

EXTRAÇÃO QUÍMICA DE ASTAXANTINA EM EUGLENA VERMELHA¹

CHEMICAL ASTAXANTHIN EXTRACTION IN RED EUGLENA

**Bianca Schizzi², Sérgio Roberto Mortari³, Alexandre Rubin⁴, Anderson Veras Maciel⁴,
Daiane Martins Regacon⁴ e Noeli Júlia Schüssler de Vasconcellos⁵**

RESUMO

No Rio Grande do Sul, florações de euglenas vermelhas ocorrem em lavouras com cultivo de arroz irrigado por inundação, onde encontram características favoráveis à sua proliferação. Essa coloração se deve à presença de grânulos de hematocromo, constituídos pelo pigmento carotenoide astaxantina. Assim, o objetivo, ao conduzir esta pesquisa, foi avaliar a eficiência de diferentes métodos de lise celular, bem como de diferentes sistemas extratores para obtenção de astaxantina em euglena vermelha. Foram testados dois sistemas, cuja eficiência foi determinada por alta eficiência (HPLC) para separação da astaxantina. Os métodos químicos de extração testados neste trabalho demonstraram resultados semelhantes na CCD, em que as amostras não acompanharam a migração do padrão, o que indica uma possível mudança de polaridade da molécula devido a sua isomerização. A separação por HPLC evidenciou a presença de impurezas na amostra que interferiram na quantificação da astaxantina extraída, além de indícios de diferenças químicas na molécula da astaxantina extraída, em comparação com a molécula da astaxantina padrão. Em razão disso, sugere-se, para estudos futuros, a caracterização química da molécula presente nas amostras ambientais.

Palavras-chave: antioxidante, arroz irrigado, caroteno, euglenoficea.

ABSTRACT

In Rio Grande do Sul, blooms of red euglenas occur in crops with rice irrigated for flood, where there are favorable characteristics to the proliferation. This coloring is due to the presence of granules of hematochrome, which are consisted by carotenoid astaxanthin pigment. So, the goal in conducting this research was to evaluate the efficiency of different lise cellular methods, also, of different extractor systems for obtaining the astaxanthin in red euglena. Two systems were tested, to which the efficiency was determined through Chromatography in Thin Layer (CTL) and High-performance Liquid Chromatography (HPLC). Chemical extraction methods tested showed similar results in the CTL, in which the samples did not follow the pattern of migration, indicating a possible change of polarity of the molecule due to its isomerization. Separation by HPLC showed the presence of impurities in the sample, what interferes in the quantification of the extracted astaxanthin, beyond evidences of chemical differences in the molecule of the extracted astaxanthin in comparison to the molecule of astaxanthin standard. As a result, it is suggested for further study, the chemical characterization of this molecule in environmental samples.

Keywords: antioxidant, irrigated rice, carotene, euglenoficea.

¹Trabalho Final de Graduação - TFG.

²Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - Centro Universitário Franciscano. E-mail: bia.schizzi@hotmail.com

³Professor colaborador - Centro Universitário Franciscano. E-mail: mortari@unifra.br

⁴Técnicos-administrativos colaboradores - Centro Universitário Franciscano. E-mail: anderson@unifra.br; rubim9@hotmail.com; daiane_regacon@hotmail.com

⁵Orientadora. Docente do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - Centro Universitário Franciscano. E-mail: noejuabio@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As eugleníficeas são algas unicelulares de ocorrência preferencial em sistemas de água doce. Entre os fatores que favorecem seu crescimento estão as elevadas temperaturas, alta radiação solar e a presença de matéria orgânica, sendo, geralmente, raras em águas limpas (CIUGULEA; TRIEMER, 2010). Algumas espécies, como a *Euglena sanguínea* Ehr., acumulam no hematocromo o pigmento carotenoide de coloração avermelhada astaxantina, que pode mascarar completamente a clorofila dos plastídios (ALVES-DA-SILVA; TAMANAHA, 2008). De acordo com os autores, existe no mundo inteiro mais de uma centena de espécies abundantes, sobretudo em águas ricas em matéria orgânica. Por essa razão, segundo Rosowski (2003), são constituintes na composição do fitoplâncton em lagos eutróficos e reservatórios rodeados por terras agricultáveis, onde a existência de nitrogênio e fósforo oriundos de herbicidas e fertilizantes favorece a ocorrência da espécie.

No Rio Grande do Sul, florações de euglenas vermelhas ocorrem em lavouras com cultivo de arroz irrigado por inundação, onde encontram características favoráveis à sua proliferação. A alga impacta esse ambiente, recobrando total ou parcialmente a superfície da lâmina d'água, impedindo que a luz chegue ao arroz em fase inicial de cultivo, o que provoca redução no seu crescimento e desenvolvimento, devido à inibição de sua atividade fotossintética (SARTORI et al., 2011). Além disso, é uma espécie que produz toxinas que podem comprometer a sobrevivência de outros organismos no meio, a exemplo dos sistemas de rizipiscicultura (lavoura de arroz irrigado em consórcio com peixes), onde experimentos com peixes cultivados em tanques com culturas de *E. sanguínea* apresentaram desorientação, respiração acelerada e incapacidade de manter o equilíbrio durante a exposição (ZIMBA et al., 2004).

A astaxantina é caracterizada como um carotenoide do grupo das xantofilas, encontrado em euglenas vermelhas, é produto da oxidação do betacaroteno, tem poder antioxidante aproximadamente 10 vezes maior que este (SUH et al., 2006). É um corante natural bioativo utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, tem um elevado valor comercial, é insolúvel em água, mas pode ser dissolvido por solventes apolares (GHIGGI, 2007).

Devido ao alto custo para obtenção da astaxantina, houve, na década de 80, a substituição desse corante pela cantaxantina sintética usualmente empregada em rações de salmonídeos, conferindo tonalidade avermelhada a sua musculatura, sendo critério de qualidade para o filé. Conforme Ghiggi (2007), o interesse atual por produtos “naturais” e ecológicos impulsionou a substituição dos corantes sintéticos por corantes obtidos de fontes biológicas, pois estes não provocam danos à saúde e têm propriedades benéficas para os humanos, como proteção contra radicais livres, efeitos da luz UV, retardo de doenças degenerativas, entre outros. Na natureza, a astaxantina confere a coloração rosada a alguns pássaros como flamingo e íbis escarlata, a crustáceos, como o camarão e a lagosta,

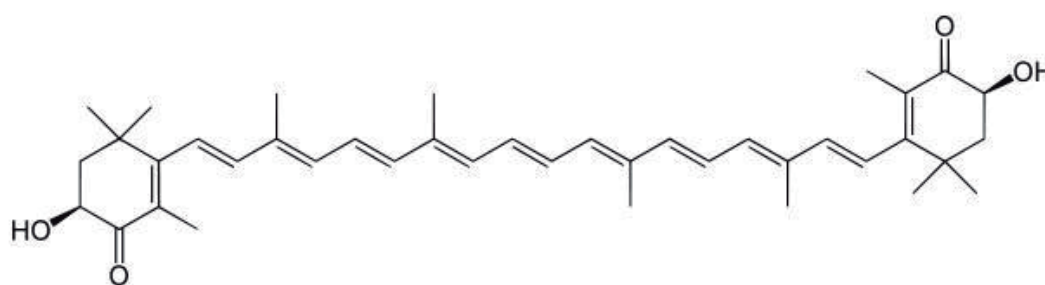
alguns microrganismos, como a alga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma* e a peixes, como a truta e o salmão.

Em animais aquáticos, a astaxantina tem a função de proteger contra oxidação de ácidos graxos, efeitos da luz ultravioleta e aumentar a resposta imunológica (LORENZ; CYSEWSKI, 2000). Os autores citam que, no ambiente marinho, a biossíntese da astaxantina é realizada por microalgas ou fitoplâncton, em nível primário de produção e, posteriormente, são consumidas pelo zooplâncton, insetos ou crustáceos que acumulam o caroteno e são ingeridos, subsequentemente, pelos peixes.

A extração da astaxantina na euglena vermelha é realizada por meio de sua solubilização pela ação do solvente extrator. Estudos de Passos et al. (2007) demonstraram que a escolha correta dos solventes para cada fonte de obtenção do pigmento astaxantina é necessária, considerando que cada organismo tem suas particularidades, o solvente adequado otimiza o processo, produzindo extratos mais puros e em maiores quantidades.

A astaxantina, na sua forma livre, é instável e extremamente sensível em relação a fatores como luz, oxigênio, acidez e calor (GUERIN et al., 2003). Nessas condições, são muito suscetíveis a uma variedade de conversões oxidativas, processos degradativos, ou são isomerizados da sua forma *trans*, configuração habitual na natureza, para a configuração *cis*. As taxas de isomerização da *trans*-astaxantina também dependem do solvente orgânico utilizado, confirmam os estudos de Yuan (1999) apud Ricardo (2013, p. 15). A astaxantina (Figura 1) é uma molécula apolar, entretanto sua configuração é mais polar que outros carotenoides (GHIGGI, 2007). Tem peso molecular de 596,841 g/mol, ponto de fusão de 182,5 °C e número CAS 472-61-7.

Figura 1 - Fórmula estrutural da astaxantina livre (3, 3' - diidroxib- β , β -caroteno-4, 4' diona) C₄₀H₅₂O₄ (GHIGGI, 2007).



A identificação da espécie de euglena vermelha de ocorrência em lavoura de arroz alagado, bem como a extração e quantificação do pigmento astaxantina sintetizado por ela representa uma alternativa de baixo custo comparado à astaxantina disponível no mercado. Diante disso, neste trabalho, teve-se como propósito avaliar a eficiência de diferentes sistemas extratores para obtenção do pigmento astaxantina, definir o melhor método de lise celular para liberação do pigmento e identificar a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água foram coletadas na porção subsuperficial em lavouras de arroz irrigado por inundação, com o auxílio de frascos de polietileno transparente nos municípios de Santa Maria/RS e São João do Polêsine/RS. Em laboratório, realizou-se a filtragem das amostras em malha de plâncton com diâmetro de 2 μm , e a caracterização fenotípica em microscópio ótico, trinocular, marca Olympus, modelo LX 50, equipado com o sistema digital de imagem Nikon coolpix 4500 e ocular micrometrada. A determinação do taxon foi efetuada por comparação com as morfoespécies relatadas em trabalhos recentes, como os realizados por Alves-da-Silva e Tamanaha (2008) e Zimba et al. (2004).

As características morfológicas utilizadas para a identificação de gêneros e espécies foram: morfologia celular, dimensões celulares, forma dos cloroplastos, forma dos paramidos, presença ou ausência e tipo de pirenoides.

A ruptura das células foi efetuada por quatro métodos distintos: agitação mecânica associada com partículas de vidro (5%), banho ultrassônico, congelamento e centrifugação.

Antes de submeter as células aos diferentes métodos de lise, observou-se ao microscópio ótico uma gota de amostra com centenas de células de euglena vermelha intactas, usadas como fator de comparação com as células após a aplicação dos métodos de lise.

Para a extração por agitação mecânica com partículas de vidro, transferiram-se alíquotas de 10 mL de amostra e 0,5 g de partículas de vidro (0,2 μm) em tubos Falcon revestidos com papel alumínio e agitou-se na velocidade máxima em “vortex”, por períodos de 10 e 20 minutos, repetindo-se a observação no microscópio e na lupa para averiguar a eficácia do método.

Para o congelamento, alíquotas de 10 mL de amostra foram dispostas em tubos Falcon de 15 mL (v\v) revestidos com papel alumínio e submetidos ao congelamento em freezer a -8 °C, por 24 horas. Após esse período, as amostras foram descongeladas ao ambiente, e uma gota da amostra foi observada ao microscópio ótico nos aumentos de 10x, 25x e 40x.

Na sonificação, tubos Falcon revestidos com papel alumínio com 10 mL de amostra foram submetidos ao banho ultrassônico pelo período de 20 minutos. Como nos métodos anteriormente citados, uma gota da amostra foi imediatamente observada ao microscópio nas objetivas de 10x, 25x e 40x.

Por fim, testou-se a centrifugação transferindo-se alíquotas de 10 mL de amostra dispostas em tubos Falcon de 15 mL (v\v) revestidos com papel alumínio, os quais foram centrifugados por 20 minutos a 4000 rpm.

Para escolha dos extratores, baseou-se na literatura técnico-científica sobre solubilidade de carotenos e experimentos para extração de astaxantina na microalga *Haematococcus pluvialis*.

Para extrair a astaxantina, foi testado o método descrito em Sedmak et al. (1990), adicionando-se, em um tubo Falcon, 10 mL da amostra homogeneizada em vortex por um minuto e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi removido, e sobre a biomassa restante foi adicionado

2,5 mL de solvente extrator, agitando-se em vortex por um minuto e centrifugando-se novamente a 4000 rpm por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi transferido para um recipiente coberto com papel alumínio. O processo foi repetido, com tempo e velocidade reduzidos (5 minutos a 2000 rpm) até a biomassa não apresentar coloração avermelhada. Foram testados os extratores dimetilsulfóxido em temperatura ambiente, dimetilsulfóxido a 55°C, acetato de etila, éter de petróleo, álcool etílico, hexano, acetona e diclorometano, no volume de 2,5 mL para 10 mL de amostra.

Outro método testado para extração de astaxantina foi o de separação Líquido-Líquido para o qual se adotou o seguinte procedimento: 100 mL da amostra descongelada foram depositados previamente em um funil de separação, foram adicionados no total, em ordem crescente de polaridade, 95 mL de hexano, 130 mL de clorofórmio, 80 mL de acetato de etila. Nesse processo, cada extrator reteve as substâncias de igual polaridade (astaxantina e outros carotenoides presentes na euglena vermelha). Para cada adição de extrator, o funil de separação foi agitado até a mistura das amostras. Deixou-se a solução em repouso para separação das fases. O extrator, junto com as substâncias extraídas, depositou-se na parte inferior do funil. Retirou-se o extrator com o caroteno extraído do funil de separação e armazenou-se em local escuro para evitar a degradação. Cada extrator foi adicionado até que removesse totalmente a coloração da solução.

Para identificar qual ou quais extratos obtidos por meio dos processos anteriores foram mais eficientes na remoção da astaxantina da amostra, eles foram submetidos a CCD e HPLC.

A CCD foi utilizada para separar a astaxantina de outros pigmentos, possivelmente carotenoides e clorofilas, extraídos na etapa anterior. A fase móvel foi composta por hexano, metanol, álcool etílico, clorofórmio e misturas entre eles. Utilizou-se o produto da extração líquido e, com o auxílio de um tubo capilar, depositou-se a amostra em papel adsorvente (sílica gel). Com o auxílio de outro tubo capilar, depositou-se uma gota do padrão trans-astaxantina ao lado da amostra (Padrão SigmaAldrich 98,5% de pureza, padrão HPLC, lote BCBM6891V, em que 1 mg foi diluído em 10 mL de etanol). A seguir, depositou-se a placa de sílica gel na cuba cromatográfica e aguardou-se a migração das amostras. Após o processo, retirou-se a placa de sílica gel da cuba e visualizou-se em luz visível e depois em luz ultravioleta para verificar se ocorreu a migração das amostras nessa frequência de onda. Quando não houve separação dos componentes, repetiu-se o processo variando a composição da fase móvel.

O outro método realizado para verificar se o produto das extrações anteriores extraiu a astaxantina da amostra foi o HPLC. Essa é uma técnica amplamente aplicada no estudo e na análise de carotenoides como a astaxantina, e tem várias vantagens em relação aos métodos tradicionais, tais como rapidez de análise, alta resolução, boa reprodutibilidade e pouca modificação estrutural dos carotenoides. Nesse método, tomaram-se alíquotas de 300 µL do extrato (0,22 µm). As amostras (10 µL) foram injetadas num cromatógrafo a líquido (Shimadzu LC-10A) acoplado a uma coluna C18 reversa (Vydac - BioRad, 250 x 4,6 MMAE) e detector de UV-visível ($\lambda = 460$ nm) de fase reversa, de temperatura controlada (40 °C). Foi utilizado acetonitrilo: metanol (90:10, grau HPLC), a uma

vazão de 0,8 mL/min, como fase móvel. A identificação da astaxantina foi realizada por comparação do padrão interno com tempo de retenção sob as mesmas condições experimentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2, 3 e 4, são apresentadas comparações das características morfológicas encontradas na espécie coletada nos municípios de São João do Polêsine e Santa Maria, com as identificações da espécie *euglena sanguínea* feitas por Alves-da-Silva e Tamanaha (2008) e Zimba et al. (2004). As descrições dos autores coincidem com a espécie encontrada nesta pesquisa: células amplamente fusiformes a fusiformes (Figura 2); polo posterior atenuado em processo caudal hialino (Figura 2a, parte superior); cloroplastos alongados, radialmente arranjados (Figura 3); grãos de paramido amplamente elípticos (Figura 2, parte inferior e superior da célula); grânulos de hematocromos numerosos, distribuídos em toda a superfície da célula (Figura 4).

Os valores medidos de largura média da célula (μm) foram $44,4 \pm 8,1$ e comprimento médio da célula (μm) $121,8 \pm 22,3$. Os valores estão próximos aos encontrados por Alves-da-Silva e Tamanaha (2008) de 20-30 μm de largura e 110-120 μm de comprimento. As características morfológicas das euglenas amostradas nos dois municípios sugerem um único morfotipo: *Euglena sanguínea* Ehr.

A figura 5 ilustra os resultados obtidos nos diferentes processos de lise celular testados e, como pode ser observado, o método que rompeu totalmente a membrana celular foi o congelamento. Portanto, este foi o processo escolhido para o rompimento celular nesta pesquisa.

Figura 2 - Euglena vermelha coletada pela autora, sob reduzida radiação (a). Esquema da imagem obtida por microscopia de varredura, de autoria de Alves-da-Silva e Tamanaha (2008) em b e Zimba et al. (2004) em c.

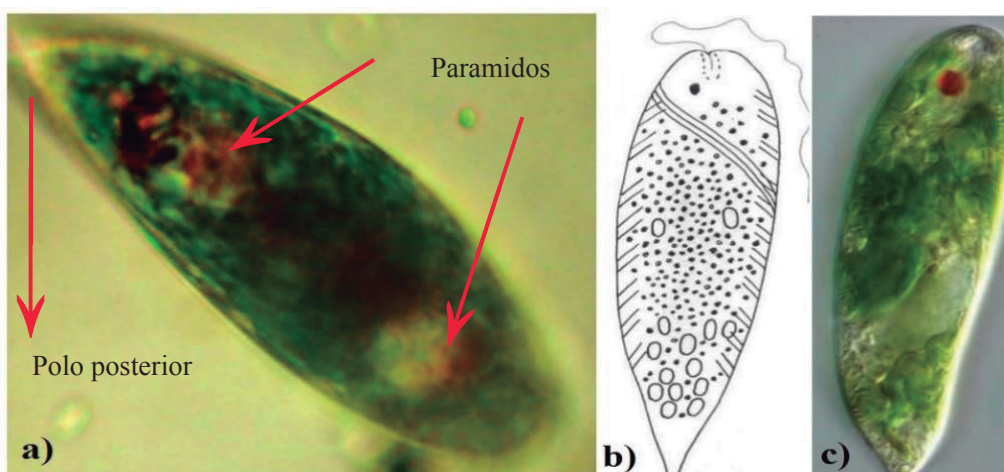


Figura 3 - Comparação de espécies de euglenas na forma encistada. (ALVES-DA-SILVA; TAMANAHA, 2008) (d). Autor (e), (f).

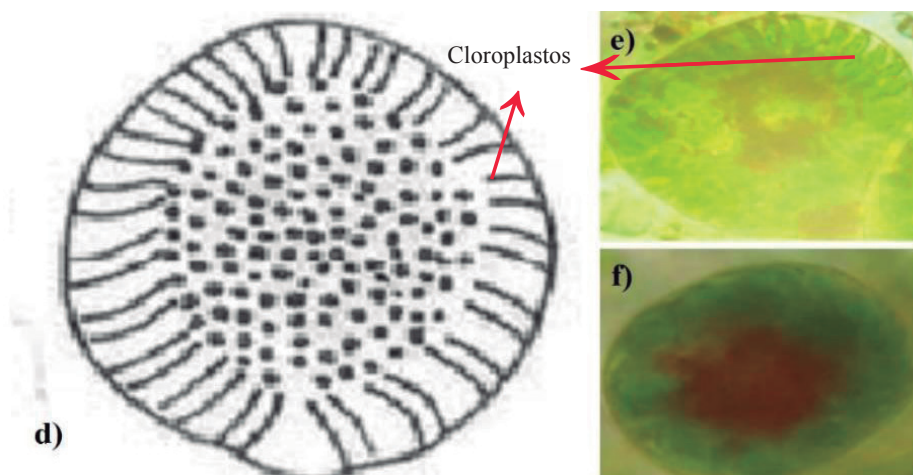


Figura 4 - Hematocromo distribuído em toda superfície da célula.

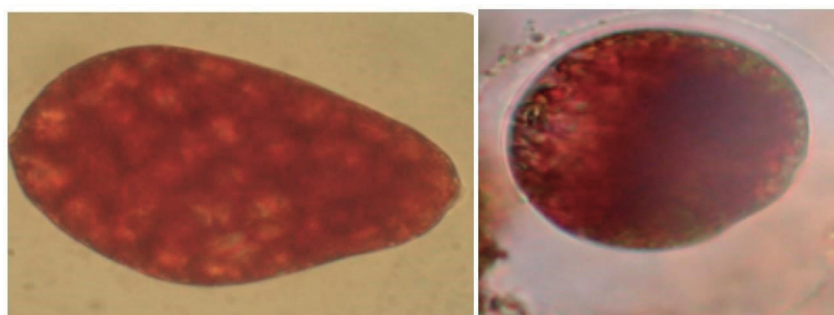
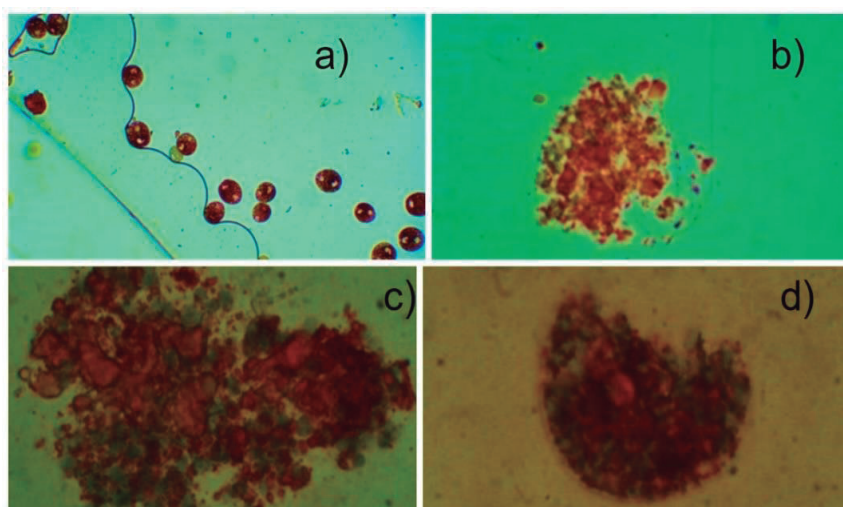


Figura 5 - Células de euglena vermelha submetidas a diferentes métodos de lise. Agitação mecânica com partículas de vidro (a), banho ultrassônico (b) congelamento (c) e centrifugação (d).

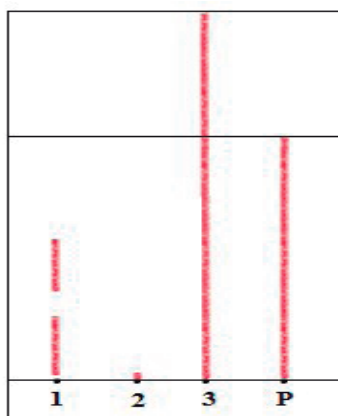


A extração da astaxantina pelo método Sedmak et al. (1990), com a utilização dos solventes diclorometano, hexano e éter de petróleo (apolares), não alteraram sua coloração durante o

procedimento. Esse resultado comprova que o método aliado a esses extratores não obteve sucesso na remoção dos carotenos da amostra. Os extratores acetato de etila, acetona, álcool etílico e dimetilsulfóxido (a 55°C e temperatura ambiente) (polares e de média polaridade) conseguiram extrair o caroteno da biomassa. Os solventes orgânicos, que não foram eficientes na extração, apresentavam características apolares ou tinham polaridade baixa. Em contrapartida, os solventes polares foram os mais eficientes na extração da astaxantina. Desse modo, conclui-se que, pelo método Sedmak et al. (1990), a extração com solventes polares foi mais eficiente.

Durante o processo de cromatografia, em camada delgada, a migração das amostras não acompanhou a migração do padrão, apesar das inúmeras composições da fase móvel (Figura 6).

Figura 6 - Esquema CCD (P= padrão; 1,2,3 = amostras).



No processo de extração líquido-líquido, observou-se que o hexano, assim como os outros extratores (clorofórmio e acetato de etila), obteve sucesso na remoção do caroteno, o que não havia ocorrido pelo método anterior. O último extrator (acetato de etila) descaracterizou a amostra. Portanto, optou-se por não continuar o processo com outros extratores.

Na análise cromatográfica dos extratos do processo líquido-líquido, novamente a migração da amostra não acompanhou a migração do padrão, com todos os extratores testados. Assim, concluiu-se que ou os extratores removeram outro caroteno e não a astaxantina e/ou o mais provável devido à instabilidade da astaxantina, foi que, durante o processo, ocorreu a isomerização da molécula, conforme apontam os estudos de Guerin et al. (2003).

A astaxantina é uma molécula opticamente ativa e, naturalmente, organismos produzem estereoisômeros em diferentes proporções (RICARDO, 2013). Os isômeros apresentam características químicas diversas do padrão utilizado nas análises e podem ter polaridades diferentes, como acontece na isomeria espacial *cis*, *trans*, que ocorre na astaxantina (GHIGGI, 2007). Diante disso, conclui-se que pode ter acontecido a mudança de polaridade da molécula, o que dificultaria a afinidade dela com a fase móvel durante a CCD. Assim, a migração das amostras e do padrão não coincidiu, indicando que há diferenças moleculares entre elas.

A análise por HPLC, realizada com as amostras extraídas pelo método de Sedmak et al. (1990), comprovou que foram extraídos outros compostos na amostra que absorvem luz em 476 nm além da astaxantina, possivelmente carotenoides ou isômeros, que têm estrutura química semelhante. O pico principal (1), na figura 7, refere-se à predominância da astaxantina no padrão, os picos menores (2) aparecem porque o padrão não é 100% puro. Na figura 8, a flecha indica o pico que corresponde com o da astaxantina do padrão (Tempos de retenção próximos). O fato de o pico ser menor comparado com a figura 7 indica que, ou existe pouca quantidade de astaxantina extraída (correspondente ao padrão) ou o método não foi satisfatório na extração de astaxantina da euglena vermelha.

Figura 7 - Cromatograma da trans-astaxantina padrão HPLC Sigma-Aldrich 98,5%.
Com tempo de retenção (Tr) de 3,3 minutos.

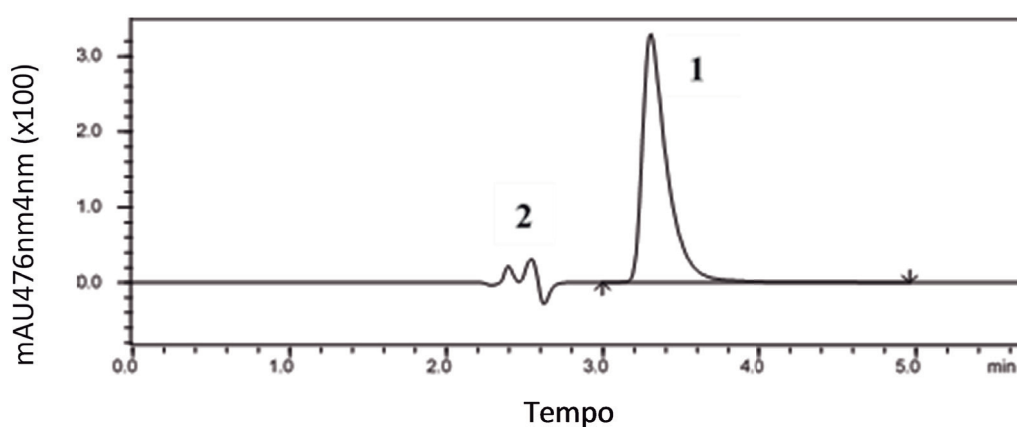
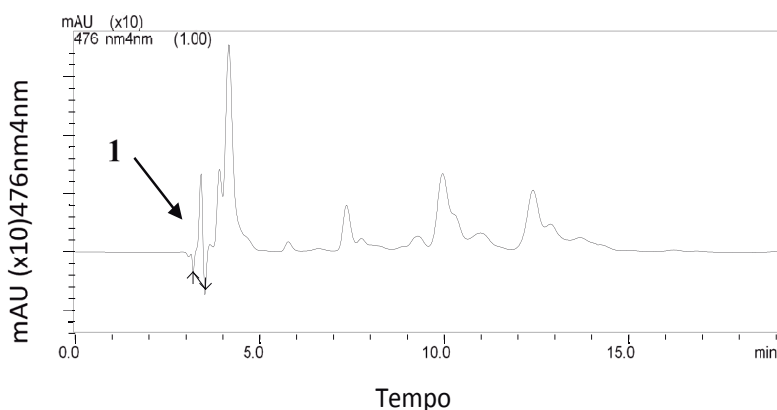


Figura 8 - Cromatograma da astaxantina extraída da amostra ambiental com tempo de retenção (Tr) 3,4 minutos.



Antioxidantes têm sensibilidade para quantidades vestigiárias de impurezas e são suscetíveis a processos degradativos (LACHMAN et al., 2001). A astaxantina possui grupos éster em sua composição que, de acordo com o Lachman (2001), são facilmente degradados por hidrólise. Alguns fatores, como a luz solar ou artificial, calor e presença de metais pesados, são catalisadores em reações de degradação por oxidação-redução, suscetível em compostos com ligações duplas e fenóis, como a astaxantina, e provocam modificações e/ou rearranjo de anéis. Solventes também podem agir como catalisadores sobre reações de oxidação em antioxidantes e, ainda, carbonos assimétricos podem sofrer racemização.

Além dos interferentes citados, a presença de água na amostra também pode explicar a diferença entre os tempos de retenção (3,3 minutos) observados nos cromatogramas da astaxantina padrão HPLC, conforme ilustrado na figura 7 (que não possuem água), com o da amostra (3,4 minutos), na figura 8, pois ela (água) é um agente oxidante. Outra possível fonte de alterações na molécula de astaxantina são os contaminantes presentes na lavoura, como metais pesados e compostos organoclorados e a manipulação em laboratório.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização desta pesquisa, foi possível perceber a necessidade de buscar protocolos de extração para astaxantina em euglenas vermelhas que interfiram menos na estabilidade da molécula, que é suscetível a processos degradativos e de isomerização, como a obtenção de cultura pura. O cultivo puro evitaria a presença de pigmentos de outros micro-organismos.

Outra possibilidade é isolar células de amostras ambientais e caracterizá-las com um polarímetro, para identificar os isômeros presentes na amostra antes e após a extração. As conclusões apontam para a necessidade da continuidade desta pesquisa. Nesse sentido, é importante fazer o possível para isolar a cultura de interferências ambientais ou até para purificação dessas amostras, transformando o problema das florações de euglenas vermelhas em lavouras de arroz em um nicho para exploração econômica.

Impurezas na amostra interferiram na quantificação da astaxantina extraída, além de indícios de diferenças químicas na molécula da astaxantina extraída, em comparação com a molécula da astaxantina padrão. Assim, há necessidade de mais estudos para a caracterização química da molécula presente nas amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

ALVES-da-SILVA, S. M.; TAMANAHA, M. S. Ocorrência de Euglenophyceae pigmentadas na rizipiscicultura na região do Vale do Itajaí. *Acta Bot. Bras.*, v. 22, n. 1, p. 145-163, 2008.

CIUGULEA, I.; TRIEMER, R. E. **A color atlas of photosynthetic euglenoids**. Michigan: Michigan State University Press, 2010. 232 p.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *haematococcus pluvialis***. 2007. 119f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210-216, May 2003.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. Cap. 26, v. 2, p. 1277-1255.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. **Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin**. 2000. Disponível em: <<https://goo.gl/2JHBqA>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

PASSOS, R. et al. Fontes naturais de carotenoides de interesse para a aquicultura: Análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Rev. Bras. Enga. Pesca**, v. 2, n. 1, p. 103-113, jan. 2007.

RICARDO, P. M. N. **Quantificação de astaxantina e α -tocoferol em lagostim *Procambarus clarkii* e seus subprodutos por HPLC-DAD e determinação da sua atividade antioxidante**. 2013. 138f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) - Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2013. Disponível em: <<https://goo.gl/8nmpNM>>. Acesso em: 16 set. 2015.

ROSOWSKI, J. R. Photosynthetic Euglenoids. In: WEHR, J. D. & SHEATH, R. G. (Ed) **Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification**. San Diego: Academic Press, 2003. p. 383-422.

SARTORI, G. M. S. et al. Manejo da adubação e seus efeitos na ocorrência de algas e na produtividade de arroz irrigado em áreas com residual de imidazolinonas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1323-1330, 2011.

SEDMAK, J. J.; WEERASINGHE, D. K.; JOLLY, S. O. Extração e quantificação de astaxantina a partir de *Phaffia rhodaozyma*. **Biotechnol Tech.**, v. 4, n. 2, p. 107-112, 1990.

SUH, I. S.; JOO, H.-N; LE, C.-G. Le. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. **Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 125, p. 540-546, March 2006.

ZIMBA, P. V. et al. Identification of euglenoid algae that produce ichthyotoxin(s). **Journal of Fish Diseases**, v. 2, n. 27, p. 115-117, 2004.

