

GÉSSICA CAVALCANTI PEREIRA MOTA

**PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA A PARTIR DA MICROALGA *Haematococcus*
pluvialis: PROCESSOS, APLICAÇÕES E MERCADO**

Recife

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA

**PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA A PARTIR DA MICROALGA *Haematococcus*
pluvialis: PROCESSOS, APLICAÇÕES E MERCADO**

GÉSSICA CAVALCANTI PEREIRA MOTA

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez

Orientador

Ma. Laenne Barbara Silva de Moraes

Coorientadora

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M917p Mota, Géssica Cavalcanti Pereira
Produção de astaxantina a partir da microalga *Haematococcus pluvialis*: processos, aplicações e mercado / Géssica Cavalcanti Pereira Mota. - 2021.
36 f. : il.
- Orientador: Alfredo Olivera Galvez.
Coorientadora: Laenne Barbara Silva de Moraes.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Engenharia de Pesca, Recife, 2021.
1. Microalga. 2. Carotenóide. 3. Sistemas de cultivo. I. Galvez, Alfredo Olivera, orient. II. Moraes, Laenne Barbara Silva de, coorient. III. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA

**PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA A PARTIR DA MICROALGA *Haematococcus*
pluvialis: PROCESSOS, APLICAÇÕES E MERCADO**

Géssica Cavalcanti Pereira Mota

TCC julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca. Defendido e aprovado em __/__/__ pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez

(Orientador)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Profa. Dra. Danielli Matias de Macedo Dantas

(Membro titular)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Ma. Elizabeth Pereira dos Santos

(Membro titular)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Ma. Clarissa Vilela Figueiredo da Silva Campos

(Membro suplente)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Dedicatória

Dedico esta monografia à minha querida avó Maria do Carmo Cavalcanti, que sempre me apoiou nos meus sonhos e projetos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida que ele me concedeu.

Agradeço a minha mãe, Gerciane Cavalcanti, por todo o esforço investido na minha educação.

Ao meu padrasto, Antônio Vasconcelos, que sempre me apoiou. Esta monografia é a prova de que os esforços deles pela minha educação não foram em vão.

Aos meus irmãos Gerson e Gustavo pela amizade e atenção dedicadas quando sempre precisei.

Agradeço a minha família que sempre me apoiou.

Sou grata pela confiança depositada na minha proposta de projeto pelo meu professor Alfredo Olivera Gálvez, orientador do meu trabalho. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo.

Sou grata pela contribuição da minha coorientadora, Laenne Moraes.

Agradeço ao Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LPAVI) por esses anos de apoio.

Agradeço a FACEPE e ao Programa de Educação Tutorial pelas bolsas concedidas.

Agradeço aos amigos que me apoiaram.

Por último, quero agradecer também à Universidade Federal Rural de Pernambuco e todo o seu corpo docente.

Artigo científico

Produção de astaxantina a partir da microalga *Haematococcus pluviialis*: processos, aplicações e mercado

Astaxanthin production from microalga *Haematococcus pluviialis*: processes, applications and market

Géssica Cavalcanti Pereira Mota; Laenne Barbara Silva de Moraes; Alfredo Olivera Gálvez.

Artigo científico a ser encaminhado a Food Science and Technology International.

Todas as normas de redação e citação atendem as estabelecidas pela referida revista (<https://journals.sagepub.com/home/fst>).

Resumo

A astaxantina é um carotenoide com aplicações na saúde e nutrição humana e animal, biossintetizado por muitos microrganismos, entre esses a microalga *Haematococcus pluviialis*. O processo de biossíntese da astaxantina nessa microalga é realizado no citoplasma, iniciando-se na fase vegetativa do ciclo de vida e finalizando-se na fase cística, quando ocorre a indução dos carotenoides secundários através de mudanças físico-químicas no cultivo. A produção de *H. pluviialis* se dá em estruturas de cultivo abertas ou fechadas, em modos semi-contínuo, contínuo ou descontínuo, apresentando diferentes variáveis de crescimento, produtividades e características relacionadas à pureza da cultura. Os processos decorridos do cultivo da microalga para obtenção da astaxantina consistem em: colheita de biomassa, ruptura das células, secagem da biomassa e extração da astaxantina. Devido aos processos necessários para a produção de biomassa e astaxantina, os custos de produção são altos, a depender dos métodos de cultivo e processamento, todavia possui maior valor de mercado comparada às outras fontes de astaxantina. A produção de astaxantina a partir da *H. pluviialis* torna-se mais viável e sustentável quando aplicado o modelo de biorrefinaria, com a integração de bioprocessamentos a fim de obter produtos e coprodutos de alto valor, como proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos, bem como geração de energia, de modo a maximizar os benefícios e limitar os custos.

Palavras-chave: Microalga. Carotenoide. Sistemas de cultivo. Biomassa seca.

Abstract

Astaxanthin is a carotenoid with applications in human and animal health and nutrition, biosynthesized by many microorganisms, including the microalga *Haematococcus pluviialis*. The astaxanthin biosynthesis process in this microalga is carried out in the cytoplasm, starting in the vegetative phase of the life cycle and ending in the cystic phase, when secondary carotenoids are induced through physical-chemical changes in cultivation. The production of *H. pluviialis* occurs in open or closed cultivation structures, in semi-continuous, continuous or discontinuous modes, presenting different growth variables, productivity and characteristics related to the purity of the culture. The processes resulting from the cultivation of microalga to obtain astaxanthin consists of biomass harvest, cell disruption, drying of biomass and astaxanthin extraction. Due to the processes necessary to produce biomass and astaxanthin, the production costs are high, depending on the methods of cultivation and processing, however it has a higher market value compared to other astaxanthin sources. The astaxanthin production from *H. pluviialis* becomes more viable and sustainable when the biorefinery model is applied, with the integration of bioprocessing to obtain products and co-products of high value, such as proteins, lipids, carbohydrates and pigments, as well as energy generation, in order to maximize benefits and limit costs.

Keywords: Microalgae. Carotenoid. Cultivation systems. Dry biomass.

Lista de figuras

	Página
Figura 1 - Biossíntese de astaxantina na microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
Figura 2 - Esquema do processo de obtenção da astaxantina em <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Figura 3 - Modelo de biorrefinaria aplicado à <i>Haematococcus pluvialis</i>	24

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Produtividades de astaxantina proveniente de fontes naturais.....	15
Tabela 2- Histórico de produtividades em biomassa e astaxantina de <i>Haematococcus pluviialis</i>	20

Sumário

	Página
Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Artigo científico.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	x
1- Introdução.....	12
2- Biossíntese de astaxantina e microrganismos produtores.....	13
3- Metabolismo em <i>Haematococcus pluvialis</i>	16
4- Sistemas de cultivo da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
5- Processos de obtenção de astaxantina a partir de <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
6- Mercado da astaxantina.....	23
7- Conclusões.....	25
8- Referências.....	27

1 INTRODUÇÃO

2 A astaxantina é um carotenoide de propriedades químicas peculiares devido à sua
3 estrutura molecular. A presença dos grupos funcionais hidroxila e carbonila, a possibilidade de
4 esterificação e a configuração mais polar que outros carotenoides, fazem com que essa molécula
5 tenha maior ação antioxidante e anti-inflamatória (Hussein, 2006). Desse modo, exerce diversas
6 funções biológicas nos animais aquáticos, como proteção contra oxidação de ácidos graxos
7 poli-insaturados essenciais e efeitos da luz UV, aumento da resposta imunológica e influência
8 na coloração destes (Zuanon et al., 2011).

9 Ademais, esse carotenoide possui aplicações na nutrição e saúde humana,
10 principalmente contra danos oxidativos em células, apresentando efeitos em várias doenças,
11 incluindo câncer, hipertensão, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, gastrointestinais,
12 hepáticas, entre outras (Ambati et al., 2014). A astaxantina como um fator anticâncer, atua
13 promovendo a desaceleração do crescimento das células cancerígenas e modulando respostas
14 imunes contra células tumorais (Nagendraprabhu et al., 2011). Quando utilizada no tratamento
15 da obesidade, pode melhorar o desempenho físico e reduzir a gordura corporal (Aoi et al.,
16 2008). Além de atuar na saúde ocular e cerebral, proteção UV e saúde da pele (Yamashita,
17 2005; Nakagawa et al., 2011).

18 Majoritariamente, a produção em escala industrial de astaxantina dá-se por métodos
19 químicos, através de petroquímicos e derivados (Nguyen, 2013). Contudo, esse modo de
20 produção pode resultar em uma molécula com configuração diferente da natural e com
21 atividades biológicas mais atenuadas, além de ter produção com custo elevado e processos
22 complexos (Capelli et al., 2013; Nguyen, 2013). Esse produto sintético é aplicado,
23 principalmente, em ração para peixes, salmão e truta, para pigmentação do músculo (EFSA,
24 2014). Entretanto, não é adequado o uso desse tipo de astaxantina em detrimento da astaxantina
25 natural como suplemento nutracêutico para humanos, além de não ser condizente com o modelo
26 de bioeconomia e desenvolvimento sustentável (Capelli et al., 2013; Brendler e Williamson,
27 2019).

28 A astaxantina pode ser biossintetizada por muitos microrganismos, como leveduras,
29 bactérias e microalgas. A microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) é o
30 microrganismo com maior capacidade de acumular esse carotenoide, atingindo concentração
31 de até 5% do conteúdo celular (Valduga et al., 2009; Kim et al., 2015). Por conseguinte, a
32 astaxantina extraída de *H. pluvialis* dispõe do status “GRAS” (geralmente reconhecido como
33 seguro) da agência de alimentação e medicamentos dos Estados Unidos (US Food and Drug

34 Administration) e no Brasil já possui registro pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância
35 Sanitária), representando grande parte do mercado mundial de astaxantina (Capelli et al., 2013;
36 FDA, 2017; ANVISA, 2020).

37

38 **BIOSSÍNTESE DE ASTAXANTINA E MICRORGANISMOS PRODUTORES**

39 Carotenóides são isoprenóides lipofílicos tetraterpenos, compostos por cadeias
40 carbônicas longas, podendo apresentar um ou dois anéis de β -ionona (McGarvey e Croteau,
41 1995). São classificados em: carotenos, caracterizados pela presença de carbono e hidrogênio
42 (α e β -caroteno, β -cryptoxantina, licopeno); e xantofilas, que possuem também átomos de
43 oxigênio. No grupo das xantofilas encontra-se a astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4, 4'-
44 diona), molécula composta por dois anéis terminais de β -ionona, com um grupamento hidroxila
45 em cada anel (Jin et al., 2003). Em fontes naturais, a astaxantina apresenta-se se na forma livre
46 ou esterificada, sendo a forma esterificada mais estável e menos susceptível a degradação e
47 oxidação (Ambati et al., 2014).

48 A biossíntese da astaxantina ocorre a partir da formação do isopentenil pirofosfato (IPP)
49 por duas vias metabólicas: a rota dependente de mevalonato (MVA) e a rota do metileritritol
50 fosfato (MEP) (Rhommer, 1999). Nas microalgas clorofíceas, a síntese ocorre através da rota
51 MEP, iniciando-se na condensação entre o piruvato e o gliceraldeído, conversão em MEP,
52 formação de diferentes moléculas de pirofosfato, conversão estereo-específica em fitoeno,
53 insaturação em licopeno, ciclização em β -caroteno, que após reações de oxidação e
54 hidroxilação, resultará em astaxantina (Valduga et al., 2009). Já na rota MVA, o ácido
55 mevalônico é sintetizado a partir do acetil coenzima A e convertido em moléculas de
56 pirofosfato, seguindo o mesmo processo até a produção das xantofilas (Valduga et al., 2009).

57 A astaxantina pode ser produzida de forma sintética ou extraída de diversos organismos.
58 Dentre estes estão: as microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e
59 *Chlorococcum* spp. (Ma e Chen, 2001; Kim et al., 2015; Mao et al., 2018); as leveduras *Phaffia*
60 *rhodozyma*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Yarrowia lipolytica* (Stoklosa, Johnston e
61 Nghiem, 2019; Tramontin et al., 2019; Wang et al., 2019); e algumas bactérias, como
62 *Agrobacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Paracoccus* spp. e *Aurantiochytrium* (Ide et al.,
63 2012; Xuan et al., 2018; Watanabe et al., 2018). Os microrganismos produtores possuem
64 diferentes produtividades em biomassa e astaxantina (Tabela 1), sendo estes alguns dos fatores
65 que viabilizam ou dificultam sua aplicação industrial.

66 O conteúdo de astaxantina relatado nesses microrganismos está entre 0,04 e 2,7% do
67 peso seco, sendo *H. pluvialis* a fonte mais rica de produção natural de astaxantina, com
68 conteúdo de até 5%, estando presente majoritariamente na forma esterificada (Kim et al., 2015).
69 Entretanto, a produção de astaxantina a partir de microalgas possui algumas desvantagens,
70 como o longo período de cultivo comparado às leveduras e bactérias (aproximadamente 7 - 10
71 dias), e desafios a serem superados, desde o cultivo até o processamento da biomassa. Esses
72 fatores abrem possibilidade para o uso de leveduras e bactérias para este fim e estimulam
73 pesquisas referentes a utilização de cepas recombinantes, melhoradas geneticamente para a
74 produção de astaxantina e com maiores taxas de crescimento (Lu, Bu e Liu, 2017; Zhou et al.,
75 2017; Watanabe et al., 2018; Chou et al., 2019; Tramontin et al., 2019).

76 Além desses, outros organismos são capazes de acumular esse carotenoide, como o
77 salmão, a truta e os crustáceos (Ambati et al., 2014). Por consequência, é possível extrair
78 astaxantina de resíduos de crustáceos, como camarões, caranguejos e lagostas, para aplicação
79 em rações, todavia o conteúdo é inferior a 1 mg g⁻¹ de astaxantina (Ahmadkelayeh e Hawboldt,
80 2020). O uso de resíduos dos camarões *Farfantepenaeus paulensis* e *Penaeus monodon*, por
81 exemplo, provém concentrações de astaxantina de 53 e 84 µg g⁻¹ de biomassa (Sánchez-
82 Camargo et al., 2011; Radzali et al., 2014).

Tabela 1. Produtividades de astaxantina proveniente de fontes naturais.

Espécie	Biomassa seca (g L⁻¹)	Produtividade em biomassa (g L⁻¹ dia⁻¹)	Produtividade em Astaxantina (mg L⁻¹ dia⁻¹)	Conteúdo de Astaxantina (mg g⁻¹)	Referência
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3,0	0,43	25	50	Pereira e Otero (2020)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,6	0,12	0,62	3,9	Mao et al. (2018)
<i>Chlorococcum</i> sp.	10,1	1,44	8,36	5,8	Ma e Chen (2001)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	34,9	4,36	6,66	1,82	Stoklosa, Johnston e Nghiem (2019)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	5,9	1,18	1,34	1,14	Wang et al. (2019)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> *	3,33	0,67	3,12	4,67	Pan et al. (2020)
<i>Yarrowia lipolytica</i> *	56	28	48	6,0	Tramontin et al. (2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	5,83	1,77	14,2	8,1	Zhou et al. (2017)
<i>Paracoccus</i> sp.*	60	9,6	76,8	8	Ide et al. (2012)
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	-	-	-	23	Xuan et al. (2018)
<i>Escherichia coli</i> *	19,7	9,85	45,3	4,6	Lu, Bu e Liu (2017)
<i>Escherichia coli</i> *	-	-	-	8,3	Chou et al. (2019)
<i>Aurantiochytrium</i> sp. *	7,7	2,25	9,48	4,9	Watanabe et al. (2018)

* Cepas submetidas à mutagênese e engenharia genética.

83 **METABOLISMO EM *Haematococcus pluvialis***

84 A microalga *H. pluvialis* possui um ciclo de vida complexo, composto por duas fases e
85 quatro estágios: microzoóides, macrozoóides e palmela, pertencentes à fase vegetativa e,
86 aplanósporos ou hematocistos referentes à fase encistada (Shah et al., 2016). Sob condições
87 desfavoráveis de crescimento ou fatores de estresse, as células vegetativas sofrem mudanças de
88 morfologia, ocorrendo perda de flagelo e aumento de tamanho, podendo alcançar a fase cística,
89 transformando-se em aplanósporos (Nunes et al., 2013; Doria et al., 2018). Na fase vegetativa,
90 as células possuem 29 - 45% de proteínas, 15 - 17% de carboidratos e 20 - 25% de lipídios do
91 peso seco. Na fase cística, há 17 - 25% de proteínas, 37 - 74% de carboidratos, 32 - 37% de
92 lipídios e 2 - 5% de carotenóides, onde 80 - 99% é representado pela astaxantina (Shah et al.,
93 2016).

94 A rota metabólica de síntese da astaxantina em *H. pluvialis* é denominada metileritritol
95 fosfato (MEP), pois a produção do isopentenil pirofosfato (IPP), molécula chave da síntese dos
96 carotenóides, ocorre a partir do MEP (Shah et al., 2016). O processo de biossíntese da
97 astaxantina é realizado no citoplasma, iniciando-se na fase vegetativa (verde) do ciclo de vida
98 e finalizando-se na fase cística (vermelha), quando ocorre a indução dos carotenóides
99 secundários e o acúmulo em glóbulos lipídicos (Figura 1). A indução se dá em condições de
100 estresse, como: alta luminosidade (Doria et al., 2018), salinidade (Sarada et al., 2002), pH
101 (Hwang et al., 2019), tratamento elétrico (Kim et al., 2018), irradiação nuclear (Cheng et al.,
102 2016a), alta concentração de CO₂ (Cheng et al., 2016b), privação de nutrientes (Nunes et al.,
103 2013), relação carbono e nitrogênio (C/N) (Christian et al., 2018), fontes de carbono orgânico,
104 como acetato, glicose, glicerol, ribose e extrato de levedura (Tripathi et al., 1999; Pang e Chen,
105 2017) ou outros agentes químicos estimulantes, como asparagina e íons de ferro (Tripathi et al.,
106 1999; Cai et al., 2009).

107 Concomitantemente à produção de astaxantina, ocorre o acúmulo de lipídios, cujo perfil
108 de ácidos graxos é formado, principalmente, pelos ácidos oleico (18:1n9c), palmítico (16:0),
109 linoleico (18:2n6c), esteárico (18:0), linolênico (18:3n3) e linolelaídico (18:2n6t) (Damiani et
110 al., 2010; Saha et al., 2013). Os ácidos graxos produzidos por essa microalga podem ser
111 aplicados na nutrição animal e humana, além da produção de biocombustível, por serem
112 predominantemente saturados, com pequeno ou médio comprimento de cadeia carbônica
113 (Damiani et al., 2010; Saha et al., 2013). Considerando a rica diversidade de compostos
114 sintetizados pela *H. pluvialis*, além de ser reconhecida como a maior fonte de astaxantina (de
115 alto valor comercial), há grande possibilidade do seu uso em biorrefinaria, principalmente na

116 produção simultânea de astaxantina e biocombustível, já que a síntese de lipídios ocorre em
117 mesmas condições de cultivo e metabólicas (Solovchenko, 2015).

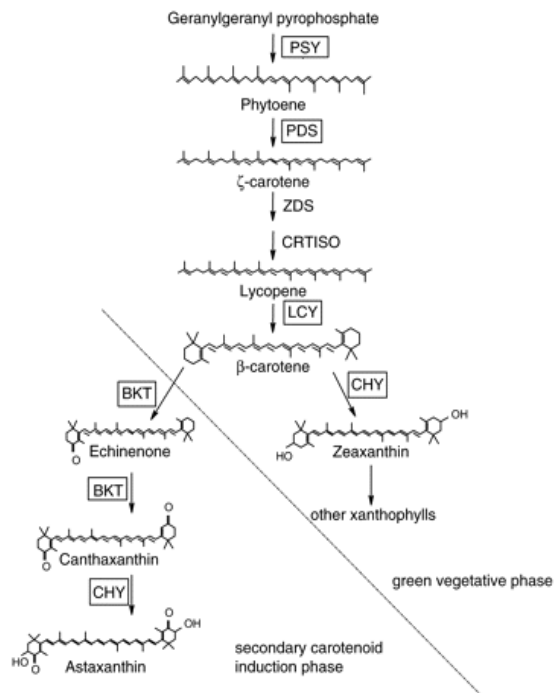


Figura 1. Biossíntese de astaxantina na microalga *Haematococcus pluvialis* (Vidhyavathi et al., 2008).

118 SISTEMAS DE CULTIVO DA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*

119 Baseado no metabolismo celular da microalga *H. pluvialis*, o sistema de cultivo pode
120 ser dividido em duas etapas: a primeira denominada fase vegetativa (verde), onde se obtém
121 máximo crescimento celular; e a segunda fase denominada de cística (indução), onde ocorre
122 síntese e acúmulo de astaxantina. Na primeira fase, as condições de cultura são controladas para
123 que as células permaneçam na fase vegetativa, quando ocorre intensa divisão celular. Ao atingir
124 densidade celular máxima, alguma condição física ou química é alterada de modo a induzir o
125 metabolismo para a síntese de astaxantina, ocorrendo assim, modificação na morfologia,
126 transformando-se em células císticas e ocasionando a redução ou inibição da divisão celular
127 (Park et al., 2014; Zhang et al., 2016).

128 A astaxantina também pode ser produzida pela *H. pluvialis* utilizando apenas uma etapa
129 de cultivo. Normalmente, envolve moderada privação de nitrogênio e irradiância média no
130 meio, que resulta em crescimento celular e acúmulo de astaxantina, simultaneamente (Del Río
131 et al., 2005; García-Malea et al., 2009). Entretanto, as condições ambientais que favorecem
132 esses dois fatores não possibilitam alcançar máximos rendimentos, uma vez que a divisão

133 celular é favorecida pela alta concentração de nitrogênio e a síntese de astaxantina pela
134 limitação de nitrogênio e alta luminosidade (Del Río et al., 2005; García-Malea et al., 2009).
135 Portanto, há muitas limitações acerca desse tipo de sistema como: crescimento lento, baixa
136 produtividade de biomassa, deterioração ou morte celular em condições de estresse e baixo ou
137 moderado acúmulo de astaxantina (Park et al., 2014; Zhang et al., 2016; Pang et al., 2019).

138 A *H. pluvialis* se adapta a diversas condições, alterando sua rota metabólica como
139 resposta às mudanças ambientais. Desse modo, possui a capacidade de crescer sob condições
140 de cultivo fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico (Zhang et al., 2016; Pang e Chen, 2017).
141 Em sistema fotoautotrófico, utilizam carbono inorgânico e luz como fonte de energia; em
142 cultivo heterotrófico, se utilizam de carbono orgânico e fonte de energia orgânica, sem presença
143 de luz; em modo mixotrófico são utilizados carbono orgânico e inorgânico, luz e compostos
144 orgânicos como fontes de energia (Perez-García e Bashan, 2015).

145 Em sistema exclusivamente fotoautotrófico, a fase de indução é normalmente acionada
146 através da privação de nutriente, principalmente nitrogênio, aumento da intensidade luminosa,
147 variação de pH ou salinidade, aplicados de forma isolada ou combinada (Nunes et al., 2013;
148 Christian et al., 2018; Doria et al., 2018). Neste sistema, as produtividades em biomassa variam
149 entre 0,03 e 0,33 g L⁻¹ dia⁻¹ (Harker et al., 1996; Kang et al., 2010) na fase vegetativa, e 0,01 a
150 0,7 g L⁻¹ dia⁻¹ (Harker et al., 1996; Li et al., 2020) na cística, atingindo biomassa seca final nas
151 fases vegetativa e cística de até 1,05 e 3,0 g L⁻¹, respectivamente (Azizi et al., 2020; Pereira e
152 Otero, 2020); enquanto a concentração de astaxantina varia de 0,4 à 190 mg L⁻¹ (Kang et al.,
153 2010; Gao et al., 2012), representando 0,8 à 4,7% do peso seco (Del Río et al., 2005; Kang et
154 al., 2010), com produtividades de 0,1 à 25 mg L⁻¹ dia⁻¹ (Lee e Soh, 1991; Pereira e Otero, 2020).

155 Por outro lado, em sistema de cultivo exclusivamente mixotrófico, a indução de
156 astaxantina ocorre através do acréscimo de carbono orgânico e/ou alta intensidade luminosa
157 (Pang e Chen, 2017; Doria et al., 2018; Pang et al., 2019). Dentre as fontes de carbono orgânico,
158 pode-se destacar, pelos altos valores de biomassa e astaxantina, o uso de acetato de sódio,
159 glicerol, gluconato e ribose. Ao utilizar ribose, como fonte de carbono orgânico, é possível obter
160 biomassa de 1,93 g L⁻¹ na fase vegetativa e 4,6 g L⁻¹ na cística, com conteúdo de astaxantina de
161 3,2% (Pang et al., 2019).

162 Ademais, são realizados estudos para otimizar o crescimento dessa microalga, de forma
163 a obter maior densidade celular na primeira fase e máximo acúmulo de astaxantina na segunda.
164 Sendo uma das possibilidades, a utilização do modo heterotrófico na fase vegetativa, com alto
165 crescimento celular, seguido do modo fotoautotrófico ou mixotrófico, estimulando o acúmulo

166 de astaxantina (Hata et al., 2001; Zhang et al., 2016). Em cultivos de duas etapas, sendo a
167 primeira heterotrófica e a segunda fotoautotrófica, foram obtidas biomassa seca de 4,5 até 7
168 g L⁻¹ para aplanósporos e produtividades de astaxantina de 4,4 a 10,5 mg L⁻¹ dia⁻¹ (Hata et al.,
169 2001; Zhang et al., 2016). Já quando se faz uso de primeira fase heterotrófica e segunda
170 mixotrófica (fotoindução), pode-se obter 26 g L⁻¹ de biomassa cística e produtividade em
171 astaxantina de até 15,6 mg L⁻¹ dia⁻¹ (Wan et al., 2015; Azizi, et al., 2020). Também é possível
172 a realização de cultivo fotoautotrófico seguido de mixotrófico, obtendo concentração de
173 biomassa de 12,3 g L⁻¹ e de astaxantina de 602 mg L⁻¹ (4,9% do conteúdo celular), com
174 produtividade de astaxantina de 15,84 mg L⁻¹ dia⁻¹, utilizando o processo de irradiação gradual
175 (Park et al., 2014).

176 A produção de *H. pluvialis* se dá em estruturas de cultivo abertas (tanques) ou fechadas
177 (fotobiorreatores), em modos semi-contínuo, contínuo ou descontínuo, apresentando diferentes
178 variáveis de crescimento, produtividades e características relacionadas à pureza da cultura
179 (Tabela 2). De modo comparativo, os fotobiorreatores oferecem maior segurança contra
180 contaminações e maiores produtividades em biomassa e astaxantina (Wan et al., 2015; Wen et
181 al., 2019). Em um estudo realizado por Wan et al. (2015), no mesmo período de fotoindução
182 (14 dias), obteve-se concentração de biomassa, teor e concentração de astaxantina de,
183 respectivamente, 0,6 g L⁻¹, 2,2% e 13,8 mg L⁻¹ em tanque tipo raceway, e 0,9 g L⁻¹, 2,8% e 24
184 mg L⁻¹ em fotobiorreator de coluna. No entanto, mesmo com produtividades menores, o uso de
185 tanques abertos para produção em larga escala apresenta vantagens pelos menores custos de
186 produção e investimento (Wan et al., 2015).

187 Ao utilizar culturas fotoautotróficas e mixotróficas em raceway, podem ser obtidas
188 biomassas de 58,22 g m⁻² (3,98 g m⁻² d⁻¹) em cultivo fotoautotrófico e 73,56 g m⁻²
189 (5,08 g m⁻² d⁻¹) em mixotrófico, após 14 dias de cultivo, com produtividade e teor de
190 astaxantina de 0,12 g m⁻² d⁻¹ e 2,7%, aproximadamente, para os dois modos de cultura (Wen et
191 al., 2019). No entanto, em relação à contaminação por bactérias, estas estão presentes em maior
192 abundância em cultura com uso de carbono orgânico (mixotrófica), alcançando UFC de 9 x 10⁵
193 mL⁻¹, três vezes maior do que em cultura fotoautotrófica (Wen et al., 2019). Contudo, essa
194 contaminação pode ser controlada em função das concentrações de nitrogênio e fósforo, já que
195 há correlação positiva entre a disponibilidade desses nutrientes no meio e a reprodução
196 bacteriana (Wen et al., 2019).

Tabela 2. Histórico de produtividades em biomassa e astaxantina de *Haematococcus pluvialis*

Referência	Sistema de cultivo	Unidade de cultivo	Meio de cultura	Biomassa seca (g L ⁻¹)	Produtividade da biomassa (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Conteúdo de Astaxantina	Produtividade de Astaxantina (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Harker et al. (1996)	Descontínuo	Reator airlift	BBM modificado	1,5	-	40 mg L ⁻¹	0,44
Del Río et al. (2005)	Contínuo	Coluna de Bolhas	Inorgânico basal	1,3	-	8 mg g ⁻¹	-
Aflalo et al. (2007)	Contínuo	Coluna de bolhas	BG-11	2,8	0,3	40 mg g ⁻¹	11,5
García-Malea et al. (2009)	Contínuo	Reator tubular	Inorgânico	-	0,7	-	8,0
Wang et al. (2013)	Descontínuo	Coluna de vidro	BG-11	6,0	0,7	180 mg L ⁻¹	13,5
Sun et al. (2015)	Semi-contínuo	Reator tubular	MCM	1,8	0,43	92 mg L ⁻¹	9,2
Christian et al. (2018)	Descontínuo	Frasco	MES-Volvox	0,8	-	36,23 mg g ⁻¹	-
Wang et al. (2019)	Semi-contínuo	Fotobiorreator de coluna	BBM modificado	20,1	1,34	271,5 mg L ⁻¹	18,1
Azizi et al. (2020)	Descontínuo	Fotobiorreator	BG-11	1,75	0,25	87 mg L ⁻¹	8,0
Cui et al. (2020)	Descontínuo	Frasco	BG-11 modificado	0,6	-	34,14 mg g ⁻¹	-
Li et al. (2020)	Contínuo	Coluna de bolhas	BG-11	2,0	0,66	38,02 mg g ⁻¹	11,4

198 **PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE ASTAXANTINA A PARTIR DE *Haematococcus***
199 ***pluvialis***

200 Os processos decorridos do cultivo da microalga para obtenção da astaxantina,
201 consistem em: colheita de biomassa, ruptura das células, secagem da biomassa e extração da
202 astaxantina (Figura 2). O modo de colheita da biomassa é baseado nas características
203 morfológicas da célula, como tamanho, peso específico, forma, concentração, e, na aplicação
204 final da biomassa (Lam e Lee, 2012). O método mais utilizado para *H. pluvialis*, em escala
205 comercial, é a centrifugação, precedida pelo assentamento (sedimentação) passivo celular,
206 devido a sua alta densidade (Han et al., 2013).

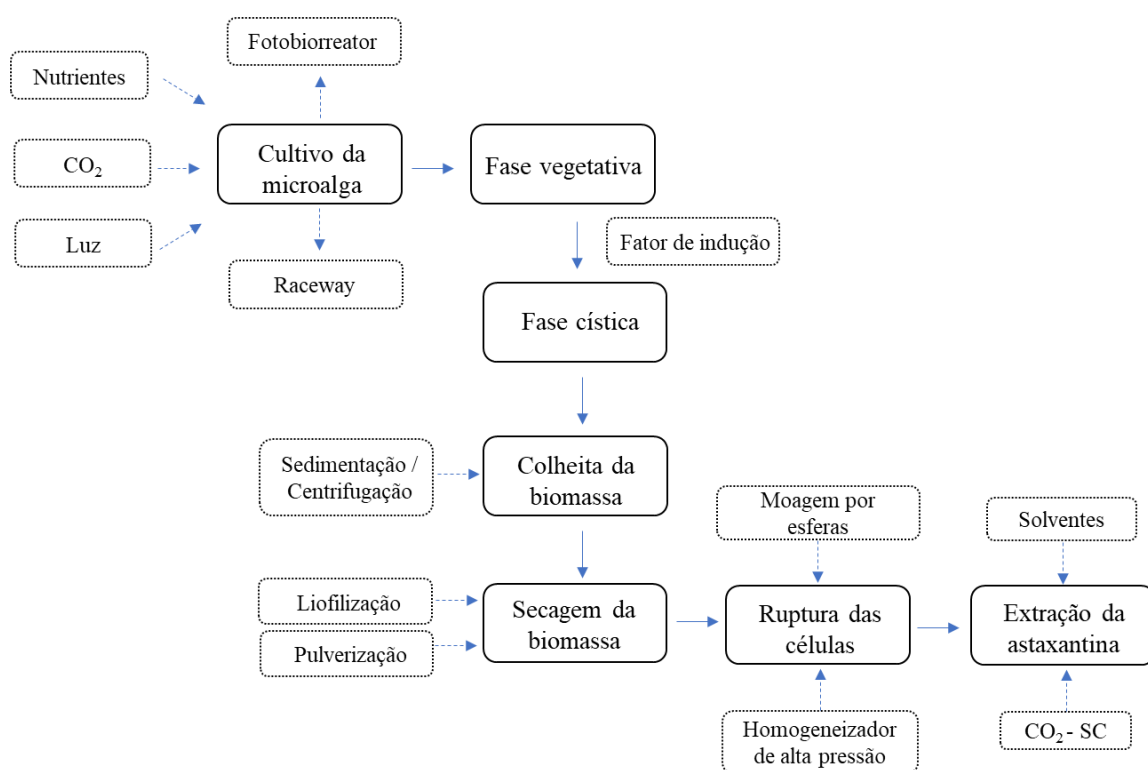


Figura 2. Esquema do processo de obtenção da astaxantina em *Haematococcus pluvialis*.

207 A secagem da biomassa deve ocorrer logo após a coleta da biomassa (que deve ser
208 congelada até a desidratação), de modo a preservar as propriedades físico-químicas da
209 astaxantina e oferecer maior tempo de prateleira, sendo os métodos mais apropriados: a
210 liofilização e a secagem por pulverização (Li et al., 2011). A liofilização (freeze drying)
211 consiste na retirada da água por sublimação, preservando de deterioração as biomoléculas
212 presentes na biomassa, sensíveis à alta temperatura, contudo possui alto custo em escala
213 comercial, sendo mais utilizada em pesquisas laboratoriais (Grima et al., 2003). Já a técnica de

214 secagem por pulverização (spray dryer), apesar de apresentar risco de deterioração aos
215 pigmentos e alto custo de operação, possui alta eficiência de recuperação da biomassa seca e
216 menor custo com relação à liofilização, sendo a técnica mais utilizada para extração de
217 biomoléculas, em escala comercial (Grima et al., 2003; Han et al., 2013).

218 A etapa de ruptura celular pode ser realizada antes ou após a secagem da biomassa e
219 tem por objetivo aumentar a eficácia de recuperação do conteúdo intracelular, devendo-se
220 conhecer a estrutura da parede celular da espécie em questão (Khoo et al., 2019). Os
221 hematocistos de *H. pluvialis* possuem parede celular composta por três camadas, sendo uma de
222 algaenano (trilaminar) e duas de celulose com manose (em diferentes arranjos), cuja espessura
223 é incrementada à medida que a célula acumula astaxantina, tornando-se rígida e firme (Hagen
224 et al., 2002; Sun et al., 2016).

225 Diante disso, é necessário o uso de métodos de pré-tratamento capazes de romper essa
226 resistência. Métodos mecânicos são os mais utilizados em escala industrial, tendo como
227 destaques a moagem por esferas (bead milling) e o homogeneizador de alta pressão (Shah et
228 al., 2016). O processo de moagem por esferas ocorre pela colisão de esferas minúsculas girando
229 em alta velocidade (Onumaegbu et al., 2018). Já o homogeneizador de alta pressão consiste em
230 uma ou duas bombas de deslocamento que forçam a suspensão de células sob uma alta pressão
231 (até 400 MPa) (Lee et al., 2012). Após a ruptura da parede celular é recomendado realizar a
232 extração da astaxantina rapidamente e proteger as células da exposição à luz (Khoo et al., 2019).
233 Em escala industrial, a ruptura celular dos aplanósporos é ainda uma etapa imprescindível,
234 contudo há a possibilidade de suprimi-la, através de um modelo de produção de cultivos
235 consecutivos, onde são manipuladas condições de crescimento e estresse, modificando a
236 pressão de turgescência e enzimas que contribuem para a resistência da parede celular (Sun et
237 al., 2016).

238 A extração de astaxantina pode ser realizada através de solventes, como hidrocarbonetos
239 alifáticos (hexano), álcoois (metanol, etanol), éter, acetona, ácidos ou bases concentradas
240 (dimetilsulfóxido, hidróxido de potássio), óleos comestíveis, enzimas, líquidos pressurizados e
241 dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) (Shah et al., 2016; Khoo et al., 2019). Dentre estas
242 técnicas, a utilização de solventes e CO₂-SC são consideradas as mais eficientes, compatíveis e
243 aplicadas para *H. pluvialis* (Shah et al., 2016). A extração por CO₂-SC é bastante utilizada
244 industrialmente, pois, comparado ao uso de solventes convencionais, apresenta baixa
245 toxicidade, menor tempo de extração, baixo custo, baixa degradação e alta pureza da astaxantina
246 (Zougagh et al., 2004). Quanto ao uso de solventes, é importante determinar seu tipo de acordo

247 com a aplicação industrial, pois muitos possuem alta toxicidade e podem causar efeitos adversos
248 à saúde humana (Khoo et al., 2019).

249

250 **MERCADO DA ASTAXANTINA**

251 O mercado mundial de astaxantina é avaliado em aproximadamente \$ 600 milhões e
252 estima-se crescimento maior que 3,5% ao ano entre 2019 e 2026 (GMI, 2019). O aumento da
253 demanda por este produto na aquicultura, na indústria de alimentos naturais e cosméticos tem
254 aumentado sua valorização e, em contrapartida, atraído novos produtores. Dessa maneira,
255 apresenta valor de venda entre U\$ 2.000,00 e U\$ 15.000,00 kg⁻¹ de astaxantina, tendo em vista
256 a procedência, nível de pureza e local de venda (Leu e Boussiba, 2014).

257 Quanto ao mercado de *H. pluvialis*, este está estimado em aproximadamente \$ 40
258 milhões e \$ 200 milhões para cultivos em raceways e fotobiorreatores (maior controle e pureza),
259 respectivamente (Lee e Boussiba, 2014). Devido aos processos necessários para a produção de
260 biomassa e extração da astaxantina, o custo de produção torna-se relativamente alto, variando
261 entre \$ 18 e \$ 100 kg⁻¹ de biomassa ou de \$ 650 à 2.500 kg⁻¹ de astaxantina, a depender dos
262 métodos de cultivo e processamento, além da aplicação comercial (Li et al., 2011; Lee e
263 Boussiba, 2014).

264 Quanto ao valor de mercado da astaxantina proveniente de microalga, este varia de
265 \$7.000 à 15.000 kg⁻¹, já a oriunda de fungos fermentados, possui valor expressivamente menor,
266 cerca de \$ 2.500 kg⁻¹ (Li et al., 2011; Lee e Boussiba, 2014). Essa diferença ocorre em razão da
267 estrutura da molécula, onde a astaxantina derivada de fungos apresenta menor atividade
268 biológica, o que restringe seu uso, não sendo totalmente recomendada para consumo humano
269 (Nguyen, 2013).

270 Em oposição aos custos de produção da astaxantina natural está a forma sintética,
271 apresentando custos próximos à \$ 1.000 kg⁻¹ e dominando o mercado comercial, todavia o preço
272 de mercado é de aproximadamente \$ 2.000 kg⁻¹, bastante inferior ao da astaxantina de
273 microalga, por conta das restrições de uso (Li et al., 2011; Nguyen, 2013). A astaxantina
274 sintética apresenta estereoisômeros que afetam a estabilidade da molécula e por utilizar
275 petroquímicos em sua formulação pode ser tóxica e carcinogênica (Nguyen, 2013, Khoo et al.,
276 2019). Por isso, é geralmente utilizada para alimentação animal, não sendo recomendado seu
277 uso em nutrição humana, cosméticos e fármacos (Nguyen, 2013).

278 Ademais, estudos realizados *in vitro* pela Escola de Farmácia da Universidade de
279 Creighton, constataram que o poder antioxidante da astaxantina natural é de 20 à 50 vezes maior

280 do que a astaxantina sintética, sendo recomendadas doses 20 à 30 vezes maior de astaxantina
281 sintética para obter similar efeito da natural (Capelli et al., 2013). No entanto, a forma sintética
282 ainda necessita de testes de segurança para uso humano direto e não foram documentados
283 benefícios fisiológicos em humanos (Capelli et al., 2013; Brendler e Williamson, 2019). Além
284 do que, seu processo de produção possui alto impacto ambiental e não faz uso de recursos
285 renováveis, antagônico ao modelo de bioeconomia (Khoo et al., 2019).

286 Por ser um produto de alto valor comercial, a astaxantina por si só justifica os altos
287 custos dos sistemas de cultivo e processamento da *H. pluvialis*, tornando-se uma atividade
288 economicamente viável (Shah et al., 2016). No entanto, a produção de astaxantina a partir desta
289 microalga torna-se mais viável e sustentável quando aplicado o modelo de biorrefinaria
290 (Figura 3). Nesta abordagem, há a integração de bioprocessamentos a fim de obter produtos e
291 coprodutos de alto valor, eliminando resíduos. As biorrefinarias algais permitem o
292 processamento de múltiplos produtos da biomassa, como proteínas, lipídios, carboidratos e
293 pigmentos, bem como geração de energia, através do arranjo das configurações de produção,
294 utilizando uma única matéria-prima, de modo a maximizar os benefícios e limitar os custos
295 (Chew et al., 2017).

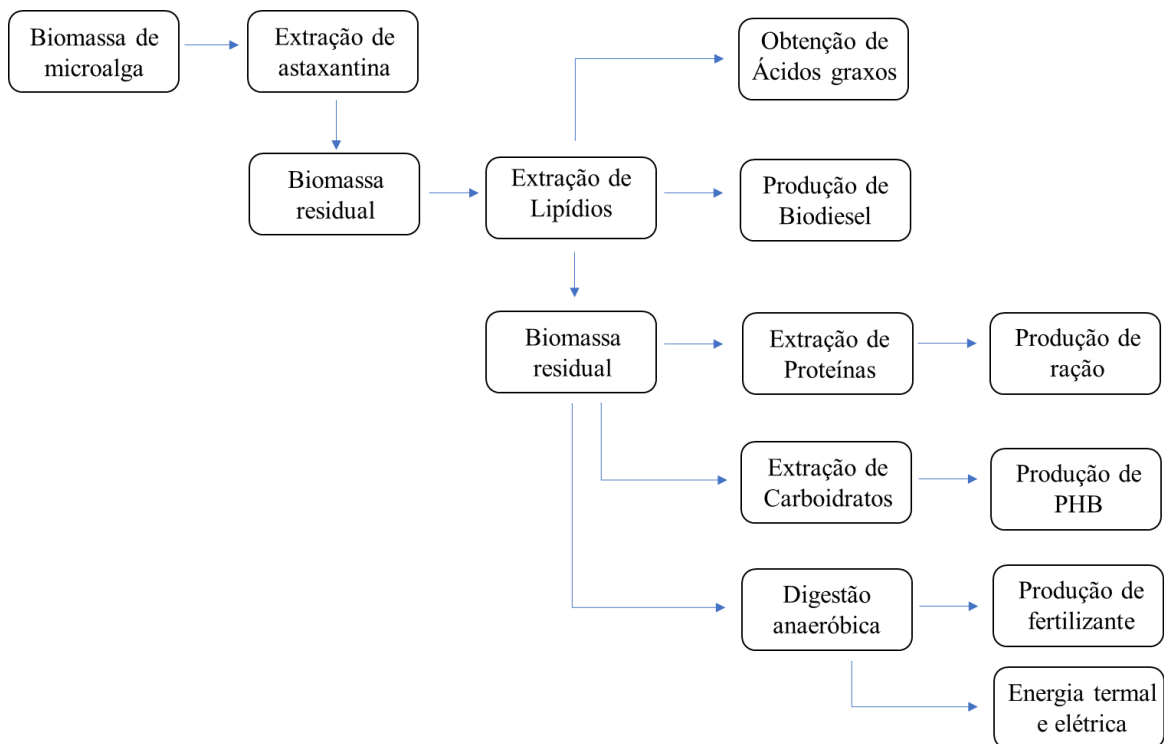


Figura 3. Modelo de biorrefinaria aplicado à *Haematococcus pluvialis*.

296 Nessa perspectiva, há a possibilidade de produção simultânea de astaxantina
297 (bioproduto principal e de maior valor), polihidroxibutirato e triglicerídeos, tornando-a fonte
298 potencial de biodiesel e biopolímeros, além de usar a biomassa residual na geração de biogás,
299 alimentando o próprio sistema (Solovchenko, 2015; Prieto et al., 2017). Ademais, a biomassa
300 residual (pós extração de astaxantina), pode ser utilizada para produzir alimentos ricos em
301 proteínas para consumo animal, metano por digestão anaeróbica para gerar energia elétrica ou
302 térmica destinada às instalações produtivas, fertilizante orgânico, como fonte de carbono em
303 indústrias de fermentação, entre outros (Chist, 2007; Chew et al., 2017).

304 O conceito de biorrefinaria está estritamente relacionado ao modelo de economia
305 circular, cuja visão é o crescimento econômico a partir do desenvolvimento sustentável. Nesse
306 modelo de economia, o sistema industrial é desenhado e executado de modo regenerativo e
307 restaurador, fazendo uso de energias renováveis e eliminando resíduos (EMAF, 2013). Outra
308 premissa é que os componentes consumíveis de um produto sejam formados por ingredientes
309 biológicos ou “nutrientes” não tóxicos e benéficos que possam ser devolvidos com segurança à
310 biosfera (EMAF, 2013), tal como a astaxantina produzida através da microalga *H. pluvialis* em
311 modelo de biorrefinaria. Esse modelo de bioeconomia é voltado para o aumento da eficiência
312 de produção e possui altas perspectivas de avanço (Ghisellini et al., 2016).

313

314 **CONCLUSÕES**

315 A microalga *Haematococcus pluvialis* é o microrganismo com maior capacidade de
316 acumular astaxantina, carotenoide com ação antioxidante e anti-inflamatória que exerce
317 diversas funções biológicas e possui aplicações nas indústrias de alimentação, cosméticos e
318 fármacos. A biossíntese de astaxantina nesta microalga inicia-se na fase vegetativa do ciclo de
319 vida - fase em que ocorre maior divisão celular - e finaliza-se na fase cística, quando ocorre a
320 indução dos carotenoides secundários através de fatores físico-químicos como luminosidade,
321 pH e disponibilidade de nutrientes.

322 O processo de produção de astaxantina em *H. pluvialis* inicia-se com o cultivo da
323 microalga que ocorre em tanques abertos ou fotobiorreatores. O sistema de cultivo aplicado
324 pode ser do tipo semi-contínuo, contínuo ou descontínuo, nos modos fotoautotrófico,
325 heterotrófico ou mixotrófico, propiciando diferentes valores de produtividades em biomassa e
326 astaxantina, bem como o nível de pureza da cultura e da biomolécula. Tanto as estruturas quanto
327 o modo de cultivo podem ser modificados de acordo com a fase, a fim de incrementar o
328 crescimento (na fase vegetativa) ou o acúmulo de astaxantina (na fase cística).

329 Os processos decorridos do cultivo da microalga para obtenção da astaxantina consistem
330 em: colheita de biomassa, ruptura das células, secagem da biomassa e extração da astaxantina.
331 O método de colheita da biomassa mais utilizado em escala comercial é a centrifugação,
332 precedida pela sedimentação. Já a secagem da biomassa ocorre através de secagem por
333 pulverização ou liofilização, precedida ou sucedida pela ruptura celular, cujo objetivo é
334 aumentar a eficácia de recuperação do conteúdo intracelular. Dentre as técnicas utilizadas para
335 extração de astaxantina, a do dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) é considerada a mais
336 eficiente, compatível e aplicada para *H. pluvialis*.

337 No mercado, a astaxantina proveniente de fontes naturais como microalgas e leveduras
338 compete com a forma sintética, ainda dominante em escala industrial, porém com valor de
339 mercado abaixo da forma natural, uso não recomendado para humanos e processo de produção
340 de alto impacto ambiental. O maior valor de mercado para este bioproduto é alcançado com a
341 microalga *H. pluvialis*, entretanto está acompanhado pelos altos custos de produção que podem
342 ser minimizados com a aplicação da biorrefinaria, obtendo produtos e coprodutos de alto valor.

343 REFERÊNCIAS

- 344 Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., & Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two-
345 vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus*
346 *pluvialis*. *Biotechnology and bioengineering*, 98(1), 300-305.
- 347 Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources,
348 extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Marine*
349 *drugs*, 12(1), 128-152.
- 350 Ahmadkelayeh, S., & Hawboldt, K. (2020). Extraction of lipids and astaxanthin from
351 crustacean by-products: A review on supercritical CO₂ extraction. *Trends in Food Science &*
352 *Technology*.
- 353 ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. (2020). Disponível em:
354 <https://consultas.anvisa.gov.br/#/alimentos/25351112295201511/>. Acesso em: 10 dez. 2020.
- 355 Aoi, W., Naito, Y., Takanami, Y., Ishii, T., Kawai, Y., Akagiri, S., ... & Yoshikawa, T. (2008).
356 Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative
357 CPT I modification. *Biochemical and biophysical research communications*, 366(4), 892-897.
- 358 Azizi, M., Motesshafi, H., & Hashemi, M. (2020). A novel CO₂ steady feeding based on the pH
359 steady strategy data in the *Haematococcus pluvialis* cultivation to maximize the cell growth
360 and carbon bio-sequestration. *Bioresource Technology*, 123752.
- 361 Brendler, T., & Williamson, E. M. (2019). Astaxanthin: How much is too much? A safety
362 review. *Phytotherapy Research*, 33(12), 3090-3111.
- 363 Cai, M., Li, Z., & Qi, A. (2009). Effects of iron electrovalence and species on growth and
364 astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and*
365 *Limnology*, 27(2), 370.
- 366 Capelli, B., Bagchi, D., & Cysewski, G. R. (2013). Synthetic astaxanthin is significantly inferior
367 to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical
368 supplement. *Nutrafoods*, 12(4), 145-152.
- 369 Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J., & Cen, K. (2016a). Enhancing the growth rate and
370 astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of
371 carbon dioxide stress. *Bioresource technology*, 204, 49-54.

372 Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Lu, H., Zhou, J., & Cen, K. (2016b). Gradient domestication of
373 *Haematococcus pluvialis* mutant with 15% CO₂ to promote biomass growth and astaxanthin
374 yield. *Bioresource Technology*, 216, 340-344.

375 Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., ... & Chang, J. S.
376 (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource*
377 *technology*, 229, 53-62.

378 Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.

379 Chou, Y. L., Ko, C. Y., Yen, C. C., Chen, L. F. O., & Shaw, J. F. (2019). Multiple promoters
380 driving the expression of astaxanthin biosynthesis genes can enhance free-form astaxanthin
381 production. *Journal of microbiological methods*, 160, 20-28.

382 Christian, D., Zhang, J., Sawdon, A. J., & Peng, C. A. (2018). Enhanced astaxanthin
383 accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light
384 illumination. *Bioresource Technology*, 256, 548-551.

385 Cui, J., Yu, C., Zhong, D. B., Zhao, Y., & Yu, X. (2020). Melatonin and calcium act
386 synergistically to enhance the coproduction of astaxanthin and lipids in *Haematococcus*
387 *pluvialis* under nitrogen deficiency and high light conditions. *Bioresource Technology*, 305,
388 123069.

389 Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in
390 *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource*
391 *technology*, 101(11), 3801-3807.

392 Del Río, E., Acién, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E., & Guerrero, M.
393 G. (2005). Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus*
394 *pluvialis* in continuous culture. *Biotechnology and bioengineering*, 91(7), 808-815.

395 Doria, E., Temporiti, M. E. E., Damiani, M. C., Popovich, C. A., Leonardi, P. I., & Nielsen, E.
396 (2018). Influence of light stress on the accumulation of xanthophylls and lipids in
397 *Haematococcus pluvialis* CCALA 1081 grown under autotrophic or mixotrophic conditions.

398 EFSA - Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. (2014). Scientific
399 Opinion on the safety and efficacy of synthetic astaxanthin as feed additive for salmon and
400 trout, other fish, ornamental fish, crustaceans and ornamental birds. *EFSA journal*, 12(6), 3724.

401 EMAF - Ellen MacArthur Foundation (2013). *Towards the Circular Economy*. London, UK.

402 FDA - Food and Drug Administration (2017). Disponível em:
403 <https://www.fda.gov/media/110185/download>. Acesso em: 13 dez. 2020.

404 Gao, Z., Meng, C., Zhang, X., Xu, D., Miao, X., Wang, Y., ... & Ye, N. (2012). Induction of
405 salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin
406 accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and microbial technology*, *51*(4), 225-230.

407 García-Malea, M. C., Acién, F. G., Del Río, E., Fernández, J. M., Cerón, M. C., Guerrero, M.
408 G., & Molina-Grima, E. (2009). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking
409 the one-step system outdoors. *Biotechnology and bioengineering*, *102*(2), 651-657.

410 Ghisellini, P., Cialani, C., & Ulgiati, S. (2016). A review on circular economy: the expected
411 transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *Journal of Cleaner*
412 *production*, *114*, 11-32.

413 GMI - Global Market Insights. (2019). Disponível em: [https://www.gminsights.com/industry-](https://www.gminsights.com/industry-analysis/astaxanthin-market)
414 [analysis/astaxanthin-market](https://www.gminsights.com/industry-analysis/astaxanthin-market) Acesso em: 13 dez. 2020.

415 Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. A., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery
416 of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology*
417 *advances*, *20*(7-8), 491-515. doi:10.1016/S0734- 9750(02)00050-2

418 Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the
419 cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore
420 formation. *European Journal of Phycology*, *37*(2), 217-226.

421 Han, D., Li, Y., & Hu, Q. (2013). Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus*
422 *pluvialis*. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2ndEdn.,
423 eds A. Richmond and Q. Hu (Hoboken, NJ: Blackwell), 388-405.
424 doi:10.1002/9781118567166.ch20.

425 Harker, M., Tsavalos, A. J., & Young, A. J. (1996). Autotrophic growth and carotenoid
426 production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of*
427 *fermentation and bioengineering*, *82*(2), 113-118.

428 Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., & Tanaka, H. (2001). Production of
429 astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic
430 culture. *Journal of Applied Phycology*, 13(5), 395-402.

431 Hwang, S. W., Choi, H. I., & Sim, S. J. (2019). Acidic cultivation of *Haematococcus pluvialis*
432 for improved astaxanthin production in the presence of a lethal fungus. *Bioresource*
433 *technology*, 278, 138-144.

434 Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a
435 carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of natural products*, 69(3),
436 443-449.

437 Ide, T., Hoya, M., Tanaka, T., & Harayama, S. (2012). Enhanced production of astaxanthin in
438 *Paracoccus* sp. strain N-81106 by using random mutagenesis and genetic
439 engineering. *Biochemical engineering journal*, 65, 37-43.

440 Jin, E. O. N. S. E. O. N., Polle, J. E., Lee, H. K., Hyun, S. M., & Chang, M. (2003). Xanthophylls
441 in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal*
442 *of microbiology and biotechnology*, 13(2), 165-174.

443 Kang, C. D., Han, S. J., Choi, S. P., & Sim, S. J. (2010). Fed-batch culture of astaxanthin-rich
444 *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light
445 supplementation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(1), 133.

446 Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent
447 advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource*
448 *technology*, 288, 121606.

449 Kim, J. H., Affan, M. A., Jang, J., Kang, M. H., Ko, A. R., Jeon, S. M., ... & Kang, D. H. (2015).
450 Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green
451 microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from
452 Korea. *J. Microbiol. Biotechnol*, 25(2), 238-246.

453 Kim, J. Y., Lee, C., Jeon, M. S., Park, J., & Choi, Y. E. (2018). Enhancement of microalga
454 *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical
455 treatment. *Bioresource technology*, 268, 815-819.

- 456 Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012). Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and
457 the way forward. *Biotechnology advances*, 30(3), 673-690.
- 458 Lee, Y. K., & Soh, C. W. (1991). Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris*
459 (chlorophyta) 1. *Journal of phycology*, 27(5), 575-577.
- 460 Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the
461 extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Biomass and*
462 *bioenergy*, 46, 89-101.
- 463 Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high-value products by
464 microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 169-183.
- 465 Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin
466 production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*,
467 29(6), 568-574.
- 468 Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Ke, H., ... & Yang, S. (2020). Enhanced Biomass
469 and Astaxanthin Production of *Haematococcus pluvialis* by a Cell Transformation Strategy
470 with Optimized Initial Biomass Density. *Marine Drugs*, 18(7), 341.
- 471 Lu, Q., Bu, Y. F., & Liu, J. Z. (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing
472 astaxanthin as the predominant carotenoid. *Marine drugs*, 15(10), 296.
- 473 Ma, R. Y. N., & Chen, F. (2001). Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species
474 in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnology letters*, 23(7), 519-523.
- 475 Mao, X., Wu, T., Sun, D., Zhang, Z., & Chen, F. (2018). Differential responses of the green
476 microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin
477 production. *Bioresource technology*, 249, 791-798.
- 478 McGarvey D.J., Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1015–1026.
- 479 Nagendraprabhu, P., & Sudhandiran, G. (2011). Astaxanthin inhibits tumor invasion by
480 decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon
481 carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Investigational*
482 *new drugs*, 29(2), 207-224.

483 Nakagawa, K., Kiko, T., Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Kimura, F., Satoh, A., & Miyazawa,
484 T. (2011). Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human
485 erythrocytes. *British journal of nutrition*, 105(11), 1563-1571.

486 Nguyen, K. D. (2013). Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS. Natural Production.
487 Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works.
488 http://trace.tennessee.edu/utk_chembiopubs/94

489 Nunes, M., Vieira, A. A. H., Pinto, E., Carneiro, R. L., & Monteiro, A. C. (2013).
490 Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* cells induced by light and nutrient
491 stresses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 825-832.

492 Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., & Olabi, A. G. (2018). Pre-treatment methods for
493 production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy*
494 *Reviews*, 93, 16-26.

495 Pan, X., Wang, B., Duan, R., Jia, J., Li, J., Xiong, W., ... & Lu, Y. (2020). Enhancing
496 astaxanthin accumulation in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a phytohormone:
497 metabolomic and gene expression profiles. *Microbial Biotechnology*.

498 Pang, N., & Chen, S. (2017). Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity
499 of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Algal Research*, 21, 227-235.

500 Pang, N., Fu, X., Fernandez, J. S. M., & Chen, S. (2019). Multilevel heuristic LED regime for
501 stimulating lipid and bioproducts biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic
502 conditions. *Bioresource technology*, 288, 121525.

503 Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M. E., & Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production
504 from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light
505 irradiation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(10), 2039-2047.

506 Pereira, S., & Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of
507 light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic
508 response. *Algal Research*, 51, 102027.

509 Perez-García, O., & Bashan, Y. (2015). Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for
510 bio-refining: from metabolic routes to techno-economics. In *Algal biorefineries* (pp. 61-131).
511 Springer, Cham.

512 Prieto, C. V. G., Ramos, F. D., Estrada, V., Villar, M. A., & Diaz, M. S. (2017). Optimization
513 of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and
514 PHB. *Energy*, *139*, 1159-1172.

515 Radzali, S. A., Baharin, B. S., Othman, R., Markom, M., & Rahman, R. A. (2014). Co-solvent
516 selection for supercritical fluid extraction of astaxanthin and other carotenoids from *Penaeus*
517 *monodon* waste. *Journal of oleo science*, ess13184.

518 Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid
519 biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural product reports*, *16*(5), 565-574.

520 Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., & Murray, P. (2013). Effect of
521 various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus*
522 *pluvialis*. *Bioresource technology*, *128*, 118-124.

523 Sánchez-Camargo, A. P., Martínez-Correa, H. A., Paviani, L. C., & Cabral, F. A. (2011).
524 Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste
525 (*Farfantepenaeus paulensis*). *The Journal of Supercritical Fluids*, *56*(2), 164-173.

526 Sarada, R., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin
527 production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process*
528 *Biochemistry*, *37*(6), 623-627.

529 Shah, M., Mahfuzur, R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing
530 green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial
531 products. *Frontiers in plant science*, *7*, 531.

532 Solovchenko, A. E. (2015). Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation
533 by microalgal cell. *Photosynthesis research*, *125*(3), 437-449.

534 Stoklosa, R. J., Johnston, D. B., & Nghiem, N. P. (2019). *Phaffia rhodozyma* cultivation on
535 structural and non-structural sugars from sweet sorghum for astaxanthin generation. *Process*
536 *Biochemistry*, *83*, 9-17.

537 Sun, H., Kong, Q., Geng, Z., Duan, L., Yang, M., & Guan, B. (2015). Enhancement of cell
538 biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*,
539 *186*, 67-73.

540 Sun, H., Guan, B., Kong, Q., Geng, Z., & Wang, N. (2016). Repeated cultivation: non-cell
541 disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. *Scientific reports*, 6, 20578.

542 Tramontin, L. R. R., Kildegaard, K. R., Sudarsan, S., & Borodina, I. (2019). Enhancement of
543 astaxanthin biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via microalgal
544 pathway. *Microorganisms*, 7(10), 472.

545 Tripathi, U., Sarada, R., Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (1999). Production of astaxanthin in
546 *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68(2), 197-199.

547 Valduga, E., Tatsch, P. O., Tiggemann, L., Treichel, H., Toniazzo, G., Zeni, J., ... & Fúrigo
548 Júnior, A. (2009). Carotenoids production: Microorganisms as source of natural dyes. *Química
549 Nova*, 32(9), 2429-2436.

550 Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2008). Regulation of
551 carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga
552 *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental
553 Botany*, 59(6), 1409-1418.

554 Wan, M., Zhang, Z., Wang, J., Huang, J., Fan, J., Yu, A., ... & Li, Y. (2015). Sequential
555 heterotrophy–dilution–photoinduction cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient
556 production of astaxanthin. *Bioresource technology*, 198, 557-563.

557 Wang, J., Han, D., Sommerfeld, M. R., Lu, C., & Hu, Q. (2013). Effect of initial biomass density
558 on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor
559 photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 253-260.

560 Wang, F., Gao, B., Wu, M., Huang, L., & Zhang, C. (2019). A novel strategy for the hyper-
561 production of astaxanthin from the newly isolated microalga *Haematococcus pluvialis*
562 JNU35. *Algal research*, 39, 101466.

563 Wang, B., Pan, X., Jia, J., Xiong, W., Manirafasha, E., Ling, X., & Yinghua, L. (2019). Strategy
564 and regulatory mechanisms of glutamate feeding to enhance astaxanthin yield in
565 *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and microbial technology*, 125, 45-52.

566 Watanabe, K., Arafiles, K. H. V., Higashi, R., Okamura, Y., Tajima, T., Matsumura, Y., ... &
567 Aki, T. (2018). Isolation of high carotenoid-producing *Aurantiochytrium* sp. mutants and

568 improvement of astaxanthin productivity using metabolic information. *Journal of oleo*
569 *science*, 67(5), 571-578.

570 Wen, X., Wang, Z., Ding, Y., Geng, Y., & Li, Y. (2019). Enhancing the production of
571 astaxanthin by mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in open raceway ponds.
572 *Aquaculture International*, 1-14.

573 Xuan, L. T., Ha, P. T., Hoang, N. H., Lien, N. T. K., Phuong, N. T. D., Huy, N. Q., & Thoa, N.
574 K. (2018). Selection of bacterial strains belonging to the astaxanthin producing *Paracoccus*
575 *genus*. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 16(3), 565-572.

576 Yamashita, E. (2005). The effects of a dietary supplement containing astaxanthin on skin
577 condition. *Food Style* 21, 9(9), 72.

578 Zhang, Z., Wang, B., Hu, Q., Sommerfeld, M., Li, Y., & Han, D. (2016). A new paradigm for
579 producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology*
580 *and bioengineering*, 113(10), 2088-2099.

581 Zhou, P., Xie, W., Li, A., Wang, F., Yao, Z., Bian, Q., ... & Ye, L. (2017). Alleviation of
582 metabolic bottleneck by combinatorial engineering enhanced astaxanthin synthesis in
583 *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 100, 28-36.

584 Zougagh, M., Valcárcel, M., & Ríos, A. (2004). Supercritical fluid extraction: a critical review
585 of its analytical usefulness. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(5), 399-405.

586 Zuanon, J. A. S., Salaro, A. L., & Furuya, W. M. (2011). Produção e nutrição de peixes
587 ornamentais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 165-174.