2013

-----  
*Adresa pentru corespondență:* Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chi in u, Republica Moldova; e-mail:ludmila\_rudi@gmail.com; tel.: (+37322) 72 53 06

### Introducere

În prezent tot mai multe cercet ri vin s confirme utilitatea mediului acvatic în producerea materiei prime pentru ob inerea antioxidantilor naturali [2,3]. În ultimii ani, tot mai intens, în calitate de surse de antioxidan i, sunt valorificate microalgele i cianobacteriile – purt tori ai unor complexe antioxidative cu o activitate net superioar , care a determinat supravie uirea i evolu ia lor [2].

*Haematococcus pluvialis* este considerat drept unul din pu inele obiecte ficobiotehnologice care, prin integritatea biomasei, constituie un poten ial antioxidant puternic, datorat, în special prezen ei pe prim loc în compozi ia sa a astaxantinei - pigment carotenoid cu cea mai înalt activitate antioxidant , drept surs principal a c ruia microalga este în prezent explorat pe scar industrial [4-6,9,11].

Pe parcursul cre terii i acumului rii de biomas microalgal , *Haematococcus pluvialis* trece prin dou faze de dezvoltare: mobil (celule verzi biflagelate) i sta ionar (cisti, bruni i ro ii), pe durata c rora se înregistreaz modific ri esen iale atât morfologice, precum i biochimice. De asemenea, i componentele antioxidante ale biomasei de *Haematococcus pluvialis* sunt supuse unor modific ri cantitative i func ionale.

Printre factorii importan i care influen eaz cre terea i dezvoltarea microalgei, dar i acumularea în masa celular de hematococ a complexelor cu activitate antioxidant sunt condi iile i parametrii de cultivare i diver ii stimulatori. Pe post de stimulatori se num r i compu ii coordinativi ai unor metale care au proprietatea de a se integra activ în activitatea biosintetic a microalgelor [13]. S-a demonstrat, de asemenea, c compu ii

coordinativi se implic indirect în activitatea biosintetic a algelor prin mecanismele de recuperare vital în rezultatul unui stres oxidativ indus. Mecanismele acestui fenomen sunt foarte variate i decurg cu acumularea de specii reactive de oxigen. Microalgele, ca organisme eucariote, au dezvoltat mecanisme de adaptare i reac ioneaz în mod diferit la toxicitatea mediului. A a cum compu ii coordinativi ac ioneaz , evident, diferit de s rurile anorganice, se creeaz posibilitatea urm ririi în evolu ie a mecanismelor de protec ie antioxidant a celulei [14].

Cobaltul este unul din elementele esen iale, cantit ile mici ale c ruia sunt strict necesare pentru cre terea i dezvoltarea normal a organismului. Studiile cu implicarea compu ilor cobaltului sunt consacrate stabilirii mecanismelor prin care organismele fotosintetizatoare reu esc s fac fa stresului provocat de toxicitatea ionilor acestui metal [8]. Excesul de cobalt în mediul de cre tere induce un puternic stres oxidativ [15]. Expunerea de durat a culturilor microalgale ac iunii concentra iilor înalte de cobalt duce la o diminuare a sensibilit ii lor fa de metal, ceea ce provoac acumularea lui în biomas cu transferarea ulterioar în lan urile trofice de la verig la verig [15].

**Scopul** cercet rilor expuse a fost de a stabili i supune analizei modificarea nivelului de productivitate i activitate antioxidant a microalgei verzi biflagelate *Haematococcus pluvialis* la diferite etape ale ciclului vital la ac iunea unor compu i coordinativi ai Co cu bazele Schiff.

#### **Materiale i metode**

Obiect al cercet rilor a servit tulpina algei verzi *Haematococcus pluvialis* CNM-AV-05, depozitat în Colec ia Na ional de Microorganisme Nepatogene. Tulpina s-a cultivat timp de 10 zile pe mediul mineral lichid RD la temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 6,8 - 7,0 i intensitatea optim a luminii de 2500-3500 lx. [3].

În cercetare s-au utilizat compu ii coordinativi ai Co cu bazele Schiff, sintetiza i în laboratorul Compu i coordinativi al Institutului de Chimie i care au fost adăyga i în mediul nutritiv specific în concentra ia de 10mg/l.

Productivitatea hematococului s-a determinat fotometric cu recalculul masei celulare în g/l biomas absolut uscat [12]. Biomasă constituit din celulele verzi mobile s-a colectat la a 3-a zi, iar biomasă de ci tii bruni – la a 10-a zi a ciclului vital.

Ci i i s-au distrus prin macerare în mojar. Au fost ob i nute extracte etanolice de 96%. Raportul biomas /etanol a fost de 1/10. Mixul s-a agitat timp de 60 min pe un agitator orbital cu viteza de 300 rota ii/min i centrifugat 5 min la 2000 g.

Activitatea antioxidant a extractelor etanolice ob inute din hematococ s-a determinat prin metoda reducerii radicalilor DPPH [1] i ABTS [10].

Con inutul carotenoizilor s-a comparat dup valorile absorban ei, utilizând expresia procentual de % martor.

Toate seriile i testele experimentale s-au realizat în 3 repet ri. Analiza statistic a rezultatelor ob inute s-a efectuat utilizând metodologia descris de Maru teri S.D.(2006) [7].

#### **Rezultate i discu ii**

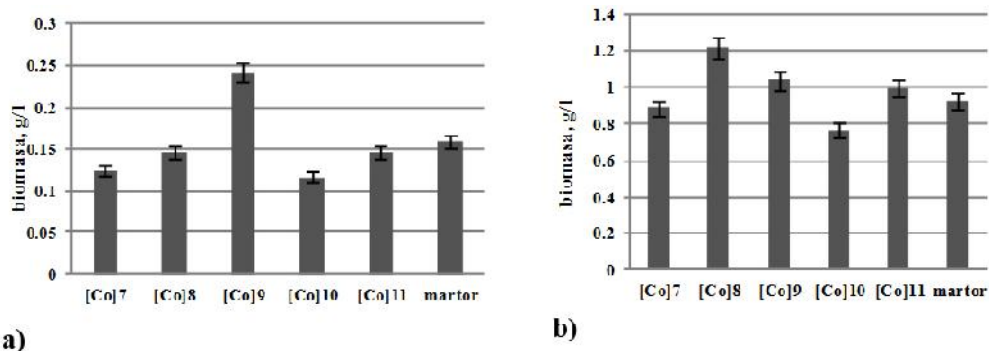
Pornind de la faptul, c cobaltul în concentra ii mici este un element esen ial pentru organismele fotosintetizatoare, iar concentra iile mari ale metalului manifest efecte metabolice vizibile, s-a studiat influen a unor compu i coordinativi ai cobaltului asupra productivit ii i modific rii activit ii antioxidante în cultura *Haematococcus*

*pluvialis*.

Pentru a stabili reac ia de r spus a hematococului (productivitatea i nivelul de activitate antioxidant a componentelor etanolosolubile) la ac iunea unor compu i coordinativi ai cobaltului, studiului experimental a fost supus microalga la diferite faze de cre tere.

Rezultatele ob inute demonstreaz caracterul diferit al ac iunii compu ilor coordina-tivi ai cobaltului cu bazele Schiff - [Co Schiff] asupra productivit ii hematococului în fazele ciclului vital: mobil - celulele verzi, i cea de ci ti bruni (fig. 1, a). Astfel, la faza mobil a ciclului de dezvoltare – celulele verzi, 4 dintre cei 5 compu i studia i s-au manifestat ca inhibitori ai procesului de cre tere i dezvoltare, intensitatea efec-tului de diminuare a procesului de acumulare a masei celulare verzi crescând în irul: [Co Schiff]8 < [Co Schiff]11 < [Co Schiff]7 < [Co Schiff]10, men ionând totodat , c în expresie procentual , productivitatea a sc zut în mediu cu 10-28% ( $p < 0,05$ ), fa de proba martor. Excep ie prezint compusul [Co Schiff]9, care, contrar primilor 4 compu i investiga i, a demonstrat un efect de stimulare asupra productivit ii hemato-cocului la faza de celule mobile verzi, biomasa celular verde constituind cu 50% ( $p < 0,05$ ) mai mult decât masa celular verde a probei martor.

i pentru faza de ci ti bruni cre terea nivelului biomasei acumulate s-a produs doar la cultivarea hematococului în prezen a unui singur compus coordinativ dintre cei selecta i pentru investiga ii - [Co Schiff]8 (fig.1, b). În cazul dat, valoarea productivit ii este de 1,22 g/l ci ti bruni, ceea ce este cu 31% mai mult ( $p < 0,05$ ) decât în proba mar-tor. Trei dintre compu ii coordinativi ai cobaltului - [Co Schiff]7, [Co Schiff]9 i [Co Schiff]11, au modificat neesen ial caracterul productivit ii, acumularea de biomas fiind la nivelul probei martor, pe când compusul [Co Schiff]10 a redus productivitatea hematococului cu 21%,  $p < 0,05$ .



**Figura 1. Productivitatea *Haematococcus pluvialis* la cultivare în prezen a compu ilor coordinativi ai Co cu bazele Schiff (a – faza celule verzi mobile; b – faza ci ti bruni).**

Astfel, se poate rezuma, c compusul coordinativ [Co Schiff]10 se manifest ca inhibitor al cre terii i dezvolt rii microalgei, dat fiind c inhib productivitatea atât la faza mobil , cât i în faza de ci ti bruni. Compusul [Co Schiff]11 este un compus inert, deoarece nu modific semnificativ productivitatea microalgei, valoarea ei fiind similar valorii productivit ii hematococului în proba martor, tablou caracteristic ambelor etape ale ciclului vital. Pentru compu ii [Co Schiff]7, [Co Schiff]8 i [Co Schiff]9, diapazonul efectelor exercitate asupra nivelului productivit ii hematococului la cele dou etape de

dezvoltare este unul divers: de la inhibitor la inert i pân la stimulator. Astfel, efectul compusului [Co Schiff]7 a fost unul inhibitor la faza celulelor mobile verzi, care, pe parcursul dezvoltării a fost anihilat i într-un final, nivelul biomasei produse la etapa ci tilor bruni a fost readus la nivelul matorului. Efectul toxic manifestat de compus în cazul celulelor verzi, vulnerabile din punct de vedere structural, a fost neglijat deja de celulele închistate, peretele celular fiind o barier anti oc sigur , iar mecanismele de detoxifiere celulare au facut fa blocând componentele toxice acumulate anterior. Ac iunea compusului [Co Schiff]8 a fost una inert fa de productivitatea celulelor verzi, iar în faza de închistare a hematococului a stimulat acumularea de biomas , care a crescut cu 31%. În cazul dat, peretele celular al hematococului, prin complexitatea structurii sale, a favorizat prin mecanisme specifice p trunderea complexului în celul . Contrar compu ilor [Co Schiff]7 și [Co Schiff]8, compusul [Co Schiff]9 a stimulat creșterea productivității celulelor verzi mobile (cu 50%), iar în continuarea ciclului vital, nivelul de productivitate a ci tilor bruni a sc zut, atingând valori similare probei mator. Luând în considerare, cele expuse i analizate, doi compu i coordonativi dintre cei studia i pot fi clasa i ca stimulatori ai productivit ii microalgei *Haematococcus pluvialis*: [Co Schiff]8 i [Co Schiff]9.

În continuare a fost analizat activitatea antioxidant a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi mobile i a ci tilor bruni cu aplicarea a doi radicali nonbiologici: DPPH i ABTS – ace tea fiind considera i drept indicatori ai acumul rii de substan e antioxidante. Vom men iona, c sinteza componentelor antioxidante poate avea loc cel pu in în dou cazuri: 1) în cazul ob inerii unui efect stimulator, ca de exemplu stimularea biosintezei carotenului, tocoferolului, clorofilei .a. i 2) ca rezultat a reac iei de r spus la inducerea stresului oxidativ.

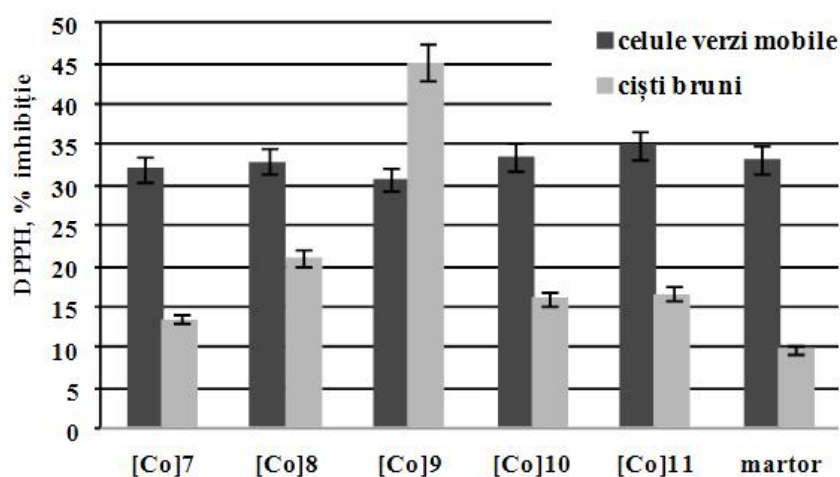


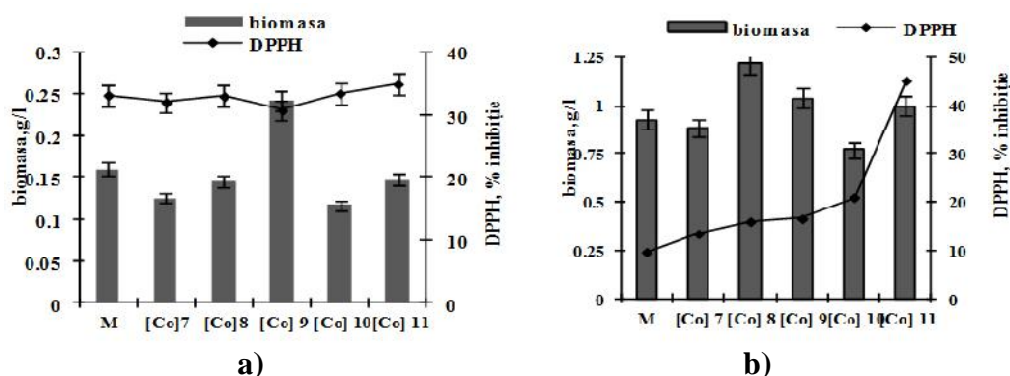
Figura 2. Activitatea antioxidant (DPPH, % inhibi ie) a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi i ci tilor bruni a *H. pluvialis*, la cultivarea în prezen a compu ilor coordonativi ai Co cu bazele Schiff .

Rezultatele testului DPPH sunt prezentate în figura 2 i demonstreaz oscila ii nesemnificative, în limitele probei mator pentru activitatea antioxidant a extractelor etanolice pe baz de mas celular verde de hematococ.

În toate cazurile experimentale, testul DPPH indic o cre tere a activit ii antioxidante a extractelor etanolice pe baz de ci ti bruni fa de proba martor. Astfel, în cazul aplic rii compusului [Co Schiff] 9 activitatea antioxidant a înregistrat cea mai înalt valoare de 45% inhibi ie DPPH, ceea ce dep e te valorile probei martor cu 390%.

Pentru a explica efectele exercitate de c tre compu ii coordinativi ai Co cu bazele Schiff investiga i, a fost analizat rela ia dintre acumularea biomasei i activitatea antioxidant (DPPH, % inhibi ie) a extractelor etanolice pe baz de mas celular verde i ci ti bruni de hematococ (fig.3).

Rezultatele analizei confirm lipsa efecului toxic al compu ilor coordinativi studia i la etapa celulelor verzi mobile ale ciclului de dezvoltare a microalgei, etap la care activitatea antioxidant a extractelor etanolice este practic la nivelul probei martor. Prin urmare, efectul de stimulare asupra productivit ii celulelor verzi mobile de c tre compusul [Co Schiff]9 este unul veridic stimulator, iar reducerea productivit ii determinat în cazul compu ilor [Co Schiff]7 i [Co Schiff]10 nu este rezultatul vre-unei interven ii toxice în cre terea i multiplicarea celulelor verzi de hematococ.



**Figura 3. Rela ia dintre productivitatea celulelor verzi mobile i a ci tilor bruni de *Haematococcus pluvialis* i activitatea antioxidant (DPPH, % inhibi ie) a extractelor etanolice din biomasa lor la cultivare în prezen a compu ilor Co cu bazele Schiff :** (a – biomasa celular verde i activitatea antioxidant a extractelor etanolice ob inute; b – biomasa ci tilor bruni i activitatea antioxidant a extractelor etanolice ob inute).

La urm toarea etap de dezvoltare a hematococului - faza ci tilor bruni, reducerea nivelului productivit ii în cazul compusului [Co Schiff] 10, este înso it de intensificarea activit ii antioxidante, ceea ce confirm instalarea efecului toxic al compusului prin inducerea stresului oxidativ în celulele hematococului i, drept rezultat, intensificarea proceselor de biosintez a substan elor antioxidante. În cazul compu ilor [Co Schiff]8 i [Co Schiff]9, cre terea activit ii antioxidante pe fondul unui spor al productivit ii este rezultatul intensific rii activit ii biosintetice ca urmare a efecului stimulator al acestor compu i. În cazul compusului [Co Schiff]11, la ac iunea c ruia activitatea antioxidant este net superioar , iar productivitatea este similar probei martor, explica ia autentic este stimularea activit ii biosintetice a hematococului în faza dat de cre tere de c tre compusul dat.

În extractele etanolice, ob inute din biomasa celulelor verzi i ci tilor bruni s-a determinat activitatea antioxidant i cu utilizarea radicalului ABTS, considerat, la fel, unul dintre cele mai demonstrative teste de apreciere a activit ii antioxidante (fig.4).

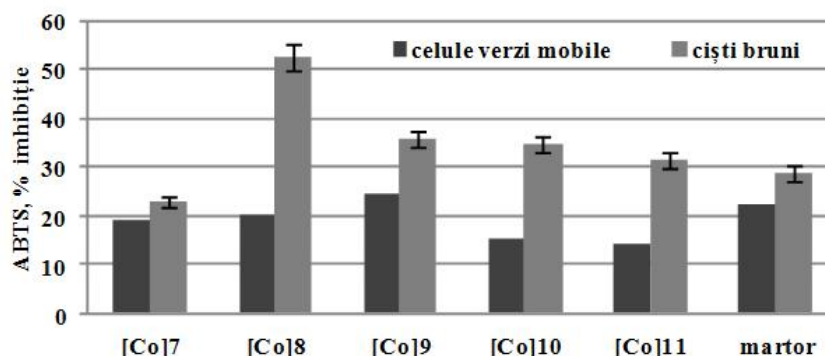


Figura 4. Activitatea antioxidant (ABTS, % inhibiție) a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi i ciștilor bruni a *Haematococcus pluvialis*, la cultivarea în prezența compușilor coordinați ai Co cu bazele Schiff.

Rezultatele testului ABTS pentru extractele etanolice din masa celular verde de hematococ demonstrează reducerea nesemnificativ a activității antioxidante în comparație cu proba martor în cazul aplicării compușilor cu excepția [Co Schiff]9.

Activitatea antioxidant, după rezultatele testului ABTS, a extractelor etanolice din biomasa ciștilor bruni și-a intensificat nivelul său la acțiunea compușilor testați. Nivelul cel mai înalt al activității antioxidante a componentelor solubile în etanol - cu 83% mai mare comparativ cu martorul ( $p < 0,05$ ), a fost atins în prezența compusului [Co Schiff]8.

Contra punerea rezultatelor productivității celulelor verzi mobile cu rezultatele activității antioxidante a extractelor etanolice din acest tip de biomasa de hematococ, cultivat în prezența compușilor coordinați ai Co cu bazele Schiff demonstrează o sensibilizare a culturii la etapa celulelor verzi mobile, ceea ce a determinat creșterea activității antioxidante față de proba martor (fig.5,a).

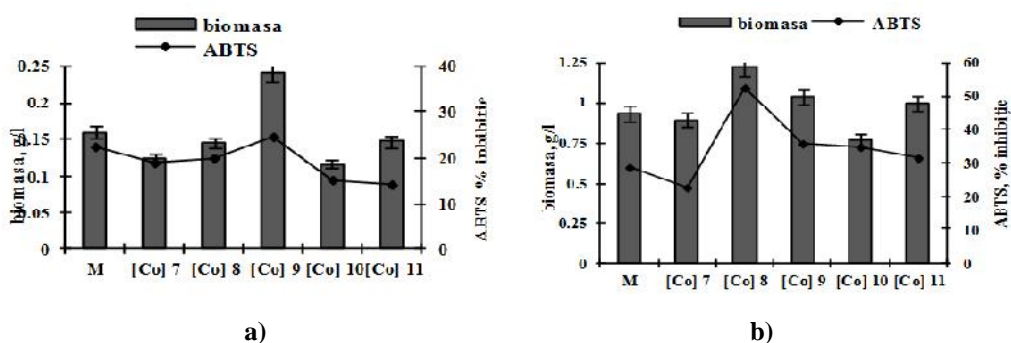


Figura 5. Relația dintre productivitatea celulelor verzi mobile și a ciștilor bruni de *Haematococcus pluvialis* și activitatea antioxidant (ABTS, % inhibiție) a extractelor etanolice din biomasa lor la cultivare în prezența compușilor coordinați ai Co cu bazele Schiff: (a) – biomasa celular verde și activitatea antioxidant a extractelor etanolice obținute; b) – biomasa ciștilor bruni și activitatea antioxidant a extractelor etanolice obținute).

Prin urmare, efectul de stimulare a productivității celulelor verzi mobile de către compusul [Co Schiff]9 este unul veridic, iar reducerea productivității determinată în

cazul compu ilor [Co Schiff]7 i [Co Schiff]10 poate constitui, atâ t rezultatul ac iunii lor toxice asupra celulelor verzi de hematococ, dar i rezultatul unui efect de stimulare a sintezei compu ilor biologic activi cu propriet i antioxidante.

Comparând rezultatele productivit ii ci tilor bruni cu rezultatele activit ii antioxidante a extractelor etanolice din tipul dat de biomas de hematococ, se poate presupune c reducerea productivit ii în cazul compusului [Co Schiff]10, îns o it de majorarea activit ii antioxidante este rezultatul efectului toxic al compusului, care a indus stresul oxidativ, i drept urmare - intensificarea proceselor de biosintez a complexelor antioxidante. Pentru experien ele cu compusul [Co Schiff]8, cre terea activit ii antioxidante pe fonul unui spor al productivit ii este rezultatul intensific rii activit ii biosintetice ca urmare a efectului stimulator al compu ilor. În cazul compusului [Co Schiff]11, în prezen a c ruia activitatea antioxidant i productivitatea prezint valori similare probei martor, explica ia cea mai probabil ar fi iner ia reac ionar a hematococului în faza dat de cre tere la prezen a în mediul de cultivare a acestui compus.

A a dar, pentru evaluarea activit ii componentelor antioxidante s-au utilizat dou metode de determinare a activit ii antioxidante, principiul c rora const în reducerea radicalilor nonbiologici prin mecanismele transferului de electron (ABTS) sau transfer de proton i electron (DPPH). Chiar dac mecanismele sunt asem n toare, rezultatele ob inute difer î ntre ele. Pentru extractele etanolice din biomas a celulelor verzi, rezultatele testului DPPH indic un efect inert antioxidant, cu mici varieri pentru experien ele cu compu ii coordinativi ai Co cu bazele Schiff. Rezultatele testului ABTS, cu toate oscil rile valorilor antioxidante ob inute, sunt cele care coreleaz cu productivitatea i prezint valori mai ridicate în probele suplimentate cu compu ii coordinativi investiga i (fig. 6,a).

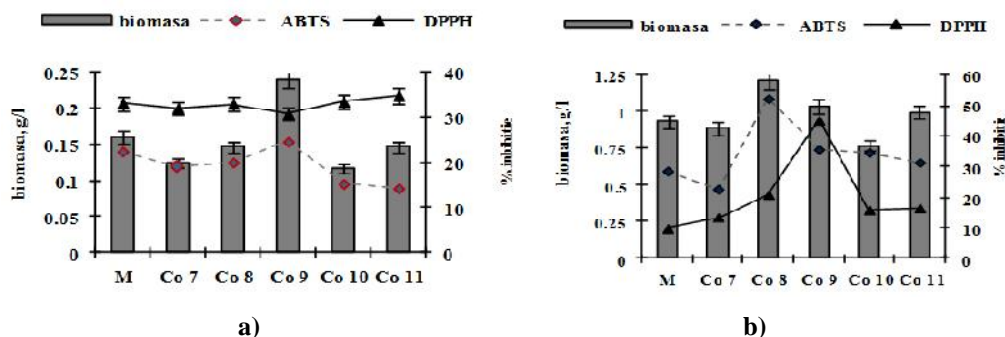


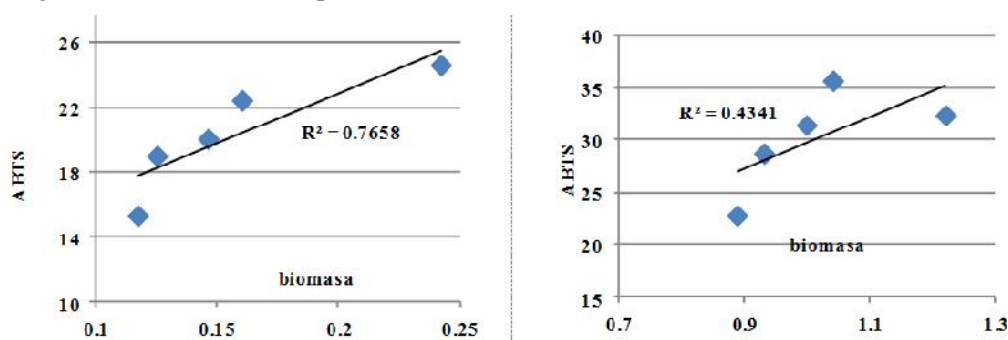
Fig. 6. Rela ia dintre productivitatea celulelor verzi mobile i a ci tilor bruni de *Haematococcus pluvialis* i activitatea antioxidant (DPPH i ABTS, % inhibi ie) a extractelor etanolice din biomas a lor la cultivare în prezen a compu ilor coordinativi ai Co cu bazele Schiff : a) – biomas a celular verde i activitatea antioxidant a extractelor etanolice ob inute; b) – biomas a ci tilor bruni i activitatea antioxidant a extractelor etanolice ob inute).

Analiza rela iei dintre productivitatea hematococului i activitatea antioxidant evaluat prin ambele teste pentru biomas a ci tilor bruni, confirm existen a unei divergen e î ntre rezultatele determin rii activit ii antioxidante prin testele ABTS i DPPH. Spre exemplu, rezultatele testului DPPH prezint valori superioare probei mar-

tor în toate cazurile experimentale, valoarea maximal înregistrându-se în varianta cu compusul [Co Schiff]9, pentru care productivitatea nu are îns , cele mai mari valori, dar care se men ine la nivelul martorului, pe când rezultatele testului ABTS înregistrează valori maximale pentru varianta cu compusul [Co Schiff]8 care a stimulat maximal i productivitatea. Cât despre stabilirea toxicit ii efectului manifestat, prin analiza rezultatelor testului ABTS, doar un singur compus - [Co Schiff]10, a redus cu mult productivitatea, reducerea fiind înso it de un spor a valorii antioxidante (fig. 6,b).

Rezumând asupra exemplelor expuse, se poate deduce, c un singur caz nu poate fi reprezentativ, i de aceea sunt necesare investiga ii suplimentare. Totu i, varierea valorilor testului ABTS care s-a înregistrat în experien ele cu colectarea biomasei la etapa celulelor verzi mobile favorizează aplicarea testului ABTS în calitate de test antioxidant. În favoarea acestui argument, este i nivelul înalt de corelare dintre productivitatea hematococului la etapa de celule verzi mobile i activitatea antioxidant , determinat prin testul ABTS (fig. 7).

Astfel, coeficientul de corelare dintre acumularea masei celulare verzi i activitatea antioxidant a extractelor etanolice din acest tip de biomas este de 0,765, ceea ce se consider drept o corelare puternic . Pentru biomasa ci tilor bruni, îns , acest coeficient este de 0,43, ceea ce se clasific ca o corelare slab , i de aceea nu se poate afirma despre existen a unei rela ii de dependen dintre productivitatea ci tilor bruni i activitatea antioxidant a extractelor etanolice, ob inute din biomasa dat . În experien ele cu colectarea biomasei la etapa ci tilor bruni, sporul maximal de biomas , înregistrat pentru compusul [Co Schiff]8, în mod evident duce la intensificarea biosintezei substan elor biologic active cu capacitate antioxidant , prin urmare valoarea sporit a testului ABTS este una mult mai real decât rezultatele testului DPPH în acest caz. Prin urmare, testul ABTS este unul mai reprezentativ pentru determinarea activit ii antioxidante. Dar, vom concretiza, c analiza rezultatelor pentru cele dou teste, a fost efectuat , în primul rând în extractele etanolice, i în al doilea rând a fost testat doar o singur concentra ie a compu ilor coordonativi ai Co cu bazele Schiff.



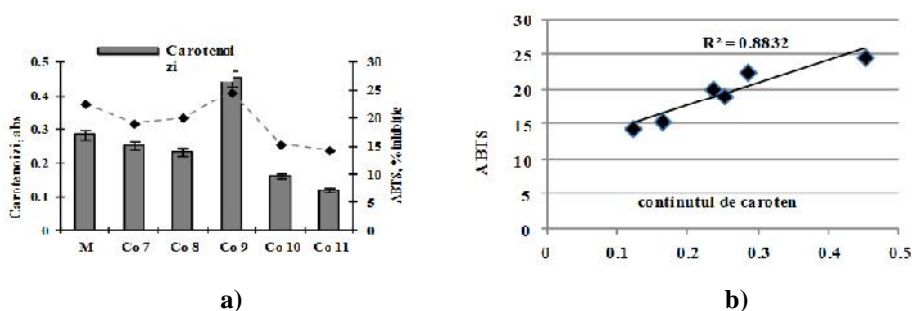
a) Corelarea dintre productivitate i activitatea antioxidant a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi mobile de hematococ. b) Corelarea dintre productivitate i activitatea antioxidant a extractelor etanolice din biomasa ci tilor bruni de hematococ.

Figura 7. Corelarea dintre productivitate i activitatea antioxidant (ABTS, % inhibi ie) a extractelor etanolice din biomasa de *Haematococcus pluvialis*, celule verzi mobile i ci ti bruni.



Propriet ile antioxidante puternice ale hematococului sunt datorate în cea mai mare parte complexelor active constituite din carotenoizi, acumularea c rora în biomas este dovada dezvolt rii unui stres oxidativ. *Haematococcus pluvialis* posed capacitatea sintezei induse a carotenoizilor la influen a unor xenobiotice. Prin urmare, analiza unei posibile corel ri dintre activitatea antioxidant a extractelor etanolice i con inutul carotenoizilor din biomasa microalgei va permite a elucida problema componentei antioxidante active care reac ioneaz cu radicalul ABTS, pe de o parte, i problema toxicit ii compusului coordinativ, pe de alt parte.

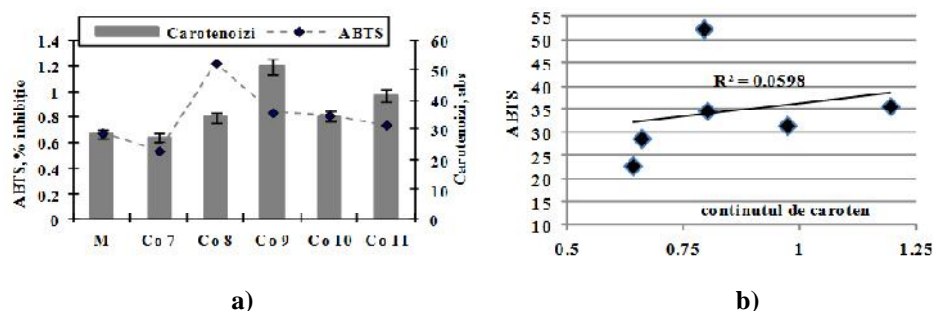
Valoarea maximal a testului ABTS coincide cu con inutul maximal al carotenoizilor, care este cu 58% mai mare comparativ cu proba martor, în extractele din biomasa celulelor verzi ob inute la cultivarea hematococului în prezen a compusului [Co Schiff]9. Vom men iona, c pentru etapa dat a ciclului vital, productivitatea maximal de asemenea s-a stabilit la ac iunea acestui compus. Prin urmare, compusul [Co Schiff]9 a stimulat la etapa celulelor verzi mobile, atât productivitatea hematococului, cât i biosinteza carotenoizilor, care au i determinat valoarea superioar a testului antioxidant ABTS (fig.8,a). Valorile reduse ale activit ii antioxidante, înregistrate pentru experien ele cu compu ii [Co Schiff]10 i [Co Schiff]11 sunt în concordan cu con inutul cu 43-57% mai sc zut al carotenoizilor în biomas . Prin urmare, la etapa celulelor verzi, ace ti compu i au inhibat activitatea biosintetic a hematococului în paralel cu productivitatea lui. Coeficientul de corelare dintre con inutul carotenoizilor în biomasa celulelor verzi i activitatea antioxidant a extractelor etanolice, ob inute din biomasa lor este de 0,88 (corelare foarte puternic ) i confirm existen a unei dependen e veridice dintre ace ti parametri biosintetici (fig. 8,b).



**Figura 8. Rela ia dintre carotenoizi i activitatea antioxidant (ABTS, % inhibi ie) a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi mobile de *Haematococcus* la cultivarea în prezen a compu ilor coordinativi ai Co cu bazele Schiff.**

Valoarea ridicat a activit ii antioxidante care s-a determinat pentru extractul din biomasa ci tilor bruni colecta i în experien a cu compusul [Co Schiff]8 nu coreleaz cu con inutul relativ sporit de carotenoizi (cu 20% mai mare comparativ cu proba martor). Con inutul ridicat al carotenoizilor s-a determinat în cazul compusului [Co Schiff]9. În cazul compu ilor [Co Schiff]10 i [Co Schiff]11, con inutul sporit de carotenoizi care este cu 20-47% mai mare fa de proba martor coincide cu valorile ridicate ale activit ii antioxidante (fig.9,a). Coeficientul de corelare dintre activitatea antioxidant a extractelor din ci tii bruni de hematococ i acumularea carotenoizilor în biomasa lor este de 0,0598 i indic lipsa dependen ei dintre acumularea pigmen ilor carotenoizi în biomasa ci tilor bruni i activitatea antioxidant , determinat prin testul ABTS

(fig.9,b). Astfel, pentru compusul [Co Schiff] 8, con inutul carotenoizilor (fig.9,a), determinat pentru biomasa ci tilor bruni, este asociat cu o productivitate sporit (fig.1,b), dar i cu o activitate antioxidant net superioar (fig.9,a). În cazul biomasei de ci ti bruni, carotenoizii nu sunt unicele componente care determin activitatea antioxidant a extractelor. Prin urmare, testul ABTS înregistreaz activitatea antioxidant nu numai a carotenoizilor, ci i a altor componente ale biomasei, care determin , în ansamblu, efectul final.



**Figura 9. Rela ia dintre carotenoizi i activitatea antioxidant (ABTS, % inhibi ie) a extractelor etanolice din biomasa ci tilor bruni de *Haematococcus* la cultivarea în prezen a compu ilor coordinativi ai Co cu bazele Schiff.**

A a dar, fiecare etap de cre tere are specificul s u al activit ii biosintetice i, respectiv, formeaz un r spuns individual la ac iunea compu ilor din mediul de cultivare. Acest r spuns individual este determinat, în cazul investiga iilor date, de productivitatea microalgal , con inutul de carotenoizii, precum i de activitatea antioxidant a extractelor etanolice specifice tipului corespunz tor de biomas . În rezultatul analizei efectuate pot fi formulate urm toarele **concluzii**:

Reac ia de r spuns a microalgei verzi biflagelate *Haematococcus pluvialis* la ac iunea compu ilor coordinativi ai Co cu bazele Schiff este diferit i se manifest în dependen de etapa de cre tere i dezvoltare a microalgei.

Între activitatea antioxidant a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi mobile de *Haematococcus* i productivitatea culturii exist o corelare puternic ( $r^2=0,75$ );

Între activitatea antioxidant a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi mobile de *Haematococcus pluvialis* i con inutul de carotenoizi din biomas exist o corelare foarte puternic ( $r^2=0,88$ );

Valorile ridicate ale testului ABTS nu sunt determinate de toxicitatea compu ilor testa i;

Testul antioxidant DPPH nu este unul reprezentativ pentru determinarea activit ii antioxidante a extractelor etanolice din biomasa celulelor verzi mobile de *Haematococcus pluvialis*.

#### Bibliografia:

1. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie. //Food Science and Technology, 1995, v. 28, p. 25-30.
2. Cerón M.C., et al. *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. //Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Apr, no.74(5),p.1112-1119.

3. Dudnicenco T. Particularitatile morfo-fiziologice, biochimice si biotehnologice ale microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow-CNM-AV-05. Autoref. tezei de dr. în biologie, Chi in u, 2001, 20 p.
4. Fabregas J. et al. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. // Journal of Biotechnology, 2001, vol.89, p.65-71.
5. Kang C. et al. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. // Applied Microbial and Cell Physiology, 2005, vol.68, p.237-241.
6. Lorenz R., Cysewski G. Comercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. //Trends Biotechnology, 2000, vol.18, p.160-167.
7. Mărușteri Ș. D. No iuni fundamentale de biostatistic : note de curs / Marius M ru teri – Târgu-Mure : University Press, 2006. 220p.
8. Mico C., et al. Use of Co speciation and soil properties to explain variation in Co toxicity to root growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) in different soils. // Environ Poll, 2008, nr.156, p.883-890;
9. Plaza M., Cifuentes A., Ibáñez E. In the search of new functional food ingredients from algae. //Trends in Food Science & Technology, 2008, vol. 19, p. 31-39;
10. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. //Free Radical Biology & Medicine,1999, vol. 26(9/10), p. 1231-1237.
11. Rodriguez-Garcia I., Guil-Guerrero J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. //Food Chemistry, 2008, vol. 108 , p. 1023–1026.
12. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chi in u: tiin a. p.25-26.
13. Rudic V., Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Chiriac T.; Cojocari A., Lozan V., Coropceanu, E., Bologa O. Ac iunea compu ilor coordinativi ai cobaltului cu dioximinele asupra unor procese biosintetice la alga ro ie *Porphyridium cruentum*. //Buletinul Academiei de tiin e a Moldovei. tiin ele vie ii. 2012, nr. 1 (316), p. 144-151.
14. Rudic V., .a. Ficobiotehnologie – cercet ri fundamentale i realiz ri practice. Chi in u: Elena VI., 2007. 365p.
15. Tewari R.K. et al. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. // Plant Science, 2002, nr.162, p. 381–388.