



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
AQUICULTURA

Rafael Pacheco Derner

**Avaliação da produtividade da microalga *Haematococcus pluvialis*  
em diferentes meios de cultura**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Engenharia de  
Aquicultura da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para a obtenção  
do Título de Engenheiro de Aquicultura.

Orientador: Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.

Supervisor: Eng. Rafaela Gordo Corrêa, M. Sc.

Florianópolis

2015

DERNER, Rafael Pacheco

AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DA MICROALGA *Haematococcus pluvialis* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. Rafael Pacheco Derner. Florianópolis, 2015.

39p.; il.

Orientador: Roberto Bianchini Derner

Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, 2015.

#### Bibliografia

1. Astaxantina 2. Microalga 3. *Haematococcus pluvialis* 4. Crescimento vegetativo

**Rafael Pacheco Derner**

**Avaliação do desempenho da microalga *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultura**

TCC submetido à Banca Examinadora como parte dos requisitos para a conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Aquicultura.

Florianópolis, 30 de novembro de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Anita Rademaker Valença, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora**

---

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.  
Orientador

---

Eng. Aquicultura Rafaela Gordo Corrêa, M. Sc.  
UFSC

---

Biol. Rafael Garcia Lopes, M. Sc.  
UFSC

---

Eng. Aquicultura Renata Ávila Ozório, Dr.<sup>a</sup>  
UFSC

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram na execução.

Em especial minha família por ter me dado todo o suporte no decorrer destes anos de Curso de Engenharia de Aquicultura.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por sempre me apoiarem e ajudarem a conquistar meus objetivos.

Aos meus amigos por sempre estarem presentes na minha vida, trazendo momentos felizes.

A minha namorada Vanessa Tonello por sempre ter paciência e me apoiar nas horas mais difíceis.

Aos colegas do Projeto Astaxantina, que me ajudaram dando total suporte para que pudesse ser executada a parte experimental deste TCC, principalmente a Rafaela Gordo Corrêa e Francisco Pchara. Ao professor Fábio Neves, diretor da Séston Biotecnologia, coordenador do Projeto. Ao CNPq/RHAE pela bolsa de estudos.

Aos funcionários/bolsistas/voluntários do Laboratório de Cultivo de Algas pela ajuda nas análises no decorrer do experimento e durante minha jornada como estagiário.

Ao amigo Rafael Arantes, que foi meu primeiro orientador e me ensinou muito sobre aquicultura.

À Banca Avaliadora pelas valiosas contribuições.

Aos meus irmãos Luisa Pacheco Derner e Francisco Ozório Derner, por trazer alegria à minha vida. Assim como a minhas avós Adelza e Terezinha.

A minha Mãe Jane Cunha Pacheco, por todo o seu carinho, e por nunca deixar faltar nada e apoio incondicional.

Agradeço ao meu Pai Roberto Bianchini Derner, que além de pai foi meu professor, orientador, chefe e tutor durante esses anos de curso e estágio.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

Diversos estudos têm sido realizados com a microalga *Haematococcus pluvialis* devido ao seu potencial de produção do pigmento astaxantina, podendo acumular até 5% deste composto em termos de biomassa seca. Estudos relatam que este pigmento natural apresenta uma atividade biológica mais potente em comparação com outros carotenoides, alavancando o interesse da indústria farmacêutica, nutracêutica, cosmética e alimentícia. Por conta destas características, muitos estudos têm sido desenvolvidos justificando a produção comercial desta microalga. Para o cultivo de microalgas os nutrientes apresentam papel muito importante no crescimento e produção de biomassa, sendo este componente um item fundamental para a viabilidade econômica dos cultivos comerciais. O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito de três diferentes meios de cultura (OHM, BBM e COMBO) no crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis*. Os parâmetros de crescimento avaliados foram: densidade celular, biomassa máxima alcançada e produtividade. O meio de cultura que gerou a maior biomassa foi o BBM (0,57 g/l), seguido do OHM e COMBO com (0,47 g/l) e (0,36 g/l), respectivamente. Porém, com relação à produtividade, o emprego dos meios COMBO e BBM apresentou os melhores resultados, com 0,046 (g/l/d) e 0,044 (g/l/d) respectivamente, não havendo diferença estatística entre eles.

**Palavras-chave:** Microalga. *Haematococcus pluvialis*. Astaxantina.

## ABSTRACT

The studies was conducted with microalgae *Haematococcus pluvialis* because of its potential to produce pigment astaxanthin, which may accumulate up to 5% of this compound in terms of dry biomass. Studies report this natural pigment presents a more potent biological activity compared to other carotenoids, leveraging the interest of the pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and food industries. Because of these characteristics, many studies have been developed justifying commercial production of this microalgae. For the cultivation of microalgae the nutrients present very important role in the growth and biomass production, which is a key component item for the economic viability of commercial product. This study aimed to determine the effect of three different culture media (OHM, BBM and COMBO) the growth of the microalgae *Haematococcus pluvialis*. The parameters of growth were: cell density, reached maximum biomass and productivity. The culture medium had the largest biomass was BBM (0.57 g/l), followed by OHM and with Combo (0.47 g /l) (0.36 g /l), respectively. However, with respect to productivity, employment of COMBO and BBM media showed the best results, with 0.046 (g /l /d) and 0.044 (g/l/d) respectively, with no statistical difference between them.

**Keywords:** Microalgae. *Haematococcus pluvialis*. Astaxanthin.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células de <i>H. pluvialis</i> em diferentes estágios de vida.....	12
Figura 2 – Ciclo de vida da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	13
Figura 3 – Estrutura molecular da astaxantina.....	14
Figura 4 – Imagem das unidades experimentais.....	18
Figura 5 – Imagem do desenho experimental.....	19
Figura 6 – Amostras para análises diárias.....	22
Figura 7 – Consumo de Nitrato (N-NO <sub>3</sub> ) nos meios de cultura.....	24
Figura 8 – Consumo de Fosfato (P-PO <sub>4</sub> ) nos meios de cultura.....	25
Figura 9 – Curva de crescimento de <i>H. pluvialis</i> em termos da Densidade celular.....	26
Figura 10 – Densidade celular do meio COMBO, fases vegetativa e encistada....	27
Figura 11 – Densidade celular do meio OHM, fases vegetativa e encistada.....	27
Figura 12 – Densidade celular do meio BBM, fases vegetativa e encistada.....	28
Figura 13 – Frequência relativa das fases da <i>H. pluvialis</i> no meio COMBO.....	29
Figura 14 – Frequência relativa das fases da <i>H. pluvialis</i> no meio OHM.....	30
Figura 15 – Frequência relativa das fases da <i>H. pluvialis</i> no meio BBM.....	31
Figura 16 – Curva de crescimento em termos da biomassa.....	32

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Formulação dos meios de cultura.....	20
Tabela 2 – Relação nitrogênio e fósforo nos meios de cultura.....	21
Tabela 3 – Densidade Celular, Tempo de cultivo, biomassa final produtividade.	33

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
2 OBJETIVO .....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Material Biológico.....	18
3.2 Condições de Cultivo.....	18
3.3 Meios de cultivo.....	19
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Consumo de Nitrato/Fosfato.....	24
4.3 Densidade Celular.....	25
4.5 Biomassa.....	31
4.5.1 Tabela de Produtividade.....	32
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

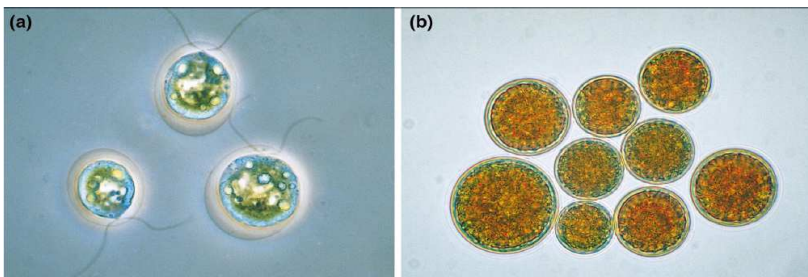
Muitos estudos têm sido realizados com a microalga *Haematococcus pluvialis* devido ao seu potencial de produção do pigmento astaxantina. Esta espécie pode acumular até 5% de astaxantina em termos de biomassa seca (ZHANG et al., 2014).

Segundo Lorenz (1999), a primeira descrição da microalga *Haematococcus pluvialis* foi conduzida por Flotow, em 1844 na Europa. No ano de 1899, Hazen fez a primeira descrição detalhada, observando que a espécie apresentava alternância de ciclo de vida, com uma fase móvel, com coloração verde e uma fase em repouso, com coloração avermelhada. O autor chamou os corpúsculos vermelhos, até o momento de natureza química desconhecida, de hematocromos. *H. pluvialis* foi enquadrada na Classe Clorofíceas, Ordem Volvocales (FLOTOW, 1844 apud LORENZ, 1999).

Em termos de distribuição, esta alga é cosmopolita, sendo encontrada da Escandinávia à Veneza e, nos Estados Unidos, de Vermont ao Texas e de Massachusetts à Nebraska (HAZEN, 1844 apud LORENZ, 1999). Esta alga é normalmente encontrada em charcos, poças, lagos e piscinas rochosas, geralmente de pequenas dimensões, desde zonas altas até poucos metros do nível do mar (ALMGREN, 1966 apud LORENZ, 1999). Considerando o fato da microalga *H. pluvialis* ser amplamente distribuída, as diferentes cepas – isoladas dos diversos ambientes – podem apresentar propriedades biológicas diferentes, tais como: taxa de crescimento, produção de biomassa, espessura da parede celular e produção de astaxantina (NOROOZI et al. 2012).

*H. pluvialis* tem quatro estágios, ou tipos de células, durante seu ciclo de vida, podendo ser classificados como: microzooides flagelados, macrozooides flagelados, células palmeloides imóveis e hematocistos ou aplanósporos, estes últimos são células grande e vermelhas com uma parede celular altamente resistente (ELIOT, 1934 apud LORENZ, 1999) (Figura 1). A reprodução pode ser tanto sexuada quanto assexuada, sendo mais comum o segundo tipo (LORENZ, 1999).

Figura 1: Células de *Haematococcus pluvialis* em diferentes estágios: (a) forma livre (macrozoóide), (b) forma encistada (aplanósporo) repleta de astaxantina.

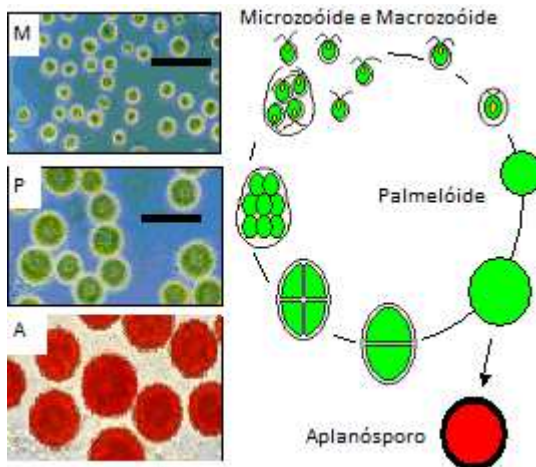


Fonte: CYSEWSKI, TODD LORENZ, 2004.

A fase microzoóide é similar à fase macrozoóide, ambas apresentam 2 flagelos que permite a locomoção, assim como, a presença de delicadas pontes citoplasmáticas que irradiam-se através do envelope glicoproteico, dando, ao microscópio, a impressão de que este é dividido em fatias (BICUDO; BICUDO, 1970). No estágio palmeloide ocorre a perda dos flagelos e é nesta fase que ocorre a reprodução, caso as condições estejam favoráveis para seu desenvolvimento, caso contrário, é iniciado o processo de encistamento da microalga. A fase aplanósoros ou hematócitos é caracterizada por um enrijecimento da parede celular e acúmulo de astaxantina, ficando até seis vezes maiores em comparação com as fases vegetativas (ELIOT,1934 apud LORENZ, 1999).

O estágio de encistamento corresponde uma forma de defesa a condições de estresse ambiental, tais como a privação de nitrogênio e fósforo, aumento da intensidade luminosa, aumento da temperatura, pH, estresse pelo incremento da salinidade ou adição de fontes de carbono (KOBAYASHI et al.,1992; KAKIZONO et al. 1992; FÁBREGAS et al.1998). Por outro lado, o maior crescimento vegetativo ou ganho em densidade celular é geralmente alcançado durante a fase de macrozooides flagelados (CAVALHEIRO et al. 1999).

Figura 2: Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis*.



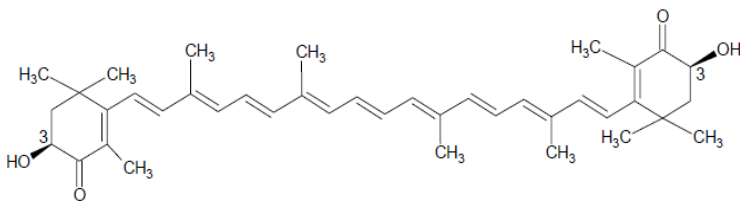
Fonte: CYSEWSKI, TODD LORENZ, 2004. Modificada.

O pigmento astaxantina tanto pode ser obtido por via sintética quanto natural, entretanto, a produção sintética supre a maior parte da demanda do mercado mundial. O pigmento obtido por síntese química vem sendo utilizado há décadas no segmento da aquicultura, adicionado à ração de peixes como salmão e truta, no entanto, a tendência mundial pelo consumo cada vez maior de

produtos naturais e, as restrições quanto ao uso de componentes sintéticos nas indústrias alimentícias, tem estimulado a realização de mais pesquisas para produção de astaxantina a partir de fontes naturais (CIAPARA et al., 2006).

O pigmento astaxantina, ilustrado na Figura 3 (3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\beta'$ -caroteno-4-4'-diona), tem coloração avermelhada, é lipossolúvel, pertence ao grupo dos carotenoides, e é sintetizado por um grupo restrito de microalgas, bactérias e fungos. Este composto pode ser encontrado também na carne de salmão, truta, krill e em algumas espécies de camarões (NOROOZI et al, 2012; GREEN et al, 2010).

Figura 3: Estrutura molecular da astaxantina.



Fonte: FONTANA et al., 2000.

Estudos relatam que o pigmento natural possui uma atividade biológica como antioxidante mais potente quando comparada a outros carotenoides, alavancando o interesse das indústrias farmacêutica, nutracêutica, cosmética e alimentícia. A astaxantina proveniente de fontes naturais tem efeitos preventivos à doenças em humanos e animais, incluindo: câncer, hipertensão, diabetes, doenças de pele, cardiovasculares e neurodegenerativas (HAN et al. 2013; AMBATI et al.2014).

Essas características justificam o potencial uso da astaxantina em alimentos, cosméticos, suplementos vitamínicos, medicamentos e na fabricação de ração e aditivos alimentares para aves, peixes e crustáceos. O mercado global para astaxantina tanto sintética quanto natural em alimentos para organismos aquáticos, nutraceuticos, cosméticos, alimentos e bebidas foi estimado em 280 t, estimados em US\$ 447 milhões em 2014, com uma projeção de em 2020 alcançar 670 t avaliada em US\$ 1,1 bilhão (RESEARCH AND MARKETS, 2015).

O preço de venda é estimado entre US\$ 2.000 - 2.500/kg, o custo de produção é de cerca de US\$ 1.000/kg (RESEARCH AND MARKETS, 2015), sendo que a maior parte destes valores de mercado estão baseados na produção de carotenóides sintéticos. Embora a maior parte do mercado atual esteja baseada em astaxantina sintética, a procura por produtos naturais proporciona uma excelente oportunidade para a produção da microalga *Haematococcus pluvialis*, que representa a maior fonte biológica deste pigmento, e tem sido cultivada em grande escala por várias empresas, entre elas: BioReal (Suécia),

Algatechnologies (Israel) e Cyanotech, Mera Pharmaceuticals e Fuji Health Science (Havaí).

Conforme (OLAIZOLA, 2003) a produção comercial de astaxantina a partir da microalga *H. pluvialis* é realizada em sua grande maioria pela combinação de duas etapas. Na primeira etapa, que visa à obtenção de biomassa, as células vegetativas são produzidas em um ambiente fechado, com controle de iluminação, pH, temperatura e nutrientes. Na segunda etapa, o cultivo inteiro é transferido para outros tanques, do tipo raceway ao ar livre, e os parâmetros antes favoráveis para o crescimento agora são propositalmente alterados (causando um estresse), tais como: privação de nutrientes, principalmente de nitrogênio, aumento da temperatura e da irradiância (intensidade luminosa) e/ou adição de cloreto de sódio ao meio de cultura. Após 2-3 dias nestas condições de estresse, as células algais iniciam o processo de alteração morfológica. De 3-5 dias as algas aumentam a porcentagem de astaxantina acumulada - cerca de 1,5 até 3,0% da biomassa seca - e assim estão prontas para colheita (OLAIZOLA; HUNTLEY, 2003). Este tempo pode ser variável dependendo da cepa (ou variedade) e das condições ambientais para o estresse.

Um sistema de cultivo contínuo, para utilização na produção comercial do pigmento astaxantina, vem sendo estudado por um grupo espanhol. O cultivo é realizado em um fotobiorreator com controle de pH, temperatura, nutrientes e irradiação; o processo de encistamento é feita pela limitação do nitrogênio fazendo assim com que as células entrem na fase de encistamento (DEL RIO et al., 2005).

Numa cultura de microalgas, para o crescimento da população, são necessários nutrientes. Estes compostos têm funções altamente diversificadas, sendo muito essenciais por serem constituintes estruturais de biomoléculas, de membranas e do meio intracelular, por participarem de processos de trocas de energia, por regularem atividades metabólicas, dentre outras funções relevantes. Os nutrientes são divididos em dois grupos principais: os macronutrientes como, por exemplo, o carbono, nitrogênio, fósforo, hidrogênio, cálcio, magnésio, ferro, zinco e potássio; os micronutrientes, como por exemplo, o boro, manganês, molibdênio, zinco e cobre, além disso as vitaminas também desempenham um papel importante. (BOROWITZKA et al, 1991).

O carbono é considerado o macronutriente mais importante no cultivo, uma vez que constitui ao redor de 50% de biomassa microalgal, sendo que, comumente o crescimento das microalgas encontra-se limitado por este composto (ABALDE et al., 1995; DERNER, 2006). Outros dois macronutrientes muito importantes são o nitrogênio e o fósforo. O nitrogênio compõe três classes de substâncias estruturais da célula: proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos fotossintetizantes como clorofilas e ficobilinas. Já o fósforo está associado a realizações de todos os processos que envolvem trocas energéticas das células: ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas (LORENZ, 2006).

As vitaminas também são constituintes dos meios de cultura e tem importância no desenvolvimento das algas, sendo as principais: cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), que segundo (CROFT et al. 2005 apud LOURENÇO, 2006), atua como cofator de uma enzima da síntese de metionina; a tiamina é constituinte de enzima envolvida em processos de fermentação e respiração celular e a biotina (vitamina H) que tem função transportadora de CO<sub>2</sub>.

Reconhecidamente os meios de cultura precisam proporcionar uma composição balanceada de nutrientes, que atenda às necessidades das microalgas. Segundo Noroozi e colaboradores (2012) que estudaram o crescimento de diferentes cepas da microalga *H. pluvialis* em distintos meios de cultura, o melhor desempenho na produção de biomassa foi obtido utilizando o meio COMBO em relação ao meio OHM, que por sua vez levou a um melhor desempenho do que o meio BBM.

O estudo realizado por Fábregas et al (2000) demonstrou que o cultivo empregando o meio de cultura OHM alcançou uma densidade celular três vezes maior em comparação com o meio BBM e seis vezes maior quando comparado ao meio CHU.

Tocquin e colaboradores (2012), testaram diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo e observaram que *H. pluvialis* apresentou um melhor desempenho na fase vegetativa com concentrações mais elevadas de fósforo.

As pesquisas geradas com *H. pluvialis* diferem em estratégias quanto à otimização da produção de astaxantina. Um dos gargalos para a produção comercial desta microalga é o fornecimento de um meio de cultura que conduza a um melhor desempenho em relação à produção de biomassa. Por conta da significativa importância do meio de cultura, o presente trabalho teve como objetivo a comparação entre diferentes meios de cultura sobre o crescimento vegetativo da microalga *H. pluvialis*.



## 2 OBJETIVOS

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar o efeito de diferentes meios de cultura na produtividade da microalga *Haematococcus pluvialis*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Determinar o efeito dos meios de cultura COMBO, OHM e BBM no crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis*, em termos da Densidade Celular e da Biomassa.

Determinar o efeito dos meios de cultura COMBO, OHM e BBM na produtividade em biomassa microalga *Haematococcus pluvialis*.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material Biológico

O estudo foi realizado a partir da cepa de *H. pluvialis* cedida pelo Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). México.

### 3.2 Condições de Cultivo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), do Departamento de Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para aclimação das células, as culturas foram mantidas durante 15 dias em cada meio de cultura (tratamentos), de acordo com Voltolina et al. (1988). Após este período, as culturas foram centrifugadas (2.510 x g, 10 min), a biomassa aderida ao fundo dos frascos foi lavada com água esterilizada (autoclave) e resuspendida, homogeneizada e inoculada nas unidades experimentais, conforme o meio de cultura. A biomassa inicial das culturas foi de  $0,13 \pm 3$  (g/l).

O experimento foi conduzido em frascos de 5.000 ml com volume útil de 4.000 ml, sendo três diferentes meios de cultura com quatro repetições por tratamento, totalizando 12 unidades experimentais. As unidades experimentais foram mantidas em 24°C, iluminação contínua de  $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com a utilização de lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia de 36 W (temperatura de cor de 6.400 K) posicionadas em um dos lados dos frascos de cultivo. As culturas foram mantidas com agitação através do borbulhamento constante de ar atmosférico (num fluxo de  $1 \text{ l min}^{-1}$ ) com suplementação de  $\text{CO}_2$  (0,5%).

Figura 4: Imagem das unidades experimentais.



Figura 5: Imagem do desenho experimental.



### **3.3 Meios de cultivo**

Três diferentes meios de cultura foram selecionados para o experimento: OHM (FÁBREGAS et al, 2000), COMBO (KILHAM et al, 1998) e BBM (BOLD, 1949). As composições dos meios de cultivo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Formulação dos meios de cultura BBM, OHM e COMBO.

<b>Fórmula</b>	<b>BBM (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>OHM (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>COMBO (mg l<sup>-1</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14	11,42	24
EDTA-Na <sub>2</sub>	50	-	4,3
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	12
Vit. H	0,0024	0,025	0,0005
B12	0,0013	0,15	0,00055
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	2,62	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	25	110,9	36
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,011	0,012
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	1
NaCl	25	-	-
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,4	0,989	0,18
SeO <sub>2</sub>	0	0,005	0,0016
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75	-	8,7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	30	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175	-	-
KOH	31	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,039	0,12	0,022
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49	-	-
KNO <sub>3</sub>	-	410	-
NaNO <sub>3</sub>	250	-	85
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0,076	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57	0,012	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75	246,5	37
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	0,001
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,8	-	0,022
B1	0,0168	17,5	-

Para o preparo dos diferentes meios de cultura, foram previamente estocadas soluções de nutrientes concentradas (filtradas a vácuo em filtro GF-1 – 0,8µm) e mantidas sob refrigeração a 4<sup>o</sup>C. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico P.A. As soluções estoques, como assim são chamadas, foram manipuladas assepticamente para evitar a contaminação e o

desenvolvimento de micro-organismos como bactérias e fungos nas soluções e mesmo nos meios de cultura. Inicialmente, as soluções foram preparadas com água filtrada, deionizada e esterilizada em autoclave e, posteriormente, foram adicionados os nutrientes respectivos a cada solução. Os meios de cultura foram preparados a partir de alíquotas de volumes conhecidos, filtrados e homogeneizados em cada solução.

### 3.4 Relação Nitrogênio/Fósforo

Tabela 2: Relação nitrogênio e fósforo nos meios de cultura.

Meio	N (mg/l)	P (mg/l)	Relação N/P (Atômico)
COMBO	14,0	1,6	20/1
OHM	56,7	6,5	19/1
BBM	41,2	53,0	1,7/1

A razão nitrogênio/fósforo é uma relação da quantidade (concentração), destes compostos no meio de cultura. O meio de cultura COMBO tem as menores concentrações de nitrogênio e fósforo dentre os 3 meios analisados, com 14,0 mg/l de nitrogênio e 1,5 mg/l de fósforo, já o meio de cultura OHM tem 56,7 mg/l de nitrogênio e 6,5 mg/l de fósforo sendo que o BBM apresenta uma concentração de 41,1 mg/l e 53,0 mg/l de nitrogênio e fósforo respectivamente. Com relação a relação atômica podemos observar que o meio de cultura COMBO apresenta a maior relação N/P, sendo de 20 vezes mais nitrogênio do que fósforo, enquanto o meio OHM tem uma relação de 19/1 e o BBM de 1,7/1.

### 3.5 Parâmetros Avaliados

Para a avaliação do desempenho em relação ao crescimento dos cultivos, foram retiradas alíquotas de 0,5 ml para a determinação da densidade celular, sendo as células fixadas com uma gota de lugol. A densidade celular foi estimada por contagens em duplicata, para cada unidade experimental, com auxílio de microscópio óptico e câmaras de Neubauer. A contagem foi feita anotando separadamente os diferentes estágios de desenvolvimento das células algais (microzoóide, macrozoóide, palmeloide e aplanósporo) a fim de determinar qual fase foi favorecida diante das condições de cultivo

estabelecidas. As células foram identificadas como estando em fase vegetativa (englobando os estágios microzooide, macrozooide e palmeloide) e fase de encistamento (corresponde apenas a fase de aplanóspero). Essa identificação tem o intuito de reconhecer se as microalgas estão em fase de crescimento ou se atingiram a fase de encistamento.

Para determinar a produtividade dos cultivos foram coletadas diariamente amostras de 30 ml das culturas. Para a coleta das amostras, a cultura de cada unidade experimental foi vigorosamente agitada (para homogeneização) e, com auxílio de uma seringa de 60 ml foram retiradas as amostras. As amostras foram filtradas a vácuo, em filtro de fibra de vidro com porosidade de  $0,8 \mu\text{m}$  (GF-1). A biomassa retida nos filtros foi seca em estufa ( $50^\circ\text{C}$ ) até atingir peso constante (24 h), segundo Arredondo e Voltolina (2007). A produtividade, em  $\text{g l}^{-1} \text{dia}$ , foi calculada a partir dos dados de massa seca final e do tempo de cultivo no qual cada unidade experimental apresentou a maior biomassa.

Figura 6 - amostras para análises diárias.



O meio de cultura resultante do processo de filtração para a determinação da biomassa (amostras de 30 ml filtradas em filtro GF-1 –  $0,8 \mu\text{m}$  de porosidade) foi empregado para a análise dos nutrientes, sendo mantidas em frascos estéreis para a aplicação das metodologias: Nitrato ( $\text{N-NO}_3$ ,  $\text{mg l}^{-1}$ ) (APHA, 2005) e Ortofosfato ( $\text{P-PO}_4$ ,  $\text{mg l}^{-1}$ ) (AMINOT; CHAUSSEPIED, 1983 in BAUMGARTEN et al., 1996).

O pH e temperatura foram monitorados diariamente para verificar se as condições ideais de crescimento estavam mantidas, através do aparelho pH 100 EcoSense, YSI.

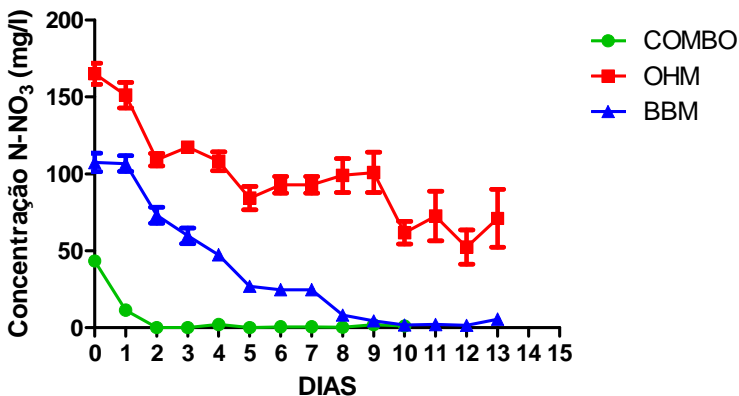
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software STATISTICA 11. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA,  $\alpha < 0,05$ ). Quando detectadas diferenças significativas foi aplicado o Teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ), para comparação entre as médias dos tratamentos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Consumo de Nitrato

As concentrações iniciais medidas de nitrato foram de 165,15 mg/l no meio OHM, 107,42 mg/l no meio BBM com e 43,35 mg/l no meio COMBO. Na Figura 7 pode-se observar que o nitrato do meio COMBO foi consumido integralmente no dia 4do cultivo. Já os nutrientes do meio BBM foram totalmente consumidos em dez dias, e no caso do meio de OHM, não foi observado o consumo total do nitrogênio até o término do experimento, ficando ainda com um residual de 71,4 mg/l no dia 13 do cultivo.

Figura 7 – Consumo de Nitrato (N-NO<sub>3</sub>) nos meios de cultura.

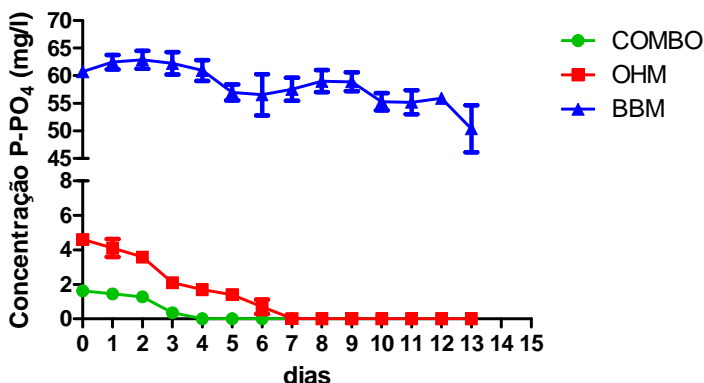


### 4.2 Consumo de Fosfato

Uma vez que as concentrações iniciais medidas foram de 60 mg/l no meio BBM, 4,6 mg/l e 1,6 mg/l nos meios OHM e COMBO, respectivamente, é possível observar na Figura 8 que o meio COMBO o fosfato foi inteiramente consumido até o quarto dia. Já o meio OHM foi inteiramente consumido até o dia 7, enquanto o meio de cultura BBM ainda apresentava um residual de 50,4 mg/l de fosfato até o término do experimento.



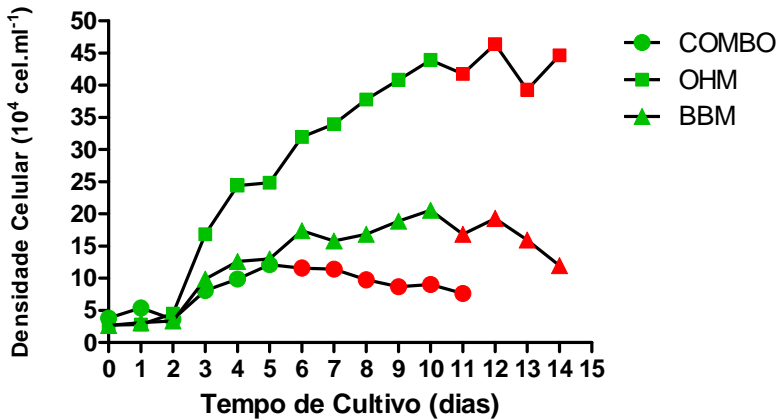
Figura 8 – Consumo de Fosfato (P-PO<sub>4</sub>) nos meios de cultura.



### 4.3 Densidade Celular

Para analisar/identificar as fases de crescimento de *H. pluvialis*, foi necessário fazer a contagem das células separando cada estágio, considerando os estágios microzoóide, macrozoóide e palmeloide como sendo da fase de crescimento vegetativo. E o estágio aplanósporo como da fase de encistamento. Conforme pode ser visualizado na Figura 9, nestas condições foi observado que o final da fase vegetativa, que foi objetivo deste experimento, ocorreu no meio de cultura OHM até o dia 10 do cultivo, e atingindo a densidade celular de  $43,9 \times 10^4 \text{ cel ml}^{-1}$ , seguido pelo meio de cultura BBM que também apontou o final da fase vegetativa no dia 10 de cultivo com uma densidade de  $20,6 \times 10^4 \text{ cel ml}^{-1}$ , enquanto o meio COMBO apontou o final de fase vegetativa no dia 5 de cultivo, com densidade de  $12,15 \times 10^4 \text{ cel ml}^{-1}$ .

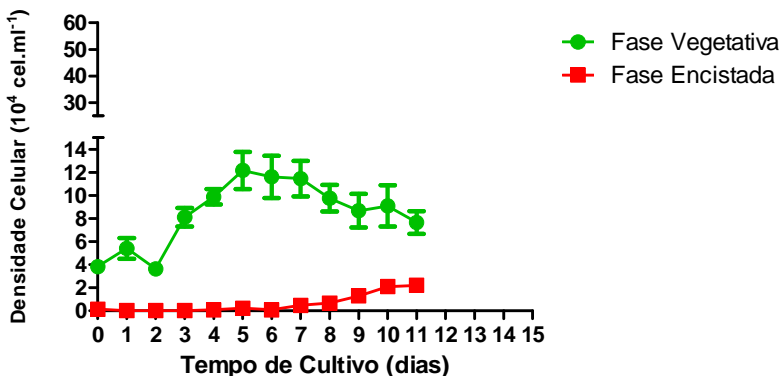
Figura 9 – Curva de crescimento de *H. pluvialis* em termos da Densidade celular (pontos verdes representam a fase vegetativa, pontos vermelhos o fim da fase vegetativa).



#### 4.3.1 Densidade celular do meio COMBO

O emprego do meio de cultura COMBO levou a uma menor densidade celular, assim como o tempo de cultivo também foi inferior aos outros meios, uma vez que a cultura entrou em fase estacionária no 5º dia de cultivo, que ocorreu provavelmente por conta da falta de nitrogênio e de fósforo no meio, que foram consumidos por inteiro já no 4º dia de cultivo. Pelo fato destes nutrientes terem uma grande importância sobre o crescimento das microalgas, e uma vez que não estavam disponíveis no meio de cultura, as condições já não eram favoráveis para seu crescimento das células microalgais, iniciando o processo de encistamento. Como mostrado na Figura 10, após o 5 dia de cultivo (fase vegetativa) ocorre uma redução na densidade celular, e em contrapartida a fase encistada começa a parecer, chegando no último dia do experimento com uma densidade de  $2,2 \times 10^4$  cel ml<sup>-1</sup> encistadas.

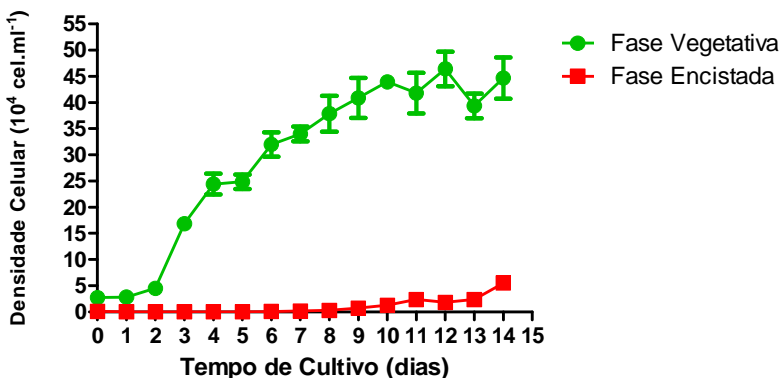
Figura 10 – Curva de crescimento de *H. pluvialis* em densidade celular do meio COMBO.



#### 4.3.2 Densidade celular do meio OHM

O emprego do meio OHM gerou densidade celular superior àquela do meio COMBO e idêntica àquela obtida com o meio BBM, sendo o dia 10 o final do crescimento da fase vegetativa. Uma hipótese para que este fato tenha acontecido pode ser por conta do fósforo ter acabado no dia 8. Na Figura 11 fica claro que a fase encistada teve início apenas após o 9 dia, que correspondeu com a falta de fósforo no meio de cultura. A densidade final da fase encistada foi de  $5,5 (10^4 \text{ cel ml}^{-1})$ .

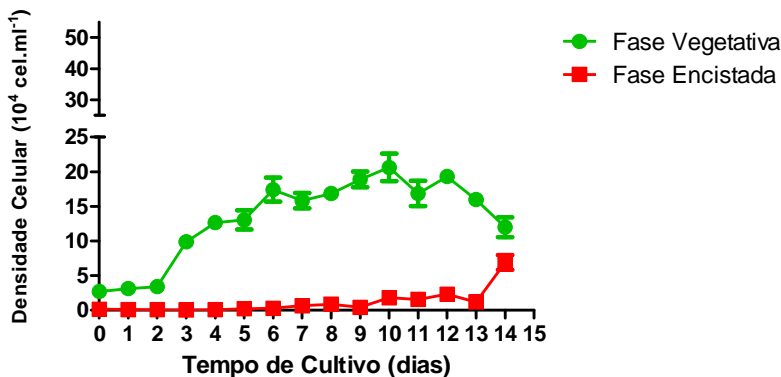
Figura 11 – Curva de crescimento de *H. pluvialis* em densidade celular do meio OHM.



### 4.3.3 Densidade celular do meio BBM

No meio BBM, que assim como o OHM levou a um tempo de cultura mais longo, teve o início da fase de encistamento no dia 9, sendo o final do crescimento da fase vegetativa no dia 10. Este diferente dos outros meio não ocorreu o consumo total do fósforo até o término do experimento no dia 14, sendo este um fator que permitiu um maior crescimento. A densidade celular final da fase encistada foi de  $6,8 (10^4 \text{ cel ml}^{-1})$  no dia 14.

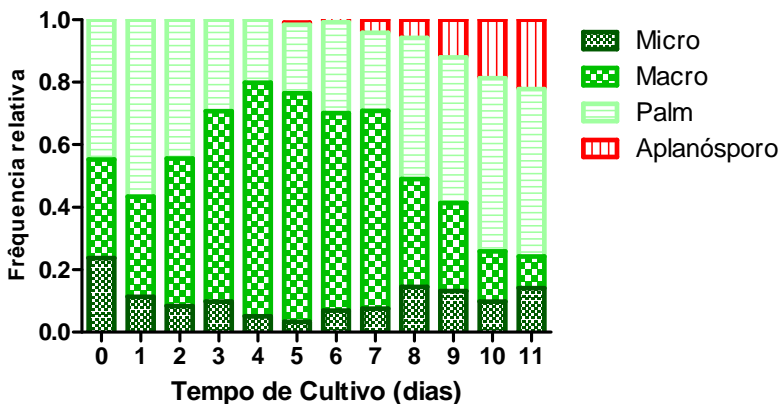
Figura 12 – Curva de crescimento de *H. pluviialis* em densidade celular do meio BBM.



### 4.4.1 Densidade celular no estágio de vida - COMBO

Foi feita a contagem celular diferenciando os 4 estágios do ciclo de vida da microalga *H. pluviialis* com o objetivo de determinar a representação de cada estágio de vida ao longo do cultivo, para isso, foram construídos gráficos com frequência relativa, levando em conta a porcentagem de cada tipo de célula no dia apresentado. Nos três primeiros dias do meio de cultura COMBO o estágio predominante foi palmeloide, isso se deve ao fato do inóculo para o início do cultivo ter uma quantidade considerável de células neste estágio. Após o dia 3 de cultivo pode se observar um grande aumento do número de células macrozooides, assim ocorrendo uma redução das células palmeloides. No 5 de cultivo ocorreu o início da fase de encistamento, aparecendo assim células aplanósporo. Como a partir dessa data as células algais antes macrozooides, agora se transformam e palmeloides, para posteriormente virarem células aplanósporos, ocorrendo assim uma grande redução no número de células macrozooides nos dias finais de cultivo.

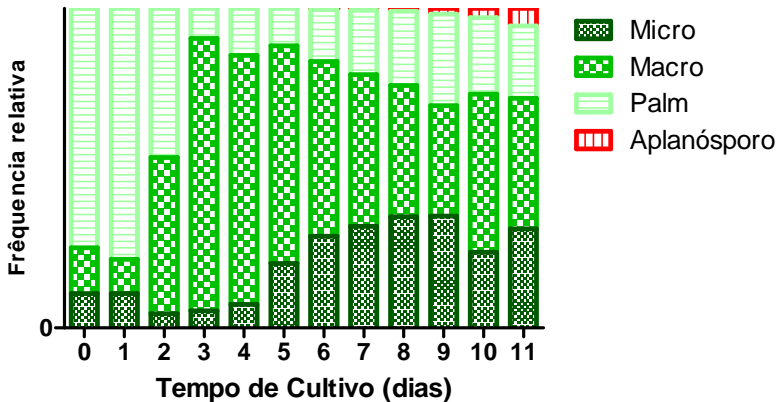
Figura13 – Frequência relativa de *H. pluvialis* em distribuição celular do meio COMBO, separado pelos estágios de vida: Micro - Microzoóide, Macro - Macrozoóide, Palm - Palmeloide e Aplanósporo.



#### 4.4.2 Densidade celular no estágio de vida – OHM

Após o terceiro dia da fase de aclimação é possível observar uma grande redução das células palmeloides, ocorrendo um aumento significativo de células microzoóide e macrozoóide. No dia 7 as células palmeloides começaram a aparecer com maior evidência, e então no dia 9 de cultivo ocorreu o início da transformação das células palmeloides em células aplanósporo, sendo mais evidente nos dias subsequentes. Após o dia 10 ocorreu a redução das células micro e macrozoóides.

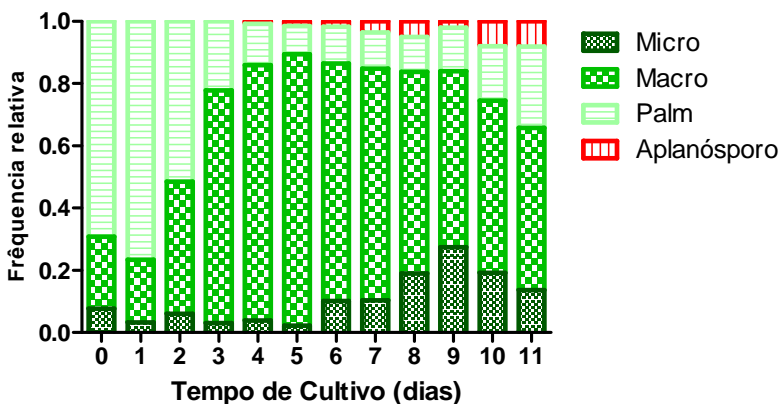
Figura14 – Frequência relativa de *H. pluviialis* em distribuição celular do meio OHM, separado pelos estágios de vida: Micro - Microzooide, Macro - Macrozooide, Palm - Palmeloide e Aplanóspero.



#### 4.4.3 Densidade celular no estágio de vida – BBM

Assim como nos outros meios de cultura, as microalgas levaram cerca de três dias para se aclimatar ao meio de cultura e começar a crescer. No dia 4 é possível observar (Figura 15) um crescimento das células macrozooídes, com uma significativa diminuição das células palmeloídes. E no sexto dia é possível observar o crescimento das células microzooídes, sendo que, já no sétimo dia ocorreu o aparecimento de algumas células aplanósperos, ficando mais evidente no dia 10. Foi também no dia 10 que as células micro e macrozooíde começaram a reduzir e dar lugar a células palmeloide e aplanóspero de forma mais acentuada.

Figura 15 – Frequência relativa de *H. pluvialis* em distribuição celular do meio BBM, separado pelos estágios de vida: Micro - Microzoóide, Macro - Macrozoóide, Palm - Palmeloide e Aplanósforo.

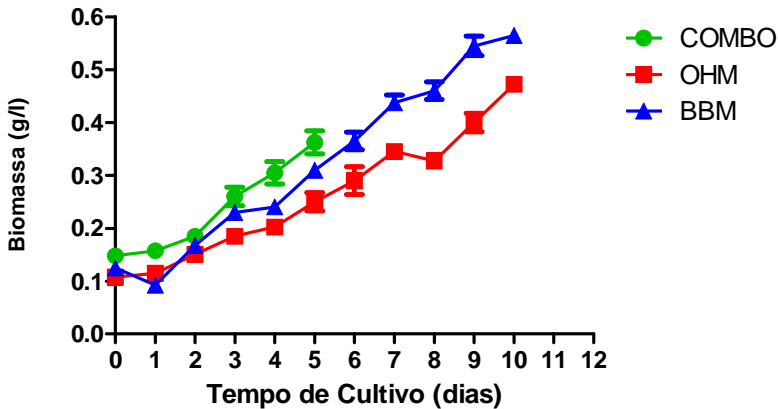


#### 4.5 Biomassa

Uma vez que o objetivo deste estudo foi comparar o efeito dos diferentes meios de cultura e determinar o crescimento da microalga *H. pluvialis* na fase vegetativa, foi levada em conta apenas a biomassa referente aos dias nos quais a cultura ainda se encontrava nesta fase, tendo em vista que até o final do experimento a biomassa das culturas não atingiu o ponto máximo. Isso ocorreu por que quando *H. pluvialis* passa da fase vegetativa para fase de encistamento as células aplanósforas são muito mais pesadas que as células micro, macro e palmeloide, acontecendo assim um aumento da biomassa.

Conforme mostrado na Figura 16, o meio de cultura que correspondeu a maior biomassa na fase vegetativa foi o BBM, com 0,57 g/l no dia 10 do cultivo, seguido pelo meio OHM com 0,47 g/l, também no dia 10, sendo o meio COMBO aquele com o pior resultado de biomassa na fase vegetativa, com 0,36 g/l no dia 5 de cultivo.

Figura 16 – Curva de crescimento em termos da biomassa: □ OHM, Δ COMBO, ○ BBM.



#### 4.5.1 Tabela de Produtividade

Segundo os dados apresentados na Tabela 3, o meio de cultura que levou à máxima densidade celular no menor tempo de cultivo foi o COMBO, com  $12,2 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}$  no dia 5 de cultivo. Os meios BBM e OHM permitiram alcançar a densidade máxima da fase vegetativa no dia 10 com,  $20,7 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}$  e  $43,9 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. Com relação à densidade celular, todos os meios foram estatisticamente diferentes para  $p < 0,05$ , sendo o OHM com melhor desempenho seguido do BBM e, com a menor densidade celular o meio COMBO. Um estudo conduzido por FÁBREGAS et al (2000), testando o meio de cultura OHM e BBM obteve resultados densidade celular bem superior com o meio de cultura OHM em comparação ao BBM, resultado bastante parecido com o presente estudo. Apesar do número de células no meio OHM ser muito maior do que do BBM e do COMBO, esse comportamento do meio OHM não se reflete em biomassa, sendo a maior biomassa alcançada, de 0,57 g/l, com o meio BBM, seguida dos meios OHM e COMBO, com 0,47 g/l e 0,36 g/l, respectivamente. O fato do meio de cultura OHM ter alcançado maior densidade celular do que o meio BBM - porém apresentar desempenho inferior com relação a biomassa final - se deve ao fato das células do meio OHM terem apresentado menor volume celular do que aquelas do meio BBM, assim também como a presença de mais células no estágio microzoóide no meio OHM com relação ao BBM.

Em relação à produtividade, os meios COMBO e BBM não mostraram diferenças significativas, tendo atingido os melhores resultados com 0,046 g/l/d e 0,044 g/l/d respectivamente. O meio com o pior desempenho foi o OHM com



0,037 g/l/d. Um estudo feito por Noroozi et al (2012), testando meios de cultura BBM, OHM, COMBO e Mixotrófico, conseguiu resultados de produtividade superior para o meio de cultura COMBO em relação ao OHM e BBM, perdendo apenas para o meio que continha acetado (mixotrófico).

A análise estatística mostrou que os meios de cultura COMBO e BBM tiveram o mesmo desempenho, porém esses dois meios causaram comportamentos diferentes, sendo o COMBO um meio de crescimento rápido e tempo de cultivo de cinco dias contra dez dias do meio BBM.

Porém pode-se levar em conta que houve consumo total dos nutrientes nitrogênio e fósforo no meio de cultura COMBO, gerando assim um cultivo mais eficiente se comparado ao meio BBM, que até o termino do experimento (dia 10) apresentava 1,67 mg/l de nitrogênio e 55,3 mg/l de fósforo, sendo assim, considerado como um excesso de nutrientes para essa microalga nessas condições de cultivo.

Isso ocorre pelo fato do meio BBM ter concentrações iniciais de nitrogênio e fósforo de 41,16 mg/l de nitrogênio e 53,01 mg/l de fósforo, sendo estas muito superiores, as concentrações de nitrogênio de 14 mg/l e de fósforo de 1,55 mg/l do meio COMBO.

Tabela 3 – Densidade celular máxima (DCM), tempo de cultivo (TC), biomassa final e produtividade.

Meio	DCM	Biomassa (g/l)	TC	Produtividade (g/l/d)
COMBO	12,15 ± 1,62 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>c</sup>	5 <sup>a</sup>	0,046 ± 0,002 <sup>a</sup>
OHM	43,93 ± 0,86 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	0,037 ± 0,001 <sup>b</sup>
BBM	20,65 ± 1,94 <sup>b</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	0,044 ± 0,001 <sup>a</sup>

ANOVA e Teste de Tukey, p<0,05).

Segundo a razão de Redfield (REDFIELD, 1958), a relação de nutrientes na biomassa de plâncton é 106C: 16N: 1P, enquanto o meio de cultura COMBO apresenta relação N: P de 20:1 contra um relação bem baixa do meio BBM 1,7:1. Parece que, apesar do meio BMM não ter uma razão N/P adequada conforme a razão de Redfield, isto não afetou a produtividade desta microalga.

A partir dos dados de produtividade foi possível fazer alguns cálculos considerando a produção de 1,0 kg de biomassa empregando os três meios de cultura. Para obtenção de 1,0 kg de biomassa seca de *H. pluvialis*, seriam necessários 21.739 l de cultura para o meio COMBO, 27.027 l para o meio OHM e 22.727 l para o meio BBM. Se calcular a quantidade necessária de nitrogênio e fósforo que cada meio de cultura usaria, seriam necessários 304,3 g e 33,7 g de nitrogênio e fósforo respectivamente para meio o meio COMBO,

1532,4 g e 175,7 g para o meio OHM e 936,4g e 1204,5 g para o meio BBM de nitrogênio e fósforo respectivamente. O meio de cultura COMBO usaria 5 vezes menos nitrogênio que o meio OHM e 3 vezes menos que o BBM, em questão de fósforo o meio COMBO usaria 5 vezes que o OHM e 36 vezes menos que o BBM.

## 5 CONCLUSÃO

No cultivo de *Haematococcus pluvialis* o emprego meio OHM permitiu alcançar a maior densidade celular ( $43,9 \times 10^4$  cel ml<sup>-1</sup>) em comparação os demais meios de cultura avaliados.

O emprego do meio BBM permitiu alcançar a maior biomassa final (0,57 g/l). Em termos de produtividade, o emprego dos meios BBM e COMBO originou os melhores resultados, com 0,046 g/l/d e 0,044 g/l/d, respectivamente, não tendo diferença estatística entre eles.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os dados obtidos neste experimento pode concluir que os meios COMBO e BBM obtiveram os melhores desempenhos, sendo o meio de cultura COMBO mais balanceado com relação ao nitrogênio e ao fósforo, porém para que se tenham uma melhor clareza sobre qual meio tem uma melhor desempenho, seria necessário um estudo aprofundado da biomassa final - fazer um experimento com os respectivos meios de cultura até alcançar a fase final de encistamento, onde as culturas microalgais se encontram com a maioria das células na fase aplanósporo, para assim analisar essa biomassa com o intuito de determinar qual meio de cultura produz a maior concentração de astaxantina. Fazendo assim uma relação com a produção de biomassa seca e a concentração de astaxantina, para obter os dados de produtividade da astaxantina de cada meio analisado. Uma vez que estudos realizados por Noroozi et al (2012) mostraram que o meio de cultura COMBO obteve resultados superiores tanto na produtividade quanto na contração final de astaxantina em comparação com os meio OHM e BBM e mixotrófico.

Um dos estudos necessários seria, para um melhor entendimento deste experimento, seria fazer a análise econômica dos meios' de cultura, para assim poder determinar qual o real custo de produção e assim poder afirmar qual dos meios de cultura testados leva ao melhor desempenho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALHEIRO R. et al. Testes preliminares de crescimento com uma cepa da microalga produtora de astaxantina *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). **Notas Técnicas Facimar**, Itajaí, v. 3, p. 73-77, 1999.

CIAPARA H. et al. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185-196, 2006.

Cyanotech Corporation: Technical Bulletin #060, **A technical review of Haematococcus Algae**. 1999.

DEL RIO ET AL., 2005. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. **Biotechnol Bioeng**, v. 91, p. 808-815.

DERNER R B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FÁBREGAS J. et al. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n 6, 623-626. 1998.

FÁBREGAS J. et al. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 65-71, 2001.

GREEN B, GARDNER C, LINNANE A, HAWTHORNE P (2010). The Good, the Bad and the Recovery in an Assisted Migration. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-8.

HAN D. et al. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. **Algae**. v. 28, p.131-147, 2013.

HAZEN T.E. 1899. The life history of *Sphaerella lacustris*. **Mern. Torrey Bot. Club**, v. 6(3), p. 211-247.

IMAMOGLU, E.; DALAY, M.C.; SUKAN, F.V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **New Biotechnology**, v.26, p.199-204, 2009.

KAKIZONO T. et al. Effect of Carbon/Nitrogen Ratio on Encystment Accompanied with Astaxanthin Formation in a Green Alga, *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p.403-405, 1992.

KILHAM S, KREEGER DA, LYNN SG, GOULDEN C, HERRERA L (1998). COMBO: A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. **Hydrobiologia**, v 377, p. 147-159.

KOBAYASHI M. et al. Astaxanthin Production by a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 5, p. 335-339, 1991.

KOBAYASHI M. et al. 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.

LORENZ RT, CYSEWSKI GR. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends Biotechnol**, v. 18, p.160–167.

LORENZ T. 1999. A technical review of *Haematococcus* algae. **Nature Technical Bulletin**, v. 060, p. 9.

LOURENÇO, Sergio O. **Cultivo de Microalgas Marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 588p.

NOROOZI M, HISHAMUDDIN O, SOON GUAN T, SUHAIMI N (2011). Studies on the Genetic Variation of the Green Unicellular Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Obtained from Different Geographical Locations Using ISSR and RAPD Molecular Marker. *Molecules*. 16: 2598-2608. doi: 10.3390/molecules16032599

NUNES M. et al. Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 825-832, 2013.

ZHANG W. et al. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 329–335, 2014.

REDFIELD, A.C., The biological control of chemical factors in the environment, *American Scientist*, 1958.

RESEARCH AND MARKETS (Dublin) (Ed.). **Global Astaxanthin Market 2015: Sources, Technologies and Application**. 2015. Disponível em: <<http://www.researchandmarkets.com/research/t4crxd/global>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

TOCQUIN P. & ANTHONY FRATAMICO & FABRICE FRANCK: Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. Laboratory Of Plant Biochemistry And Photobiology, Institute Of Plant Biology, **University Of Liège**; **J Appl Phycol**, v. 24, n. 365, 9 dez. 2011.