

# Influência do CO<sub>2</sub> no Crescimento de *Haematococcus Pluvialis* e na Produção de Carotenoides

## Influence of CO<sub>2</sub> on the Growth of *Haematococcus Pluvialis* and Carotenoid Production

Daiane Felix Reis<sup>a\*</sup>; Francisco Roberto da Silva Machado Junior<sup>a</sup>; Joana da Costa Ores<sup>ab</sup>; Ailton Cesar Lemes<sup>c</sup>; Carlos Andre Veiga Burkert<sup>d</sup>; Janaina Fernandes de Medeiros Burkert<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. RS, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Química. RS, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Morrinhos.

<sup>d</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia e Ciência de Alimentos e Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Química. RS, Brasil.

\*E-mail: [daiane.felixreis@gmail.com](mailto:daiane.felixreis@gmail.com).

### Resumo

O crescimento celular da microalga de água doce *Haematococcus pluvialis* e a bioprodução de carotenoides são influenciados pelas diferentes condições de cultivo, como deficiência de nutrientes, iluminação, aeração, agitação, temperatura e pH, alterando sua morfologia celular e produzindo cistos avermelhados (carotenogênese). A aeração nos cultivos de microalgas está relacionada a alguns fatores que influenciam no crescimento celular. As microalgas absorvem e utilizam CO<sub>2</sub> como a principal fonte de carbono no crescimento celular. Logo, a biossíntese de pigmentos pode ocorrer pela limitação do nitrogênio em presença de excesso de fontes de carbono. O objetivo desse trabalho foi investigar a influência do emprego de CO<sub>2</sub> na aeração do cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* sob o crescimento celular e a bioprodução de carotenoides. No cultivo foi utilizado o meio mixotrófico BBM (*Bold Basal Medium*) e acetato de sódio, empregando 20% de inóculo em pH inicial de 7,0, aeração de 0,30 L.min<sup>-1</sup>, com 30% de injeção de CO<sub>2</sub> uma vez ao dia durante 1 h, sob iluminação de 6 klux, à 25 °C durante 22 dias. Nestas condições o crescimento celular alcançou o máximo de 1,13±0,39 g.L<sup>-1</sup> (10 dias) e os carotenoides totais 2949,91±988,65 µg.g<sup>-1</sup>, onde foi observado que a suplementação de CO<sub>2</sub> como fonte de carbono dissolvida no meio de cultivo pode influenciar o crescimento celular e os carotenoides totais.

**Palavras-chave:** Microalga. Pigmento. Aeração. Cultivo.

### Abstract

*The cellular growth of the freshwater microalgae Haematococcus pluvialis and the bioproduction of carotenoids are influenced by the different culture conditions, such as nutrient deficiency, illuminance, aeration, agitation, temperature and pH, altering its cellular morphology and producing reddish cysts (carotenogenesis). Aeration in microalgae cultures is related to some factors that influence cell growth. Microalgae absorb and utilize CO<sub>2</sub> as the main source of carbon in cell growth. Therefore, the biosynthesis of pigments can occur by the limitation of nitrogen in the presence of excess carbon sources. The objective of this work was to investigate the influence of the use of CO<sub>2</sub> on the aeration of the microalgae Haematococcus pluvialis under cell growth and bioproduction of carotenoids. In the culture, mixotrophic medium BBM (Bold Basal Medium) and sodium acetate were used, using 20% of inoculum at initial pH of 7.0, aeration of 0.30 L.min<sup>-1</sup>, with 30% of CO<sub>2</sub> injection once a day for 1 h under 6 Klux illuminance at 25 °C for 22 days. Under these conditions the cell growth reached a maximum of 1.13 ± 0.39 g.L<sup>-1</sup> (10 days) and the total carotenoids 2949.91 ± 988.65 µg.g<sup>-1</sup>, where it was observed that CO<sub>2</sub> supplementation as a source of carbon dissolved in the culture medium may influence cell growth and total carotenoids.*

**Keywords:** microalgae; pigment; aeration; cultivation.

### 1 Introdução

Microalgas vêm sendo utilizadas como fonte de nutrientes em alimentos, rações e compostos promotores de saúde. *Haematococcus pluvialis* é uma microalga de água doce que, em respostas às condições desfavoráveis do meio de cultivo, como deficiência de nutrientes, pH, alta intensidade de luz ou temperatura modifica sua morfologia celular, aumentando de tamanho, produzindo cistos acompanhados por uma mudança de cor verde para alaranjada ou vermelha (EDMONDSON, 1996; SHAH et al., 2016).

Nas células verdes, a coloração é conferida devido à presença da clorofila, luteína e β-caroteno que predominam no conteúdo total de pigmentos (BOUSSIBA; VONSHAK, 1991). Quando o encistamento é induzido (carotenogênese),

a atividade fotossintética diminui e a quantidade de carotenoides aumenta, sendo que a astaxantina pode constituir até 98% do conteúdo total de pigmentos (BOUSSIBA, 2000; RODRÍGUEZ-MEIOZO et al., 2010).

A astaxantina é um pigmento vermelho-alaranjado com propriedades antioxidantes, empregada nos setores nutracêuticos, cosméticos, alimentícios e de aquicultura (CHEN et al., 2015). A produção biotecnológica de astaxantina, desenvolvida pela microalga *H. pluvialis*, é aprovada como corante natural para salmões e como suplemento alimentar para o consumo humano nos EUA, Japão e vários países europeus (YUAN et al., 2011).

Carotenoides produzidos naturalmente compreende apenas uma fração do mercado mundial. A demanda por

pigmentos multiplicou-se desde os anos 90, porém o mercado global ainda utiliza mais de 90% de corantes derivados de forma sintética (LOURENÇO, 2006; YUAN et al., 2011). Contudo, sintetizar pigmentos levanta questões que envolvem segurança alimentar, poluição e sustentabilidade (PANIS; CARREON, 2016). Logo, a procura por produtos oriundos de forma natural faz com que os pigmentos sintéticos sejam menos desejáveis e oferece um mercado disponível para produção de carotenoides biotecnologicamente.

Um dos aspectos fundamentais do cultivo de microalgas é o conhecimento dos nutrientes necessários a seu desenvolvimento. As condições de cultivo influenciam consideravelmente na composição das microalgas, sendo importante seu estudo, a fim maximizar os bioprodutos alvos (LOURENÇO, 2006). A aeração nas culturas de microalgas está relacionada a alguns fatores que influenciam no crescimento celular. A aeração deve impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células (GRIMA et al., 1996), permitir a captação de CO<sub>2</sub> da atmosfera, liberação de O<sub>2</sub> do interior do meio líquido, diminuir os gradientes gasosos e de nutrientes do meio (JIMENEZ et al., 2003).

As microalgas, por serem fotossintéticas, absorvem e utilizam CO<sub>2</sub> como a principal fonte de carbono no crescimento celular. Logo, a biossíntese de carotenoides pode ocorrer pela limitação do nitrogênio em presença de excesso de fontes de carbono, como a utilização de CO<sub>2</sub> ou acetato e glicose em cultivos mixotróficos (GALVÃO et al., 2013).

De acordo com o exposto, considerando a importância da obtenção de pigmentos provenientes de fontes naturais, este trabalho teve como objetivo investigar a influência do emprego de CO<sub>2</sub> na aeração do cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* sob o crescimento celular e a bioprodução de carotenoides.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a microalga *Haematococcus pluvialis*, cedida através da Coleção de Microalgas Elisabeth Adair do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (UFF). O inóculo foi cultivado em meio BBM (*Bold Basal Medium*) em fotobiorreatores de 1 L contendo 700 mL de meio, sob constante iluminância de 1,5 Klx à 24 °C (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004).

### 2.2 Condições de cultivo

O cultivo foi realizado em triplicata em fotobiorreatores de 1 L contendo 700 mL do meio BBM e acetato de sódio (TRIPATHI et al., 1999), adicionado de 20% de inóculo e incubados a 25 °C, sob iluminância constante de 6 Klx por 22 dias. Inicialmente o pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 e a aeração foi realizada por injeção constante de ar

estéril (0,30 L.min<sup>-1</sup>) enriquecido de 30% CO<sub>2</sub> (v/v). O CO<sub>2</sub> foi injetado no meio de cultivo durante 1 hora uma vez ao dia.

### 2.3 Determinações analíticas

A concentração celular foi avaliada diariamente através de leitura de absorvância a 560 nm utilizando espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) (ONCEL et al., 2010). A conversão de absorvância em concentração celular foi realizada utilizando uma curva padrão para a microalga.

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH (Hanna Instruments®, modelo pH 21) segundo AOAC (2000).

A ruptura celular foi realizada de acordo com Michelin et al. (2012), após 22 dias de cultivo. A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro a 474 nm (RODRÍGUEZ-AMAYA, 2001) e os valores quantificados pela Equação 1 (DAVIES, 1976), expressos em termos de seu carotenoide majoritário astaxantina em éter de petróleo com coeficiente de absorvidade molar de 2100 (SEDMAK; WEERASINGHE; JOLLY, 1990).

$$C = \frac{A * V * 10^6}{A_{1m}^{1\%} * 100 * m} \quad (1)$$

Onde:  $C_i$  = carotenoides totais (µg.g<sup>-1</sup>),  $A$  = absorvância;  $V$  = volume (mL);  $m$  = biomassa seca (g),  $A_{1m}^{1\%}$  = coeficiente de absorvidade molar.

### 2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

A produtividade em célula (g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) foi calculada de acordo com a Equação 2, onde  $X_t$  é a concentração celular máxima (g.L<sup>-1</sup>) no tempo  $t$  de cultivo (dia) e  $X_o$  a concentração celular (g.L<sup>-1</sup>) no tempo inicial de cultivo  $t_o$  (dia) (BORZANI et al., 2001).

$$P = \frac{(X_t - X_o)}{(t - t_o)} \quad (2)$$

A produtividade em carotenoide  $P_c$  (µg.g<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) foi calculada pela Equação 3, onde  $C_t$  (µg.g<sup>-1</sup>) é a concentração de carotenoides totais atingida no tempo final de cultivo  $t_f$  (dia) e  $C_o$  é a concentração de carotenoides no início do cultivo (considerada inexistente = 0).

$$P = \frac{(C_t - C_o)}{t_f} \quad (3)$$

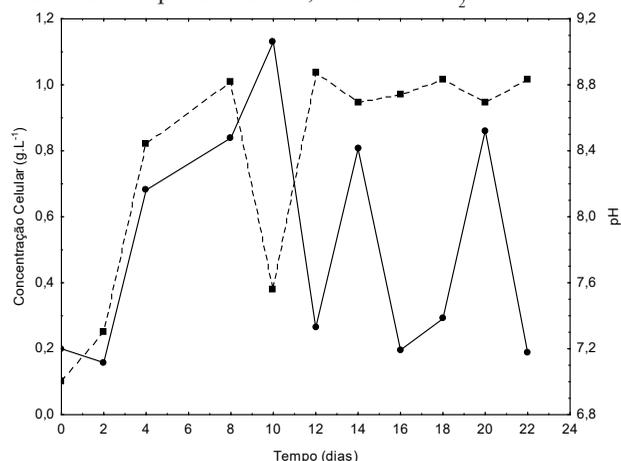
A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{máx}$ ) em (dia<sup>-1</sup>) foi obtida na fase exponencial, correspondendo ao coeficiente angular da curva  $\ln(X)$  versus tempo (BORZANI et al., 2001).

## 3 Resultados e Discussão

Na Figura 1 estão apresentados o acompanhamento do crescimento celular e o comportamento do pH. A microalga *H. pluvialis* apresenta um comportamento singular, no qual

podem ocorrer alterações metabólicas em suas células e posterior mudança na cinética de crescimento de acordo com as condições de cultivo, como observado nos dias 12, 16 e 18. A influência do pH sobre o crescimento celular foi verificada no décimo dia de cultivo onde ocorreu a maior variação de pH (7,4) ocorrendo maior concentração celular ( $1,13 \text{ g.L}^{-1}$ ). Esse comportamento é esperado, pois, de acordo com Galvão et al. (2013), normalmente a microalga *H. pluvialis* entra em estado de excitação em pH mais baixos, passando a produzir mais pigmento. Sarada, Bhattacharya e Ravishankar (2002) relatam que, para a mesma microalga, o pH ótimo para produção de biomassa e astaxantina está na faixa de 7,0-7,8.

**Figura 1** - Cinética de crescimento celular (●) e pH (■) em meio de cultivo BBM e acetato de sódio, com 20% de inóculo, 6 Klx a 25°C e pH inicial de 7, com 30%  $\text{CO}_2$ .



Fonte: Dados da Pesquisa.

O Quadro 1 apresenta os parâmetros de cultivo, concentração celular máxima, produtividade em célula, velocidade específica máxima de crescimento, com adição de 30% de  $\text{CO}_2$ , e após 22 dias de cultivo a concentração de carotenoides e produtividade em carot

**Quadro 1** - Parâmetros estudados (média±desvio-padrão) para o meio de cultivo BBM e acetato de sódio, pH 7, 20% de inóculo, 6 Klx a 25 °C, com aeração enriquecida com 30% de  $\text{CO}_2$ .

| Parâmetros                                     | Presença de $\text{CO}_2$ |
|--|---------------------------|
| $X_{max}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )                | 1,13±0,004                |
| P ( $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )        | 0,11±0,004                |
| $\mu_{max}$ ( $\text{dia}^{-1}$ )              | 0,04±0,02                 |
| $C_t$ ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )                 | 2949,91±988,65            |
| $P_c$ ( $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) | 193,13±56,44              |

$X_{max}$ : concentração celular máxima; P: produtividade em célula;  $\mu_{max}$ : velocidade específica máxima de crescimento;  $C_t$ : carotenoides totais específicos;  $P_c$ : produtividade dos carotenoides totais específicos.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Dentre os parâmetros mais importantes no cultivo que afetam o crescimento das microalgas, os gases dissolvidos têm destaque. O cultivo realizado na ausência de  $\text{CO}_2$  apresentou concentração celular máxima de  $1,29\pm0,07 \text{ g.L}^{-1}$  e carotenoides totais específicos de  $5653,56\pm235,27 \mu\text{g.g}^{-1}$ ,

esses resultados provavelmente indicam que houve excesso de suplementação de  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono dissolvida no meio de cultivo da microalga em estudo. Comumente em cultivos de microalgas, o  $\text{CO}_2$  é acrescentado em concentrações que variam de 0,2 a 5% (v/v), com a finalidade de aumentar a produtividade de biomassa microalgal (BIBEAU, 2009). No entanto, neste trabalho, mesmo com a condição elevada de injeção de  $\text{CO}_2$  (30%), a microalga apresentou crescimento celular com resultados similares aos encontrados na literatura, ademais, o encistamento (carotenogênese) foi induzido, produzindo pigmentos.

Em cultivos mixotróficos, as microalgas precisam de uma fonte de carbono inorgânico para realizar a fotossíntese, adicionados geralmente na forma de  $\text{CO}_2$ . Somente a adição de ar atmosférico ao cultivo proporciona baixas concentrações de carbono inorgânico, limitando, muitas vezes o crescimento. Portanto, é comum acrescentar  $\text{CO}_2$  ao cultivo, com o objetivo de aumentar a produtividade de biomassa microalgal. No entanto, quando se utiliza ar atmosférico enriquecido com  $\text{CO}_2$ , deve ser observado a quantidade e a dissolução deste gás no meio de cultivo e a consequente liberação de íons  $\text{H}^+$ , reduzindo assim o pH do meio, que pode levar a inibição do crescimento das microalgas, fato esse que pode explicar os resultados encontrados na ausência de  $\text{CO}_2$  (RICHMOND, 2004; BIBEAU, 2009).

Além disso, alguns estudos relatam que em alguns cultivos mixotróficos, o  $\text{CO}_2$  e a fonte de carbono orgânico podem ser assimilados simultaneamente pelo metabolismo respiratório e fotossintético das microalgas, porém, algumas espécies não têm essa capacidade (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Adicionalmente, é relatado que algumas cepas da microalga *H. pluvialis* toleram até 12% de  $\text{CO}_2$  nos cultivos (KOBAYASHI; KURIMURA; TSUJI, 1997; FABREGAS et al., 2000; KWAK; KIM; SIM, 2015).

Domínguez-Bocanegra et al. (2007) relatam valores entre  $2000\pm140$  a  $3300\pm100 \mu\text{g.g}^{-1}$  para os carotenoides totais presentes na biomassa de *H. pluvialis*. Resultados semelhantes foram observados no desenvolvimento deste trabalho, o qual, na presença de  $\text{CO}_2$ , apresentou concentração celular máxima de  $1,13\pm0,04 \text{ g.L}^{-1}$ , no décimo dia de cultivo e a produção de carotenoides totais foi de  $2949,91\pm988,65 \mu\text{g.g}^{-1}$ .

Como já foi dito anteriormente, a bioprodução carotenogênica pode ocorrer pela limitação de nitrogênio em presença de excesso de fontes de carbono, como a utilização de  $\text{CO}_2$ . Droop (1954) relata em seu trabalho que a combinação da utilização de dióxido de carbono e da iluminância pode estar relacionada com o aumento da produção de haematocromos (pigmento avermelhado da microalga *H. pluvialis*). No mesmo trabalho, o autor menciona que dificilmente, a microalga produzirá pigmentos em cultivos com nitrogênio em excesso.

O papel que as condições nutricionais exercem sobre a acumulação de astaxantina tem sido investigado por muitos pesquisadores, porém ainda há poucos estudos com relação

a injeção de CO<sub>2</sub> no cultivo de *H. pluvialis*. Del Rio *et al.* (2005) encontraram valores diferentes aos deste trabalho, de 5600 µg.g<sup>-1</sup> de astaxantina. No estudo, os autores realizaram o cultivo da microalga *H. pluvialis* utilizando fotobiorreatores de coluna, a 25 °C, pH inicial de 7 em cultivos autotróficos com injeção de CO<sub>2</sub> sob iluminância de 1220 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Kang *et al.* (2005) reportaram que o conteúdo de astaxantina produzida pela mesma microalga estudada neste trabalho, empregando meio mixotrófico e 5% de CO<sub>2</sub> aos meios de cultivo, foi de 77, mg.g<sup>-1</sup>.

Quando comparamos este trabalho aos demais encontrados na literatura, observa-se que ainda há lacunas, sendo necessário mais pesquisas que envolvam diferentes condições do emprego de CO<sub>2</sub>, a fim de definir qual melhor cenário para a produção de biomassa e de carotenoides. Contudo, os resultados encontrados demonstram a importância desse artigo, uma vez que a microalga *H. pluvialis* apresenta resultados pertinentes para a produção de carotenoides, apresentando um grande potencial biotecnológico.

#### 4 Conclusão

Nesse contexto, a suplementação de 30% de CO<sub>2</sub> ao meio de cultivo de *H. pluvialis* apresentou crescimento celular de 1,13±0,39 g.L<sup>-1</sup> (10 dias) e carotenoides totais de 2949,91±988,65 µg.g<sup>-1</sup>. Logo, o aumento de carbono dissolvido (alta concentração de CO<sub>2</sub>) ao meio de cultivo comprovou que a atividade fotossintética foi mantida, ainda que os resultados no cultivo com a ausência de CO<sub>2</sub> apresentarem valores superiores, indicando a importância de mais estudos que envolvam as condições para o emprego deste gás, a fim de otimizar o processo de biossíntese de carotenoides.

#### Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro.

#### Referências

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th. v. II., Virginia, 2000.

BIBEAU, E. *Microalgae Technologies & Processes for Biofuels/ Bioenergy Production* in British Columbia. 2009.

BORZANI, W. *et al. Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

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

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

CHEN, G. *et al.* Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus*

*pluvialis* (Chlorophyceae). *Plant J.*, v.81, n.1, p.95-107, 2015.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. New York: Academic Press London, 1976. p.38-165.

DEL-RIO, E. *et al.* Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, v.91, n.7, 2005.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A.R. *et al.* Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, v.92 p.209-214, 2004.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A.R. *et al.* Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.75, p.783-791, 2007.

DROOP, M.R. Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Arch. Mikrobiol.*, v.20, n.4, p.391-397, 1954.

EDMONDSON, W. T. Freshwater algae: Their microscopic world explored (H. Canter Lund and JWG Lund). *Limnol. Oceanogr.*, v.41, n.1, p.194-195, 1996.

FABREGAS, J. *et al.* Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.53, p.530-535, 2000.

GALVÃO, R.M. *et al.* Modeling of biomass production of *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Math.*, v.4, n.8A, p.50-56, 2013.

GRIMA, E.M. *et al.* A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition on dense microalgal cultures taking into account incident and average irradiances. *J. Biotechnol.*, v.45, p.59-69, 1996.

JIMENEZ, C. *et al.* Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Energy Convers. Manag.*, v.36, p.725-728, 2003.

KANG, C.D. *et al.* Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.68, p.237-241, 2005.

KOBAYASHI, M.; KURIMURA, Y.; TSUJI, Y. Light-independent, astaxanthin production by green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Letters*, v.19, p.507-509, 1997.

KWAK, H.S.; KIM J.J.; SIM, S.J. A microreactor system for cultivation of *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v.15, n.2, p.1618-1623, 2015.

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

MICHELON, M. *et al.* Extraction of carotenoid from *Phaffia Rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. *Food Sci. Biotechnol.*, v.21, p.1-8, 2012.

ONCEL, S.S. *et al.* Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.86, p.414-420, 2010.

PANIS, G., CARREON, J. R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Res.*, v.18, p.175-190, 2016.

PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae:

- metabolism and potential products. *Water Res.*, v.25, p.11-36, 2011.
- RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, B.B. *A guide to carotenoid analysis in food*. Washington: ILSI, 2001.
- RODRÍGUEZ-MEIOZO, I. *et al.* Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Food Tech.*, v.43, p.105-112, 2010.
- SEDMAK, J.J.; WEERASINGHE, D.K.; JOLLY, S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.*, v. 4, p.107-112, 1990.
- SHAH, M. *et al.* Astaxanthin-producing green microalgae *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front. Plant. Sci.*, v.7, p.531, 2016.
- SARADA, R., BHATTACHARYA, S., RAVISHANKAR, G. A. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 18, n.6, p. 517-521, 2002.
- TRIPATHI, U. *et al.* Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresour. Technol.*, v.68, p.197-199, 1999.
- YUAN, J.P. *et al.* Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.55, p.150-165, 2011.