

**DETERMINAREA DEPENDENȚEI CORELAȚIONALE DINTRE  
VALORILE TESTULUI ABTS ȘI CONȚINUTUL DE CAROTENOIZI  
ÎN EXTRACTELE ETANOLICE DIN BIOMASA ALGEI VERZI  
*HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

**Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Chiriac T., Valuța A., Djur S.,  
Sadovnic D., Rudic V.**

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei*

**Rezumat**

A fost determinată existența unei corelări foarte puternice  $R^2=0,9$  dintre conținutul de carotenoizi și valorile testului ABTS în extractele etanolice, obținute în baza biomasei de *Haematococcus pluvialis*, colectată în faza celulelor verzi mobile și ciștii roșii. Acest tip de corelare este caracteristic carotenului din complexul antioxidant extras din biomasa algală verde și astaxantinei, obținută din ciștii roșii. Dependența dată se respectă și în cazul modulării activității biosintetice la *Haematococcus* prin aplicarea compușilor coordinați ai cobaltului cu bazele Schiff.

*Cuvinte cheie:* carotenoizi, test ABTS, corelare, activitate antioxidantă

*Depus la redacție* 19 noiembrie 2013

-----  
*Adresa pentru corespondență:* Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str.Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail:rudiludmila@gmail.com; tel.(+373 22)72-53-06

**Introducere**

Microalga verde *Haematococcus pluvialis* este un superproducător de astaxantină, carotenoid cu proprietăți antioxidante unice [3]. Astaxantina este produsul transformărilor biosintetice ale carotenului în celula algală care trece câteva etape de dezvoltare, pornind de la etapa celulelor verzi mobile, când au loc procese biosintetice intense [7]. Dintre carotenoizi în biomasa celulelor verzi predomină  $\beta$ -carotenu, iar în ciștii roșii – astaxantina. Astfel, ambele forme de biomasă (celulele verzi și ciștii roșii) sunt surse de antioxidanți [16]. Dacă din biomasa ciștilor roșii de *Haematococcus* se obține un singur compus antioxidant - astaxantina, din biomasa celulelor verzi – un complex de antioxidanți, care poate avea o activitate antioxidantă mai mare [1, 6, 8].

Unul din momentele importante în obținerea de complexe antioxidante din biomasa algală și cea vegetală este tipul solventului pentru obținerea produsului antioxidant.

Antioxidanții carotenoizi sunt nepolari după structura chimică și extragerea lor presupune, de obicei, utilizarea solvenților toxici pentru om și mediu. Atunci când este vorba despre preparate antioxidante de uz uman și animal este foarte important de a avea la dispoziție tehnologii prietenoase mediului cu utilizarea extractanților nontoxici. A fost deja dovedit, că alcoolul etilic este un solvent eficient pentru extragerea antioxidantilor din biomasa *Haematococcus pluvialis* [6, 10, 14], inclusiv a carotenoizilor [11].

În scopul determinării activității antioxidante sunt aplicate metode contemporane simple în utilizare, reproductibile, care economisesc timp și sunt cost-efective așa ca testul ABTS de decolorare a radicalului cation 2,2 –azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid. Radicalul este produs de persulfat de potasiu, iar compusul antioxidant induce procesul de reducere a cationului [12, 15].

Metoda dată este utilizată activ în farmaceutică, fiind aplicată în studiul extractelor din biomasa vegetală. Pentru biomasa vegetală a fost determinată dependența corelațională dintre valorile testului ABTS și concentrația fenolilor în biomasă și în extractul obținut din ea [5], dar și în aceste cazuri se ia în calcul concentrația fenolilor în biomasă și în extractele din ea. Testul ABTS este aplicat tot mai frecvent în studiul activității antioxidante a extractelor obținute din biomasa algelor și cianobacteriilor [2], fiind optimizat și adaptat modul de preparare a radicalului și tipul extractului antioxidant. În cazul biomasei algale nu a fost demonstrată existența corelării dintre valorile testului ABTS cu conținutul fenolilor în extract [4]. Datorită unei componente biochimice variate din punct de vedere structural a biomasei algale, în majoritatea cazurilor se obține un extract policomponent în care este prezent un amestec de antioxidanți donori de electroni, efectul antioxidant sumar fiind determinat de mai mulți factori, iar corelațiile individuale sunt greu de stabilit [1]. Valoarea testului ABTS poate corela cu componenta majoritară din complexul de antioxidanți care este un donator activ de electroni. Așa cum carotenoizii sunt antioxidanți care reduc radicalii prin mecanismul transferului de electroni, testul antioxidant ABTS este unul indicat în determinarea activității antioxidante a extractelor în care carotenoizii formează fracția majoritară [9].

O componentă indispensabilă a tuturor biotehnologiilor moderne este constituită din metode și procedee de sporire a eficienței procesului de acumulare a produsului de interes. În cadrul cercetărilor anterioare, realizate în laboratorul Ficobiotehnologie a fost demonstrată posibilitatea sporirii producerii de astaxantină prin utilizarea compușilor coordinațivi care, fiind suplimentați la mediile de cultivare, acționează pe două căi: prin sporirea productivității și prin sporirea carotenogenezei [13]. În ambele cazuri, în faza celulelor verzi mobile, are loc acumularea de caroten care se transformă în astaxantină la etapa de ciști roșii.

Astfel, un conținut înalt de  $\beta$ -caroten în celulele verzi poate asigura un conținut înalt de astaxantină în ciștii roșii. Iată de ce este importantă monitorizarea procesului de acumulare a carotenului în biomasă.

Scopul cercetărilor efectuate a fost în determinarea relațiilor de corelare dintre valorile testului antioxidant ABTS și conținutului de carotenoizi ca componente majoritari în extractul etanolic, obținut din biomasa algei verzi *Haematococcus pluvialis*, colectată în faza celulelor verzi mobile și cea de ciști roșii în cultură de acumulare în normă și la aplicarea compușilor coordinațivi în calitate de modulatori ai proceselor biochimice.

### Materiale și metode

Alga verde *Haematococcus pluvialis* a fost cultivată pe mediul nutritiv RD cu următoarea componență (g/l):  $\text{NaNO}_3$  – 0,3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,02;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,08;  $\text{NaCl}$  – 0,02;  $\text{CaCl}_2$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0001;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,0015;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,00008;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,0003;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,0003;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,0175;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,0002; EDTA – 0,0075, la temperatura de 26°C, la iluminare constantă de 1500 lx cu agitare periodică pentru primele zece zile de cultivare. Inducerea astaxantinogenezei s-a efectuat prin iluminare excesivă cu intensitatea de 3000 lx timp de 72 ore.

În calitate de modulatori ai sintezei componentelor antioxidante în biomasa de hematococ au fost utilizați compușii coordinați ai cobaltului cu bazele Schiff. Având în calitate de liganzi componente toxice acești compuși sunt adăugați la mediul nutritiv pentru a induce un stres oxidativ, la care microalga răspunde prin modificarea sintezei factorilor de protecție, inclusiv a carotenului. Toți compușii coordinați utilizați în acest studiu au fost sintetizați în laboratorul Compuși coordinați al Institutului de Chimie al AȘM, șef laborator dr. I. Bulhac.

**Obținerea extractelor etanolice.** Biomasa celulelor verzi mobile a fost colectată la a 9-a zi de cultivare. Extractul etanolic din biomasa celulelor verzi a fost obținut prin extragere în alcool etilic de 96% în raport de 10 ml la 0,01 g biomasă pe un agitator orbital cu viteza de 200 rot/min timp de o oră [14]. Pentru extragerea astaxantinei din biomasa ciștilor roșii în prealabil a fost aplicată tehnica hidrolizei acide a componentelor peretelui celular al ciștilor cu HCl de 0,1N, regimul termic de 90°C și durata de 10 min. Extractul etanolic a fost obținut în modul descris mai sus.

**Determinarea capacității antioxidante cu utilizarea radicalului cation ABTS.** Soluția stoc a radicalului  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  se obține prin oxidarea reagentului ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. Se prepară reagentul ABTS de 7 mM în apă deionizată. Persulfatul de potasiu se adăugă în concentrație de 2,45 mM. Reacția de formare a radicalului  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  decurge la întuneric, la temperatura camerei timp de 12-16 ore. Anterior testului, soluția stoc este diluată cu etanol până la stabilizarea absorbanței de  $0,700 \pm 0,020$  la 734 nm [15].

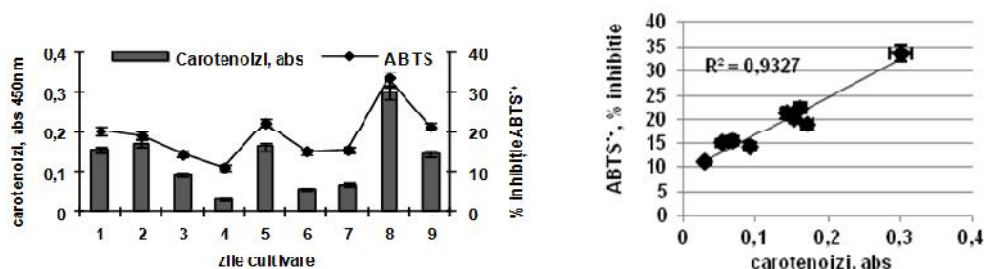
Pentru stabilirea capacității antiradicalice a extractelor din biomasa de hematococ la 10 ml soluție ABTS se adaugă 10  $\mu\text{l}$  din probă. Reacția decurge la temperatura camerei timp de 6 min, iar procentul de inhibiție a fost calculat conform ecuației

$$\% \text{ Inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100,$$

unde  $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$  este valoarea extincției soluției ABTS și  $\text{Abs}_{t=6 \text{ min}}$  este valoarea extincției soluției ABTS după 6 min incubare cu probele.

### Rezultate și discuții

Ciclul vital al microalgei include faza celulelor verzi mobile, faza ciștilor bruni și faza de aplanospori sau ciști roșii. Faza celulelor verzi mobile implică o activitate biosintetică sporită cu intensificarea tuturor mecanismelor de adaptare primară la condițiile mediului. Evoluția culturii în ciclul vital este însoțită de modificări cantitative și calitative ale biomasei. La prima etapă a fost stabilită activitatea antiradicalică a extractelor din biomasa de hematococ colectată pe durata fazei celulelor verzi pe parcursul căreia au fost fixate salturi în procesul de acumulare a carotenoizilor. (fig. 1).



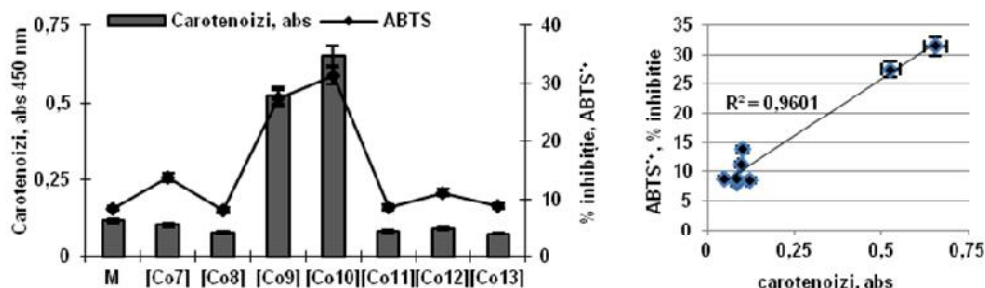
**Figura 1. Corelarea dintre conținutul de carotenoizi (absorbanta la 450 nm) și activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS<sup>+</sup>) a extractelor etanolice din biomasa *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile.**

Atunci când în calitate de inoculum se utilizează aplanosporii, în primele 4 zile are loc modificarea peretelui celular al ciștilor și transformarea lor în celule verzi mobile. În această perioadă are loc modificarea structurală a carotenoizilor cu micșorarea conținutului lor în celulele ciștilor roșii și respectiv, reducerea activității antioxidante (Fig. 1). Fluctuațiile ulterioare ale conținutului de carotenoizi sunt determinate de modificarea ratei de acumulare a biomasei, iar valoarea maximală a lui se înregistrează la ziua a 8-a. Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice, obținute din biomasa de *Haematococcus*, colectată în aceste zile, a înregistrat valori, care sunt în concordanță cu modificarea conținutului de caroten din biomasă. Conținutul de carotenoizi în extractele etanolice și valorile testului ABTS sunt în corelare pronunțată, coeficientul de determinare între acești doi indicatori fiind  $R^2=0,93$ . În baza acestui rezultat putem afirma cu siguranță, că cantitatea carotenoizilor în extract determină capacitatea lor antiradicalică, determinată prin aplicarea testului ABTS.

Pentru a verifica existența acestei dependențe nu numai pe parcursul ciclului vital normal, dar și în condiții de modificare a condițiilor de creștere a hematococului a fost montată o altă serie de experiențe. În cadrul ei biomasa de *Haematococcus pluvialis* a fost obținută pe mediu cu adaos de compuși coordinați ai cobaltului cu bazele Schiff, în concentrațiile de 20 și 30 mg/l. Biomasa algală a fost colectată în ziua a 9-a considerată sfârșitul fazei de celule verzi mobile și la ziua a 16-a – etapa de ciști roșii. Din ambele tipuri de biomasă au fost obținute extractele etanolice și stabilită activitatea lor antiradicalică.

Rezultatele obținute pentru componența și activitatea antiradicalică a extractelor obținute din biomasa celulelor verzi de hematococ (ziua a 9-a), crescute pe mediu cu adaos de 20 mg/l compuși coordinați sunt prezentate în figura 2. Deoarece în aceste experiențe structura acestor compuși de fapt nu este luată în calcul, ci se atrage atenția doar la acele modificări cantitative și calitative care se produc în cultura de hematococ la prezența lor, pentru comoditate și ușurarea percepției rezultatelor aceștea sunt notați în continuare prin abrevieri convenționale (Co7, Co8, Co9, Co10, Co11, Co12 și Co13). Analiza rezultatelor obținute a permis de a sesiza o dependență la fel de stransă între conținutul de carotenoizi în extractele etanolice și activitatea lor antiradicalică, ca și în cazul extractelor din biomasa obținută pe mediul standard. De exemplu, compușii Co9 și Co10, care au asigurat creșterea conținutului de caroten în biomasa celulelor verzi de 4-5 ori, au provocat de asemenea și o creștere semnificativă de 3-4 ori a

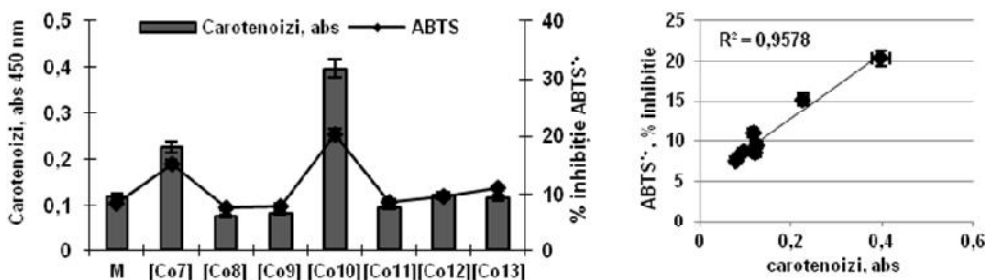
activității antiradicalice a extractului etanolic obținut din biomasa celulelor verzi (fig. 2). Capacitatea de reducere a radicalului ABTS este de 27,5 și 31,0% inhibiție în cazul acestor compuși față de 8,5% inhibiție în cazul extractului din biomasa probei martor.



**Figura 2.** Corelarea dintre conținutul de carotenoizi (*absorbanta la 450 nm*) și activitatea antioxidantă (*ABTS%<sup>+</sup>, % inhibiție*) a extractelor etanolice din biomasa *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile, cultivată în prezența compușilor Co(II) cu bazele Schiff, 20 mg/l.

Pentru compușii cobaltului care au modificat neînsemnat conținutul de caroten în biomasa celulelor verzi, valorile testului antioxidant de asemenea nu s-au schimbat semnificativ. Ca și în cazul biomasei, obținute din cultivarea pe mediile lipsite de compus coordonativ, dependența corelațională dintre valorile testului ABTS și conținutul de caroten în biomasa celulelor verzi mobile este una foarte puternică, coeficientul de determinare având valori foarte înalte -  $R^2=0,96$  (fig. 2).

Același tip de rezultate obținute pentru extractele din biomasa de hematococ, crescută pe mediu cu adaos al unei cantități mai mari de compuși coordonativi (30 mg/l) sunt prezentate în figura 3.



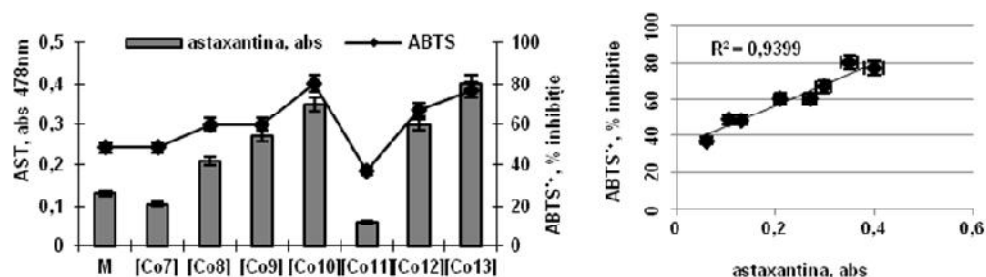
**Figura 3.** Corelarea dintre conținutul de carotenoizi (*absorbanta la 450 nm*) și activitatea antioxidantă (*ABTS%<sup>+</sup>, % inhibiție*) a extractelor etanolice din biomasa *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile, cultivată în prezența compușilor Co(II) cu bazele Schiff, 30 mg/l.

Astfel, a fost fixată o scădere cu 20-35% a conținutului de carotenoizi, în cazul utilizării compușilor Co8 și Co9; o creștere a conținutului de carotenoizi de 1,8 ori în experiența cu compusul Co7 și de 3,3 ori în biomasa rezultată din experiența cu compusul Co10, precum și rezultate similare probelor martor (compușii Co12 și Co 13). Valorile testului antioxidant, în majoritatea cazurilor, au repetat tipul de abatere

de la valorile înregistrate pentru proba martor, care a fost prezent în cazul conținutului de carotenoizi. În extractele, obținute din biomasa celulelor verzi de hematococ, în care a fost depistat un conținut sporit de carotenoizi, a fost înregistrată și o creștere a capacității antiradicalice a extractelor, stabilită prin aplicarea testului ABTS. Corelarea dintre valorile testului ABTS și conținutul de carotenoizi în biomasa celulelor verzi mobile este una foarte puternică, coeficientul de determinare fiind  $R^2=0,9578$  (fig. 3).

Prin urmare, în cazul extractului etanolic, obținut din biomasa celulelor verzi mobile de *Haematococcus pluvialis*, colectate în condițiile mediului standard și în condițiile experimentale, cu aplicarea compușilor coordinați ai cobaltului, valorile testului antioxidant ABTS sunt determinate de conținutul carotenoizilor în acest extract.

Carotenoidul, pentru obținerea căruia de fapt microalga *Haematococcus pluvialis* a devenit un obiect biotehnic este astaxantina, care se acumulează în biomasa ciștilor roșii, faza finală a ciclului de dezvoltare. Din această cauză este foarte important de a stabili, dacă rezultatele obținute la etapa celulelor verzi au soldat cu concluzii valabile și pentru etapa de aplanospori. Pentru aceasta, din biomasa de aplanospori colectată la ziua a 16-a de cultivare au fost obținute extracte etanolice în care a fost apreciat conținutul de carotenoizi și activitatea antiradicalică prin aplicarea testului ABTS. La această etapă a ciclului vital are loc o transformare practic totală a tuturor carotenoizilor prezenți în celulă în astaxantină. Posibilitatea aplicării testelor antiradicalice nespecifice, inclusiv a testului ABTS pentru stabilirea activității antioxidante a produselor cu conținut de astaxantină a fost stabilită în cadrul laboratorului Ficobiotehnic al IMB [13], fapt ce ne permite să afirmăm veridicitatea rezultatelor obținute prin aplicarea acestui test. Rezultatele obținute pentru extractele etanolice obținute din aplanosporii roșii de hematococ, crescut pe mediu standard și pe mediu cu adaos de 20 mg/l compuși coordinați ai cobaltului sunt prezentate în figura 4.



**Figura 4. Corelarea dintre conținutul de astaxantină (abs) și activitatea antioxidantă (ABTS<sup>+</sup>, % inhibiție) a extractelor etanolice din biomasa *Haematococcus pluvialis*, faza de ciști roșii, cultivată în prezența compușilor Co(II) cu bazele Schiff, 20 mg/l.**

Astfel, conținutul de astaxantină în extractele obținute din ciștii roșii a crescut în majoritatea cazurilor de aplicare a compușilor, cu excepția experiențelor cu compușii Co7 și Co11 (fig. 4). Tot în aceste cazuri a fost înregistrată și scăderea capacității antiradicalice a extractelor. Cele mai mari valori ale testului ABTS au fost stabilite pentru extractele de astaxantină, obținute din biomasa de hematococ cultivată pe mediile suplimentate cu compușii Co10, Co12 și Co13. Un spor de 2,3 - 3,0 ori a conținutului de astaxantină în extractele etanolice, obținute în baza biomasei colectate din experiențele cu compușii cobaltului a dus după sine o creștere a valorilor testului

antioxidant ABTS cu 38-58%. Corelarea dintre valorile conținutului de astaxantină și valorile testului ABTS este una foarte puternică, coeficientul de determinare fiind  $R^2=0,94$ .

Rezultatele obținute la testarea extractelor etanolice din biomasa de aplanospori de hematococ, crescut pe mediu cu adaos a 30 mg/l compuși coordinați ai cobaltului cu bazele Schiff sunt prezentate în figura 5. Pentru compusul Co9, astaxantina depășește proba control de 3,78 ori. Doi compuși (Co7 și Co8) au indus un spor al conținutului de astaxantină cu 60-66% și restul compușilor au prezentat rezultate similare probei control (fig. 5).

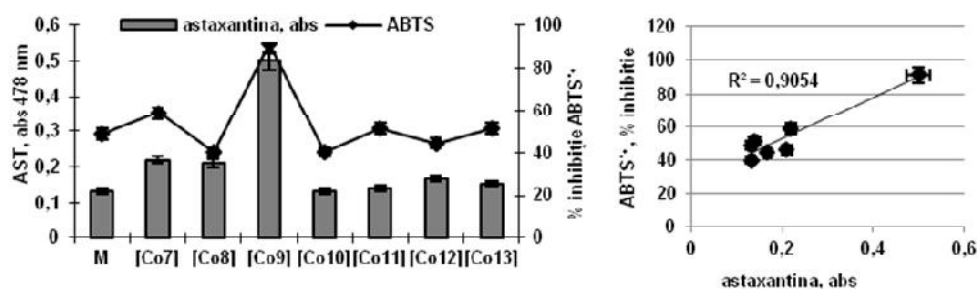


Figura 5. Corelarea dintre conținutul de astaxantină (abs) și activitatea antioxidantă (ABTS<sup>+</sup>, % inhibiție) a extractelor etanolice din biomasa *Haematococcus pluvialis*, faza de ciști roșii, cultivată în prezența compușilor Co(II) cu bazele Schiff, 30 mg/l.

Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice, obținute din biomasa colectată din experiențele cu concentrația compușilor de 30 mg/l a prezentat valori diferite comparativ cu proba control. În cazul probelor cu conținutul de astaxantină similar probei de referință, varierea valorilor testului ABTS este una foarte nesemnificativă. Concentrația evident sporită a astaxantinei, obținută în experiențele cu compusul Co9 a determinat valorile crescute ale testului antioxidant – 91% inhibiție. Coeficientul de determinare dintre valorile testului ABTS și concentrația astaxantinei, determinate în extractele etanolice, obținute în experiențele cu aplicarea concentrației de 30 mg/l compus coordinațiv are valori semnificative  $R^2=0,9$ .

Prin urmare, valorile testului ABTS, aplicat extractelor etanolice din biomasa de *Haematococcus pluvialis*, corelează cu conținutul de carotenoizi din aceste extrase. Această afirmație este valabilă pentru extractele etanolice, obținute atât din biomasa algală colectată în faza celulelor verzi mobile cât și din biomasa de ciști roșii.

Testul ABTS poate fi aplicat pentru determinarea activității antioxidante a biomasei de *Haematococcus pluvialis* în experiențele de suplimentare la mediul de cultivare a unor compuși chimici anorganici destinați modificării proceselor metabolice în scopuri biotehnologice.

### Bibliografie

1. Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* by various methods. // The Annals of Oradea University Biology Fascicle, 2009, XVI/2: 43-48.
2. Guedes Catarina A., Amaro Helena M., Gião Maria S., Malcata F. Xavier. Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. // Food Chemistry, 2013, 138: 638–643.

3. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. // Trends in Biotechnology, 2003, 21: 210–215.
4. Hua-Bin Li, Ka-Wing Cheng, Chi-Chun Wong, King-Wai Fan, Feng Chen, Yue Jiang. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. // Food Chemistry, 2007, 102: 771–776.
5. Jacobo-Velazquez D.A., Isneros-Zevallos L. C. Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. // Journal of Food Science, 2009, 74(9): 107–113.
6. Jaime L., Rodríguez-Meizoso I., Cifuentes A., Santoyo S., Suarez S., Ibáñez E., Señorans F. J. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalga. // LWT – Food Science and Technology, 2010, 43: 105–112.
7. Jin E., Lee C.G., Polle J.E.W. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology. // Journal of Microbiol Biotechnol, 2006, 16: 821–831.
8. Lababpour Abdolmajid, Lee Choul-Gyun. Simultaneous Measurement of Chlorophyll and Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* Cells by First-Order Derivative Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. // Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(2): 104–110.
9. Lingzhao Wang, Bao Yang, Binlun Yan, Xingcun Yao. Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. // Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 13: 120–127.
10. Mendes R. L., Nobre B. P., Cardoso M. T., Pereira A. P., Palabra A. F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. // Inorganica Chimica Acta, 2003, 356: 328–334.
11. Mendiola Jose A., Herrero Miguel, Cifuentes Alejandro, Ibanez Elena. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. // Journal of Chromatography A, 2007, 1152: 234–246.
12. Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. // FEBS Letters, 1996, 384: 240–242.
13. Miscu V. Acumularea astaxantinei în biomasa *Haematococcus pluvialis* la cultivare pe mediu cu compuși coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizii. // Buletinul AȘM. Științele vieții, 2009, 3(309): 143–150.
14. Miscu V., Cepoi L., Rudi L. Studiul activității antioxidante și antiradicalice a extractului etanolic de astaxantină. // Buletinul AȘM. Științele vieții, 2009, 309(3): 127–136.
15. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. // Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26: 1231–1237.
16. Rodríguez-Meizoso I., Jaime L., Santoyob S., Señorans F.J., Cifuentes A., Ibáñez E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51: 456–463.