

# FONTES NATURAIS DE CAROTENÓIDES DE INTERESSE PARA A AQUICULTURA: ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Renata PASSOS (renatapassos1978@yahoo.com.br)

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Danilo G. MORIEL (danimoriel@gmail.com)

Laboratório de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações, Universidade Federal do Paraná.

Francisco LAGREZE (flagreze@hotmail.com)

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Luisa GOUVEIA (luisa.gouveia@ineti.pt)

DER-Unidade de Biomassa, INETI, Lisboa, Portugal.

Marcelo MARASCHIN (m2@cca.ufsc.br); Luis H. BEIRÃO (beirao@cca.ufsc.br)

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

## RESUMO

Na Indústria Alimentar, em particular na Indústria Aquícola, a utilização de corantes tornou-se uma ferramenta indispensável na conquista de mercado, garantindo uma melhoria no aspecto e no aumento da aceitação e valor econômico de seus produtos. A associação dos corantes naturais às vantagens nutricionais e sua obtenção por processos de baixo custo têm reduzido a utilização de pigmentos de origem sintética na Indústria Alimentar em escala mundial. Desta forma, estudou-se a eficiência de três métodos de extração de pigmentos carotenóidicos totais e astaxantina das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* e da levedura *Phaffia rhodozyma*, potencialmente utilizadas no arraçoamento de peixes e crustáceos em cativeiro. Dentro das biomassas estudadas, a microalga *Haematococcus pluvialis* revelou o maior conteúdo de carotenóides totais (20,79 mg de carotenóides totais/g célula seca), enquanto a levedura *Phaffia rhodozyma*, apesar de um menor conteúdo de pigmentos totais (0,22 mg/g célula seca), apresentou a maior relação entre a concentração de astaxantina livre e o conteúdo de carotenóides totais (cerca de 87,5% dos carotenóides presentes como astaxantina livre), quando comparada aos outros microorganismos (*Chlorella vulgaris*, 13,4%; *Haematococcus pluvialis*, 4,7%). A utilização de dimetilsulfóxido DMSO como solvente revelou ser a melhor estratégia para a extração dos carotenóides dentro dos métodos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: aquicultura, carotenóides, astaxantina.

NATURAL SOURCES OF CAROTENOIDS OF INTEREST FOR AQUACULTURE:  
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF EXTRATION METHODS

## ABSTRACT

In Food Industry, particularly Aquaculture Industry, the utilization of pigments has been an indispensable tool to market achievement, assuring an improvement on visual aspects, increase on acceptability and economic value of its products. The association of natural pigments to nutritional advantages and its acquisition by low cost processes have decreased the utilization of synthetic pigments in Food Industry, followed by a worldwide tendency for the reduction in the utilization of synthetic products on foods. Thus the pigmentation activity and pigment extraction efficiency of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* and the yeast *Phaffia rhodozyma*, potentially used on fish farming, were studied. The microalga *Haematococcus pluvialis* showed the highest total pigment content (20.79 mg of total carotenoids per gram of dried cells) while the yeast *Phaffia rhodozyma*, although showing the lowest total pigment content (0.22 mg/g dried yeast), showed the highest free astaxanthin content (87.5%) when compared to the other microorganisms studied (*Chlorella vulgaris*, 13.4%; *Haematococcus pluvialis*, 4.7%). The utilization of DMSO as solvent showed the highest efficiency on carotenoid extraction.

KEYWORDS: aquaculture, carotenoids, astaxanthin.

## INTRODUÇÃO

A aqüicultura é uma atividade em crescente expansão devido ao aumento da população mundial e ao declínio de fontes pesqueiras naturais, associado ao consumo crescente de pescados em uma dieta equilibrada e saudável.

Astaxantina é o principal pigmento utilizado na aqüicultura, especialmente na criação de salmões, trutas e crustáceos. Estes organismos não são capazes de sintetizar carotenóides e, desta forma, estes pigmentos devem ser adicionados à sua alimentação para viabilizar sua incorporação e deposição na carne, conferindo a coloração característica da espécie e aumentando sua aceitação e valor de mercado.

A deposição de astaxantina em trutas e salmões é muito mais eficiente, comparativamente a outros carotenóides, sendo que a maioria dos criadores utiliza astaxantina sintética. Contudo, o custo deste insumo é elevado, aliado ao fato de que suas formulações podem conter configurações indesejadas de astaxantina e seus derivados, diminuindo sua eficiência na pigmentação (LATSCHA, 1990 e TORRISEN, 1995). Adicionalmente, observa-se uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e à exclusão de componentes sintéticos da cadeia alimentar. Tais fatores têm aumentado o interesse em fontes naturais de astaxantina, sendo que diversas empresas têm investindo

na obtenção deste pigmento, a partir de fontes naturais (MCCOY, 1999). Atualmente, as fontes naturais mais promissoras de astaxantina são a microalga *Haematococcus pluvialis* (GOUVEIA et al., 1996) e a levedura *Phaffia rhodozyma* (MORIEL, 2005).

Neste contexto, a necessidade de obtenção de astaxantina a partir de fontes naturais com elevada produtividade, sustentabilidade e baixo custo, aliado ao uso de processos eficientes de extração e quantificação daquele carotenóide, vem direcionando pesquisas nesta área, buscando incrementos de qualidade e redução do custo do pescado produzido em cativeiro. Este trabalho avaliou a eficiência de três métodos de extração de carotenóides totais e astaxantina, a partir de fontes naturais, a saber, as microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* e a levedura *Phaffia rhodozyma*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MICROORGANISMOS

Amostras de biomassas das microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI – Portugal). Para o cultivo dos microrganismos e produção das biomassas de interesse, utilizou-se o protocolo e as condições experimentais descritas por Gouveia et al. (2006).

A levedura *Phaffia rhodozyma* (cepa ATCC 24202) utilizada nesse estudo foi cultivada conforme descrito por (BONFIM, 1999) e cedida pela Universidade Federal do Paraná.

Com o intuito de romper a parede celular e otimizar a extração dos pigmentos de interesse, amostras (10g – peso seco) das biomassas em estudo foram trituradas em moinho de bolas (NV-TEMA, Labor-Scheibenschwingmuhle, T100), por 60 segundos. Alíquotas de 100 mg de amostra triturada de cada microorganismo foram utilizadas, em três experimentos independentes, segundo o protocolo de extração dos pigmentos carotenóidicos.

### EXTRAÇÃO

Três diferentes métodos de extração foram testados:

Método A: a extração e a determinação do conteúdo de carotenóides totais nas amostras em estudo foi realizada conforme método descrito por Lim et al. (2002), utilizando-se acetona (Merck, p.a.) como solvente. Sucintamente, a 100 mg de cada amostra foram adicionados 5 mL de acetona. A suspensão foi homogeneizada em agitador vortex e levada à centrifugação (10 krpm/5min). Os sobrenadantes foram coletados, seguido da repetição do procedimento descrito até a exaustão da extração dos pigmentos carotenóidicos, condição esta confirmada através da espectrofotometria de varredura UV-

Vis ( $\lambda = 474 \text{ nm}$ ) dos sobrenadantes retirados. Ao final do processo de extração, os sobrenadantes coletados foram reunidos para efeitos de dosagem do teor de carotenóides totais.

Método AB: A cada 100 mg de amostra, adicionou-se concomitantemente 6 mL de acetona (Merck, p.a.) e 2 mL de bolas de vidro (Sigma, 425-600 microns), conforme descrito previamente por Goveia et al. (1996), seguido de agitação (Vortex) por 1 min, com intervalos de repouso em banhos de gelo por 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, repetindo-se o procedimento de forma a extrair exaustivamente os pigmentos das biomassas. A confirmação da ausência destes compostos nas amostras foi realizada através de espectrofotometria de varredura UV-Vis ( $\lambda = 474 \text{ nm}$ ), considerando-se finalizado o procedimento quando valores de absorvância inferiores a 0.05 foram obtidos.

Método DMSO: A cada amostra (100mg) foram adicionados 2ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, p.a.), incubando-se o material em condição de repouso por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob atmosfera de  $\text{N}_2$ , na ausência de luz. Subsequentemente, o material foi centrifugado (3,5 krpm/5 min), recuperando-se o sobrenadante e repetindo-se o processo de extração com o material precipitado. Aos sobrenadantes coletados foram adicionados 10 ml de solução de NaCl 20% e éter de petróleo (1:1). A fase etérea foi coletada e, sob a fase aquosa, 5 mL de éter de petróleo foram adicionados por mais duas vezes. A fase etérea foi filtrada em suporte contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e completada ao volume final de 25ml (adaptado segundo Moriel, 2005). Todas as extrações foram repetidas até que cor da biomassa se esgotasse nos solventes extratores, conforme descrito acima (*Método AB* – extração exaustiva). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Para a quantificação dos carotenóides totais, os valores de absorvância a 477 nm (*métodos A e AB*) e 474 nm (método DMSO) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu LC10. Para efeito de cálculo da concentração de carotenóides totais, utilizou-se a lei de Lambert-Beer para os métodos de extração *A* e *AB*, onde o valor da absorvância aplicado para a acetona foi de 219,8 L/g.cm, sendo o valor de carotenóides totais expresso em equivalentes de astaxantina. Para o método *DMSO*, calculou-se a concentração de astaxantina a partir de dados da literatura (ANDREWES e STARR, 1976, LIM et al., 2002), utilizando-se a absorvância específica para as xantofilas a 474 nm, i.e.,  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.600$ .

Para a identificação dos pigmentos, os extratos foram filtrados (0.22  $\mu\text{m}$ ) e injetados (10 $\mu\text{L}$ ) em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência HP-1100, equipado com coluna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa (Vydac 201TP54, 250mm, 4,6 mm  $\varnothing$ ), e detector UV-VIS (477 nm). Metanol:acetonitrila (90:10 v:v) foi utilizado como fase móvel, em fluxo de 1ml/min. A identidade de astaxantina livre no perfil

cromatográfico foi confirmada através do tempo de retenção (min) de padrão cromatográfico (1 mg/ml, SIGMA, St. Louis – USA, 98% de pureza) e para efeitos de cálculo da concentração daquele pigmento, utilizou-se uma curva-padrão externa ( $r^2 = 0,99$ ), construída a partir da área do pico de interesse ( $R_t$  4,59min), nas condições experimentais acima descritas.

Os dados obtidos foram sumarizados e analisados através do teste *t*-student ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa Statistica (v. 5.0). Tendo em vista o uso mais freqüente de *Haematococcus pluvialis* como suplemento carotenóidico da dieta de peixes e crustáceos cultivados em cativeiro, aquela microalga foi considerada como testemunha relativa, para efeito de análise estatística referente às biomassas fontes de carotenóides, enquanto o método *A* foi utilizado como referência comparativa para os tratamentos de extração em estudo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras das microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* apresentaram valores de conteúdos de carotenóides totais superiores, comparativamente ao observado para a levedura *Phaffia rhodozyma*, independente do protocolo de extração utilizado. Teores de carotenóides totais superiores em 16 e 82 ordens de magnitude foram detectados nas amostras de *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*, em relação à amostra de *P. rhodozyma*, para os métodos de extração *A* e *AB* (Figura 1), respectivamente. Tal fato é de interesse, porque indica que o uso de bolas de vidro (*Método AB*) e a incubação das amostras em banho de gelo (20 min) não se mostraram vantajosos em relação à utilização do organosolvente isoladamente (*Método A*).

O método *DMSO*, por sua vez, revelou o efeito positivo do pré-tratamento das amostras com aquele solvente aprótico nas condições experimentais utilizadas. A interação do *DMSO* com os componentes de parede celular, corroborando para um relaxamento das estruturas macromoleculares associadas, é um fator que, em alguma extensão, parece favorecer a extração dos pigmentos carotenóidicos por organosolventes, i.e., éter de petróleo, conforme observado. De fato, o método *DMSO* mostrou-se como o de maior eficiência, independente da espécie fonte de carotenóides. Adicionalmente, ressalta-se que a associação de *DMSO* e éter de petróleo: NaCl (1:1) revelou a existência de concentrações de carotenóides totais altamente significativas ( $p < 0,01$ ) em *H. pluvialis* (28785ug carotenóides totais/g biomassa seca), comparativamente à *C. vulgaris* (4413ug carotenóides totais/g biomassa seca) e *P. rhodozyma* (254ug carotenóides totais/g biomassa seca). Estes resultados dão suporte à preferência de uso de *H. pluvialis* como fonte de compostos carotenóidicos em sistemas intensivos de cultivos de peixes e crustáceos, por exemplo.

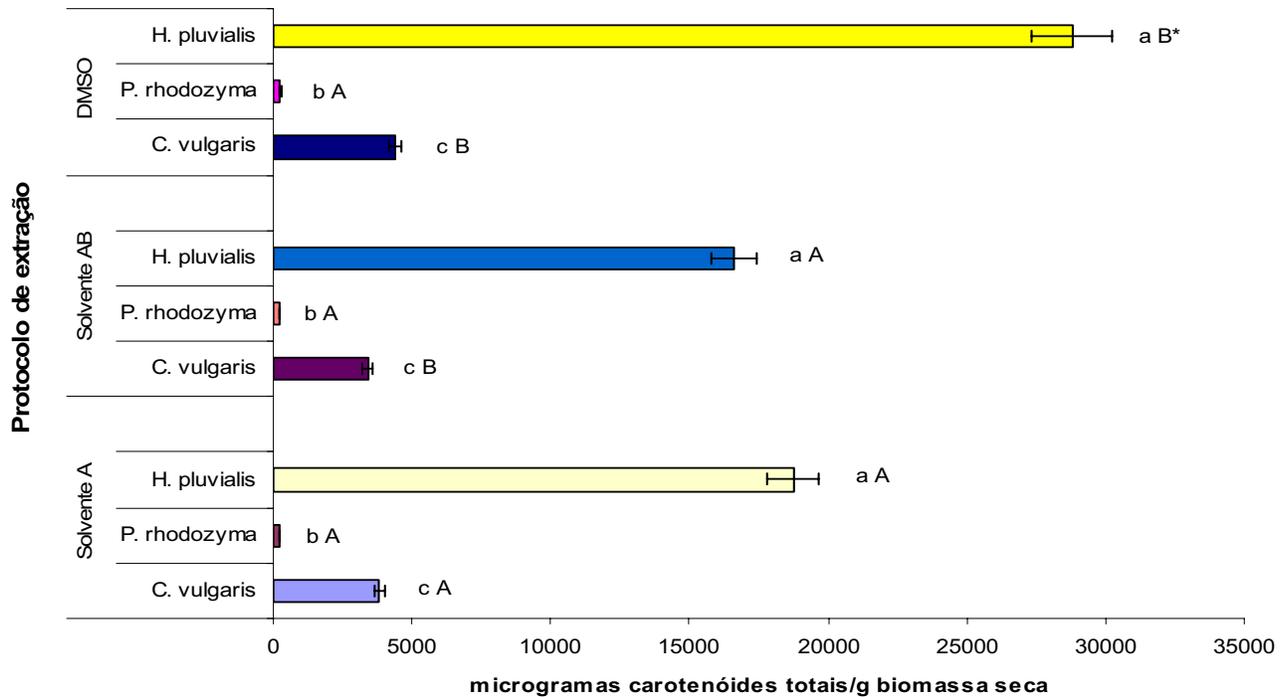


Figura 1 - Conteúdo de carotenóides totais (equivalentes de astaxantina) das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* e da levedura *Phaffia rhodozyma*, segundo o método de extração utilizado (A, AB e DMSO). Valores médios de três experimentos independentes (\**t*-student,  $p < 0,05$ ), segundo a espécie fonte de carotenóides em estudo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ( $p < 0,05$ ), segundo a fonte de carotenóides. Valores médios não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) para os métodos de extração, quando acompanhados pela mesma letra maiúscula.

A Figura 2 ilustra as distintas colorações das biomassas em estudo, previamente à extração dos pigmentos carotenóidicos.



Figura 2 - Amostras de biomassas liofilizadas dos microorganismos em estudo (a) *Chlorella vulgaris*, (b) *Phaffia rhodozyma* e (c) *Haematococcus pluvialis*, previamente à extração dos pigmentos carotenóidicos.

As análises por cromatografia líquida revelaram a eficiência na extração de astaxantina livre ( $R_t = 4.59\text{min}$ ) em relação aos outros carotenóides, nomeadamente sobre o  $\beta$ -caroteno, equinenona. As amostras de *Haematococcus pluvialis* apresentaram concentrações de astaxantina livre de 2,6%, 1,7% e 4,7%, em relação ao conteúdo de carotenóides totais, com a utilização dos métodos *A*, *AB* e *DMSO*, respectivamente. De forma similar ao observado para a extração de carotenóides totais, o método *DMSO* evidenciou um rendimento superior ( $p < 0,05$ ) à obtenção de astaxantina livre em relação aos demais tratamentos em estudo.

Para a microalga *Chlorella vulgaris*, valores de concentração de astaxantina livre de 13,1% (método *A*), 13,16% (método *AB*) e 13,4% (método *DMSO*) foram observados em relação ao conteúdo de carotenóides totais, indicando que os três métodos apresentaram a mesma eficiência na extração daquele carotenóide em sua forma livre. No entanto, conteúdos de astaxantina livre de 87,5%, 52,7% e 16,2% foram observados para os solventes *A*, *AB* e *DMSO*, respectivamente, para *Phaffia rhodozyma*. Este resultado é de interesse, uma vez que revela claramente a necessidade da escolha correta do(s) solvente(s) na definição de métodos extratores de alta eficiência. Dadas as características estruturais da parede celular de *Phaffia rhodozyma* (BONFIM, 1999), é instigante especular que o efeito da acetona foi mais efetivo em relação aos demais agentes extratores utilizados, no que concerne a uma maior permeabilização daquele componente celular, viabilizando um maior rendimento de extração de astaxantina livre, portanto.

Em resumo, os resultados demonstraram que para *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* o método *DMSO* foi o mais eficiente à extração de astaxantina livre ( $p < 0,05$ ). De forma contrária, para as amostras da levedura *Phaffia rhodozyma*, o método *A* mostrou-se mais seletivo à extração de astaxantina livre. Em função disto, recomenda-se a determinação prévia da eficiência de sistemas extratores, quando se objetiva alcançar altos rendimentos e seletividade na obtenção dos pigmentos de interesse, haja vista a aparente especificidade de ação destes, segundo a fonte de carotenóides em estudo. Tal abordagem é de interesse tecnológico dado ao alto valor agregado dos pigmentos carotenóides à atividade aquícola e à saúde humana, bem como em processos de identificação e avaliação do potencial de novas fontes daqueles metabólitos secundários.

As microalgas em estudo apresentaram conteúdos altamente significativos ( $p < 0,01$ ) de astaxantina livre em relação à levedura *Phaffia rhodozyma*, independentemente do solvente extrator utilizado (Figura 3). De forma interessante, destaca-se a similaridade de valores de conteúdo daquele pigmento nas amostras de microalgas observada para o método de extração *AB*, indicando claramente o efeito do sistema extrator sobre os resultados de rendimento do pigmento de interesse, a despeito das diferenças genéticas e bioquímicas (i.e., potencial produtivo intrínseco de cada genótipo) e de

tecnologia de produção das biomassas (i.e., sistemas de cultivo e manejo) entre aquelas amostras. Este resultado reforça a necessidade de definição de sistemas extratores adequados, de baixo custo e de alto rendimento, em processos produtivos de compostos de alto valor agregado e de reconhecida importância tecnológica nas áreas da aqüicultura e da nutrição e saúde humana.

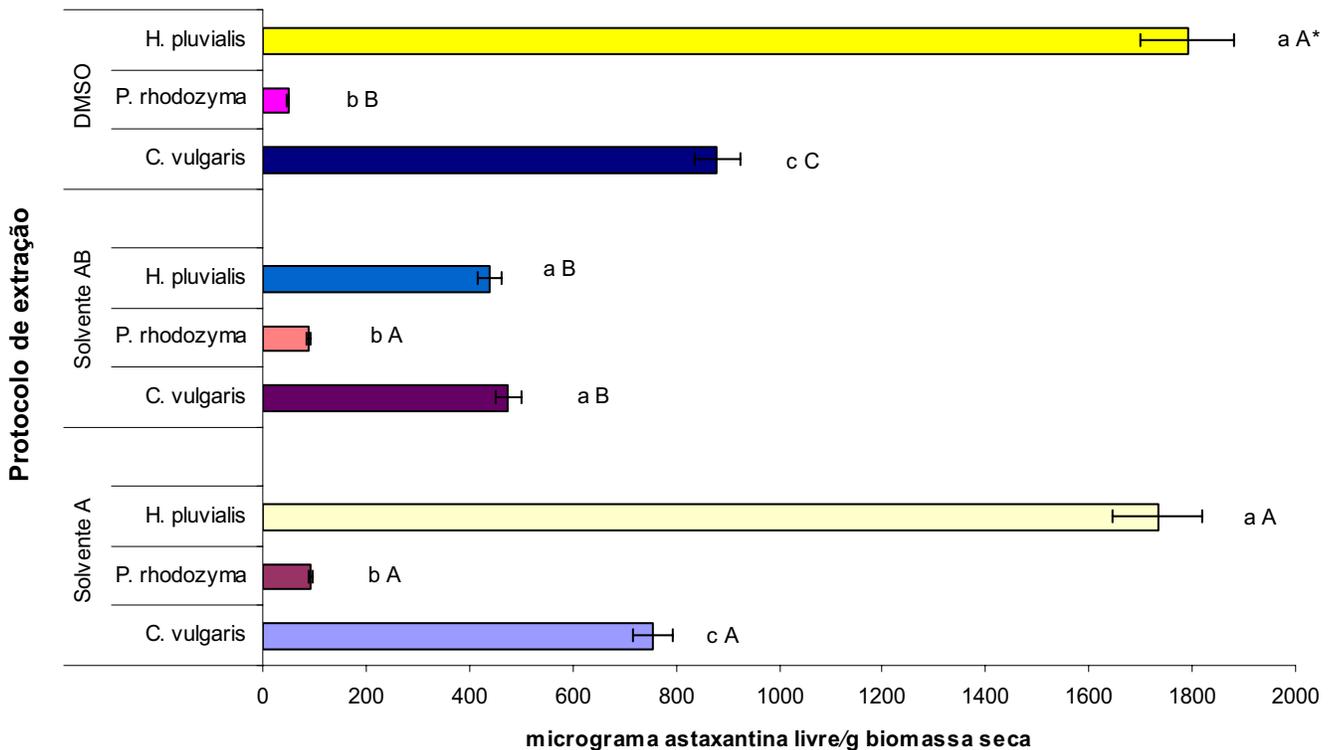


Figura 3 - Conteúdo de astaxantina livre de amostras de biomassas de microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* e de levedura *Phaffia rhodozyma*, segundo o método de extração DMSO, AB e A. Valores médios de três experimentos independentes (\**t*-student,  $p < 0,05$ ), segundo a espécie fonte de carotenóides em estudo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ( $p < 0,05$ ), segundo a fonte de carotenóides. Valores médios não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) para os métodos de extração, quando acompanhados pela mesma letra maiúscula.

Na análise dos resultados obtidos, é de interesse considerar que as discrepâncias observadas nos valores de concentração dos pigmentos carotenóides para os tratamentos em estudo podem estar relacionadas, em alguma extensão, à ligação destes compostos a macromoléculas tais como proteínas protoplasmáticas e polissacarídeos (CREMADES et al., 2003; VELU, 2003) nas amostras, dificultando sua extração. Além disto, a degradação enzimática dos compostos carotenóides pode ser observada

no decorrer da etapa de moagem das amostras, ainda que o efeito deste processo possa ser inibido com a utilização de agentes antioxidantes e/ou inibidores enzimáticos.

O protocolo que considera o pré-tratamento das amostras via adição de DMSO mostrou-se o mais eficiente para as amostras de microalgas, explicado pelo fato de que aquele solvente aprótico promove o inchamento das células dos microorganismos em estudo, favorecendo a extração dos carotenóides com solventes orgânicos subsequente (ANDREWES; STARR, 1976) (Figura 1). No que concerne aos resultados obtidos para *Phaffia rodozyma*, entretanto, tal fato não foi observado, ressaltando-se que esta levedura apresenta uma parede celular de espessura bastante proeminente, o que dificulta sobremaneira a extração dos pigmentos em análise (BONFIM, 1999).

Outros métodos de extração vêm sendo estudados, com o intuito de maximizar a extração dos carotenóides para posterior emprego alimentos, como é o caso do uso extração supercrítica associada ou não ao óleo de soja usado para a extração de carotenóides das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* (GOUVEIA et al., 2007; NOBRE et al., 2006)

Em estudo recente Nobre, et al., (2006), verificou que a extração de carotenóides de *Haematococcus pluvialis* com o uso do método *AB* mostrou resultados similares ao observado no presente trabalho para o conteúdo de carotenóides totais. No entanto, o método *DMSO* realizado neste estudo proporcionou ainda maiores percentagens de extração, cerca de 59,2% de carotenóides totais extraídos da microalga *Haematococcus pluvialis*.

Em outro estudo, Gouveia et al. (2006) apresenta concentrações na ordem de 4mg/g de carotenóides totais na microalga *Chlorella vulgaris*, um valor bastante próximo aos resultados encontrados dentro dos três métodos estudados: 4,4mg/g para o método *DMSO*, 3,4 mg/g para o método *AB*, e 3,8mg/g para o método *A*.

PASSOS et al. (2006) recentemente publicaram um estudo onde se verificou a extração de astaxantina por extração supercrítica e organosolventes na levedura *Phaffia rodozyma*. Os autores concluíram que a biomassa moída em moinhos de bola e extraída com acetona apresentava o maior rendimento dentro das técnicas estudadas.

Adicionalmente, a extração supercrítica mostrou ter um rendimento em torno de 75% comparada com a extração com acetona. A extração supercrítica mostra-se ser uma alternativa eficaz, e de alta qualidade, uma vez que esta proporciona seus extratos de forma limpa, sem resíduos de solventes orgânicos.

## CONCLUSÕES

Independentemente do método de extração escolhido, a microalga *Haematococcus pluvialis* parece ser a biomassa de escolha no que concerne à quantidade de carotenóides totais, assim como de astaxantina livre.

Entre os métodos de extração estudados, o método *DMSO* mostra ser de maior eficiência para a obtenção de carotenóides totais e astaxantina livre. Contudo, devido à alta toxicidade inerente aquele composto, este método deve ser reservado apenas para a quantificação em laboratório.

Sugere-se para estudos futuros uma análise detalhada sobre a facilidade em obtenção das três biomassas em análise e a sua produção de carotenóides em larga escala, com a finalidade de se obter a melhor relação custo-benefício entre os métodos e fontes de carotenóides estudadas.

## AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Tânia Bonfim por ter cedido a levedura *Phaffia rhodozyma* para este estudo. A CAPES pela Bolsa de Estudos de Renata dos Passos e de Danilo G. Moriel

## REFERÊNCIAS

- ANDREWES, A. G.; STARR, M. P. (3R, 3'R)-astaxanthin from yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry*, v. 15, p. 1009-1011, 1976.
- BONFIM, T. M. B. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Phaffia rhodozyma*) a partir de meios de cultura de baixo custo. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, 1999. 159p.
- CREMADES, O. et al. Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chemistry*, v. 82, p. 559–566, 2003.
- GOUVEIA, L.; GOMES, E.; EMPIS, J. Potential use of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v. 202, p. 75-79, 1996.
- GOUVEIA, L. et al. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research Technology*, v. 222, p. 362–367, 2006.
- GOUVEIA, L. et al. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, v. 101, p. 717-723, 2007.
- LATSCHA, T. *Carotenoids - their nature and significance in animal feeds*. Basel: Hoffman-La Roche Ltd, 110p. 1990.

- LIM, G-B. et al. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal*, n. 11, p. 181-187, 2002.
- MCCOY, M. Astaxanthin market a hard one to crack. *Chemical and Engineering News*, v. 77, n. 14, p. 15-17, 1999.
- MORIEL, D. G. et al. Effect of Feeding Methods on the Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Fed-Batch Process. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, v. 48, n. 3, pp. 397-401, 2005.
- NOBRE, N. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research Technology* v. 223, p. 787-790, 2006.
- PASSOS, R. et al. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rodoyima*. Supercritical carbon dioxide and organic solvents extraction. *Journal of Food technology*, v. 4, n. 1, p. 59-63, 2006.
- TORRISEN, O. J. Strategies for Salmonid pigmentation. *J. Appl. Technol.*, n. 11, p. 276-278, 2005.
- VELU, C. S., CZECZUGA, B., NUNUSWAMY, N. Carotenoprotein complexes in entomostracan crustaceans (*Streptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B. v. 135, p. 35-42, 2003. ❁