

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA - UFOB
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA

OZÂNIA BOMFIM NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA SÍNTESE DE CAROTENOIDES
TOTAIS DAS MICROALGAS *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp.
ISOLADAS DE FONTES DULCÍCOLAS DA REGIÃO OESTE DA
BAHIA

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA - UFOB
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA

OZÂNIA BOMFIM NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA SÍNTESE DE CAROTENOIDES
TOTAIS DAS MICROALGAS *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp.
ISOLADAS DE FONTES DULCÍCOLAS DA REGIÃO OESTE DA
BAHIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado
na Universidade Federal do Oeste da Bahia
como requisito parcial para obtenção de
aprovação na disciplina TCC II do curso de
Engenharia de Biotecnologia.

Orientador: Dr. Felipe Figueira.

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

N244 Nascimento, Ozânia Bomfim.

Avaliação do potencial da síntese de carotenoides totais das microalgas *chlamydomonas sp.* e *sce-
nedesmus sp.* isoladas de fontes dulcícolas da Região Oeste da Bahia/ Ozânia Bomfim Nascimento. –
2022.

84 f.

Orientador: Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira.

Trabalho de Conclusão de Curso: (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) –
Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro Multidisciplinar do *Campus* de Luís Eduardo Magalhães, Luís Eduardo Magalhães, BA, 2022.

1. Microalgas – Cultivo. 2. Carotenoides. 3. Microalgas de água doce – Bahia, Região Oeste da.
I. Figueira, Felipe da Silva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro Multidisciplinar do
Campus de Luís Eduardo Magalhães. III. Título.

CDD: 660.6

BIBLIOTECAS UFOB - Biblioteca Universitária de Luís Eduardo Magalhães

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às mulheres da minha família, em especial minha mãe Marivalda e minha irmã Pauliana. Vocês foram e sempre serão a minha base e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao ser superior que me fortalece, me guia e me equilibra.

Aos meus pais Osvaldino Nascimento e Marivalda Nascimento, que sempre foram minha base. A minhas irmãs Pauliana (Lia) e Elitânia (Tania), e aos meus irmãos José Carlos (Zé) e Marcio por me mostrarem todos os dias os motivos pelo qual estou lutando.

Ao meu cunhado Darlei Zamarchi por assumir juntamente à minha irmã Lia o papel de segundo pai e segunda mãe. A minha gratidão é eterna.

Aos meus sobrinhos Rikelme André, Dhenyfer Vitória, Ana Laura, Emily Francine, Jose Jonas e Carmem Ester pelos sorrisos dados quando eu apenas precisava disso e não sabia.

Agradeço aos meus amigos Pedro, Renata, Tayane, Luis Biesek, Deburah Cristina, Matheus, Kadma, Tayane e Bruna pela amizade e companheirismo durante esses anos.

Gratidão ao meu orientador Dr. Felipe Figueira pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, e então desenvolver esse trabalho. Suas orientações me tornaram a cada dia um profissional mais sábio e dedicado.

Agradeço à Universidade Federal do Oeste da Bahia, juntamente ao corpo docente do Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães e aos técnicos administrativos por exercerem o trabalho de excelência no *campus* e tornarem possível a minha formação. Sou grata por todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

RESUMO

A classe de corantes e pigmentos sintéticos são utilizados em diferentes processos industriais para aderir coloração aos produtos. O uso desses compostos têm sido relatados como causadores de danos à saúde, provocando doenças como alergias, complicações digestivas e câncer. Diante da necessidade de produtos de origem natural, os carotenoides, um conjunto de aproximadamente 850 moléculas, estão amplamente distribuídos na natureza e são produzidos por plantas e microrganismos, possibilitando a produção em larga escala, sem causar danos ao meio ambiente e à saúde dos consumidores. Essas biomoléculas desempenham funções essenciais tais como, atividade pró-vitamina A, antioxidante, fortalecimento do sistema imunológico, sinalização celular, proteção contra degeneração macular relativa à idade, proteção da pele, redução do risco de doenças degenerativas e cardiovasculares. Considerando esses benefícios, têm-se a necessidade de alternativas para a produção em larga escala de carotenoides, e as microalgas estão sendo apresentadas como grandes promissoras desse potencial. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da síntese de carotenoides totais das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. obtidas de fontes dulcícolas da Região Oeste da Bahia e cultivadas sob condições de estresse. As linhagens das microalgas foram cultivadas por 20 dias, em meio ASM1, sob depleções de 50 e 70% de nitrogênio e variações de temperatura, incidência luminosa e homogeneização. Os resultados obtidos indicam que as condições impostas influenciam na densidade celular e na produção de carotenoides totais. Ao fim dos experimentos as melhores condições e produção de carotenoides totais por parte da microalga *Chlamydomonas* sp. foi de 0,972 (\pm 0,049) mg/g na condição A70% e *Scenedesmus* sp. foi de 0,380 (\pm 0,006) mg/g na condição A50%.

Palavras chaves: microalgas, *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus* sp., carotenoides, condições de estresse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espectro eletromagnético.....	18
Figura 2 - Clivagem do β -caroteno em duas moléculas de retinol.....	29
Figura 3 - Estimativa da produção mundial de corantes naturais segundo a Receita do mercado global entre o período de 2014 a 2022.....	31
Figura 4 - Participação no mercado global de carotenoides, por aplicações em 2019.....	32
Figura 5 - Diversidade morfológica de espécies Scenedesmaceae. a-f. <i>Desmodesmus maximus</i> . g-h. <i>D. microspina</i> . i-j. <i>D. perforatus</i> . k-m. <i>D. serratus</i> . n-q. <i>D. spinoso- aculeolatus</i> . r-t. <i>D. subspicatus</i> . u. <i>Scenedesmus arcuatus</i> . v. <i>S. obtusus</i> . w-y. <i>S. pectinatus</i>	36
Figura 6 - Lagoa tipo <i>raceway</i>	41
Figura 7 - Geometria dos fotobiorreatores fechados. A. Tipo tubular. B. Tipo placas.....	42
Figura 8 - Microalgas vistas no microscópio óptico (aumento de 100x). A. <i>Chlamydomonas</i> sp. B. <i>Scenedesmus</i> sp.....	49
Figura 9 - Coleta das microalgas. A. Rede fitoplâncton de coleta. B. Cachoeira do redondo. C. Cachoeira do acaba vida.....	50
Figura 10 - Inóculos iniciais das microalgas <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp. acondicionados na incubadora automática orbital MSM 130/PGA/F.....	51
Figura 11 - Tratamento da biomassa. A) Biomassa seca na placa de petri após 24h na estufa. B) Biomassa seca raspada da placa de petri.....	53
Figura 12 -. Tubos de Falcon contendo as amostras, revolvidos com papel alumínio para evitar fotodegradação.....	54
Figura 13 - Sobrenadantes submergidos das amostras de biomassa das microalgas <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp. submetidos a análise no espectrofotômetro.....	54
Figura 14 - Unidades experimentais para <i>Chlamydomonas</i> sp. A) Tratamento A50% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento A50% ao 20° dia de cultivo.....	56
Figura 15 - Unidades experimentais para <i>Chlamydomonas</i> sp. A) Tratamento B50% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento B50% ao 20° dia de cultivo.....	56

Figura 16 -. Unidades experimentais para <i>Chlamydomonas</i> sp. A) Tratamento A70% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento A70% ao 20° dia de cultivo.....	57
Figura 17 -. Unidades experimentais para <i>Chlamydomonas</i> sp. A) Tratamento B70% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento B70% ao 20° dia de cultivo.....	57
Figura 18 - Unidades experimentais para <i>Scenedesmus</i> sp. A) Tratamento A50% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento A50% ao 20° dia de cultivo.	57
Figura 19 - Unidades experimentais para <i>Scenedesmus</i> sp. A) Tratamento B50% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento B50% ao 20° dia de cultivo.....	57
Figura 20 - Unidades experimentais para <i>Scenedesmus</i> sp. A) Tratamento A70% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento A70% ao 20° dia de cultivo.....	58
Figura 21 - Unidades experimentais para <i>Scenedesmus</i> sp. A) Tratamento A70% ao 1° dia de cultivo. B) Tratamento A70% ao 20° dia de cultivo.....	58
Figura 22 - Crescimento em biomassa da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp. nas condições A50% e B50%.....	59
Figura 23 - Crescimento em biomassa da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp. nas condições A70% e B70%.....	59
Figura 24 - Curvas de crescimentos da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp. sobrepostas, resultante dos tratamentos utilizados neste estudo.....	60
Figura 25 - Crescimento em biomassa da <i>Scenedesmus</i> sp. nas condições A50% e B50%.....	60
Figura 26 - Crescimento em biomassa da <i>Scenedesmus</i> sp. nas condições A70% e B70%.....	61
Figura 27 -. Curvas de crescimentos da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. sobrepostas, resultante dos tratamentos utilizados neste estudo.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos corantes utilizados na indústria brasileira de alimentos.....	21
Tabela 2 - Corantes artificiais, código de rotulagem e valores de IDA.....	22
Tabela 3 - Corantes e pigmentos naturais permitidos no Brasil.....	23
Tabela 4 - Classificação dos corantes usados na indústria têxtil.....	24
Tabela 5 - Substância, origem e campo de aplicação de corantes e pigmentos naturais.....	27
Tabela 6 - Principais pigmentos produzidos pelos grupos procariontes e eucariontes das microalgas.....	34
Tabela 7 - Microrganismo, metabólito produzido e campo de aplicação.....	44
Tabela 8 - Composição dos reagentes utilizados no preparo da solução estoque do meio ASM1.....	50
Tabela 9 -. Condições estabelecidas pra cultivar sob condições de estresse, as microalgas <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp. durante 20 dias de experimento.....	52
Tabela 10 - Valores referentes a quantidade de nitrato de sódio (NaNO ₃) pesados para o preparo das soluções estoque do meio ASM1 utilizadas nos tratamentos com depleção de nitrogênio.....	52
Tabela 11 -. Rendimento em gramas de biomassa por litro de cultivo da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp. em meio de cultivo ASM-1 no decorrer dos 20 dias de cultivo no fotobiorreator.....	
Tabela 12 Rendimento em gramas de biomassa por litro de cultivo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio de cultivo ASM-1 no decorrer dos 20 dias de cultivo no fotobiorreator.....	59
Tabela 13 - Valores de rendimento máximo $R_{máx}$ (g/L) e velocidade específica de crescimento μ_x (d ⁻¹) para as microalgas <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp. obtidos em meio de cultivo ASM-1 no decorrer dos 20 dias de cultivo no fotobiorreator.....	64
Tabela 14 - Conteúdo de carotenoides totais para as microalgas <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abit - Associação Brasileira da Indústria Têxtil

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Humana

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAGR - Taxa de crescimento anual composta

CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CT – Carotenoides totais

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EREs - Espécies reativas do enxofre

ERNs - Espécies reativas do nitrogênio

ERs - Espécies reativas do oxigênio

FAO - Organização para a Alimentação e Agricultura

GMC - Grupo Mercado Comum

IDA - Ingestão Diária Aceitável

INS - Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares

OMS - Organização Mundial da Saúde

pH - Potencial hidrogeniônico

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
4.1 Corantes e pigmentos.....	18
4.1.1 Definição de corantes e pigmentos	18
4.1.2 Corantes e pigmentos sintéticos.....	19
4.1.3 Corantes e pigmentos naturais	19
4.1.4 Legislação	20
4.1.5 Efeitos negativos associados.....	24
4.2 Aplicação dos corantes e pigmentos naturais	26
4.3 Carotenoides	27
4.3.2.1 Atividade pró vitamina A	28
4.3.2.2 Atividade antioxidante.....	30
4.4 Mercado e produção biotecnológica dos carotenoides	30
4.5 Microalgas	33
4.5.1 <i>Chlamydomonas</i> sp.	34
4.5.2 <i>Scenedesmus</i> sp.....	35
4.5.3 Fotossíntese.....	36
4.5.4 Condições de cultivo.....	37
4.5.4.1 Temperatura	37
4.5.4.2 pH.....	38
4.5.4.3 Iluminação	38

4.5.4.4	Agitação e aeração	39
4.5.4.5	Nutrientes	39
4.5.5	Sistemas de cultivo	40
4.6	Carotenoides em microalgas	42
4.7	Biotecnologia das microalgas	43
4.8	Fatores que influenciam na carotenogênese	45
4.8.1	Composição do meio de cultivo.....	45
4.8.2	Efeito do pH.....	46
4.8.3	Efeito da Temperatura	46
4.8.4	Efeito da iluminação	47
5.	METODOLOGIA.....	49
5.1	Obtenção da linhagem	49
5.2	Meio de cultura	50
5.3	Preparo do inóculo	51
5.4	Condições de cultivo.....	51
5.5	Avaliação do crescimento.....	53
5.6	Extração e quantificação dos carotenoides totais.....	53
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1	Acompanhamento do crescimento celular.....	56
6.2	Carotenoides totais.....	64
7.	CONCLUSÃO.....	68
8.	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	69
9.	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Corantes e pigmentos sintéticos são substâncias utilizadas em processos produtivos nas indústrias têxteis, plásticas, alimentícias (humana e animal), cosméticas e farmacêuticas para atribuir qualidade aos produtos. Esses aditivos conferem coloração, realça as propriedades organolépticas, influencia na aceitação ou rejeição, possibilita melhorias na conservação e promove alta estabilidade à luz, oxigênio, calor e pH (ZANONI; YAMANAK, 2016; PALIYATH, 2003; CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

Apesar da ampla utilização dos corantes de origem sintética e suas vantagens associadas, o seu uso indiscriminado tem causado efeitos potencialmente nocivos aos seres humanos, animais e ao meio ambiente. Muitos destes apresentam caráter tóxico, mutagênico, carcinogênico, genotóxico, recalcitrante e desencadeiam reações alérgicas e degenerações celulares (MERCİ et al., 2019; VELÁZQUEZ, 2012).

Em contrapartida, os corantes e pigmentos de origem naturais são tidos como uma solução promissora para a substituição de seus homólogos sintéticos. Além de conferir coloração aos produtos, estão envolvidos em bioatividades importantes e benéficos à saúde como proteção do organismo e prevenção de doenças, resultante da diversidade de nutrientes e componentes bioativos presentes (VARGAS et al. 2017; ROCHA; REED, 2014).

Os carotenoides, uma das famílias dos compostos naturais, têm se destacado por serem sintetizados naturalmente pelas plantas, algas, bactérias, fungos e insetos (FONTANA et al., 2000). Essas substâncias são atuantes em funções fisiológicas como atividade pro-vitamina A e antioxidantes, fortalecimento do sistema imunológico, sinalização celular, proteção contra degeneração macular relativa à idade, redução do risco de doenças degenerativas e cardiovasculares (MAOKA, 2020; SCHWARTZ, 2010).

As microalgas sob condições controladas de cultivo apresentam potencial para biossíntese de altas taxas de metabólitos como os carotenoides. A classe Chlorophyceae, também conhecidas como algas verdes, são promissoras para produção dessas substâncias. Existe uma biodiversidade ampla e são facilmente encontradas em fontes de água doce. Destas, os gêneros *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. têm sido associadas como produtoras dos carotenoides β -caroteno, neoxantina, linoxantina, violaxantina e luteína, em resposta a condições extremas de

cultivo, como o estresse oxidativo (PŘIBYL et al., 2015; CHU *et al.*, 2011; RICHMOND, 2004).

Diante da necessidade de novas alternativas para produção dos corantes e pigmentos naturais, a produção biotecnológica de carotenoides utilizando microalgas se torna cada vez mais promissora. A Biotecnologia possibilita a otimização das técnicas existentes, como também, obtenção de novas técnicas e fontes microbiológicas para favorecer a produção em larga escala dessas substâncias. Para validar essa possibilidade, o presente trabalho consta na verificação do potencial da síntese de carotenoides totais das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. isoladas por meio de uma Bioprospecção realizada em fontes dulcícolas da região Oeste da Bahia.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a indústria biológica desempenhou um papel fundamental em prol da melhoria da qualidade de vida dos seres vivos e das mudanças ambientais ocorridas durante séculos. O uso de resíduos não biodegradáveis e não sustentáveis tem resultado na geração excessiva, descarte inapropriado, desequilíbrio ambiental e danos potenciais à saúde dos usuários como consequência dessa ação, necessitando de alternativas que reduzam os efeitos causados até então, assim como evitar danos futuros.

Os corantes e os pigmentos naturais por sua vez, apresentam vantagens em relação ao uso daqueles de origem sintética, são substâncias atóxicas, biodegradáveis, não prejudiciais ao meio ambiente e podem ser obtidos a partir das fontes renováveis de origem animal, vegetal e microbiana. No entanto, muitos destes apresentam desvantagens como instabilidade à luz, ao calor e a variações de temperatura, necessitando de melhorias no processo produtivo (BALAN, 2017; CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

A produção biotecnológica de corantes e pigmentos naturais por meio do uso de microrganismos vem sendo estabelecida e ganhando destaque em relação às demais fontes de obtenção. Alguns dos fatores que contribuem para essa revolução estão na possibilidade do uso substratos de baixo custo, redução de espaços para a bioprodução, controle do cultivo e obtenção de altas taxas crescimento e acúmulos de biomassa e produtos (metabólitos), assegurando melhores resultados produtivos (SILVA JUNIOR et al., 2018).

Visto isso, as microalgas são investigadas para a produção em larga escala dessas moléculas. Esses microrganismos compõem um grupo diversificado de microrganismos e apresentam composição bioquímica variada. Naturalmente são constituídas por carotenoides, pigmentos acessórios à fotossíntese e proteção ao fotossistema (PIÑEROS et al., 2019). Visto isso, estudos mostram que sob privação de nutrientes e condições ambientais ocorrem variações fisiológicas resultando no acúmulo substâncias específicas, no qual uma destas são os carotenoides (DERNER, 2006).

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade e apresenta condições climáticas e ambientais favoráveis para a produção em larga escala desses microrganismos. O país é caracterizado por duas das exigências vitais das microalgas,

recebe níveis médios de insolação de 8 – 22 MJ/m².dia e constitui 10.959 km de costa, onde aproximadamente 12% equivale a reservas de água doce do mundo (BRASIL, 2014).

Utilizando-se das condições favoráveis do país, associado com as tecnologias provindas da biotecnologia, é possível aprimorar a produção desses pigmentos, a partir da investigação de novos microrganismos produtores de carotenoides. Por meio da compreensão da bioconversão dos nutrientes e do estabelecimento das condições bióticas e abióticas, é possível potencializar a produção.

Com o objetivo de elucidar a biossíntese de carotenoides e demais metabólitos secundários por parte das microalgas e identificar quais destes microrganismos são potenciais produtores desses metabólitos, o grupo de pesquisa e desenvolvimento de Bioprospecção de microalgas na Região Oeste da Bahia composto por alunos do Curso de Engenharia de Biotecnologia na Universidade Federal do Oeste da Bahia, desenvolveram estudos e experimentos preliminares comprovando o potencial estimado, e a partir de então o presente trabalho foi possibilitado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da síntese de carotenoides totais das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. sob diferentes condições de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar as microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. em depleção de 50 e 70% de nitrogênio;
- Submeter os cultivos a diferentes condições de incidência luminosa, temperaturas e homogeneização;
- Investigar os efeitos das condições estabelecidas para avaliar a produção de carotenoides;
- Extrair carotenoides totais (CT);

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Corantes e pigmentos

4.1.1 Definição de corantes e pigmentos

Corantes e pigmentos são compostos químicos de origem sintética ou natural, que transmitem cores específicas através da absorção da luz nos comprimentos de ondas entre 400 e 700 nm no espectro eletromagnético (Figura 1). A fixação dessas substâncias a um dado substrato se dá a nível molecular, e a ligação química entre ambos define se a molécula tem caráter de corante ou pigmento (MARTINS; SUCURIPA; SUAREZ, 2015; GUARATINI; ZANONI, 2000).

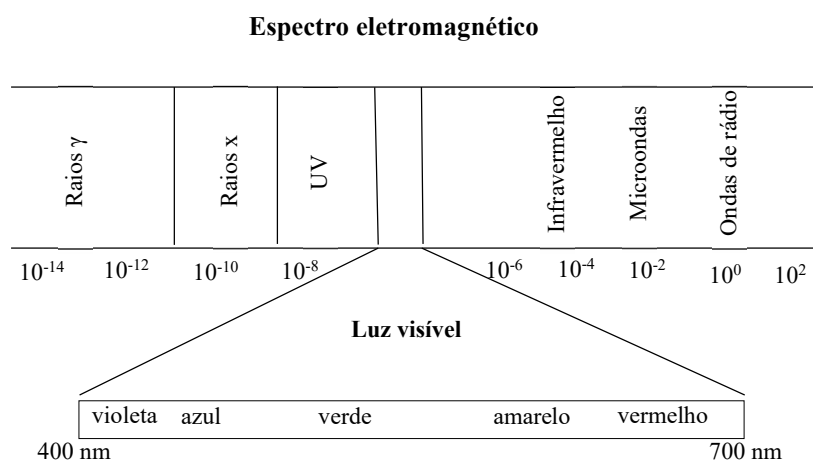


Figura 1. Espectro eletromagnético. Adaptado de NASCIMENTO (2016).

Segundo a definição da Colour Index (2015a) os corantes são substâncias orgânicas ou inorgânicas, coloridas ou fluorescentes de modo intencional. Essas substâncias são solúveis naturalmente ou então são submetidas a tratamentos que conferem a solubilidade, por meio da quebra da estrutura cristalina por tratamentos químicos ou mecânicos. Podem ser aplicadas diretamente na matéria no qual se deseja incorporar a coloração, uma vez que há afinidade entre ambos.

Os pigmentos diferem dos corantes quanto à solubilidade, necessitam de um suporte para que seja incorporado no material. Essas substâncias são partículas sólidas orgânicas ou inorgânicas, característicos por serem coloridos, pretos, brancos ou

fluorescentes, que quando em contato com a matéria a ser incorporada, apresenta caráter insolúvel (COLOUR INDEX, 2015b).

4.1.2 Corantes e pigmentos sintéticos

Corantes e pigmentos artificiais são aqueles obtidos por síntese química. A utilização dessas substâncias em detrimento daqueles de origem natural se dá pela alta estabilidade à luz, oxigênio, pH, maior poder calorífico, menores custos de produção, uniformidade das cores e fixação, apresentam maior grau de pureza e maiores possibilidades de sínteses com grupos cromóforos e auxocrômicos que ampliam a diversidade de cores (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

É notório as vantagens dos compostos sintéticos em relação aos naturais. No entanto essas substâncias são utilizadas industrialmente com o único propósito de conferir coloração aos produtos, já que não há valor nutritivo associado aos mesmos. Por este motivo, nos últimos anos há uma busca por alternativas derivadas de fontes naturais, que possam colorir e simultaneamente beneficiar a saúde (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

4.1.3 Corantes e pigmentos naturais

Os corantes naturais estão abundantemente distribuídos pela natureza. As principais fontes de obtenção são as plantas (estruturas reprodutivas, folhas, raízes, cascas), animais (insetos) e microrganismos (fungos, bactérias e microalgas) (MENDONÇA, 2011). São substâncias consideradas mais seguras quando comparados aos de origem sintética, por apresentarem características atóxicas, não carcinogênicas e são biodegradáveis (ALI; HUSSAIN; NAWAZ, 2009).

Conforme Netto (2009) a classificação dos corantes naturais é dada em três grupos principais: Os compostos tetrapirrólicos como as clorofilas, os compostos isoprenóides que constituem os carotenoides e os compostos heterocíclicos que contém oxigênio em suas moléculas, é o caso dos flavonoides.

Os pigmentos naturais são característicos por serem substâncias que desempenham funções biológicas importantes, que são benéficas para a saúde de seus consumidores. Algumas dessas funções são as atividades e propriedades antioxidantes, proteção contra danos a espécies reativas do oxigênio aos componentes celulares, ação

anti-inflamatória, assim como prevenção de doenças crônicas (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

4.1.4 Legislação

O uso de corantes sintéticos como substâncias aditivas e coadjuvantes nos produtos tem aumentado nos últimos tempos e tem levantado questionamentos relativos à saúde. Com isso, essas substâncias são investigadas constantemente a partir de protocolos e legislações, estabelecidos por autoridades sanitárias e legisladores em que são feitos estudos e testes para que seja validado se são ou não prejudiciais, visando à redução dos riscos para os consumidores (VELOSO, 2012).

Em cada país as leis que regem são específicas. O Brasil segue as legislações do ministério da Saúde, sob o controle de qualidade estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina os limites máximos, com base nas IDAs (Ingestão Diária Aceitável), para o caso do uso em alimentos e derivados.

A legislação vigente pode sofrer alterações conforme as determinações científicas e tecnológicas, visando à qualidade de vida e segurança dos usuários. As atualizações podem ser de modo independente por parte da ANVISA, ou por meio de acordos com as demais entidades do Mercosul, de acordo com o Guia para Pedidos de Inclusão e Extensão de Uso de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação na Legislação Brasileira (ANVISA, 2021).

4.1.4.1 Legislação brasileira vigente para indústria de alimentos

Por meio da Resolução – CNNPA n° 44, publicada em 1997 os corantes são substâncias ou misturas destas que tem o caráter de conferir ou intensificar a coloração de um alimento, e são classificadas de acordo com a Tabela 1. A partir dessa resolução foram estabelecidos as condições de elaborações, classificações, apresentações, designações, composições e os fatores qualitativos dos corantes, tendo sofrido alterações por meio da portaria n°540/97 da SVS/MS.

Tabela 1. Classificação dos corantes utilizados na indústria brasileira de alimentos.

Classificação	Origem
Corante orgânico natural	Fontes vegetais ou animais, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
Corante orgânico sintético	Obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.
Corante artificial	Corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.
Corante orgânico sintético idêntico ao natural	É o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
Corante inorgânico	Obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimentos.
Caramelo I	Corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
Caramelo II	Processo sulfito cáustico (INS 150b)
Caramelo III	Processo amônia (INS 150c): É o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200mg/kg (duzentos miligramas por quilo).
Caramelo IV	Processo sulfito – amônia (INS 150d)

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 1977).

A utilização dos corantes de origem sintética para fins alimentícios segue de acordo com a Resoluções nº 382 a 388 de 9 de agosto de 1999 da ANVISA. Sendo assim, é permitido apenas o uso dos corantes descritos na Tabela 2, onde tem associado a descrição da rotulagem e os valores de IDA (Ingestão diária aceitável).

Tabela 2. Corantes artificiais, código de rotulagem e valores de IDA.

CORANTE	INS	IDA (mg/Kg PC)
Amarelo crepúsculo	110	4
Amarelo de Quinoleína	104	5
Azorrubina	122	4
Azul patente V	131	Não alocada
Azul brilhante	133	12,5
Amaranto	123	0,5
Eritrosina	127	0,1
Indigotina	132	5
Marrom HT	155	1,5
Negro brilhante BN	151	1
Ponceau 4R	124	4
Verde sólido	143	25
Tartrazina	102	7,5
Vermelho 40	129	7

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 1999).

A Resolução RDC nº 259/2002 da ANVISA/MS, determina que os aditivos alimentares devem ser declarados com o seu nome completo ou seu número de INS (Sistema Internacional de Numeração, Codex Alimentarius FAO/OMS) e a presença da descrição “colorido artificialmente” no rótulo, conforme o Decreto 55.851/65 e Decreto Lei nº 986/69 (NETTO, 2009).

Presente na Tabela 3 tem a origem, e colorantes naturais permitidos no Brasil. Essa permissão é dada conforme o art.10, 1º do Decreto 55.871 de 26/03/65 que estabelece que os corantes e pigmentos naturais para serem utilizados na indústria de alimentos devem ser extraídos de origem vegetal ou animal, ou então e podem ser obtidos perante aquecimento de açúcares diante o art.10, 2º do mesmo decreto.

Tabelas 3 – Corantes e pigmentos naturais permitidos no Brasil.

Origem	Corante
Plantas, animais e microrganismos	Curcumina, riboflavina, cochonilha; ácido carmínico, urzela; orceína, orencína sulfonada, antocianinas, cacau, carmim, carotenóides (carotenos e xantofilas), carvão, clorofila, clorofila cúprica, sal de amônio de clorofila cúprica, sal de potássio de clorofila cúprica, sal de sódio de clorofila cúprica, cochonilha, cúrcuma, curcumina, hemoglobina, índigo, páprica, urzela (orceína e orceína sulfonada), urucum, vermelho de beterraba e betanina.
Obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão	Caramelo I

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 1977).

Desde 2014 há um consenso entre os países membros do Mercosul com a legislação vigente. A Resolução GMC (Grupo Mercado Comum) GMC nº 52/98 trata dessa harmonização, assim como a Resolução GMC Nº 31/92 que se refere aos critérios para determinar as funções dos aditivos e seus máximos valores para todas as categorias de alimentos (SICE, 2021).

4.1.4.2 Legislação brasileira vigente para indústria têxtil

Assim como na indústria de alimentos, os corantes sintéticos são muito utilizados na indústria têxtil. A classificação é dada de duas formas, de acordo com a estrutura química ou pelo modo que são fixados na fibra. Ambas as classificações estão descritas na Tabela 4.

A identificação dada pelo grupo químico se dá pela estrutura ou pela presença do grupo cromóforo. Assim como grupos cromóforos há também agregado nas moléculas os grupos ouxocromos e antiaoxocromos. No qual os primeiros atuam como doadores de elétrons, e os antiaoxocromos atuam como receptores de elétrons. Juntos são classificados como cromogênio e estão associados com as absorções dos corantes no espectro visível (ZOLLINGER, 1991).

Tabela 4. Classificação dos corantes usados na indústria têxtil.

Classificação	Corantes
Estrutura química	Corantes azo, corantes antraquinona, corantes metalizados, corantes indigoide, corantes ftalocianias, corantes metina, polimetina e polienos, corantes di e triarilmetina e aza análogos, corantes nitro e nitrosos, e corantes sulfurosos
Método de uso ou aplicação	Corantes reativos, diretos, azoicos, ácidos, à Cuba, de enxofre, catiônicos, dispersos, pré-metalizados, solventes e branqueadores.

Fonte: Adaptado de (ZANONI; YAMANAK, 2016; ZOLLINGER, 1991).

4.1.5 Efeitos negativos associados

São muitos os usos dos corantes sintéticos devido às características físico-químicas atribuídas aos produtos. Além do emprego nas indústrias alimentícias e têxtil outras aplicações são: empregados nas etapas de tingimento de couros e plásticos, indústrias de papel, cosmética e de tintas, tintas para impressão, etc. (VELOSO, 2012). Como consequência da ampla utilização têm-se o seu uso indiscriminado e sem certificação de qualidade, o que pode resultar em danos irreparáveis aos seres vivos e ao meio ambiente.

Dentre os efeitos indesejados associados ao uso desses compostos destaca-se a potencialidade de desenvolver carcinogenicidade e toxicidade. Alguns dos corantes e pigmentos empregados na indústria alimentícia, cosmética, avicultura e aquicultura estão sendo relatados como causadores de problemas de saúde como alergias, complicações digestivas e câncer (VELÁZQUEZ, 2012).

Estudo realizado por Netto (2009) para verificar a toxicidade dos corantes tartrazina e amarelo crepúsculo utilizados na produção de refrigerantes para condicionar estabilidade a luz, calor e pH, comprovou que os mesmos estão envolvidos em relatos toxicológicos, e resultam em reações adversas que vão desde a urticária até a asma. Outra resposta ao uso da tartrazina está no desencadeamento de hipercinesia em pacientes diagnosticados com hiperatividade. Podendo atingir respostas de hipersensibilidade de até 2,4% dos consumidores (CASTRO et al, 2005).

Pessoas que fazem o uso de aspirina se mostram mais sensíveis ao uso da tartrazina, com estimativa de que de 8 a 20% terão reações adversas e mesmo não

apresentando intolerância estão suscetíveis a ter reações de broncoespasmo, urticária e angioderma (NETTO, 2009). O uso prolongado desse corante desencadeia o aumento da produção de linfócitos e eosinófilos na mucosa antro gástrica de ratos a nível experimental, no entanto não foi verificadas alterações carcinogênicas na dose de 7,5 mg de corante/kg/dia durante o tempo de investigação (MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007).

O potencial genotóxico do corante amarantho foi investigado por Jabeen et al (2013). Por meio dos experimentos os colaboradores demonstraram que em temperaturas próximas de 37 °C o corante causa lesões na molécula de DNA. Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram expostas a soluções de 9,76 à 5.000,00 µg/mL do corante, as amostras em suspensão apresentaram concentrações iguais ou superiores à 1.250,00 µg/mL e então submetidas a análise de eletroforese. Os resultados indicaram danos ao material genético do microrganismo estudado.

Com abordagens metodológicas similares, Sarikaya et al (2012) avaliaram o potencial genotóxico do corante amarantho por meio de experimentos conduzindo larvas de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. Foi utilizado o teste de Mutação e Recombinação Somáticas (SMART) em que as larvas se alimentaram com diferentes concentrações do corante (1; 1,25; 25 e 50 µg/mL). O objetivo do experimento foi verificar se as larvas iriam apresentar mutações após a ingestão do corante, e assim foi constatado que a ingestão de concentrações iguais ou superiores à 1,25 µg/mL induziram mutações genéticas e danos ao DNA.

Assim como descrito anteriormente para o experimento utilizando o corante amarantho, Sarikaya et al (2012) testaram o corante eritrosina B alimentando as larvas da mosca *Drosophila melanogaster*. As concentrações testadas foram de 1, 3 e 6 µg/mL de eritrosina B. Os resultados para as concentrações testadas foram inconclusivos. Os autores reforçam a necessidade de novos estudos para que as devidas conclusões possam ser estabelecidas.

Objetivando verificar o potencial genotóxico e mutagênico da eritrozina, utilizando os testes cometa (Ensaio eletroforese em gel de célula única) e o CBMN-Cyt, Chequer et al. (2012) expuseram as células HepG2 em diferentes concentrações do corante. Os resultados confirmaram que o corante estudado tem potencial genotóxico e mutagênico. Os maiores danos à molécula de DNA foram observados nas maiores concentrações por meio do teste cometa, e das sete concentrações, seis apresentaram capacidade mutagênica por meio do teste CBMN-Cyt.

A categoria de corantes sintéticos usados na indústria têxtil é considerada uma das que mais poluem o meio ambiente, cerca de 10% dos derivados da produção e do consumo são descartados diretamente neste (GHAZI MOKRI et al., 2015). Quando os resíduos têxteis são descartados nos efluentes sem o tratamento adequado a tendência é que haja o esgotamento do oxigênio dissolvido, resultando no desequilíbrio do ecossistema local. O acúmulo dessas substâncias impede a distribuição da luz solar nas águas, modificam a atividade fotossintética, e conseqüentemente deteriora a água, reduz a solubilidade do oxigênio e gera efeitos tóxicos (LALNUNHLIMI; KRISHNASWAMY, 2016).

O corante índigo é um dos mais usados utilizados na indústria têxtil, correspondendo a aproximadamente de 3% da produção total dos corantes (VAUTIER; GUILLARD; HERRMANN, 2001). É característico pela baixa solubilidade que resulta na ecotoxicidade quando disperso em meios aquáticos. Essa exposição pode ocorrer a partir de sedimentos, águas ou biomagnificação pela ingestão dos alimentos que serão por consequência bioacumulados no organismo do ser vivo exposto, uma vez que quanto menos solúvel o corante, mais chances de ser absorvido (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

4.2 Aplicação dos corantes e pigmentos naturais

A indústria de alimentos tem investido em novas fontes naturais com potencial para produção de corantes e pigmentos, de modo a não alterar a segurança alimentar e nem as características dos produtos (GONÇALVES, 2020). O uso desses compostos estão empregados na indústria de alimentos de modo geral, além de conferir coloração aos produtos atribuem valor nutricional, e estão associados a alguma funcionalidade. É o caso dos carotenoides, que são precursores da vitamina A e atuam como substâncias antioxidantes (DE SOUZA, 2012).

Recentemente, devido ao aumento dos problemas ambientais as empresas têxteis tem demonstrado preocupação inserindo nos processos industriais medidas de gestão ambientais para amenizar os efeitos negativos causados por conta do uso dos corantes sintéticos. Para firmar esta iniciativa, foram estabelecidos acordos científicos entre a Associação Brasileira da Indústria Têxtil (Abit), o Sindicato das Indústrias Têxteis Paulistas (Sinditêxtil-SP) e o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

(MCTI) afim de tornar a indústria têxtil mais competitiva e sustentável (BALAN, 2017).

A manipulação dos corantes e pigmentos naturais possibilita colorações únicas e harmoniosas por meio da combinação das fontes derivadas. A cor desejada irá variar de acordo com a origem (animal, vegetal ou microbiana), métodos de extração (físico-químicos ou bioquímicos) e aplicação ao substrato (NARIMATSU, 2020). Diante disso, os testes manipulando essas substâncias têm aumentado e conseqüentemente tem ampliado os campos de aplicação conforme visto na Tabela 5.

Tabela 5. Substância, origem e campo de aplicação de corantes e pigmentos naturais.

Substância (s)	Origem	Aplicação	Fonte
Antocianinas e fenólicos	<i>Sorghum bicolor</i> L.	Produção de bala de goma de gelatina	Barbosa; Queiroz (2018)
Betalainas e carotenoides	<i>Tacinga inamoena</i>	Produção de iogurte	Silva Junior (2018)
Carotenoides e fenólicos	<i>Mauritia flexuosa</i> L. f.	Aditivos alimentares	Morais et al (2019)
Bixina	<i>Bixa orellana</i> L.	Coloração de pipoca de micro-ondas	Trombete et al. (2020)
Bixina	<i>Bixa orellana</i> L.	Indústria de lácteos	Constant (2020)
Carotenoides, bixina, polifenóis e outros.	<i>Curcuma longa</i> , <i>Stryphnodendron</i> , <i>Hibiscus</i> <i>sabdariffa</i> e outros.	Indústria têxtil	Narimatsu et al. (2020)
Carotenoides	<i>Chlorella vulgaris</i>	Nutrição animal e suplementação humana	Ahmad (2020)
Carotenoides	<i>Dunaliella salina</i>	Nutrição animal e suplementação humana	Almeida (2020)
Antocianinas e fenólicos	<i>Syzygium cumini</i> L.	Espessante e aglutinante de alimentos	Freita (2021)
Carotenoides	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Suplemento alimentar e produtos farmacêuticos	Vieira (2021)

4.3 Carotenoides

Os carotenoides compreendem um dos principais grupos de pigmentos naturais com cerca de 850 representantes, constituído por duas classes, os carotenos compostos por hidrocarbonetos (β -caroteno, licopeno, α -caroteno, etc.) e as xantofilas que são seus derivados oxigenados com um átomo de oxigênio (α e β -criptoxantina, zeaxantina, luteína, cataxantina, astaxantina, etc.) (MAOKA, 2020; ERNST, 2002).

4.3.1 Biossíntese dos carotenoides

Quimicamente, os carotenoides são moléculas de tetraterpenos (C₄₀), formados a partir unidades do isopreno, o isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), compostos por cinco átomos de carbono (C₅), caracterizando uma molécula linear e simétrica, com a ordem invertida na posição central (BHATT; PATEL, 2020).

A síntese dessas moléculas pode ocorrer através da via do ácido mevalônico (MVA) ou do metileritritol fosfato (MEP), variando de acordo com o organismo produtor. Na primeira via há o uso de Acetil-CoA para produzir IPP. Já na segunda, há a produção de IPP e DMAPP a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (G3P), via denominada “via independente do mevalonato”. (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; TETALI, 2019).

4.3.2 Propriedades e funções dos carotenoides

Essa classe de compostos tem-se destacado por serem produzidos naturalmente por plantas, algas, bactérias e fungos e podem ser produzidos em larga escala sem causar danos ao meio ambiente, além de atuarem em funções biológicas e fisiológicas como atividade pró vitamina A, atividades antioxidantes, fortalecimento do sistema imunológico, sinalização celular, proteção contra degeneração macular relativa à idade, proteção da pele, redução do risco de doenças degenerativas e cardiovasculares (FONTANA et al., 2000; MESQUITA, 2013; SCHWARTZ, 2010).

4.3.2.1 Atividade pró vitamina A

Alguns carotenoides como o β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina e β -criptoxantina são caracterizados como precursores da vitamina A (ARSCOTT;

4.3.2.2 Atividade antioxidante

As ERs são moléculas, átomos ou íons derivados do oxigênio que possuem alta reatividade. São definidos em três classes: EROs (espécies reativas do oxigênio), ERNs (espécies reativas do nitrogênio) e EREs (espécies reativas do enxofre) (MAGDER, 2006; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

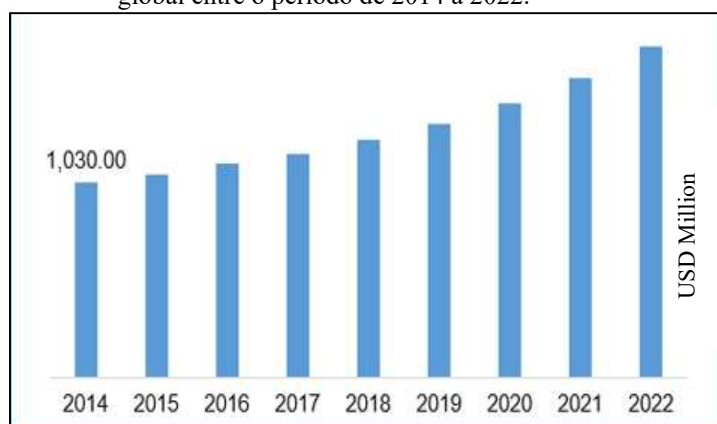
A desregulação dos compostos descritos desencadeia desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, que por consequência resulta no processo de estresse oxidativo, que danifica muitas biomoléculas fundamentais para o organismo. Muitas doenças estão associadas a esse tipo de deterioração, algumas destas são: artrite, catarata, disfunções cognitivas, neoplasias, AIDS, obesidade, diabetes, cardiovasculares, neurodegenerativos e câncer (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

Visto isso, os carotenoides atuam retirando as espécies altamente reativas presentes no meio, promovendo proteção antioxidante. Esse mecanismo ocorrerá por meio de duas ações específicas, por meio de ações físicas, que envolve a transferência de energia e por mecanismos químicos, que envolve a reação química entre o carotenoide e a espécie reativa química (MESQUITA, TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

4.4 Mercado e produção biotecnológica dos carotenoides

O mercado global de corantes naturais tem sido alavancado nos últimos anos diante da necessidade do aumento da demanda por rótulos limpos e produtos derivados de fontes naturais (ALBUQUERQUE, 2015). Previsões anuais fornecidas pelo relatório da Credence Research (2016a) estimaram o crescimento do mercado de corantes naturais para fins alimentícios entre o período de 2014 a 2022 conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Estimativa da produção mundial de corantes naturais segundo a Receita do mercado global entre o período de 2014 a 2022.



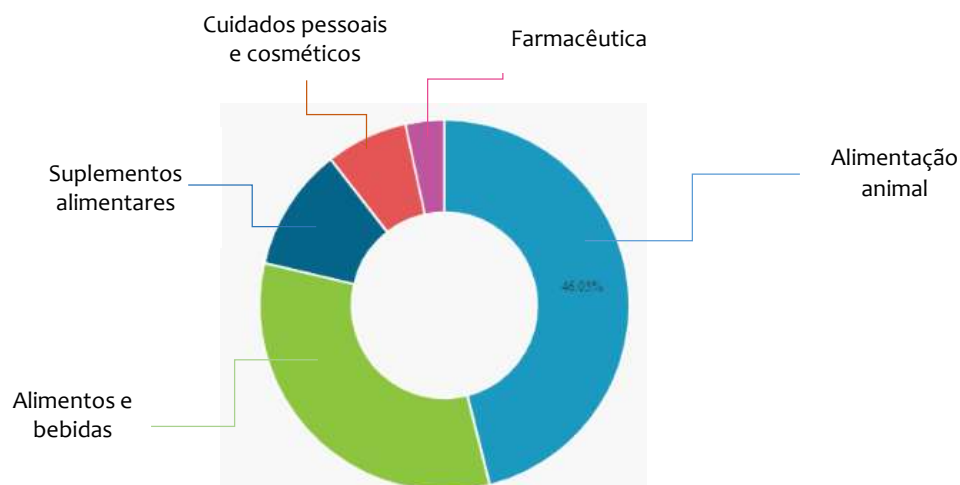
Fonte: CREDENCE RESEARCH (2016a)

O faturamento do mercado mundial de corantes naturais no ano de 2014 foi de US\$1,030.00 milhões. Em 2019 foi de US \$ 1,44 bilhão e está projetado para atingir US \$ 1,84 bilhão até 2027, a um CAGR (taxa de crescimento anual composta) de 3,4% durante o período de previsão. Espera-se um aumento considerável para os próximos anos, com os EUA liderando a posição de maior mercado da América do Norte e deve crescer a um CAGR de 7,4%. (CREDENCE RESEARCH, 2016b; FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2020).

O mercado de carotenoides tem sido impulsionado pelas mudanças de hábitos devido ao aumento das preocupações com a saúde e bem estar, assim como a demanda pela substituição dos corantes sintéticos pelos corantes de origem naturais nos processos produtivos. Essas exigências têm aumentado a demanda das economias emergentes, e fontes de carotenoides como algas e alimentos funcionais têm despertado grandes oportunidades de negócios (RAMMUNI et al., 2019).

Como visto na Figura 4 os carotenoides utilizados como aditivos para alimentação animal lidera o segmento de maior aplicação desses corantes, com destaque para a produção de rações destinadas para alimentação de peixes, crustáceos e aves. No segmento de alimentos e bebidas a utilização dos carotenoides tem destaque para a produção de alimentos processados e suplementos dietéticos, justificado pelo aumento constante e notável na demanda por ofertas de alimentos orgânicos e naturais (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2020).

Figura 4. Participação no mercado global de carotenoides, por aplicações em 2019.



Fonte: Adaptado de FORTUNE BUSINESS INSIGHTS (2020).

O β -caroteno representa o maior mercado de produtos apoiado pelo uso extensivo como agente corante em várias aplicações, com ênfase nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. No ano de 2014 o corante teve uma produção global, por volume produzido de 343,72 toneladas, 40% destes foi destinado aos segmentos de comida e bebida em termos de receita, liderado também pelos EUA com projeção de crescimento com CAGR de 3,5% (Credence Research, 2019b).

No ano de 2015 a receita global para o β -caroteno alcançou US\$432,2 milhões, no qual 35% da participação foram derivados das algas como fonte de obtenção. Em 2019 a previsão foi de US\$ 532 milhões, com uma taxa de crescimento anual acumulada CAGR de 3,3% (HU, 2019).

Devido ao alto acúmulo de carotenoides e a projeção da demanda de mercado, as microalgas são tidas como as principais promissoras para essa finalidade. As microalgas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são duas das mais promissoras fontes algal para obtenção dessas substâncias (LOCH-NECKEL, 2018).

A microalga *Dunaliella salina* é considerada a melhor fonte de β -caroteno produzido comercialmente, o conteúdo de β -caroteno pode atingir até 14% da biomassa, seguido da microalga *Haematococcus pluvialis* que tem destaque para síntese da astaxantina no estágio vermelho, onde 90% dos CT corresponde a esse carotenoide, enquanto a concentração média de carotenoides para a maioria das algas é de apenas 0,1% -0,2% (BAJPAI, 2017; RAPOSO; MORAIS, 2015).

A produção biotecnológica de carotenoides utilizando microrganismos é uma consequência da crescente demanda mundial por essas substâncias. Os processos biotecnológicos permitem obtenção de melhores resultados a partir do uso de linhagens sintetizadoras de maiores quantidades de carotenoides e a otimização dos processos. Alguns dos fatores que torna a produção de carotenoides em escala comercial são: redução de espaços para produção, baixo custo associado, adaptação dos cultivos (independência das condições ambientais), sistema controlado de cultivo, obtenção de maiores taxas de metabolitos (VALDUGA et al., 2009).

4.5 Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes, caracterizados morfológicamente em unicelulares e multicelulares, e filogeneticamente organizadas nos grupos procariontes que englobam as divisões Cyanophyta e Prochlorophyta e os eucariontes composto pelas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta (WOJCIECHOWSKI, 2013).

Outras caracterizações são utilizadas para classificar esses microrganismos, como os pigmentos produzidos, a constituição da parede celular, a natureza dos compostos bioativos e dos produtos químicos, e os aspectos citológicos e morfológicos (TOMASELLI, 2004). Do ponto de vista biotecnológico é importante identificar a caracterização quanto à constituição dos pigmentos produzidos, dado isso a Tabela 6 apresenta as divisões e junto os principais pigmentos produzidos.

Tabela 6. Principais pigmentos produzidos pelos grupos procariontes e eucariontes das microalgas.

Grupo	Nome comum	Pigmentos sintetizados	
Procariontes	Cyanophyta	Cianobactérias Clorofila a, ficocianina e ficoeritrina	
	Prochlorophyta	*	Clorofila a, b, ficobiliproteínas e ficocianina
Eucariontes	Chlorophyta	Algas verdes	Clorofila a, b e carotenoides
	Euglenophyta	Euglena	Clorofila a, b e carotenoides
	Rhodophyta	Algas vermelhas	Clorofila a, d, ficobiliproteínas, ficocianina e carotenoides
	Haptophyta	Algas douradas/marrons	Clorofila a, c e carotenoides
	Heterokontophyta	Heterokonta	Clorofila a, c e carotenoides
	Cryptophyta	Diatomáceas	Clorofila a, c e carotenoides
	Dinophyta	Dinoflagelados	Clorofila a, b, c e carotenoides

* Nome comum não identificado

Fonte: Adaptado de ANDRADE; COLOZZI FILHO (2014); RICHMOND (2008).

Microalgas são microrganismos produtores primários de energia, produzem matéria orgânica utilizando luz solar, CO₂, carbono e água, e fornecem oxigênio para o metabolismo dos organismos que as consome. Habitam diferentes ecossistemas da terra, seja em solos ou em ambientes aquáticos sob condições climáticas distintas, predominando a maior diversidade para os meios marinhos e fontes dulcícolas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; LEE, 2008).

4.5.1 *Chlamydomonas* sp.

Microalgas do gênero *Chlamydomonas* pertencem à divisão Chlorophyta predominantes de fontes de águas doces. São microrganismos eucariontes unicelulares, flagelados, suas células são arredondadas ou ovoides com paredes finas

e lisas, e definida com aproximadamente 20 μ de largura e 10 μ de comprimento. (HARRIS, 1998; VALENTE, 2012).

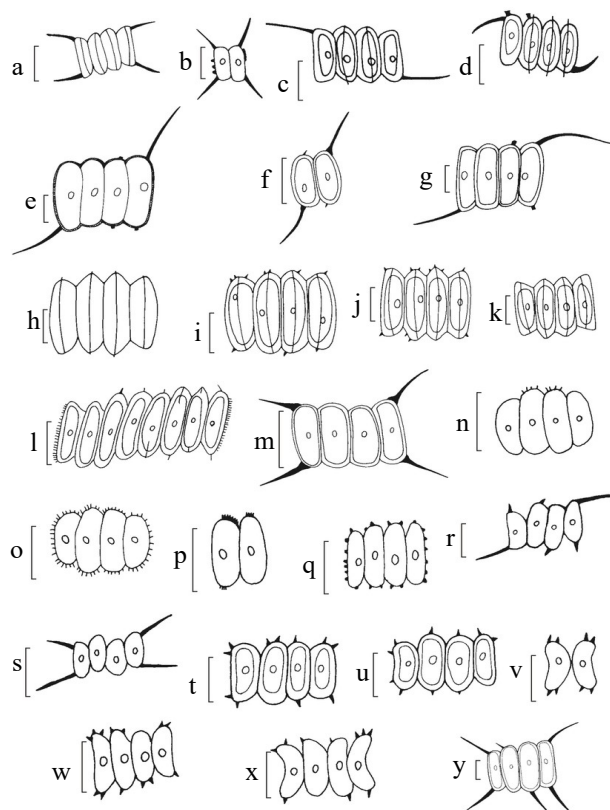
A temperatura ótima para o crescimento das microalgas *Chlamydomonas* sp. em escala laboratorial varia entre 20 e 25 °C, com fotoperíodo de 12/12, 14/10 e 16/8 horas (claro/escuro) e pH neutro. Por serem seres fotossintetizantes, o fotoperíodo é um dos fatores importantes na concentração celular, na etapa de escuridão é predominante a fase mitótica, no qual ocorre rápidas taxas de divisões celulares. Apresenta ciclo de vida simples, com requisição de nutrientes em baixa concentração e rápido crescimento (HARRIS, 2001).

4.5.2 *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp. são microalgas aquáticas pertencentes a família Scenedesmaceae, da ordem Chlorococcales, classe Chlorophyceae e divisão Chlorophyta (LEE et al., 2008). Taxonomicamente existem 74 espécies aceitas. Três dos principais subgêneros desse grupo são: *Acutodesmus*, *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (HEGEWALD, 1997).

Microalgas deste gênero apresentam alta taxa de crescimento, iniciando a autorreprodução (esporulação) a partir das células individuais, e durante a replicação, após múltiplas divisões a célula mãe se torna multinucleada, derivando novas células filhas. Os cenóbios são planos e agrupados por 2 a 32 células com tamanhos variados entre 3 a 31 μ m, estruturados com cenóbios diferentes com padrões lineares, costulatóides, irregulares, alternados ou actilococóides, podendo apresentar espinhos ou não, com um cloroplasto e um pirenoide, conforme visto na Figura 5 (ANDRADE, 2014; RAMIREZ, 2013; AKGUL, 2017).

Figura 5. Diversidade morfológica de espécies Scenedesmaceae. a-f. *Desmodesmus maximus*. g-h. *D. microspina*. i-j. *D. perforatus*. k-m. *D. serratus*. n-q. *D. spinoso-aculeolatus*. r-t. *D. subspicatus*. u. *Scenedesmus arcuatus*. v. *S. obtusus*. w-y. *S. pectinatus*.



Fonte: Adaptado de HENTSCHEKE; TORGAN (2010).

A morfologia das microalgas *scenedesmus* pode ser afetada por vários fatores. A formação de diferentes *ecomorph* é caracterizada pelas condições de temperatura, fotoperíodo, nutrientes, pH, temperatura, densidade celular, a idade e a taxa de crescimento e condições climáticas. Outra justificativa para essa diversidade morfológica desses microrganismos está na liberação de substâncias químicas nos habitats, fato que explica o porquê que um táxon é capaz de produzir dois morfotipos distintos (TRAINOR, 1998; VAN DONK; HESSEN, 1993).

4.5.3 Fotossíntese

Microalgas utilizam dos processos fotossintéticos e da respiração celular para manter suas funções metabólicas. A fotossíntese em si, consiste em uma série de reações no qual ocorre a conversão da energia eletromagnética em energia química, destinada para a biossíntese da matéria orgânica a nível celular (GEST, 2002). Os compostos orgânicos liberados a partir desse processo são utilizados pelos demais

organismos, por meio do consumo, uma vez que não são capazes de realizar fotossíntese (ALBERTS et al., 1997).

As etapas reacionais da fotossíntese ocorrem nos cloroplastos, onde há os pigmentos fotossintetizantes clorofilas, carotenoides e ficobilinas que capturam a luz, e os carregadores de elétrons responsáveis que caracterizam as etapas fotoquímicas e bioquímicas (STREIT et al., 2005). A etapa fotoquímica, conhecida também por fase clara ou reações de luz, envolve a absorção dos fótons pelos pigmentos fotossintetizantes, que migram de estágio de energia eletrônica para outro (VIEIRA et al., 2010).

O nível de energia da excitação dos elétrons define o comprimento de onda que os pigmentos fotossintetizantes podem coletar. Por meio dessa energia há o desprendimento do elétron da clorofila, e então ocorre a fotólise da molécula de água, para repor o elétron perdido, e assim há a liberação de duas moléculas de oxigênio e dois hidrogênios. Por meio de uma série de transportadores de hidrogênio ocorre reações até que NADP (Nicotinamida adenina difosfato) é reduzido em NADPH₂ (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008).

Paralelamente ocorre o transporte o transporte de elétrons, que resulta na conversão ADP (Adenosina difosfato) e fosfato inorgânico (Pi) à ATP (Adenosina trifosfato). Na fase escura os produtos derivados da fase clara NADPH₂ e ATP são utilizados para assimilar CO₂ e então formar gliceraldeído 3-fosfato (G3P), essencial para a síntese dos carboidratos orgânicos (CAMARGO, 2020).

4.5.4 Condições de cultivo

O crescimento das microalgas ocorre de modo exponencial assim como para os demais microrganismos. A simplicidade de sua estrutura permite que em curtos períodos de tempo seja possível obter altas concentrações de biomassa e acúmulo de metabolitos de interesse. Essa viabilidade depende das condições impostas aos sistemas cultivos e os fatores físico-químicos reportados em estudos como mais importantes estão a temperatura, iluminação, pH, oxigenação e disponibilidade de nutrientes (SIPAÚBA-TAVARES; TEDESQUE; SCARDOELI-TRUZZI, 2019).

4.5.4.1 Temperatura

A temperatura é uma variável que tem efeito direto nas taxas de reações bioquímicas das microalgas. É imprescindível manter o controle ideal nos cultivos, uma vez que variações bruscas de temperaturas tendem a interferir na respiração celular, reações fotossintéticas e por consequência na produção de metabolitos (TORRENTERA; TACON, 1989; LOURENÇO, 2006).

Para manutenção dos cultivos a faixa ideal de temperatura irá variar de acordo com a cepa, local de origem e o meio de cultivo. Considerando as condições ambientais e a origem, estudos sugerem a faixa 20 a 35°C para o cultivo das microalgas derivadas de ambientes tropicais (DANTAS, 2013; LOURENÇO, 2006). Outros estudos confirmam também que temperaturas abaixo de 16 °C contribuem para redução da atividade metabólica, enquanto as superiores a 35 °C podem ser letais para algumas cepas (TORRENTERA; TACON, 1989; RICHMOND, 2004).

4.5.4.2 pH

O potencial hidrogeniônico (pH) é um parâmetro de grande relevância no cultivo de microalgas, uma vez que desempenha a função de solubilização de CO₂ e dos minerais no meio de cultivo. A maioria dos sistemas produtivos para esses microrganismos são favorecidos com o pH neutro, no entanto há espécies que prevalecem com o pH entre 4,0 e 9,0 (BECKER, 1995; KUMAR et al., 2010).

Variações bruscas nos valores de pH tendem a modificar o estado físico-químico das substâncias que desempenham funções vitais, e por consequência alteram as funções metabólicas, atuam na permeabilidade da membrana, transporte iônico e na velocidade das reações enzimáticas (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

4.5.4.3 Iluminação

O cultivo de microalgas exige sistemas de cultivos diferente daqueles dos demais microrganismos, uma vez que a maioria são fotoautotróficas e dependem diretamente da luz para obtenção de energia por meio das reações fotossintéticas. Nessa exposição os fótons são absorvidos pelas células como fonte de nutrientes, e por isso as propriedades da luz, qualidade do espectro (comprimento de onda específico) e a intensidade (quantidade de fótons incidentes na área) devem ser considerados para o estabelecimento das mesmas (WANG et al, 2006; WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

Como a fotossíntese compreende uma fase fotoquímica (clara) e uma química (escura), apenas a primeira depende diretamente de luz. Essa informação é de grande relevância para determinar o fotoperíodo, levando em conta o tempo suficiente para que as reações desta etapa ocorram, assim como tem que ser considerado a faixa do comprimento radiação fotossinteticamente ativa (RFA), que varia de 400 a 700 nm e possibilita que a fotossíntese aconteça (MOLINA et al., 2001).

Para que a distribuição da luz seja eficiente no cultivo das microalgas, são utilizados fotobiorreatores. O uso desses equipamentos permite a passagem de alta densidade luminosa, garantindo que a distribuição da luz seja uniforme e controlada, de modo que haja formação de zonas escuras e resulte em fotoinibição pelo excesso de irradiação e oxigênio molecular, resultando em baixa eficiência fotossintética (ACIÉN et al., 2017; HENDREY; HOUGHTON; BROWN, 1987).

4.5.4.4 Agitação e aeração

O sistema de agitação e incorporação de gases possibilita a suspensão das células no meio de cultivo e torna a distribuição dos gases e dos nutrientes homogêneos. Por meio dessa variável é possível aumentar a produtividade dos cultivos e obter êxito na produção a partir do fornecimento de CO₂ necessário para aumentar a atividade fotossintética (MAZZUCA et al., 2006; SCHMIDELL, 2001).

4.5.4.5 Nutrientes

A utilização dos nutrientes em proporções ideais, associados à otimização do processo de fotossíntese são dois pontos essenciais para superar os desafios envolvidos na produção da biomassa microalgal e viabilizar a escala industrial. Quando não padronizado, a concentração dos nutrientes afeta diretamente o desenvolvimento das microalgas, que por consequência afeta o processo fotossintético e o ciclo de vida (LEU; LIN, 2013; ESTEVES, 2011).

O meio de cultura para produção de microalgas apresenta uma relação complexa entre os substratos, bioquímica, genética e os fatores ambientais. Visto isso, para formulação do meio deve-se considerar tais fatores: Concentração de sais minerais; fonte de carbono; fonte de nitrogênio; pH adequado para a microalga cultivada; uso do EDTA par solubilização dos elementos anteriores (RUSSO, 2011).

Com exceção do carbono, o nitrogênio, fósforo e ferro são os principais macronutrientes limitantes dos meios de cultura. Na ausência dessas substâncias a produção de microalgas é submetida a estresse metabólico. Essas perturbações resultam na produção de componentes como lipídeos, proteínas, carboidratos e carotenoides (LOURENÇO, 2006).

4.5.5 Sistemas de cultivo

O cultivo controlado de microalgas possibilita a inserção de melhorias no processo produtivo. Esses ajustes permitem induzir a síntese e o aumento de metabólitos de interesse biotecnológico, com vantagens que sobressaem outros métodos de produção. No cultivo de microalgas não há competição com as cultivares agrícolas (não há exigências de terras aráveis), os microrganismos adaptam facilmente a diferentes condições ambientais e climáticas, e estes apresentam alta taxa de fixação de CO₂, cerca de 10 a 50 vezes mais do que as plantas (ZENG; GUO; SU, 2015; SIMÕES, 2016).

Os sistemas de cultivos são projetados para obter densidade celular com altas taxas de concentração de produtos por volume de colheita, levando em consideração as características desejadas para deste último. A eficiência da produção depende de um conjunto de diferentes parâmetros ambientais, físicos e biológicos, relacionados com as características intrínsecas das espécies de microalgas, e a geometria do sistema (TEBBANI et al., 2014).

Dentre os fatores mais relevantes para o sucesso do cultivo estão a temperatura, pH, iluminação, agitação e disponibilidade de nutrientes. Assim como é fundamental a seleção da cepa e o sistema adequado para cultivo da mesma. Para os sistemas de cultivo fotoautotróficos dois tipos são predominantes, os fotobiorreatores de sistemas abertos e fechados, e fermentadores para os cultivos heterotróficos (HENRARD, 2009; GUIMARÃES, 2012; MILANO, 2016).

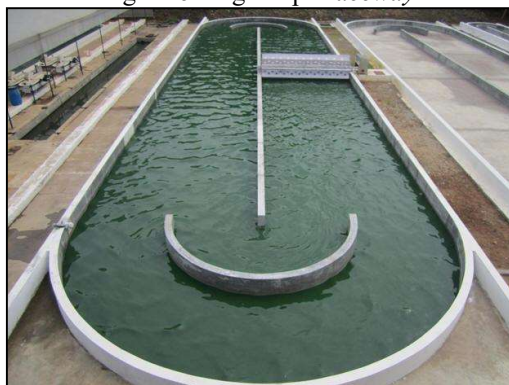
4.5.5.1 Sistemas abertos

Sistemas abertos conhecidos também como *open ponds*, são caracterizados pela simplicidade e acessibilidade da implementação. Geralmente são lagoas ou tanques instalados em áreas externas ou sob estufas, expostos a radiação solar para

fornecimento de energia. Devido essa última exigência, a instalação deve ser projetada para locais com alta incidência solar e disponibilidade de área (COSTA, 2016).

Nos sistemas abertos são empregadas geometrias básicas tais como lagoas e tanques abertos sem mecanização para realização da mistura, lagoas circulares e lagoas do tipo *raceway*, também conhecidos como *high rate ponds* ou *raceway paddle wheel mixed open ponds* (Figura 6).

Figura 6. Lagoa tipo *raceway*.



Fonte: ROCHA (2016).

Os modelos de lagoas tipo *raceway* são mais empregados comercialmente, e promove homogeneização do meio a partir de pás circulares, bombas ou defletores, que resultam taxas contínuas de crescimento, já a homogeneização nas lagoas circulares há também a possibilidade de aeração, porém a capacidade de mistura é inferior (LEAL, 2015).

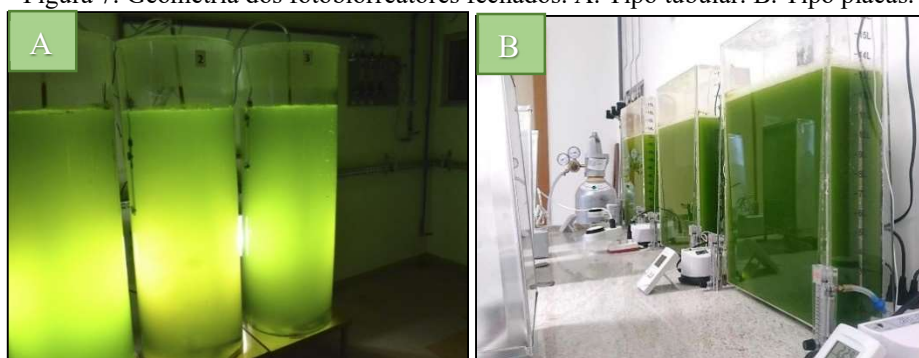
Embora a utilização desse tipo de sistema seja abrangente em escala industrial pelas condições econômicas, algumas limitações técnicas tais como baixa produtividade (em comparação aos sistemas fechados), suscetibilidade a contaminações e variações climáticas (perda por evaporação, baixa incidência luminosa, chuva, etc.) podem interferir na obtenção da biomassa algal e produtos derivados. Com isso, o uso recomendando para produção em sistemas abertos é restrito para microalgas como *Dunaliella* sp., *Spirulina* sp. e *Chlorella* sp. que apresentam rápido crescimento ou extremófilas (CARLSSON, 2007).

4.5.5.2 Sistemas fechados

Os sistemas de cultivos fechados, conhecidos como sistemas de fotobiorreatores fechados sanam parte dos problemas existentes nos cultivos abertos. Nesse tipo de cultivo a cultura não fica exposta ao ar livre, reduz os riscos de contaminações externas e o sistema possibilita o controle das condições de cultivo, que permitem obter altas taxas de biomassa e produtos (SLADE; BAUEN, 2013; DZUMAN, 2013).

A divisão segundo o tipo de biorreator é dada em tubulares (Figura 7A) ou tipo placas planas (Figura 7B). O material constituído pode ser de plástico, vidro ou policarbonato, para permitir uma melhor distribuição e penetração da fonte luminosa, que é fornecida natural ou artificial, dependendo da localização e adequação do sistema (XU et al., 2009; DZUMAN, 2013). Os sistemas fechados são mais onerosos em relação aos sistemas abertos, devido ao alto custo de instalação e manutenção (FERNANDEZ et al., 2017).

Figura 7. Geometria dos fotobiorreatores fechados. A. Tipo tubular. B. Tipo placas.



Fonte: Figura 7A. EMBRAPA (2017); Figura 7B. NASCIMENTO (2016).

4.6 Carotenoides em microalgas

Pigmentos naturais como os carotenoides apresentam funções biológicas importantes nas microalgas. A variabilidade e concentração destes dependem das condições bióticas e abióticas submetidas ao cultivo. Duas classes são predominantes, os carotenoides primários, sintetizados em condições de cultivo normais, com destaque para a função de pigmento acessório à fotossíntese e auxílio no crescimento celular, e os carotenoides secundários que são produzidos como resposta do organismo a condições de extremas de cultivo (TELFER, 2002; MESQUITA, 2013).

Os carotenoides secundários produzidos em condições de “estress” em resposta do organismo e são originados a partir de fatores como incidência luminosa

em excesso, variações de temperatura e pH, limitações de nitrogênio e pela presença ou ausência de compostos químicos no meio de cultivo (OROSA et al., 2001; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). Diante da busca pela elucidação da biossíntese e acúmulo dessas substâncias em maiores proporções, as investigações estão cada vez mais frequentes.

4.7 Biotecnologia das microalgas

Microalgas são microrganismos base da cadeia alimentar consideradas máquinas fotossintéticas geradoras de pigmentos. A partir de adaptações ecológicas e sua plasticidade bioquímica, esses microrganismos possibilitam a bioconversão direta da energia solar em compostos químicos sob variadas condições ambientais (VENKATA et al, 2015).

Relatos bibliográficos que estimam que haja aproximadamente mais de um milhão de espécies de microalgas e apenas quarenta e quatro mil são conhecidas e já estudadas. Essa diversidade remete uma fonte ilimitada de biocompostos que podem utilizados de forma benéfica para a humanidade e ao meio ambiente, assim como há aqueles altamente tóxicos (NEOFOTIS et al. 2016).

A Biotecnologia permite elucidar os bioprocessos e desenvolver métodos produtivos para distintos campos de aplicações. Como pode ser visto na Tabela 7 o uso das microalgas tem sido de maior destaque para fabricação de biocombustíveis, produção de alimentos para humanos e animais, formulação de compostos como vitaminas, lipídeos, esteróis, polissacarídeos, enzimas, antibióticos e fármacos (VALDUGA, et al., 2009).

Tabela 7. Microorganismo, metabólito produzido e campo de aplicação.

Microalga	Biocomposto	Aplicação	Fonte
<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> e <i>Dunaliella</i>	Clorofilas, carotenóides, proteínas e vitaminas	Aquicultura	Dantas (2013)
<i>Spirulina</i> sp., <i>Dunaliella tertiolecta</i> e <i>Synechococcus nidulans</i>	Enzimas e ficobiliproteínas	Captação de CO ₂ e indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica	Ores (2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nanopartículas metálicas	Ação antimicrobiana	Ferreira (2015)
<i>Scenedesmus dimorphus</i> e <i>Desmodesmus</i> sp.	Lipídeos e clorofilas	Biocombustível e cosmética	Ferreira (2015)
<i>Dunaliella salina</i>	βcaroteno	Suplemento alimentar e cosmética	Tinoco (2015)
<i>Chlorella minutissima</i>	Lipídeos	Biocombustível	Zorn et al. (2017)
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	Luteína	Suplemento alimentar e farmacologia	Flórez-Miranda (2017)
<i>Spirulina</i> sp.	Carotenoides, vitaminas, ácidos graxos e ficocianina	Suplemento alimentar e farmacologia	Meireles (2018)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Enzimas	Biorremediação	Slompo (2018)
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	Aminoácidos e ácidos orgânicos	Ação antibacteriana	Patil; Kaliwa (2019)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Suplemento alimentar e cosmética	Marinoa et al. (2020)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofilas, carotenóides, proteínas e vitaminas	Cosmética, Farmacêutica e nutrição	Agustina; Aidha; Oktarina (2021)

4.8 Fatores que influenciam na carotenogênese

A possibilidade da produção de carotenoides em escala industrial a partir de microrganismos como as microalgas têm atribuído valor comercial a essas substâncias e intensificado estudos voltados para a otimização dos processos e da biossíntese. A eficiência desta última depende diretamente das condições de cultivo impostas, uma vez que reflete na atividade enzimática, responsável pela síntese dos carotenoides (BAUMGARTNER, 2013; OROSA, et al., 2001).

4.8.1 Composição do meio de cultivo

A limitação de nutrientes nos meios de culturas afeta em grandes proporções a composição química das algas, assim como sua taxa de crescimento. Diante disso é fundamental determinar a composição dos meios de cultura, de modo que contribua no crescimento e desenvolvimento celular, assim como auxilie na produção de bioprodutos. Atualmente, o nutriente mais utilizado para a realização de estudos fisiológicos e acúmulo de metabólitos nas microalgas é o nitrogênio (HAKALIN, 2014; JI et al., 2014).

4.8.1.1 Nitrogênio

O nitrogênio depois do carbono, o macronutriente mais importante para o desenvolvimento das microalgas. Compreende de 1 a 12% da biomassa, variando de acordo com a espécie. É um componente fundamental das moléculas estruturais: proteínas, ácidos nucleicos e os pigmentos fotossintetizantes (BECKER, 1994; WOJCIECHOWSKI et al., 2013; LOURENÇO, 2006).

A limitação de nitrogênio nas microalgas influencia na taxa de divisão celular e por consequência na concentração das proteínas e dos pigmentos fotossintetizantes. O principal pigmento fotossintetizante dessa classe de microrganismos é a clorofila (aproximadamente 0,1–1% biomassa/volume), molécula rica em nitrogênio. O suprimento limitado deste elemento afeta a fotossíntese, que reduz a eficiência da captação da energia pela perda da clorofila, conduzindo metabolicamente a formação de pigmentos auxiliares como os carotenoides (XIN et al., 2010).

O acúmulo de carotenoides secundários é uma característica de uma ampla diversidade de microalgas que se desenvolvem em condições limitadas de nitrogênio (RICHMOND, 2004). Barros (2016) cultivou a microalga *Heterochlorella Luteoviridis* em fotobioreatores utilizando o meio “f/2” sob diferentes concentrações nutriente nitrato de sódio e temperaturas. O maior teor de carotenoides totais (2,47 mg g⁻¹) foram obtidos na condição de 60 mg L⁻¹ NaNO₃ a 27 ° C. Foi observado que o teor dos carotenoides são afetados diretamente pelo aumento da concentração de nitrogênio, com destaque para a all-*trans*-luteína com (0,77 mg g⁻¹) na biomassa.

Fré e Chies (2016) investigaram a influência de diferentes concentrações de nitrato de sódio juntamente com intensidades de luz variadas, na síntese de carotenoides por parte da microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivadas em fotobiorreatores *airlif* em meio f/2 padrão. As condições de 17,5 klx de intensidade de luz e 300 mg L⁻¹ de NaNO₃ resultaram em maiores teores de carotenoides carotenoides (0,738 ± 0,038 mg L⁻¹ d⁻¹), biomassa (0,176 ± 0,005g L⁻¹d⁻¹) e lipídios (16,68 ± 1,50 mg L⁻¹d⁻¹).

4.8.2 Efeito do pH

Mudanças de pH nos meios de cultivos são característicos quando está havendo biossíntese de carotenoides e outros metabólitos. Para a maioria das microalgas, a carotenogênese está associada a um pH entre 6 a 7. Segundo Luo et al. (2013) nas primeiras 72 h de bioprodução há um decréscimo dos valores de pH, seguido da elevação durante a fase de carotenogênese, e posteriormente permanece constante, indicando o término da biossíntese.

Essa variável exerce influência no desenvolvimento celular e formação de metabolitos. Visto isso, estudos voltados para comprovação dos efeitos resultantes estão sendo desenvolvidos. Mayorga, Murillo e Manso (2017) verificaram o acúmulo dos carotenoides luteína e βcaroteno em cultivos com pH de (8,0-9,0), iluminação de 84.49 (μmol.m⁻²s⁻¹) e salinidade de 12 -13% superior aos cultivo normal. As condições impostas resultaram em valores elevados dos carotenoides trans- βcaroteno (295,1 μg/g), violaxantina (247,5 μg/g), neoxantina (163 μg/g) e outros carotenoides em menores proporções.

4.8.3 Efeito da Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento e crescimento das microalgas. Essa variável reflete alterações nas vias biossintéticas e por consequência possibilita o acúmulo de metabólitos como os carotenoides. Cultivos submetidos a temperaturas superiores a temperaturas normais de crescimento resultam em taxas elevadas de carotenoides por conta do estresse foto-oxidativo (TRIPATHI et al., 2019; JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY. 2013).

A condição de que a temperatura contribui para formação de carotenoides ainda não foi bem elucidada, alguns autores justificam que quando as microalgas são expostas a essa condição, ocorre alteração nutricional e em seguida ocorre a diminuição da síntese de clorofila e, por consequência, aumento da biossíntese de carotenoides. Estudos avaliando o efeito dessa variável em conjunto com demais restrições de cultivo têm se mostrado eficazes (MINHAS et al., 2016).

Gregory (2015) demonstrou a influência da temperatura e da fonte de nitrogênio na fase de carotenogênese. Dos ensaios realizados os melhores valores de metabólitos e biomassa foram nas condições de temperatura a 27 °C e nitrato de sódio 375 mg L⁻¹. A biomassa resultante foi de 3,53 g L⁻¹ e carotenoides totais 2,44 mg g⁻¹.

4.8.4 Efeito da iluminação

A síntese de carotenoides em microalgas e nos demais microrganismos são afetados de forma positiva pelo uso da irradiação da luz branca. O tempo de exposição e a intensidade vão variar de acordo com a espécie e o local de origem. Diante disso é preciso considerar essas duas condições para estabelecer o fotoperíodo, levando em consideração que a exposição prolongada a luz pode danificar o fotossistema, resultando em fotoinibição (MANRIQUE; CORZO PIÑEROS, 2019; BHOSALE, 2004).

As microalgas *Chlorella* sp., e *Scenedesmus* sp. foram submetidas a experimentos com diferentes fotoperíodos para avaliar a síntese de carotenoides nos diferentes ensaios. As melhores concentrações de CT para a *Scenedesmus* sp. foram obtidos nos fotoperíodos de 12h/12h (claro/escuro) e 16h/h8 (claro/escuro), com rendimentos de 61,7 mg/L e 85,7 mg/L. Para a microalga *Chlorella* sp. o fotoperíodo de maiores rendimentos foi de 24 horas claro, com concentração de 64.9 mg/L e

7,5h/16,5h (claro/escuro) com 67,7 mg/L (CARDENAS-GUTIERREZ; MACHUCA-MARTINEZ; GARCÍA-MARTÍNEZ, 2021).

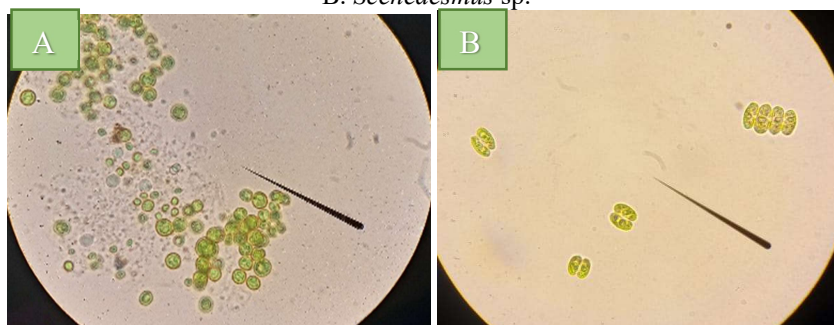
5. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Oeste da Bahia, Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães – CMLEM, no Laboratório 3, conduzidos com o suporte da equipe de Bioprospecção de Biomoléculas de interesse Biotecnológico da Região Oeste da Bahia.

5.1 Obtenção da linhagem

As microalgas *Chlamydomonas* sp. (Figura 8A) e *Scenedesmus* sp. (Figura 8B) foram disponibilizadas pelo professor Dr. Felipe da Silva Figueira, docente da Universidade Federal do Oeste da Bahia e coordenador da equipe de pesquisa de Bioprospecção de Microalgas. A escolha desses microrganismos foi dada com base em estudos prévios realizados por Silva (2019) comprovando o potencial da síntese de carotenoides em condições normais de cultivo.

Figura 8. Microalgas vistas no microscópio óptico (aumento de 100x). A. *Chlamydomonas* sp.
B. *Scenedesmus* sp.



Fonte: Autora.

As linhagens foram isoladas no laboratório, a partir de amostras obtidas das fontes dulcícolas pertencentes à região Oeste da Bahia utilizando uma rede de coleta de fitoplâncton (Figura 9A). Os pontos de coletas foram na Cachoeira do renondo (Figura 9B) e Cachoeira do acaba vida (Figura 9C), localizados no município de Barreiras, Bahia.

Figura 9. Coleta das microalgas. A. Rede fitoplâncton de coleta. B. Cachoeira do redondo. C. Cachoeira do acaba vida.



Fonte: Banco de dados do laboratório de bioprocessos.

5.2 Meio de cultura

O meio aquoso usado para cultivo das linhagens foi o ASM1, modificado por Gorham et al. (1964) e Zagatto e Aragão (1992). De acordo com Rangel (2018) esse meio é específico para o desenvolvimento de cianobactérias, mas os testes realizados com clorófitas em laboratórios apresentaram resultados promissores.

O meio ASM1 é composto por 4 soluções estoque (Tabela 8). Para cada solução (A, B, C e D) os compostos são diluídos em 1000 mL de água destilada, autoclavados e armazenados sob refrigeração.

Tabela 8. Composição dos reagentes utilizados no preparo da solução estoque do meio ASM1.

Solução estoque	Reagentes	Quantidade (g)
A	NaNO ₃	8,50
	MgSO ₄ + 7 H ₂ O	2,45
	MgCl ₂ + 6 H ₂ O	2,05
	CaCl ₂ + 2H ₂ O	1,45
B	KH ₂ PO ₄	8,70
	Na ₂ HPO ₄ + 12H ₂ O	17,8
C	H ₃ BO ₃	28,4
	MnCl ₂ + 4 H ₂ O	13,9
	FeCl ₂ + 6 H ₂ O	10,8
	ZnCl ₂	3,35
	CoCl ₂ + 6 H ₂ O	0,19
	CuCl ₂ + 2 H ₂ O	0,014
D	EDTA	18,6

Fonte: Adaptado de GORHAM et al. (1964) e ZAGATTO; ARAGÃO (1992).

5.3 Preparo do inóculo

Para realização dos experimentos e verificação do potencial da produção de carotenoides, fez-se necessário aumentar a concentração celular da cultura. Para manutenção e multiplicação das linhagens utilizou-se reatores do tipo frasco erlenmeyers de 1000 mL contendo o meio ASM1. O volume total do cultivo foi de 500 mL, com 450 mL de meio e 50 mL de amostra das microalgas.

As microalgas foram mantidas na incubadora automática orbital refrigerada MSM 130/PGA/F (Figura 10) sob condições controladas de temperatura 25 °C (± 1), intensidade luminosa aproximada de 23,6 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescente (20W), com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, e agitação constante (100 rpm). O crescimento celular foi acompanhado utilizando câmara de Neubauer por 14 dias. Período este, em que foi constatado a fase exponencial, característico por altas taxas de crescimento celular.

Figura 10. Inóculos iniciais das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. acondicionados na incubadora automática orbital MSM 130/PGA/F.



Fonte: Autora.

5.4 Condições de cultivo

O protocolo usado para o delineamento experimental foi adaptado de Jacinavicius, *et al.* (2019); Piñeros (2019); Rangel (2018). Os cultivos foram feitos em triplicatas, em frascos erlenmeyers de 500 mL, com 250 mL de meio ASM1, respectivamente sob depleção de 50 e 70% de nitrogênio, e 50 mL de inóculo das microalgas produzidas por 20 dias em condições de batelada simples.

Foram denominados meios de cultura A50% e B50% (meios submetidos a depleção de 50% de NaNO_3), e A70% e B70% (meios submetidos a depleção de 70%

de NaNO_3). Cada meio foi submetido a condições de cultivos diferentes, descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Condições estabelecidas pra cultivar sob condições de estresse, as microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. durante 20 dias de experimento.

Tratamento Experimental	Condições
A50%	Depleção de 50% de nitrogênio Agitação com rotação de 100 rpm Temperatura ambiente 25°C Fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro
B50%	Depleção de 50% de nitrogênio Agitação manual a cada 2 dias Temperatura de 30 à 38 °C Iluminação constante
A70%	Depleção de 70% de nitrogênio Agitação com rotação de 100 rpm Temperatura ambiente 25°C Fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro
B70%	Depleção de 50% de nitrogênio Agitação manual a cada 2 dias Temperatura de 30 à 38 °C Iluminação constante

Fonte: Adaptado de JACINAVICIUS et al. (2019); PIÑEROS (2019) RANGEL (2018).

Para o preparo das soluções estoque com depleções de 50 e 70% de nitrogênio, foram utilizadas quantidades dos reagentes estabelecidos pelos protocolos já descritos, exceto pela fonte de nitrogênio. A Tabela 10 mostra os valores que adotados na pesagem do nitrato de sódio para o preparo da solução estoque referente a cada limitação submetida.

Tabela 10. Valores referentes a quantidade de nitrato de sódio (NaNO_3) pesados para o preparo das soluções estoque do meio ASM1 utilizadas nos tratamentos com depleção de nitrogênio.

Solução estoque A (meio ASM-1)	
Tratamento Experimental	Quantidade de NaNO_3 (g)
A e B (50 % de depleção)	4,25
A e B (70 % de depleção)	2,55

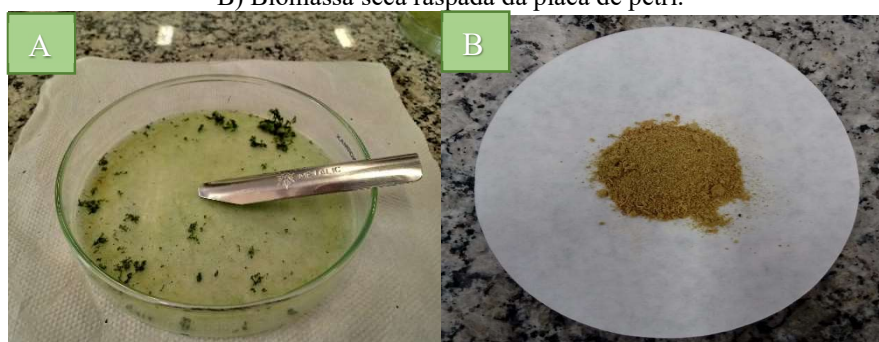
5.5 Avaliação do crescimento

Para avaliação do crescimento microalgal foi utilizado o método da determinação da densidade óptica (DO). O crescimento foi acompanhado do 1 ao 20º dia. A cada dois dias foram coletados uma alíquota de 3 mL de cada unidade experimental, totalizando 11 coletas. Os valores de DO de cada amostra foram quantificadas em espectrofotômetro UV/VIS (Global Trade Technology) no comprimento de onda de 570 nm. Os valores da absorbância foram convertidos em concentração de biomassa. O pH foi determinado utilizando o phmetro e fitas de pH (simultaneamente), e a temperatura foi aferida usando o termômetro de mercúrio.

5.6 Extração e quantificação dos carotenoides totais

Após 20 dias de cultivo, os meios foram adicionados à placas de petri e posteriormente colocados na estufa LUCADEMA por 24 horas, sob temperatura de 105 °C (FREITAS, 2017). Passado o tempo de secagem, as biomassas secas foram transferidos para o dessecador até temperatura ambiente e foram raspadas da placa com o auxílio de uma espátula de metal (Fig.11A e Fig11B).

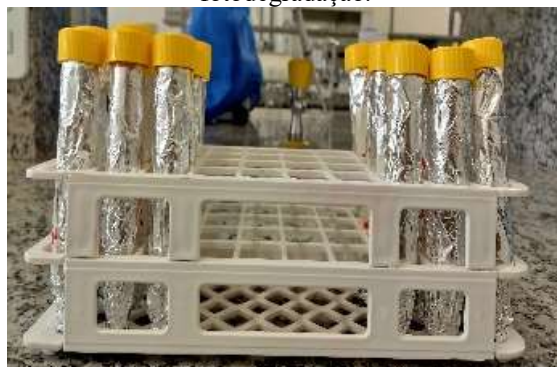
Figura 11. Tratamento da biomassa. A) Biomassa seca na placa de petri após 24h na estufa.
B) Biomassa seca raspada da placa de petri.



Fonte: Autora.

Para quantificação dos carotenoides totais foi utilizado o protocolo de Porra *et al.* (1989), adaptado por Huang e Cheung (2011). A solução extratora usada foi acetona 90%. Foram pesados 100,0 mg de biomassa de cada linhagem e adicionados a tubos de Falcon envoltos em papel alumínio (Fig.12).

Figura 12. Tubos de Falcon contendo as amostras, revoltidos com papel alumínio para evitar fotodegradação.



Fonte: Autora.

Com a biomassa quantificada, procedeu-se com a adição de 5mL do solvente extrator. As amostras foram submetidas a ultrassom por 15 minutos e posteriormente armazenados na incubadora refrigerada com proteção a luminosidade a 4 °C por 24 h. Todos os experimentos de manipulação da biomassa foram executados no escuro para evitar fotodegradação e oxidação dos biocompostos. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Após o tempo de repouso, agitou-se os tubos no agitador vortex GLOBAL TRADE, e centrifugou-se em centrífuga de bancada refrigerada SOLAB, a 5 °C, durante 30 min, a 3000 rpm. O sobrenadante (Figura 13) foi recolhido e a partir desses extratos foram obtidas as leituras de DO nos comprimentos de onda de 440,5 nm; 646,6 nm e 663,6 nm no espectrofotômetro. O conteúdo de carotenoides totais foi calculado de acordo com a equação 1.

Figura 13. Sobrenadantes submergidos das amostras de biomassa das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. submetidos a análise no espectrofotômetro.



Fonte: Autora.

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{4,69A^{440,5} - 4,74A^{646,6} - 1,96A^{663,6}}{\text{concentração da amostra (g/L)}} \quad \text{equação (1)}$$

Onde, $A^{440,5}$ é a absorvância da solução no comprimento de onda de 440,5 nm; $A^{646,6}$ é a absorvância da solução no comprimento de onda de 646,6 nm e $A^{663,6}$ é a absorvância da solução no comprimento de onda de 663,6 nm.

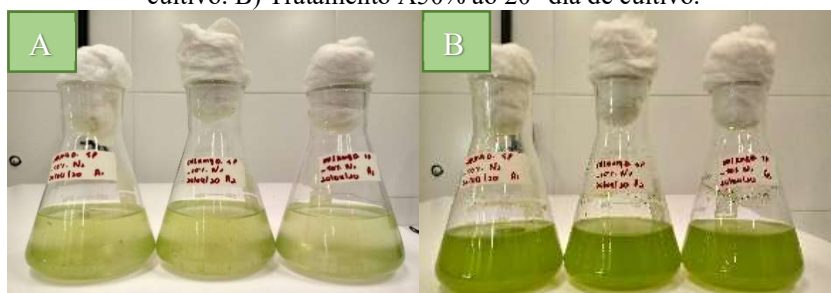
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Acompanhamento do crescimento celular

O crescimento celular das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. foram monitorados durante os 20 dias cultivados. As Figuras de 14 a 17 apresentam as diferentes variações de cores durante o 1º e 20º dia para os cultivos da *Chlamydomonas* sp.. Do mesmo modo pode ser visto a intensificação das cores para *Scenedesmus* sp. das Figuras 18 a 21.

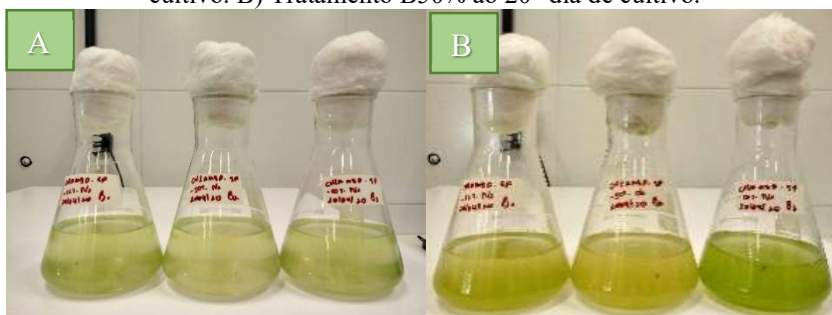
Essa verificação visual das mudanças de cores nos cultivo no decorrer dos dias, possibilita observar o aumento da densidade celular e da provável presença de pigmentos fotossintetizantes que compõem a estrutura das microalgas, sendo os principais as clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, como também a presença de outros compostos como lipídeos, proteínas e carboidratos.

Figura 14. Unidades experimentais para *Chlamydomonas* sp. A) Tratamento A50% ao 1º dia de cultivo. B) Tratamento A50% ao 20º dia de cultivo.



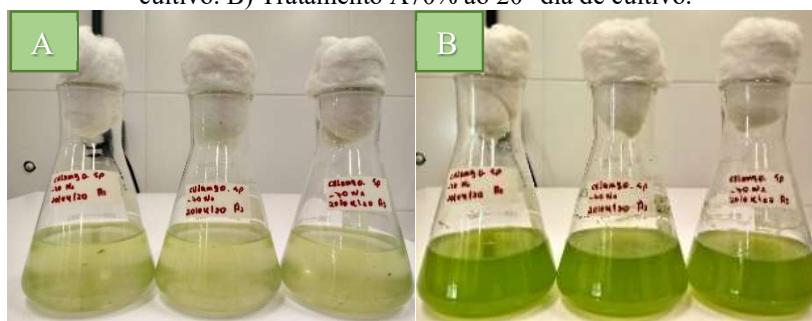
Fonte. Autora.

Figura 15. Unidades experimentais para *Chlamydomonas* sp. A) Tratamento B50% ao 1º dia de cultivo. B) Tratamento B50% ao 20º dia de cultivo.



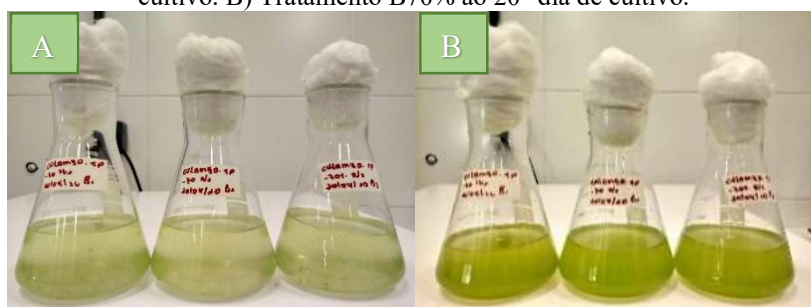
Fonte. Autora.

Figura 16. Unidades experimentais para *Chlamydomonas* sp. A) Tratamento A70% ao 1º dia de cultivo. B) Tratamento A70% ao 20º dia de cultivo.



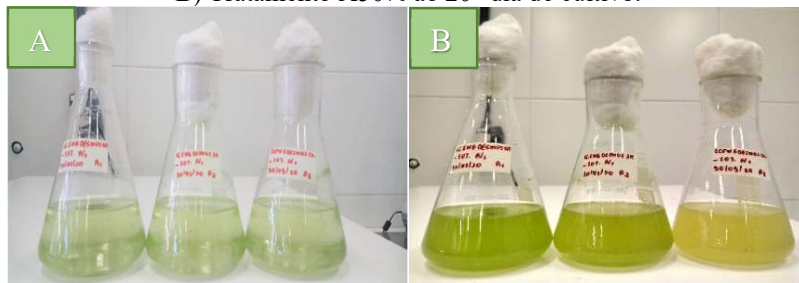
Fonte. Autora.

Figura 17. Unidades experimentais para *Chlamydomonas* sp. A) Tratamento B70% ao 1º dia de cultivo. B) Tratamento B70% ao 20º dia de cultivo.



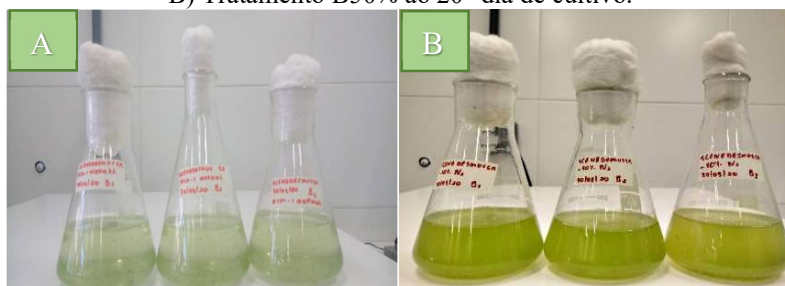
Fonte. Autora.

Figura 18. Unidades experimentais para *Scenedesmus* sp. A) Tratamento A50% ao 1º dia de cultivo. B) Tratamento A50% ao 20º dia de cultivo.



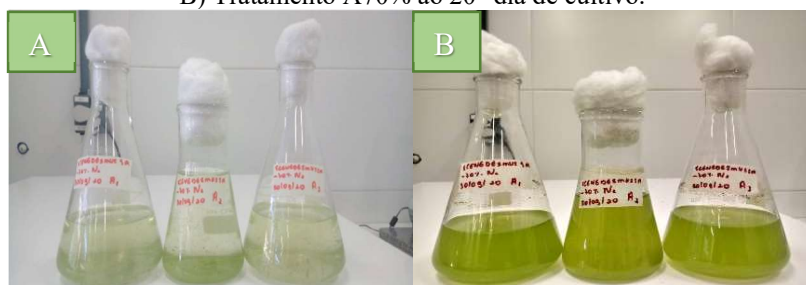
Fonte. Autora.

Figura 19. Unidades experimentais para *Scenedesmus* sp. A) Tratamento B50% ao 1º dia de cultivo. B) Tratamento B50% ao 20º dia de cultivo.



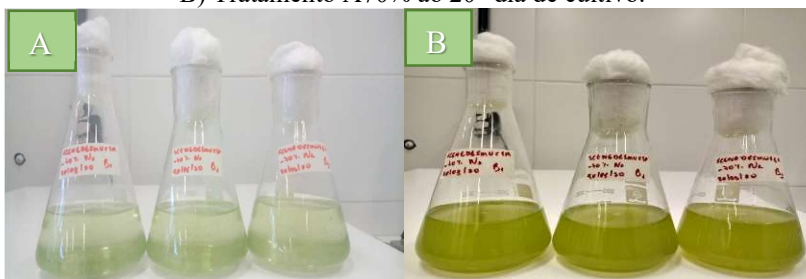
Fonte. Autora.

Figura 20. Unidades experimentais para *Scenedesmus* sp. A) Tratamento A70% ao 1º dia de cultivo.
B) Tratamento A70% ao 20º dia de cultivo.



Fonte. Autora.

Figura 21. Unidades experimentais para *Scenedesmus* sp. A) Tratamento A70% ao 1º dia de cultivo.
B) Tratamento A70% ao 20º dia de cultivo.



Fonte. Autora.

Utilizando as alíquotas de 3 mL para cada cultivo microalgal foi possível obter os rendimentos de biomassa durante os 20 dias de cultivo a partir do método da densidade óptica. Após finalizado as verificações, os resultados obtidos para a microalga *Chlamydomonas* sp. estão descritos na Tabela 11, assim como para a microalga *Scenedesmus* sp. estão descritos na Tabela 12.

Tabela 11. Rendimento em gramas de biomassa por litro de cultivo da microalga *Chlamydomonas* sp. em meio de cultivo ASM-1 no decorrer dos 20 dias de cultivo no fotobiorreator.

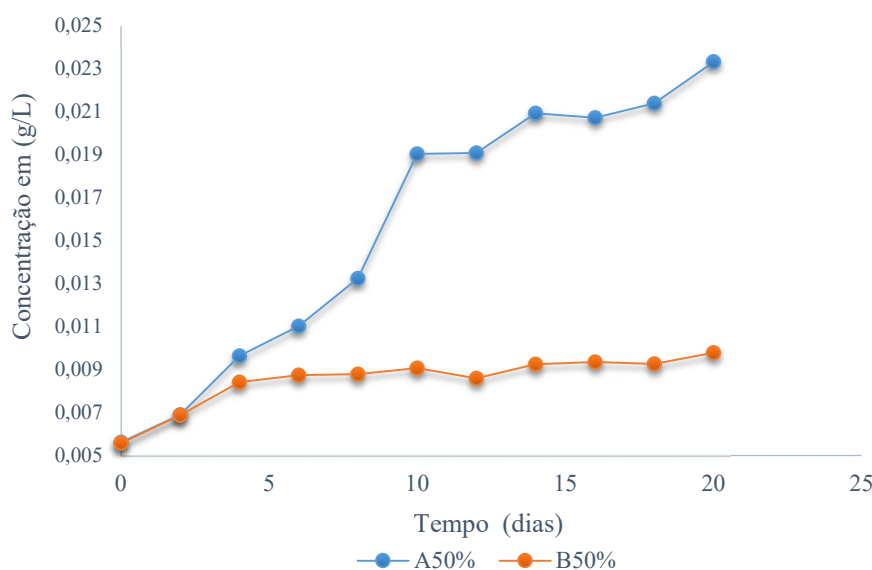
Dias	Tratamento A50 Biomassa (g/L)	Tratamento B50 Biomassa (g/L)	Tratamento A70 Biomassa (g/L)	Tratamento B70 Biomassa (g/L)
0	0,056	0,0056	0,007	0,0064
2	0,0069	0,0069	0,008	0,0077
4	0,0096	0,0084	0,011	0,0108
6	0,0110	0,0087	0,013	0,0113
8	0,0132	0,0088	0,016	0,0137
10	0,0190	0,0091	0,022	0,0137
12	0,0191	0,0086	0,023	0,0132
14	0,0209	0,0092	0,025	0,0143
16	0,0207	0,0093	0,025	0,0141
18	0,0214	0,0092	0,026	0,0134
20	0,0233	0,0098	0,026	0,0143

Tabela 12. Rendimento em gramas de biomassa por litro de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo ASM-1 no decorrer dos 20 dias de cultivo no fotobiorreator.

Dias	Tratamento A50 Biomassa (g/L)	Tratamento B50 Biomassa (g/L)	Tratamento A70 Biomassa (g/L)	Tratamento B70 Biomassa (g/L)
0	0,0003	0,0001	0,0003	0,0003
2	0,0017	0,0008	0,0002	0,0001
4	0,0034	0,0020	0,0013	0,0016
6	0,0052	0,0039	0,0029	0,0030
8	0,0070	0,0059	0,0046	0,0050
10	0,0079	0,0065	0,0065	0,0060
12	0,0092	0,0068	0,0083	0,0072
14	0,0102	0,0079	0,0108	0,0080
16	0,0107	0,0083	0,0104	0,0085
18	0,0113	0,0085	0,0097	0,0098
20	0,0114	0,0081	0,0091	0,0095

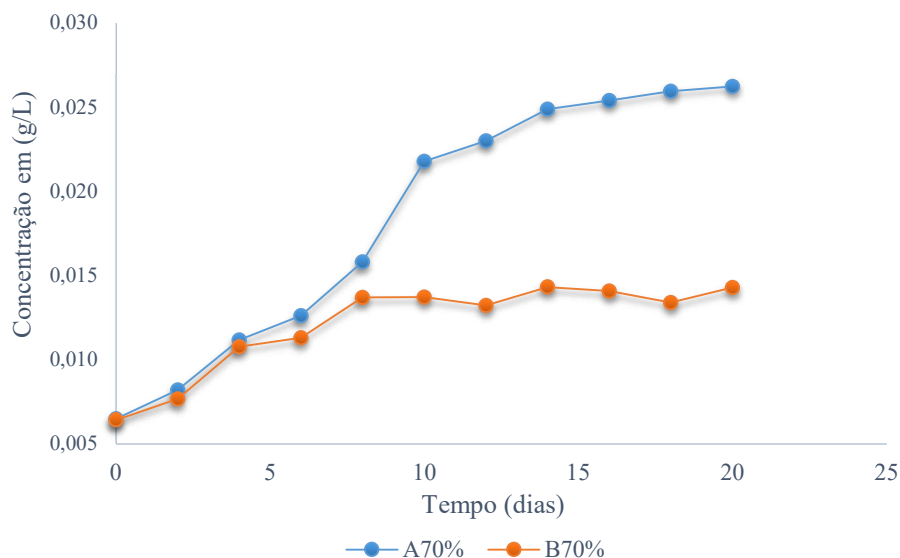
Por meio destas tabelas é possível plotar os gráficos e visualizar a variação da concentração da biomassa ao decorrer dos dias. Sendo assim. As figuras seguintes representam o resultado.

Figura 22. Crescimento em biomassa da microalga *Chlamydomonas* sp. nas condições A50% e B50%.



Conforme representado na Figura 22, é perceptível o melhor desenvolvimento da microalga *Chlamydomonas* sp. nas condições de tratamento A50% e uma baixa produtividade a partir do tratamento B50%. A produção do tratamento B50% é cerca de 64% inferior ao tratamento A50%, indicando uma melhor adaptação para as condições impostas para este último. Ambos tratamentos não apresentaram fase de indução do crescimento (lag), apresentando crescimento acentuado e migrando diretamente para a fase exponencial.

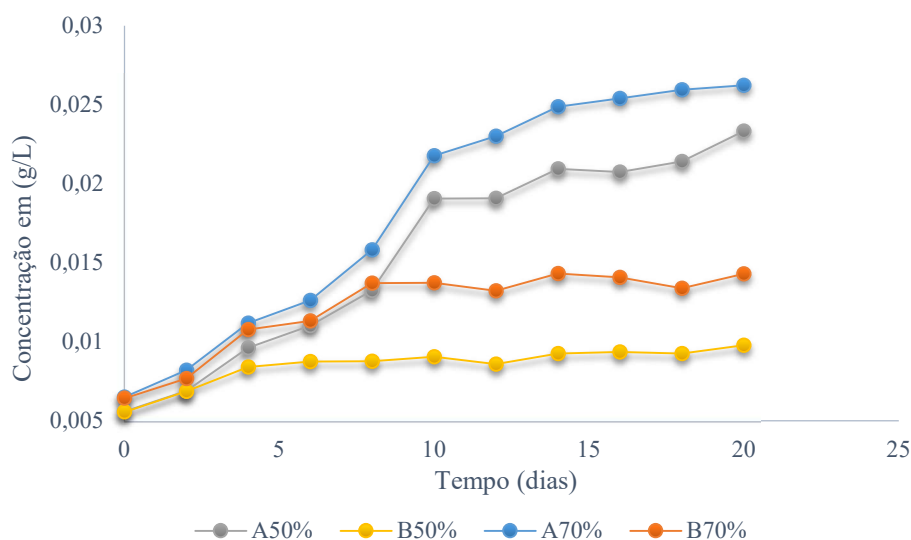
Figura 23. Crescimento em biomassa da microalga *Chlamydomonas* sp. nas condições A70% e B70%.



Do mesmo modo, como visto na Figura 23 há uma baixa produção microalgal nas condições de cultivo B70%, equivalendo a 46% de redução de biomassa em relação ao A70%. As condições de iluminação constante, temperaturas elevadas, e não homogeneização interferiram na concentração celular, indicando que esses fatores interferem diretamente no rendimento e produção da biomassa.

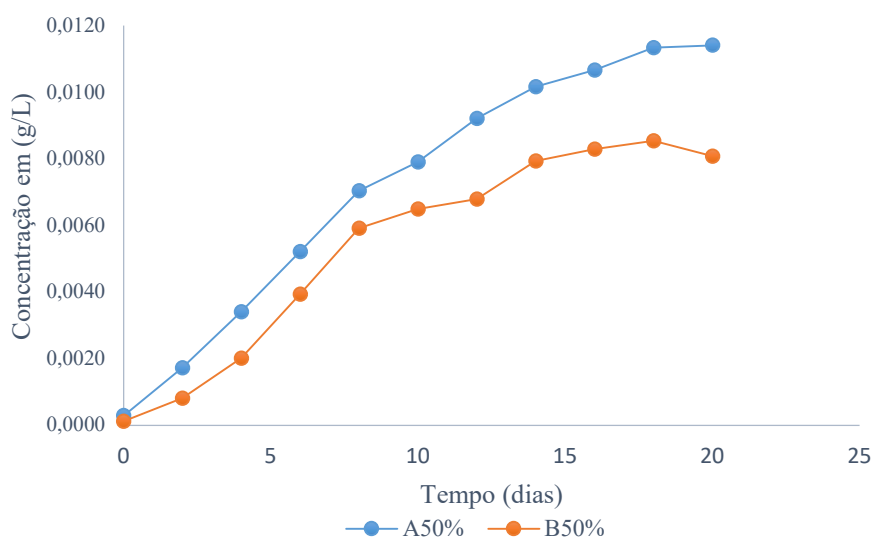
Observando a sobreposição das curvas de crescimento dos tratamentos aderidos à microalga *Chlamydomonas* sp., explicito na Figura 24, identifica-se que o melhor desenvolvimento da microalga foi em condições de depleção de 70% de nitrogênio para o cultivo A70%, apresentando um rendimento superior de 46,1% comparado ao tratamento B70%, 11,5% em relação A50% e 62,7% em consideração ao tratamento B50%. A redução de 50% da fonte de nitrogênio, associado aos estresses fornecidos pela iluminação, falta de homogeneização e controle da temperatura foram os que mais afetaram o crescimento da *Chlamydomonas* sp., resultando em uma baixa produção de biomassa.

Figura 24. Curvas de crescimentos da microalga *Chlamydomonas* sp. sobrepostas, resultante dos tratamentos utilizados neste estudo.



A Figura 25 representa o crescimento das microalgas *Scenedesmus* sp. submetidas aos tratamentos A50% e B50%. Na condição de temperatura a 25 °C, homogeneização constante a 100 rpm e fotoperíodo 12h claro/12h escuro foi observado um melhor desempenho de crescimento e produção de biomassa, com rendimento de 29,0%. Para esse mesmo cultivo, nos dois primeiros dias é característico a fase de indução de crescimento (lag) e ao 18° é iniciada a fase estacionária de crescimento.

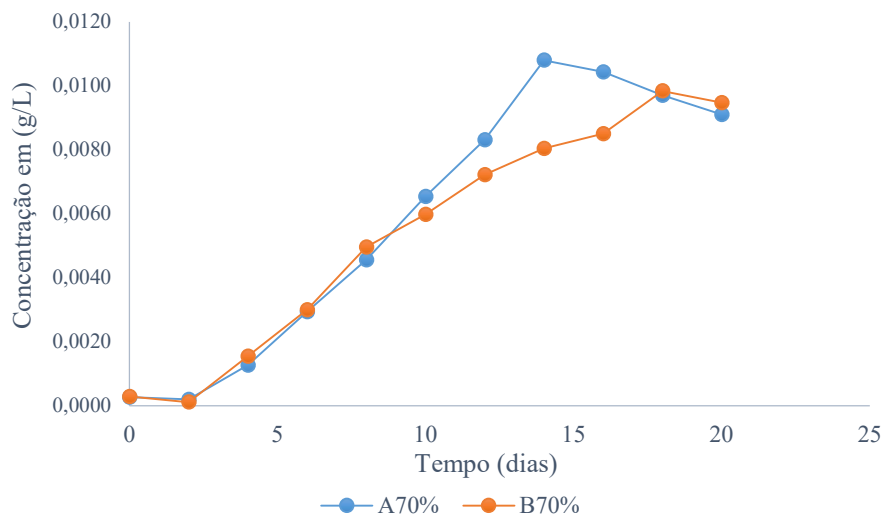
Figura 25. Crescimento em biomassa da *Scenedesmus* sp. nas condições A50% e B50%.



Fonte: Autora.

Assim como o crescimento celular no cultivo B50% foi afetado pelas limitações do cultivo, o B70% também apresentou menor concentração de biomassa em relação ao A70% (Figura 26). Ambos foram cultivados sob condições de estresse de intensidade luminosa, que pode resultar em fotoinibição pelo excesso de irradiação por consequência influencia no processo fotossintético.

Figura 26. Crescimento em biomassa da *Scenedesmus* sp. nas condições A70% e B70%.

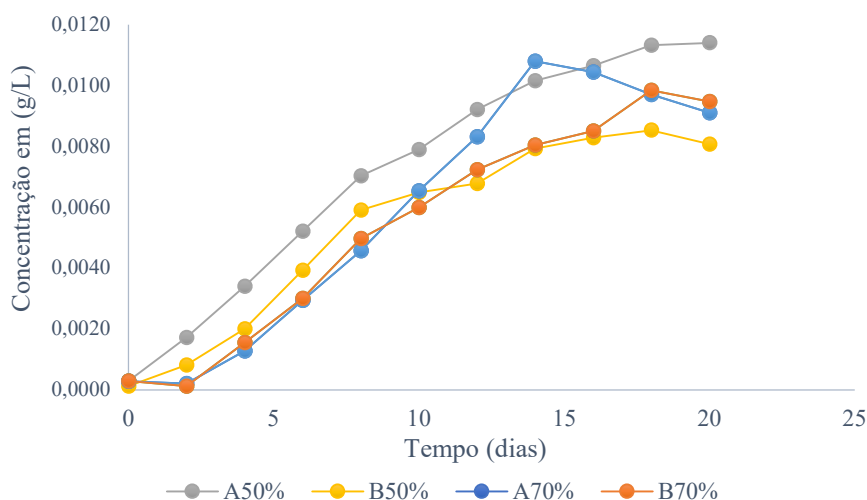


Fonte: Autora.

Como visto na Figura 26, as concentrações da biomassa foram afetadas pelas condições submetidas. Os dois cultivos apresentaram fase de adaptação ao meio (lag), com redução da densidade celular nos dois primeiros dias. No tratamento A70% a fase de crescimento exponencial foi do 4º ao 14º dia, seguido do declínio da viabilidade das células nos demais dias de cultivo. Já no tratamento B70% é observado a fase exponencial do 4º ao 18º dia, com início da fase estacionária em seguida.

Na superposição das quatro curvas de crescimento para a microalga *Scenedesmus* sp. descritas na Figura 27, é possível observar que o maior rendimento de biomassa foi obtido no vigésimo dia para o tratamento A50%, rendimento esse de 0,0114g/L, totalizando um aumento de 17,0% quando comparado com o tratamento B50%, 17,5% em relação ao tratamento A70% e 29,8% maior que o tratamento B70%.

Figura 27. Curvas de crescimentos da microalga *Scenedesmus* sp. sobrepostas, resultante dos tratamentos utilizados neste estudo.



Fonte: Autora.

Os gráficos descritos representam o comportamento do crescimento das microalgas avaliadas, assim como o acúmulo da biomassa. As variações características predominantes podem estar associadas às diferenças entre as características estabelecidas para os cultivos.

As condições para obter-se êxito no cultivo microalgal varia de microrganismo para microrganismo. Sendo os fatores mais importantes a luminosidade, nutrientes, temperatura, pH e homogeneidade do meio, e fatores como características genéticas e deficiência de CO₂ podem estar associadas a essas oscilações. As condições impostas para os cultivos tende a avaliar as melhores condições para as mesmas e assim obter um maior rendimento da biomassa e conseqüentemente uma maior produção de carotenoides por parte das mesmas, objetivando assim a otimização dos processos de produção.

Conforme representado na Tabela 13 é possível observar os valores de rendimento máximo $R_{máx}$ (g/L) e velocidade específica de crescimento μ_x (d⁻¹) obtidos nos cultivos das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp.

Tabela 13. Valores de rendimento máximo $R_{m\acute{a}x}(g/L)$ e velocidade especifica de crescimento $\mu_x(d^{-1})$ para as microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. obtidos em meio de cultivo ASM-1 no decorrer dos 20 dias de cultivo no fotobiorreator.

<i>Chlamydomonas</i> sp.				
	Tratamento A50	Tratamento B50	Tratamento A70	Tratamento B70
$R_{m\acute{a}x}$	0,018 g/L	0,004 g/L	0,020 g/L	0,008 g/L
μ_x	0,083 d ⁻¹	0,082 d ⁻¹	0,081 d ⁻¹	0,081 d ⁻¹

<i>Scenedesmus</i> sp.				
	Tratamento A50	Tratamento B50	Tratamento A70	Tratamento B70
$R_{m\acute{a}x}$	0,811 g/L	0,793 g/L	1,02 g/L	0,824 g/L
μ_x	0,105 d ⁻¹	0,110 d ⁻¹	0,040 d ⁻¹	0,037 d ⁻¹

Durante o período de cultivo foi possível acompanhar a variação de pH para a microalga *Scenedesmus* sp. na faixa de 6,0 à 8,0. Todos os cultivos foram iniciados com pH neutro, alterando de acordo com o aumento da densidade celular.

6.2 Carotenoides totais

Por meio das extrações realizadas utilizando a biomassa seca das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. foram obtidos os valores de carotenoides totais descritos na Tabela 14.

Tabela 15. Conteúdo de carotenoides totais para as microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp.

Microalga	Tratamento	Carotenoides (mg/g)
<i>Chlamydomonas</i> sp.	A50%	0,619 ± 0,063
	B50%	0,441 ± 0,003
	A70%	0,972 ± 0,049
	B70%	0,733 ± 0,025
<i>Scenedesmus</i> sp.	A50%	0,380 ± 0,006
	B50%	0,353 ± 0,006
	A70%	0,169 ± 0,003
	B70%	0,378 ± 0,011

Fonte: Autora.

Conforme descrito na Tabela 14, a microalga *Chlamydomonas* sp. apresentou uma maior produção de carotenoides totais nos tratamentos com redução de 70% da fonte de nitrogênio. No entanto, nas condições de fotoperíodo 12h claro e 12h escuro, agitação constante, e temperatura de 25 °C foi obtido um rendimento de 24,5% superior ao B70%. Essa mesma condição apontou um aumento da biomassa para ao microrganismo avaliado, tornando-o um potencial produtor de pigmentos naturais nesse mesmo tratamento.

No intuito de verificar o potencial de carotenoides por parte desta microalga, alguns cientistas também testaram sob diferentes condições. El-Mekkawi et al. (2019) estudou a *Chlamydomonas Reinhardtii* identificou a produção de 0,00215 (mg/g), simultaneamente Sassi et al. (2019) verificaram a produção de metabolitos de interesse à de tecnologia alimentos a partir de microalgas, e obteve a produção de 64,92 (mg/g) de carotenoides para *Chlamydomonas* sp. valores esses que comprovam a produção por parte dessas.

Os resultados das análises de carotenoides totais com depleção de 50% de nitrogênio para a microalga *Scenedesmus* sp. demonstram um maior rendimento do tratamento A50%, quando comparado com o tratamento B50%, rendimento esse de 7,1% maior (Tabela 14). Quando testado a depleção de 70% de nitrogênio, o tratamento B70% obteve um rendimento de 55,3% maior em relação ao tratamento A70%.

Destes resultados, observa-se um maior potencial de produção de carotenoides por parte da microalga *Scenedesmus* sp. quando cultivadas em fotoperíodo 12h claro e 12h escuro, agitação constante, e temperatura de 25 °C sob depleção de 50% de nitrogênio, uma vez que apresenta também, um maior rendimento da biomassa seca em relação aos demais tratamentos.

Estes resultados são consistentes com os estudos realizados para investigar o potencial da produção de carotenoides por parte da microalga *Scenedesmus* sp.. Silva (2019) avaliou a produção de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a*, *b*, carotenoides e ficobiliproteínas) da microalga avaliada, obteve a produção 0,024 (mg/g) usando o meio ASM-1, em condições normais de cultivo, valor este 93,7% menor que obtido neste estudo.

Os autores Piñeros et al. (2019) desenvolveram um estudo para avaliar a produção de carotenoides e lipídios para a *Scenedesmus Dimorphus* em laboratório, utilizando o meio Foliagro com diferentes molaridades dos sais NaCl e KNO₃.

Concluíram o trabalho com a produção máxima de 3,35 (mg/g) para KNO_3 (0,6M) e 1,79 (mg/g) para NaCl (0,6M), validando a produção de carotenoides sob condição de estresse de alta intensidade de luz e salinidade.

A fotoestimulação em diferentes faixas espectrais também é um fator que está sendo investigado para a maximização de carotenoides. Utilizando o planejamento experimental Plackett-Burman, Gonçalves (2019) avaliou os efeitos combinados das taxas de iluminação, fotoperíodo, pH e diferentes concentrações de NaCl e nitrogênio no cultivo da microalga *Tetradismus* sp.. As maiores concentrações foram obtidas sob $85 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 15,8h/8,2h (luz;escuro) de fotoperíodo, totalizando 7,6 (mg/g) de astaxantina, 9,1 (mg/g) de β -caroteno e 4,8 (mg/g) de licopeno.

Singh (2019) otimizou a produção de carotenoides utilizando Meio Bold Basal (BB), contendo nitrato 10 mM, fosfato 3,5 mM e salinidade 0,17 mM, sob as condições de cultivo com pH 8,5, iluminação fornecida com luz azul, com $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensidade. A produção de carotenoides utilizando a microalga *Asterarcys quadricellulare* aumentou 3x mais do que quando utilizado o meio BBM não modificado. O organismo produziu 118 (mg/g) na biomassa seca, sendo 47,0, 28,7, 15,5 e 14,0 (mg/g) de β -caroteno, luteína, astaxantina e cantaxantina.

Diante dos resultados apresentados, fica valido que os fatores biológicos, físicos e químicos influenciam no crescimento microalgal e a composição bioquímica tende a ser alterada significativamente pelas condições de cultivo que podem interferir no metabolismo das células e conseqüentemente na síntese dos biocompostos de interesse.

A intensidade luminosa e o fotoperíodo são de grande importância para bons resultados da obtenção de carotenoides. O excesso de luz pode provocar foto-oxidação ou morte foto-oxidativa devido à formação de substâncias tóxicas para as microalgas como o peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio (PENTEADO, 2014).

A luz pode ser prejudicial tanto em baixa quantidade quanto em excesso, interferindo principalmente no crescimento celular, na velocidade específica de crescimento e na produtividade. Visto isso, os resultados do crescimento celular para as duas microalgas testadas com intensidade luminosa constante apresentam produtividade inferior aos fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, não obstante aprestaram valores consideráveis de carotenoides totais.

O nitrogênio é um nutriente essencial para a produção de biomassa de algas, sendo uma integrante chave de muitos componentes celulares das algas, tais como alcalóides, amidas, aminoácidos, proteínas, DNA, RNA, enzimas e vitaminas (ZHOU, 2014). Quando testado as diferentes depleções de nitrogênio para as microalgas estudadas, é perceptível a variação no crescimento celular, densidade celular e na composição dos carotenoides totais. Validando o objetivo deste estudo.

7. CONCLUSÃO

O conteúdo de carotenoides totais obtidos através dos estudos realizados com as microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. isoladas de fontes de água doce da Região Oeste da Bahia e cultivadas em meio ASM1 com depleção de nitrogênio e variação nas condições de iluminação, temperatura e homogeneidade foram satisfatórios quando comparado com os estudos realizados com estas.

O melhor rendimento de biomassa e acúmulo de carotenoides totais para a *Chlamydomonas* sp. foi na condição A70%, com rendimentos de 0,026 g/L e 0,972 mg/g. Já para a microalga *Scenedesmus* sp. o melhor resultado foi na condição A50% com 0,011 g/L de biomassa e 0,380 mg/g de carotenoides totais.

Conclui-se, portanto que o acúmulo de carotenoides totais por parte das microalgas em estudo, é aumentado a partir da otimização do meio ASM1, e a redução da fonte de NaNO_3 , em conjunto com condições de iluminação, temperatura e homogeneidade controladas torna possível a biossíntese dessas biomoléculas. Diante disso, é possível validar que as microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. apresentam potencial Biotecnológico para produção de carotenoides, atentando-se para estudos mais aprofundados para aplicações em larga escala, uma vez que as mesmas foram testadas em escala laboratorial.

8. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante do trabalho desenvolvido e dos protocolos já existentes, é evidente o potencial biotecnológico das microalgas *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. em sintetizar carotenoides em maiores proporções. Visto isso, sugiro a realização de novos testes, com outros meios de cultivo e novas condições de limitações de nutricionais (salinidade, depleção ou adição de macro e micro nutrientes, etc.) que possam aumentar a produção da biomassa e os metabólitos sintetizados, caracterizar os carotenoides produzidos, alterar o tempo de cultivo (mais dias) em relação ao que foi usado neste estudo, e realizar monitoramentos mais intensos para quantificar a formação de biomassa, consumo de nutrientes, velocidades de crescimento e formação de produtos.

9. REFERÊNCIAS

- ACIÉN, F. G. et al. Photobioreactors for the production of microalgae. Microalgae-based biofuels and bioproducts, p. 1-44, 2017.
- AGUSTINA, S.; AIDHA, N. N.; OKTARINA, E. The extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris* for cosmetics. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, 2021. p. 012057.
- AHMAD, M. T. et al. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. Reviews in Aquaculture, v. 12, n. 1, p. 328-346, 2020.
- AKGUL, F. et al. Morphological and molecular characterization of *Scenedesmus*-like species from Ergene river basin (Thrace, Turkey). 2017.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEXIS, J.; RASS, M.; ROBERT, K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula*, 3. ed., Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
- ALBUQUERQUE, C. D. et al. Estudo da cinética de produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* e de técnicas de extração de pigmentos. 2015.
- ALI, S.; HUSSAIN, T.; NAWAZ, R. Optimization of alkaline extraction of natural dye from Henna leaves and its dyeing on cotton by exhaust method. *Journal of Cleaner Production*, pp. 61–66, 17, 2009.
- ALMEIDA, C. J. et al. Biotechnological Assessment of Culture Conditions on the Stress-Induced Carotenoid Production of *Dunaliella salina* and Growth Kinetics of Chlorophyceae Microalgae Strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 63, 2020.
- ANDRADE, D. S. et al. Microalgae of continental waters Volume 3: IPR collection of microalgae. *Microalgae of continental waters Volume 3: IPR collection of microalgae*, 2014.
- ANVISA. Aditivos alimentares. Ministério da saúde. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/alimentos/aditivos-alimentares>>. Acesso em 13 de set. 2021.
- ARSCOTT, S. A.; TANUMIHARDJO, S. A. Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 9, n. 2, p. 223-239, 2010.
- BAJPAI, V. K. A review on trend of marine sources for the development of functional foods, *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 46. 1245–1252, 2017.

BALAN, D. de S. L. Corantes naturais de aplicação têxtil: avaliação preliminar da toxicidade de urucum *Bixa orellana* L. (Malvales: Bixaceae) e hibisco *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvales: Malvaceae). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, v. 4, n. 7, p. 151-157, 2017.

BARBOSA, M. P.; QUEIROZ, V. A. V. Extração, caracterização química de corante natural de sorgo de genótipo SC 319 e aplicação em bala de goma de gelatina. In: Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: seminário de iniciação científica PIBIC/BIC júnior, 13, 2018, Sete Lagoas. [Trabalhos apresentados]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, D. V. Identificação e quantificação de carotenoides da microalga *heterochlorella luteoviridis* cultivada em fotobiorreator. 2016.

BAUMGARTNER, T. R. S. et al. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, 2013.

BECKER, E. W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, 1995. 292 p.

BHATT, T.; PATEL, K. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 10, p. 109–117, 2020 doi: 10.1007/s13659-020-00244-2.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63 p.351–361, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 387, de 05 de agosto de 1999. Aprova o “Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 5: balas, confeitos, bombons, chocolates e similares”. *Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 09 de ago. 1999. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes-anexos/17de2006/arquivos/10521json-file-1>>. Acesso em 03 de out. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. Disponível em:

<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/portaria-no-540-de-27-de-outubro-de-1997.pdf/view>>. Acesso em 03 de out. 2021.

BRASIL. Recursos hídricos. Ministério do meio ambiente. 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/mre/pt-br/assuntos/desenvolvimento-sustentavel-e-meio-ambiente/meio-ambiente-e-mudanca-do-clima/recursos-hidricos>>. Acesso em 28 de dez. 2021.

CAMARGO, E. C. Estudo da fisiologia do crescimento, produção de biomoléculas e fotossíntese em 30 espécies de microalgas verdes de água doce. 2020.

CARDENAS-GUTIERREZ, I. Y.; MACHUCA-MARTINEZ, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. B. Protocol for the maintenance of strains and escalation in the production of microalgae of industrial interest. *environmental engineering*, v. 23, n. 1-2021, 2021.

CARDOSO, L. A. C. et al. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 374-379, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15. 2013.

CASTRO, A. P. B.M. et al. Presença de corantes e lactose em medicamentos: avaliação de 181 produtos, revista brasileira alergia imunopatol. v.32, p. 748-755, 2005.

CHEQUER, F. M. D et al. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v.50, n.10, p.3447-51, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, p.294-306. Fev. 2007.

CHU, Y. *et al.* Identification of small molecular inhibitors for Ero1p by structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* vol. 21, n. 4, p. 1118-21, 2011.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and fatty acids present in oils extracted from palm fruits. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 31, p. 309-320, 2013.

COLOUR INDEX. Definitions of a dye and a pigment. Disponível em: <<https://colour-index.com/definitions-of-a-dye-and-a-pigment>>. Acesso em 19 de set. 2021a.

COLOUR INDEX. Fourth Edition Online. Disponível em: < https://colour-index.com/assets/files/upl/CI_leaflet.pdf>. Acesso em 12 de set. 2021b.

CONSTANT, P. B. L. et al. Aplicação da bixina microencapsulada em sistemas alimentícios. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 7, p. 47604-47617, 2020.

CONSTANT, P. B.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. *Boletim do CEPPA*, v. 20, p. 203-220, 2002.

CREDENCE RESEARCH. Beta Carotene Market By Application (Food & Beverages, Supplements, Animal Feed, Cosmetics) - Growth, Share, Opportunities & Competitive Analysis, 2015 – 2022. 2016b. Disponível em: <<https://www.credenceresearch.com/report/beta-carotene-market>. Acesso em 28 dez. 2021.

CREDENCE RESEARCH. Natural Food Colors Market By Product Type (Natural Food Colors, Carotenoids, Anthocyanin, Chlorophyll, Spirulina Extract, Annatto, Curcumin, Paprika), By Application (Food & Beverages, Pet Food, Carbonated Soft Drinks & Non-Alcoholic Beverages, Alcoholic Beverages) - Growth, Share, Opportunities & Competitive Analysis, 2015 - 2022. Disponível em: <<https://www.credenceresearch.com/report/natural-food-colors-market>. 2016a. Acesso em 28 dez. 2021.

DANTAS, D. M. M. Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

DE SOUZA, R. M. Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste–UEZO, Rio de Janeiro, 2012.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DZUMAN, M. J. Efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel. 2013.

- EL-BEITUNE, P. et al. Deficiência da vitamina A e associações clínicas: revisão. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 53, n. 4, p. 355-363, 2003.
- EL-MEKKAWI, S. A. et al. Assessment of stress conditions for carotenoids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* as added-value algal products. *Bulletin of the National Research Centre*, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2019.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Pesquisa encontra microalgas que crescem em resíduos e geram biocombustíveis. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20361833/pesquisa-encontra-microalgas-que-crescem-em-residuos-e-geram-biocombustiveis>>. Acesso em 02 de jan. de 2022.
- ERNST, H. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Applied Chemistry* 2002, 74, 2213, 2002.
- ESTEVES, F. A. Fundamento de limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 791 p. 2011.
- FERNANDES, A. S. et al. Avaliação de moléculas de clorofilas e seus derivados em espécies de microalgas cultivadas em fotobiorreatores. 2017.
- FERREIRA, V. S. Produtos biotecnológicos de microalgas: lipídeos, clorofila e nanopartículas metálicas. 2015.
- FLÓREZ-MIRANDA, L. et al. Two stage heterotrophy/photoinduction culture of *Scenedesmus incrassatulus*: potential for lutein production. *Journal of biotechnology*, v. 262, p. 67-74, 2017.
- FONTANA, J. D. et al. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, nº 13, p. 40-45, março/abril, 2000.
- FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. Carotenoids Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, By Type (Astaxanthin, Beta-carotene, Lutein, Zeaxanthin, Lycopene, Canthaxanthin, and others), Source (Synthetic and Natural), Application (Animal Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, Personal Care & Cosmetics, and Pharmaceuticals), and Regional Forecast, 2020-2027. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/amp/industry-reports/carotenoids-market-100180>>. Acesso em 29 dez. 2021.
- FRÉ, D.; CHIES, N. Influência das condições de cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e lipídios. 2016.

- FREITA, B. F. D. et al. Produção de corante natural extraído de jambolão (*Syzygium cumini*). *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. e27410212600-e27410212600, 2021.
- FREITAS, L. V. D. et al. Estudo sobre a desidratação de microalgas em secador rotatório. 2017.
- GHAZI MOKRI, H. S. et al. Adsorption of C.I. Acid Red 97 dye from aqueous solution onto walnut shell: kinetics, thermodynamics parameters, isotherms. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 12, p. 1401-1408, 2015.
- GONÇALVES, B. R. P et al. Prospective Study of Microbial Colorants under the Focus of Patent Documents. *Recent patents on biotechnology*, v. 14, n. 3, p. 184-193, 2020.
- GONÇALVES, V. D. et al. Maximização da síntese de carotenoides mediante a fotoestimulação do crescimento da microalga *Tetrademus* sp. 2019.
- GORHAM, P.R. *et al.* Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (lyng) de Breb. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 15:796-804, 1964.
- GREGORY, G. Efeito da variação de temperatura e concentração de nitrogênio no cultivo da microalga *Chlorella* sp. sobre a produção de carotenoides e biomassa. 2015.
- GUARATINI, C. I; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química nova*, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- HAKALIN, N. L. S et al. Enhancement of cell growth and lipid content of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. by optimizing nitrogen, phosphorus and vitamin concentrations for biodiesel production. *Natural Science*, v. 2014, 2014.
- HARRIS, E. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 363-406, 2001.
- HARRIS, E. Introduction to *Chlamydomonas*. pp.1-11. In: Rochaix, J., M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant (Eds). *Advance in Photosynthesis: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 737p. 1998.
- HEGEWALD, E. Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*. *The Korean Journal of Phycology* 12:235-246. 1997.
- HENDREY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D.; BROWN, S. B. The degradation of chlorophyll – A biological enigma. *New Phytology*, 107: 255-302. 1987.

- HENRARD, A. S. A. Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. 2009.
- HENTSCHKE, G. S.; TORGAN, L. C. *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (*Scenedesmaceae*, *Sphaeropleales*, *Chlorophyceae*) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, v. 61, n. 4, p. 585-601, 2010.
- HU, I. C. Production of potential coproducts from microalgae. In: PANDEY, A.; CHANG, J. S. et al. *Biofuels from Algae*. 2. ed. Amsterdã: Elsevier. Cap. 14. p. 345 - 358, 2019.
- HUANG, J. J.; CHEUNG, P. C. + UVA treatment increases the degree of unsaturation in microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (*Bacillariophyceae*) and *Isochrysis zhangjiangensis* (*Chrysophyceae*). *Food chemistry*, v. 129, n. 3, p. 783-791, 2011.
- JABEEN H. S et al. Genotoxicity Assessment of Amaranth and Allura Red Using *Saccharomyces Cerevisiae*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 90:22–26, 2013.
- JACINAVICIUS, F. R. et al. Manual para Cultivo de Cianobactérias. Secretária do meio ambiente. do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica – Núcleo de Pesquisa em ficologia. Disponível em: <botanica.sp.gov.br/files/2013/09/virtuais_4cianobactérias.pdf>. Acesso 04 de out 2021.
- JI, F. et al. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource technology*, v. 161, p. 200-207, 2014.
- JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, v. 6, n. 9, p. 4607-4638, 2013.
- KUMAR, A. et al. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 7, p. 371-80, 2010.
- LALNUNHLIMI, S.; KRISHNASWAMY, V. Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 39-46, 2016.
- LEAL, B. E. S. Obtenção de oligossacarídeos prebióticos a partir da hidrólise fosfórica da biomassa de microalgas utilizadas na biomitigação de CO₂ de efluente gasoso de

- churrascaria. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- LEE, R. E. Lee, "Phycology," 4th Edition, Cambridge University Press, New York, 2008, p. 645.
- LEU J. Y.; LIN Y. H. Optimization of nutritional compositions of growth medium for *Chlorella* sp. FJ3 growth kinetics in batch and continuous-flow photoreactors. *Environ Technol (United Kingdom)* 34: 2845–2855. 2013.
- LIRA, L. Q.; DIMENSTEIN, S. Vitamina A e Diabetes Gestacional. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 56, n. 3, p.355.9, 2010.
- LOCH-NECKEL, G. et al. Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (spray-drying). *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 23, 2018.
- LOURENÇO S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. Rima, São Carlos: Brasil. p.606. 2006.
- LUO, Z.; et al. A STAY-GREEN protein S1SGR1 regulates lycopene and β -carotene accumulation by interacting directly with S1PSY1 during ripening processes in tomato. *New Phytologist*, v. 198, n. 2, p. 442-452, 2013.
- MAGDER, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" *Critical Care*, 10, 208. 2006.
- MANRIQUE R., I. G.; CORZO PIÑEROS, R. J. Evaluación de carotenoides y lípidos en la microalga *scenedesmus dimorphus* a escala laboratorio bajo condiciones de fotobiorreactor. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Fundación Universidad de América.
- MAOKA, T. Carotenóides como pigmentos funcionais naturais. *Journal of natural medicine*, v. 74, n. 1, pág. 1-16, 2020.
- MARINOA, T. et al. From *Haematococcus pluvialis* microalgae a powerful antioxidant for cosmetic applications. *CHEMICAL ENGINEERING*, v. 79, 2020.
- MARTINS, G. B. C; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A química e as cores. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 4, p. 1508-1534, 2015.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232; 2010.

- MAYORGA, C.; MURILLO, E.; MANSO, L. Luteína y B-caroteno como principales antioxidantes acumulados en la microalga *Dunaliella salina*. *Revista Prisma Tecnológico*, v. 8, n. 1, p. 34-38, 2017.
- MAZZUCA, S.T. et al. “Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* and *Porphyridium cruentum*”. *Bioprocess Biosyst Eng* 2006;28: 243–50; 2006.
- MEIRELES, H. D. R. Otimização da extração de ficocianina de *Spirulina platensis*. 2018.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenóides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v. 54, n. 2, p. 149-155, 2004.
- MENDONÇA, J. N. Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- MERCI, A. et al. Avaliação de diferentes fatores na remoção de remazol brilliant blue de soluções aquosas por adsorção em fibras de cana de açúcar e coco verde. *Matéria* (Rio de Janeiro), v. 24, 2019.
- MESQUITA, C. Aplicação de tecnologia enzimática para a obtenção de hidrolisados protéicos de microalgas. 2013. Tese de Doutorado. Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- MESQUITA, S. S. Avaliação de estratégias para a indução da produção de β -caroteno por *Dunaliella bardawil*. Rio de Janeiro, 2013.
- MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenóides: Propriedades, aplicações e mercado. *Revista virtual de Química*, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.
- MÍNGUEZ-MOSQUEIRA, I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: HURST, W.J. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. CRC Press, p. 101-158, 2002.
- MINHAS, A. K. et al. A. The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 556-565, 2016. DOI:10.1016/j.biortech.2016.03.121.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução n. 44, 1977. Estabelece condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes

- empregados na produção de alimentos e bebidas e revoga as Resoluções 20/70 e 8/72. (Ementa elaborada pelo CD/MS). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 fev. 1978. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1977/res0044_00_00_1977.htm>. Acesso em 12 de set. de 2021.
- MOLINA, E. et al. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, n. 2, v. 92, p. 113-131, 2001.
- MORAIS, R. A. et al. Caracterização Química, física e tecnologia da farinha obtida a partir da casca de Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). *Brazilian Journal of Development*, 5(11), 23307-23322. DOI:10.34117/bjdv5n11-050. Acesso em:03 dez. 2020.
- MOUTINHO, I. L. D.; BERTGES, L. C.; ASSIS, R. V. C. O uso prolongado do corante alimentar tartrazina e seus efeitos sobre a mucosa gástrica de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Biologia*. v.67, n.1, 2007.
- NARIMATSU, B. M. G. et al. Corantes naturais como alternativa sustentável na indústria têxtil. *Revista Valore*, v. 5, p. 5030, 2020.
- NASCIMENTO, R. C. Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma. 2016.
- NASCIMENTO, T. C. et al. Determinação do perfil de carotenoides a partir de *Scenedesmus obliquus* (CPCC05). XXV Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos. Gramado Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/1233.pdf>>. Acesso em 26 de set. de 2021.
- NEOFOTIS, P. et al. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*, v. 15, p. 164-178, 2016.
- NETTO, R. C. M. Dossiê corantes. *FOOD INGREDIENTS BRASIL*, n. 9, 2009. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060213572001465326315.pdf>. Acesso em: 24 de set. 2021.
- OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.
- ORES, J. C. Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas. 2014.

- OROSA, M. et al. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology letters*, v. 23, n. 5, p. 373-378, 2001.
- PALIYATH, G. Natural colorants for food and nutraceutical uses. *Trends in Food Science & Technology*. 14, 438, 2003.
- PENTEADO, R. R. Desenvolvimento de controlador para cultivo de microalgas em lagoas tipo raceway. TCC (Engenharia Industrial elétrica). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Curitiba. 2014.
- PIÑEROS, R. J. C. et al. Evaluación de carotenoides y lípidos en la microalga *Scenedesmus dimorphus* a escala laboratorio. 2019.
- PORRA, R.; THOMPSON, W.; KRIEDEMANN, P. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 975, p. 384 – 394, 1989.
- PŘIBYL, P. et al. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, v. 11, p. 22–27, 2015.
- RAMIREZ, N. N. V. Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 2013.
- RAMMUNI, M. N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food chemistry*, v. 277, p. 128-134, 2019.
- RANGEL, E. S. Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e o teor lipídico da microalga *Scenedesmus acuminatus* (lagerheim) chodat para fins de produção de biodiesel. 2018.
- RAPOSO, M.; MORAIS, A. Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases. *Marine Drugs*, 13(8), pp.5128-5155. 2015. DOI: 10.3390/md13085128.
- RICHMOND, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford, p. 215-252, 2004.
- ROCHA, D. S.; REED, E. Pigmentos Naturais em Alimentos e sua Importância para a Saúde. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 41, n. 1, p. 76-85, 2014.

- RUSSO, D. A. M. T. Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura. 2011. 91 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação do departamento de Ciência e Tecnologia de Biomassa) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.
- SAMAR, A. et al. Assessment of stress conditions for carotenoids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* as added-value algal products. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019.
- SARIKAYA R. et al. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 88:974–979, 2012.
- SASSI, K. K. B. *et al.* Metabólitos de interesse à tecnologia de alimentos produzidos por microalgas do Nordeste do Brasil. *Revista Ciência Agronômica*, v. 50, n. 1, p. 54-65, jan-mar. Ceará. 2019.
- SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial - Volume 2 (Em Portuguese do Brasil)*. Edgard Blucher. 2001.
- SCHWARTZ, C. R. M. Otimização da produção de carotenoides em meio sintético por *sporidiobolus salmonicolor* cbs 2636 em biorreator. Tese (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). URI – Erechim. 2010.
- SICE. MERCOSUL - Mercado comum do Sul. Resoluções do grupo SICE. Mercado comum. MERCOSUL/GMC/RES N° 52/98. Disponível em: <<http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/res5298p.asp>>. Acesso em 24 de setembro de 2021.
- SILVA JÚNIOR, J. C. et al. Casca de gogoia (*Tacinga inamoena*): fonte de corantes naturais. 2018.
- SILVA, T. P. Cultivo de *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. obtidas em fontes de água de Luís Eduardo Magalhães e avaliação de pigmentos fotossintéticos. TCC (Engenharia de Biotecnologia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Luís Eduardo Magalhães. p. 41. 2019.
- SIMÕES, M. A. et al. Algas cultiváveis e sua aplicação biotecnológica. 2016.
- SINGH, D. P. et al. High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1. 1 under optimized culture conditions. *PloS one*, v. 14, n. 9, p. e0221930, 2019.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; TEDESQUE, M. G.; SCARDOELI-TRUZZI, B. Evaluation of the effects of sugarcane molasses as a carbon source for *Ankistrodesmus*

gracilis and Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, p. 594-600, 2019.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and bioenergy*, v. 53, p. 29-38, 2013.

SLOMPO, L. Microalgas como solução para recuperação de nutrientes de águas negras tratadas. 2018.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. *Ciência Rural*, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TELFER, A. What is β -carotene doing in the photosystem II reaction centre? *The royal society*, v. 357, p. 1431-1440, 2002.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, v. 249, p. 1–8, 2019. doi: 10.1007/s00425-018-3056-x.

TINOCO, N. A. B; TEIXEIRA, C. M. L. L; DE REZENDE, C. M. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 4, p. 1421-1440, 2015.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.

TORRENTERA, L.; TACON A. La producción de alimento vivo y su importância em acuicultura. Documento de campo N° 12, Proyecto Aquila, FAO. 89 pp., 1989.

TRAINOR, F.R. Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity. *Nova Hedwigia, Beiheft*, vol. 117, p. 367, 1998.

TRIPATHI, S. et al. Microalgae: an emerging source for mitigation of heavy metals and their potential implications for biodiesel production. In: *Advanced Biofuels*. Woodhead Publishing, 2019. p. 97-128.

TROMBETE, F. M. et al. Extrato de bixina de sementes de urucum como corante natural na formulação de pipoca de micro-ondas: avaliação e efeitos na qualidade. *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2020.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química nova*, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

- VALENTE, T. C. T. Caracterização da diversidade de eucariotas fototróficos provenientes de águas ácidas de mina. 2012. Tese de Doutorado.
- VAN DONK, E.; HESSEN, D. O. Grazing resistance in nutrient stressed phytoplankton. *Oecologia*, vol. 93, p. 508-511, 1993.
- VARGAS, E. F. et al. Obtention of Natural Dyes from Industrial Blackberry Pulp Residues (*Rubus* sp). *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1). 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12777>.
- VASUDEVAN, P.T.; BRIGGS, M. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5):421-430; 2008.
- VAUTIER, M.; GUILLARD, C.; HERRMANN, J. M. Photocatalytic degradation of dyes in water: case study of indigo and of indigo carmine. *Journal of Catalysis*, v. 201, n. 1, p. 46-59, 2001.
- VELÁZQUEZ, J. Problemas de salud ocasionados por los aditivos, preservativos, colorantes y sabores artificiales, hormonas y antibióticos en la alimentación industrial del mundo moderno. Universidad Interamericana de Puerto Rico. 2012.
- VELOSO, A. L. Corantes e Pigmentos. Dossiê Técnico. BRT-Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Instituto Federal do Paraná, 2012.
- VENKATA, S. R.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA R.; NAVANEETHA B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology*, 186, 169 - 178. 2015.
- VERONEZI, C. M.; JORGE, N. Carotenoides em abóboras. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 9-20, 2011.
- VIEIRA, E. L et al. Manual de fisiologia vegetal. São Luis: EDUFMA, 2010.
- VIEIRA, M. V.; DERNER, R. B.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of *Haematococcus pluvialis* carotenoid-loaded PLGA nanocapsules in a gel system with antioxidant properties for topical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 61, p. 102099, 2021.
- VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

- WANG, M. et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food Chem. Toxicol.*, v.44, p.1522-1559, 2006.
- WOJCIECHOWSKI, J. et al. E. Isolamento e cultivo de microalgas. 2013. DOI: 10.13140/2.1.3353.3767.
- XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. *Bioresource Technology*, v. 101, p.5494-5500. 2010.
- XU, L. et al. Microalgal bioreactors: challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 3, p. 178-189, 2009.
- ZAGATTO, P. A.; ARAGÃO, M. A. 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico. 23p.
- ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. Ed. Cultura Acadêmica, 2016.
- ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; et al. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 1385–1392, 2015.
- ZHOU, W. 2014. Potential Applications of Microalgae in Wastewater Treatments, Recent Advances in Microalgal Biotechnology. Center for Biorefining, Bioproducts and Biosystems Engineering Department, University of Minnesota, USA.
- ZOLLINGER, H. Color Chemistry Synthesis Properties and Application of Organic Dyes and Pigments, *VCH New York*, 92-102. 1991.
- ZORN, S. M. F. E. et al. Avaliação Dos Fatores Envolvidos Na Extração De Lipídios Da Biomassa Da Microalga *Chlorella minutissima* Via Solventes. *Holos*, v. 2, p. 66-78, 2017.