



Universidade Federal
de São João del-Rei

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

SOFIA EMANUELE DE SOUZA GOMES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDIOS
UTILIZANDO MICROALGAS**

**Ouro Branco
2021**

SOFIA EMANUELE DE SOUZA GOMES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDIOS
UTILIZANDO MICROALGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior.

**Ouro Branco
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G633e Gomes, Sofia Emanuele de Souza.
 Estudo da produção de carotenoides e lipídios
 utilizando microalgas / Sofia Emanuele de Souza
 Gomes ; orientador Ênio Nazaré de Oliveira Júnior.
 - Ouro Branco, 2021.
 57 p.

 Trabalho de Conclusão (Graduação - Engenharia de
 Bioprocessos) -- Universidade Federal de São João
 del-Rei, 2021.

 1. Ácidos graxos. 2. B-Caroteno. 3. Pigmentos. 4.
 Condições de cultivo. I. Júnior, Ênio Nazaré de
 Oliveira , orient. II. Título.

SOFIA EMANUELE DE SOUZA GOMES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDIOS
UTILIZANDO MICROALGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior.

Ouro Branco, 08 de dezembro de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Alessandra Costa Vilaça - UFSJ

Prof. Dr. Edson Romano Nucci - UFSJ

Prof. Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e iluminar minhas escolhas.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ênio Nazaré pelos ensinamentos e apoio não só neste trabalho, mas durante toda a graduação.

Aos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos da UFSJ, pelo conhecimento transmitido e cooperação.

Aos meus amigos e, especialmente, à Laura por percorrer todo o caminho ao meu lado mesmo a distância.

A minha família pelo suporte, compreensão e paciência de todos os dias. Em especial, meus pais, Eva e Manoel e minha irmã Lívia, pelo amor e incentivo incondicionais.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As microalgas têm sido objeto de estudo devido a sua alta taxa de crescimento, alta eficiência fotossintética, capacidade das espécies de crescerem em diferentes condições de cultivo e por apresentarem abundância de metabólitos de interesse, como aminoácidos, ácidos orgânicos e carotenoides. Atualmente, estudos envolvendo microalgas vêm sendo realizados com vistas a futuras aplicações na indústria de alimentos, rações e farmacêutica. Embora avanços e melhorias tenham sido relatados na literatura, no que diz respeito às condições de cultivo de microalgas em fotobiorreatores, faltam informações sobre a otimização do processo para melhorar sua viabilidade econômica. Nesse contexto, uma das alternativas encontradas é a otimização do processo e a obtenção simultânea de mais de um produto de interesse. O objetivo deste trabalho foi a seleção e comparação de estudos sobre os impactos na produção simultânea de lipídios e carotenoides em diferentes condições de cultivo por diferentes espécies de microalgas. As espécies de microalgas selecionadas foram *Trentepohlia arborum*, *Arthrospira platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Coccomyxa onubensis* e *Chlorella zofingiensis* e os parâmetros avaliados nos artigos (intensidade de luz, dióxido de carbono, suplementação de nitrogênio e adição de sal) foram as condições de crescimento das microalgas comparadas entre os estudos. A partir dos resultados obtidos a partir da pesquisa, viu-se que é interessante a utilização da estratégia do cultivo em dois estágios, focando o primeiro estágio no aumento da biomassa e o segundo estágio na obtenção dos lipídios e carotenoides. A maior produção simultânea de carotenoides e lipídios foi obtida a partir da microalga *Coccomyxa onubensis* e da microalga *Trentepohlia arborum*. No que se referiu aos estresses aplicados, a variação de nitrogênio teve forte influência na produção dos carotenoides, enquanto variações de salinidade impactaram a produção de lipídios. A utilização de dióxido de carbono permitiu uma maior eficiência em extração, enquanto intensidades de luz não se mostraram o principal fator quando associadas a outras condições.

Palavras chaves: Ácidos graxos. β -Caroteno. Pigmentos. Condições de cultivo.

ABSTRACT

Microalgae have been the object of study due to their high growth rate, high photosynthetic efficiency, capacity of species to grow in different cultivation conditions and for presenting an abundance of metabolites of interest. Currently, studies involving microalgae have been carried out with a view to future applications in food, feed and pharmaceutical industries. Although advances and improvements have been reported in the literature, concerning the growing conditions of microalgae in photobioreactors, it is lacking information about optimization of the process to improve its economic viability. In this context, one of the alternatives found is the optimization of the process and the simultaneous obtainment of more than one product of interest. The aim of this work was the selection and comparison of studies concerning the impacts on the simultaneous production of lipids and carotenoids in different cultivation conditions by different species of microalgae. The microalgae species selected were *Trentepohlia arborum*, *Arthrospira platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Coccomyxa onubensis* and *Chlorella zofingiensis* and parameters rates in the articles (light intensity, carbon dioxide, nitrogen supplementation and salt addition) were the microalgae growth conditions compared among the studies. The two-stage cultivation, focusing the first stage on increasing biomass and the second stage on obtaining products was an interesting strategy reported from the studies. The greatest simultaneous production of carotenoids and lipids was obtained from the microalgae *Coccomyxa onubensis* and the microalgae *Trentepohlia arborum*. Concerning in the applied stresses, the variation in nitrogen had a strong influence on the production of carotenoids, while variations in salinity impacted the production of lipids. The use of carbon dioxide allowed greater efficiency in extraction, while light intensities were not the main factor when associated with other conditions.

Keywords: Fatty acids. β -Carotene. Pigments. Culture conditions.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características de diferentes condições de cultivo	16
Quadro 2 - Comparação entre os sistemas de cultivo aberto e fechado	17
Quadro 3 - Principais aplicações de produtos obtidos a partir de algumas espécies de microalgas	25
Quadro 4 -Exemplos de carotenoides encontrados na natureza, colorações e fontes produtoras	34
Quadro 5 - Produção de carotenoides e lipídios de acordo com microalga e cultivo utilizada	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo lipídico e suas respectivas produtividades para diferentes microalgas	28
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de cultivo de microalgas em lagoas abertas do tipo pista de corrida (raceways) (a) e fotobiorreatores (b)	16
Figura 2 - Reações de claro e escuro	20
Figura 3 - Estruturas de diferentes tipos de lipídios	27
Figura 4 - Exemplos de estruturas de carotenoides	34
Figura 5 - Exemplos de estruturas de carotenoides	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

Cu - Cobre

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Mn - Manganês

Mo - Molibdênio

mRNA – RNA mensageiro

N - Nitrogênio

NADP⁺ - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH – Forma reduzida (transferência de elétrons) do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

PAR - radiações fotossinteticamente ativas

PUFAs – ácidos graxos poliinsaturados totais

UVA – Luz Ultravioleta A

UVB - Luz Ultravioleta B

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Microalgas	14
3.1.1. Cultivo de microalgas	15
3.1.2. Metabolismo	19
3.1.3. Fatores que influenciam no crescimento de microalgas	22
3.1.4. Principais produtos obtidos a partir de microalgas	25
3.2. Lipídios	26
3.2.1. Extração de lipídios	30
3.2.2. Fatores que afetam a concentração de lipídios em microalgas	30
3.2.3. Aplicações	32
3.3. Carotenoides	33
3.3.1. Extração de carotenoides	36
3.3.2. Fatores que afetam a concentração de carotenoides em microalgas	37
3.3.3. Aplicações	38
4. METODOLOGIA	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

As microalgas podem ser encontradas em quase todo o tipo de ambientes apresentando uma extensa biodiversidade que possibilita a exploração de diferentes metabólitos por elas produzidos. Com o aumento da população mundial e o crescente interesse em produtos naturais e não prejudiciais ao meio ambiente, as microalgas são seres capazes de acumular importantes componentes como lipídios, carboidratos e pigmentos, que podem ser convertidos nos mais diversos produtos.

As microalgas representam um grupo altamente especializado com capacidade de biofixação de CO₂ através de sua atividade fotossintética e acumular biomassa rápida e eficientemente. Além disso, podem usar diferentes metabolismos energéticos (mixotrófico e heterotrófico) para manutenção de suas estruturas como a respiração e fixação/assimilação de nitrogênio, o que torna algumas espécies organismos únicos, com amplo espectro de aplicação tecnológica (PIENKOS & DARZINS, 2009; OLAIOZOLA, 2003).

Diversas substâncias sintetizadas pelas microalgas têm aumentado o interesse no seu potencial biotecnológico. Por isso, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa para diversas aplicabilidades, entre elas, para uso na alimentação bem como para obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial, produção de pigmentos, ficobiliproteínas e polímeros como polissacarídeos, os quais podem ser utilizados em diversos setores da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (DERNER et al., 2006; SPOLAORE et al., 2006).

Os pigmentos naturais vêm tendo uma participação cada vez mais importante no mercado, devido às restrições maiores no uso de corantes sintéticos. Essas restrições são consequência da preocupação quanto ao aspecto de alterações orgânicas que possam ser causadas pela ingestão destas substâncias a longo prazo (CARVALHO, 2004; GHIGGI, 2007). Microalgas podem ser usadas como matéria-prima para a produção de biodiesel, pois podem fornecer alta fração de lipídios neutros, com menor grau de insaturação. Isso faz com que os lipídios microalgais sejam um potencial substituto para o diesel ou para biodiesel de primeira geração (HARUN et al., 2010).

O presente trabalho apresenta um estudo das condições de cultivo de diferentes microalgas para obtenção simultânea de carotenoides e lipídios, compostos

de grande valor comercial, analisando os principais fatores que influenciam o cultivo dessas microalgas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as condições de cultivo e fatores que influenciam a obtenção de carotenoides e lipídios a partir de microalgas por meio de uma revisão bibliográfica.

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar as características de microalgas e principais aplicações;
- Estudar o rendimento de carotenoides e lipídios das microalgas quando inseridas em diferentes condições de cultivo;
- Analisar os fatores que mais influenciam na produção de carotenoides e lipídios por microalgas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes, podendo ser procarióticos ou eucarióticos. De acordo com TOMASELLI (2004), estes microrganismos têm sido tradicionalmente classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Mas aspectos citológicos e morfológicos também têm sido considerados, tais como a ocorrência de células flageladas, os processos de formação do núcleo e da divisão celular e a presença e caracterização de envoltório do(s) cloroplasto(s).

Atualmente, as algas estão divididas de acordo com seu conteúdo pigmentar em três grandes grupos resultando em 13 divisões: algas que possuem clorofila-a, incluídas nesta categoria as Cyanophyta e Rhodophyta; algas com clorofilas a e b, que englobam as Prochlorophyta, Chlorachniophyta, Chlorophyta e Euglenophyta; e algas com clorofilas a e c, que englobam as Chrysophyta, Xanthophyta,

Bacillariophyta, Phaeophyta, Haptophyta, Dinophyta e Cryptophyta (BELL E HEMSLEY, 2000).

Todas as microalgas possuem clorofila-a, porém distinguem-se entre si pelos tipos de pigmentos presentes. As cianobactérias (Divisão Cyanophyta) são procariontes - não possuem núcleo organizado, mitocôndria e nem cloroplastos - possuem clorofila-a e alguns pigmentos acessórios, como ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina que fornecem aos representantes do grupo a coloração verde azulada característica do grupo (LORENZI, 2008). Também possuem β -caroteno, zeaxantina, mixoxantina e outros (BELL e HEMSLEY, 2000; RAVEN et al., 2007), e como produto de reserva armazenam o glicogênio.

As clorofíceas (Divisão Chlorophyta) são dotadas de clorofila-a e b, mas também possuem outros pigmentos como os carotenoides. As diatomáceas (Bacillariophyta) e os dinoflagelados (Divisão Dinophyta) possuem clorofila-a e c, mas diatomáceas possuem carotenoides, enquanto que os dinoflagelados possuem caroteno e xantofilas (BELLINGER; SIGEE, 2010).

Segundo Giddey et. al (2012), as microalgas apresentam algumas propriedades típicas de plantas superiores, como a capacidade de realizar fotossíntese aeróbica eficiente e possuírem simplicidade quanto às necessidades nutricionais. São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo. Produzem mais oxigênio do que todas as plantas existentes no mundo, sendo responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004), e, além disso, contribuem para regular a biosfera do planeta.

Dentre as características que fazem das microalgas organismos de grande importância, destaca-se a diversidade de metabólitos que produzem e a capacidade de alterarem rapidamente seu metabolismo como resposta às mudanças das condições ambientais. Quando submetidas a condições físicas e químicas específicas, produzem moléculas bioativas de alto valor agregado como antioxidantes, carotenoides, polissacarídeos, ácidos graxos e vitaminas, além de biocompostos de alto valor comercial como proteínas, lipídios e carboidratos.

3.1.1. Cultivo de microalgas

Os meios de cultivo podem ser classificados como semidefinidos e definidos quanto à composição química para a produção de biomassa. Os meios de cultivo

semidefinidos são preparados com água do mar natural suplementada com nutrientes e vitaminas. Os meios de cultivo definidos são preparados a partir de água, deionizada ou destilada, suplementada com nutrientes, vitaminas e sais inorgânicos, a fim de simular a composição da água do mar (LOURENÇO, 2006).

Mas, referindo-se a sistemas, as microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas possíveis para obtenção de biomassa, que são escolhidos de acordo com fatores como fisiologia, custo de elaboração e execução do *layout* para cultivo, intensidade do trabalho, custo de energia, disponibilidade de água, custo de nutrientes, adequação de clima (quando necessário), e especificação do produto final. Sistemas de cultivo em larga escala devem ser comparados com base em indicadores como a eficiência de utilização da luz, controle de temperatura, estresse hidrodinâmico permitido, capacidade de manter culturas unimicroalgais e/ou axênicas e viabilidade de aumento de escala (GUEDES; MACALTA, 2012).

O cultivo pode ser realizado em sistemas fechados, onde não há contato com a atmosfera, ou em sistemas abertos, em que há o contato com a atmosfera. Os sistemas abertos representam uma forma natural de cultivo, pois são desenvolvidos ao ar livre estando sujeitos às variações de temperatura, luminosidade e de inúmeras intempéries do ambiente. Por tais motivos são muito susceptíveis à contaminação que dificulta a garantia de obtenção da qualidade da biomassa produzida e reduz a produtividade (AZEREDO, 2012; VIÊGAS, 2010; FRANCO et al., 2013). Entretanto, podem apresentar um custo relativamente mais baixo de construção, instalação e manutenção. A figuras 1 apresenta exemplos desses sistemas: as lagoas ou *raceways* (a), que possuem contato com a atmosfera, e fotobiorreatores (b) fechados em laboratório.



Figura 1 – Sistema de cultivo de microalgas em lagoas abertas do tipo pista de corrida (*raceways*) (a) e fotobiorreatores (b).

Fonte: Adaptado de Militão (2016).

Os sistemas típicos utilizados em ambientes fechados para a produção de biomassa de microalgas incluem garrafas (10 a 20 L), sacos de polietileno (100 a 500 L) e tanques (1000 a 5000 L). Para volumes maiores, são preferidos tanques ou lagoas a céu aberto, com alterações necessárias para manutenção do cultivo (temperatura, pH, nutrientes). Entre os fechados, os fotobiorreatores são os mais utilizados, e podem ter diferentes configurações, tais como: tubular, placas planas, verticais, helicoidais. Os sistemas fechados apresentam custos de produção bem mais elevados que os abertos, inviabilizando seu uso em grandes escalas comparadas aos sistemas abertos. As limitações relacionadas aos fotobiorreatores incluem: alto preço de instalação, superaquecimento e entupimento, exigindo usualmente custos operacionais e de manutenção dos cultivos (ARAÚJO, 2018).

Em fotobiorreatores é possível controlar a quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH etc. Isto também viabiliza a produção de uma série de compostos de elevado valor comercial (BOROWITZKA, 1999; ERIKSEN, 2008). O quadro 1 mostra diferentes cultivos e possíveis reatores em cada um deles.

Quadro 1 - Características de diferentes condições de cultivo.

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono	Densidade celular	Reator	Custo	Problemas associados com aumento de escala
Fototrófico	Luz	Inorgânica	Baixa	Raceways ou fotobiorreatores	Baixo	Baixa densidade celular Alto custo de condensação
Heterotrófico	Orgânico	Orgânica	Alta	Fermentador convencional	Médio	Contaminação Alto custo do substrato
Mixotrófico	Luz e orgânico	Inorgânica e orgânica	Média	Fotobiorreator fechado	Alto	Contaminação Alto custo do equipamento Alto custo do substrato

Fonte: Adaptado de Chen et. al (2011).

Conforme alguns parâmetros, é possível comparar os sistemas de cultivo aberto e fechado para a produção de microalgas, como mostrado no quadro 2.

Quadro 2 - Comparação entre os sistemas de cultivo aberto e fechado.

Parâmetro de comparação	Sistema aberto Lagoa de cultivo	Sistema fechado Fotobiorreator
Área ocupada	Grande	Pequena
Perda de água	Muito alta, com possível precipitação de sais	Baixa
Perda de CO ₂	Alta, depende da profundidade da lagoa	Baixa
Concentração de Oxigênio	Usualmente baixa, devido à contínua evaporação	Acúmulo de O ₂ no sistema exige dispositivo específico
Temperatura	Altamente variável	Resfriamento usualmente necessário
Stress sobre as células	Usualmente baixo (agitação leve)	Usualmente alto (compressão de ar, agitação)
Limpeza	Muito simples	Maior exigência de limpeza das paredes
Risco de contaminação	Alto (por outras espécies)	Baixo
Qualidade da biomassa	Variável	Reprodutível
Concentração de biomassa	Baixa, entre 0,1 a 0,5 g/L	Alta, entre 0,5 a 8 g/L
Controle de processo e reprodutibilidade	Limitado	Possível sob condições adequadas
Dependência das condições climáticas	Alta (intensidade de luz, temperatura, precipitações)	Média (iluminação, pode requerer refrigeração)

Fonte: KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Os regimes de cultivo aplicados na produção de microalgas variam de acordo com a forma de operação do sistema. Os três tipos básicos de operação são: “batch” ou descontínuo, semicontínuo e contínuo (SOARES, 2010). Nos cultivos “batch” (descontínuo ou batelada), as células de microalgas são inoculadas ao meio de cultivo e após inoculação não ocorre adição de nutrientes ao longo do desenvolvimento da

cultura. O cultivo é encerrado quando os nutrientes da cultura se esgotam ou quando o produto desejado for produzido. Este tipo de cultivo é caracterizado por apresentar fases distintas de crescimento. A duração de cada fase depende basicamente de fatores como a espécie cultivada e as condições de cultivo oferecidas (LAVENS, 1996; SOARES, 2010).

Segundo Soares (2010), o cultivo semicontínuo, um volume conhecido de cultura de microalgas é periodicamente removido e substituído por meio novo. Nesse tipo de cultura, a composição química das células dificilmente muda com o tempo (porque são mantidas em condições de crescimento sem fatores limitantes), o que é diferente do cultivo em batelada. Teoricamente este processo pode ser operado indefinidamente, porém a manipulação frequente da cultura, ocasionada pelas diluições sucessivas, pode acarretar problemas de contaminação. Teoricamente, esse processo pode ser executado indefinidamente, mas a manipulação frequente da cultura devido à diluição em série pode causar problemas de contaminação.

No cultivo contínuo, um fluxo constante de solução de cultura de microalgas é retirado do biorreator enquanto o meio fresco entra. A taxa de crescimento é regulada e a densidade celular é controlada automaticamente por um sensor óptico. A concentração de células e nutrientes permanece constante e o cultivo atinge um estado estacionário. O cultivo pode manter um estado estável por muito tempo, produzindo assim um grande número de células homogêneas e de alta qualidade. Porém, segundo Mata et al. (2010), o custo do cultivo contínuo é elevado devido à necessidade de automação e constantes condições de temperatura e luminosidade.

3.1.2. Metabolismo

As microalgas apresentam metabolismos variados, podendo ser organismos fotoautotróficos, heterotróficos e/ou mixotróficos. No metabolismo fotoautotrófico, há a necessidade de luz e fonte de carbono inorgânico, como CO_2 e HCO_3^- , para obtenção de energia através da fotossíntese. A fotossíntese (figura 2) é basicamente dividida em dois estágios: dependente e independente da luz. O estágio dependente da luz é o primeiro estágio, onde os organismos absorvem a luz solar e a utilizam para converter ADP e NADP^+ em ATP e NADPH. No segundo estágio, independente da luz, os organismos capturam o CO_2 atmosférico e o convertem em compostos

orgânicos no ciclo de Calvin-Benson, utilizando as moléculas geradas anteriormente (ZHAO e SU, 2014.; HO et al, 2014).

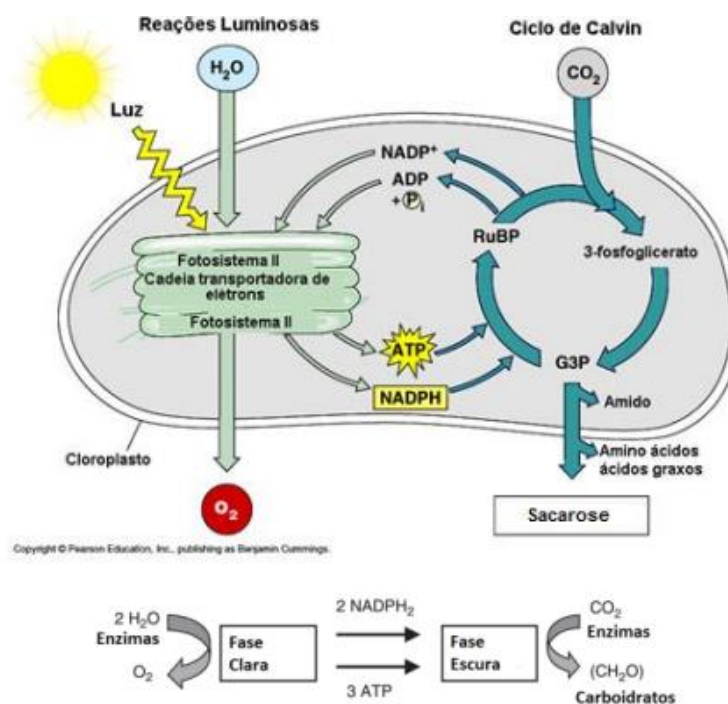


Figura 2 - Reações de claro e escuro.

Fonte: PINA et. al (2021).

No metabolismo fotoautotrófico, o crescimento das microalgas é diretamente afetado pela disponibilidade e intensidade luminosa e pela concentração dos demais compostos necessários para o crescimento celular. O aumento da intensidade luminosa acarreta em um aumento de produção dos pigmentos fotoprotetores, como os carotenoides (RICHMOND, 2004). Já em condições de deficiência de nitrogênio, por exemplo, ocorre uma diminuição do conteúdo proteico e um aumento de compostos de reserva energética, como os lipídios e carboidratos (SIAUT et al., 2011).

No metabolismo heterotrófico, as microalgas utilizam compostos orgânicos, como a glicose, como fonte de carbono e energia. A glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada para a cultura de microalgas heterotróficas, pois possui mais energia em comparação com outros substratos orgânicos (BOYLE & MORGAN, 2009). O metabolismo mixotrófico é uma união do fotoautotrófico e heterotrófico, havendo necessidade de luz e de uma fonte de carbono orgânico (BRENNAN & OWENDE, 2010). Geralmente, o cultivo mixotrófico e heterotrófico de microalgas tem como resultado uma maior produção de biomassa algal. No cultivo fotoautotrófico, as microalgas produzem mais pigmentos devido à necessidade de realizar fotossíntese.

O cultivo heterotrófico é pouco utilizado em cultivos industriais, o que provavelmente está associado ao número limitado de espécies de microalgas heterotróficas disponíveis, maior contaminação por bactérias, inibição do crescimento em substratos com baixas concentrações de compostos orgânicos e incapacidade de produzir alguns produtos induzidos pela presença de luz, como pigmentos (GARCÍA et al., 2005; PALUDO, 2012). Adicionalmente, os cultivos mixotróficos apresentam elevada produção de clorofilas, carotenoides e ácidos graxos, quando comparados aos cultivos autotróficos. Neste tipo de cultivo, ainda, ocorre uma menor perda de biomassa durante a fase escura, decorrência da adição do substrato orgânico ao meio de cultivo (BRENNAN; OWENDE, 2010; PALUDO, 2012).

As microalgas contêm múltiplas vias metabólicas para diferentes condições de crescimento. A via metabólica da condição heterotrófica envolve três passos principais: (1) A absorção/Assimilação, (2) a ativação e transformação, e (3) armazenamento/utilização de metabólitos (MORALES-SÁNCHEZ et al., 2015). Algumas microalgas podem alternar entre estes regimes de crescimento, ficando uma via ativa enquanto a outra via fica inativa por um período, dependendo das condições de cultivo. Outras microalgas são capazes de utilizar as vias simultaneamente (PEREZ-GARCIA et al., 2011). As microalgas podem evoluir para se tornar fototróficas ou heterotróficas especializadas através de mudanças de longo prazo nas condições de crescimento (LIANG et al., 2009; BELL, 2013).

Para o metabolismo da glicose, a assimilação da glicose oxidativa começa com a fosforilação da hexose para produzir glicose 6-fosfato, que é facilmente usada para armazenamento, síntese celular e respiração. De acordo com Perez-Garcia et. al. (2011), entre as várias vias utilizadas pelos microrganismos para a glicólise, aparentemente apenas duas vias foram descritas em algas: a via de Embden-Meyerhof e a via da pentose fosfato.

No metabolismo da glicose de microalgas sob condições de cultura heterotrófica, na fase escura, a glicose é metabolizada principalmente pela via de pentose-fosfato. Já no fotoautótrofo, a principal via é Embden-Meyerhof. Ambos os percursos são realizados no citosol e são funcionais em células de microalgas (YANG et al., 2000; HONG & LEE, 2007). No entanto, algumas cepas de microalgas *Dunaliella tertiolecta* e *Prymnesium parvum* são incapazes de assimilar a glicose, apesar de terem as enzimas necessárias para o seu metabolismo (NEILSON & LEWIN, 1974).

No metabolismo do acetato, segundo Boyle & Morgan (2009), uma vez presente no citosol, o acetato é assimilado por acetilação da coenzima A por acetil-CoA sintetase para formar acetil coenzima A (acetil-CoA), utilizando uma molécula de ATP. O acetato é geralmente oxidado por meio de duas maneiras: (a) pelo ciclo dos ácidos do glicoxilato, para formar o malato em glicoxissomos plastídios e (b) através do ciclo tricarboxílico (TCA), para o citrato na mitocôndria, que fornece esqueletos carbônicos e energia (NEILSON & LEWIN, 1974; BOYLE & MORGAN, 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011). O ciclo do glicoxilato requer síntese de isocitratoliase e malato sintetase. Ambas as enzimas são induzidas quando as células são transferidas para meio contendo acetato (NEILSON & LEWIN, 1974; BOYLE & MORGAN, 2009).

3.1.3. Fatores que influenciam no crescimento de microalgas

Para o crescimento de microalgas são necessárias as condições e nutrientes adequados. Os elementos mais importantes que constituem as células das algas são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Outros elementos essenciais incluem ferro, magnésio, elementos traços e, em alguns casos, silício (REBOLLOSO-FUENTES et al., 2001).

O carbono é considerado um dos elementos mais importantes, uma vez que constitui cerca de 50% da biomassa microalgal (SOARES, 2010). Segundo Perez-Garcia et al. (2011), embora algumas microalgas utilizem diversas fontes de carbono para se desenvolver, a maioria das espécies são autotróficas obrigatórias, não crescendo na ausência de luz e de carbono inorgânico. Já o nitrogênio, que geralmente representa cerca de 7-10% do peso seco da célula, é um constituinte essencial de todas as proteínas estruturais e funcionais em células de algas (RICHMOND, 1986). Nitrato, nitrito e amônio são formas inorgânicas não assimiladas que podem ser encontradas no interior de células algáceas em concentrações bastante variáveis, e juntamente com a ureia, representam as formas nitrogenadas que podem ser utilizadas pelas algas como fonte de nitrogênio.

Já o fósforo é essencial para o crescimento celular e metabolismo das microalgas, pois está associado à realização de todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células e constitui moléculas estruturais. ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas são os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em algas. Em razão da acumulação de energia

em ATP, a assimilação do fósforo depende de luz (LOURENÇO, 2006). É considerado um dos principais elementos limitantes do fitoplâncton, em razão de sua alta demanda e grande variabilidade de concentração no ambiente natural. O fósforo é preferencialmente assimilado como fosfatos inorgânicos na forma de H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (Martínez et al., 2000).

O enxofre é vital para todas as células, pois é o constituinte de alguns aminoácidos essenciais (metionina e cisteína), vitaminas, sulfolipídios, entre outros. A falta desse elemento no meio de cultura modifica de forma crucial o metabolismo celular, causando acúmulo de amido e inativação do fotossistema II e do ciclo de Calvin – Benson (ANTAL; KRENDELEVA. RUBIN, 2011). A principal forma de assimilação do enxofre pelos seres produtores é como sulfato inorgânico. O enxofre se apresenta na água do mar principalmente como íons sulfato, sendo muito abundante e, por isso, nunca é fator limitante ao desenvolvimento de microalgas marinhas.

O magnésio é essencial a algas por ser constituinte da molécula de clorofila, e está associado a várias enzimas, sendo um ativador de suas atividades. No caso de deficiência, gera o processo designado clorose, em que as células perdem seu conteúdo pigmentar. O ferro é extremamente importante para as algas por participar de funções como vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos; respiração, transporte respiratório de elétrons; fotossíntese, transporte fotossintético de elétrons; redução de nitrato e de nitrito; redução de sulfato; fixação de nitrogênio molecular e por ser cofator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006; RODEN E ZACHARA, 1996). Micronutrientes como alguns metais traço, como Mn, Mo, Cu e Zn, também desempenham papéis-chave no transporte de elétrons (RAVEN et al., 1999).

Além dos elementos, outros fatores influenciam o crescimento de microalgas. Dentre eles, pode-se destacar: a luz, a temperatura, o pH, o oxigênio e o substrato. A resposta para um cultivo equilibrado pode estar relacionada a uma combinação de fatores, sendo a espécie ou cepa de microalga o fator principal e as condições de cultivo fatores secundários (RICHMOND, 2004).

Nos cultivos autotróficos e mixotróficos, a luz tem um papel importante sobre a composição bioquímica, sendo em grande parte controlada pela fotoaclimação ou fotoadaptação. Nesse processo, as células das algas sofrem alterações dinâmicas na composição celular, juntamente com alterações nas propriedades estruturais, biofísicas e fisiológicas para aumentar a fotossíntese e o crescimento (DUBINSKY et

al., 1995). É comum como uma resposta celular para a baixa intensidade da luz o aumento do conteúdo de clorofila 'a' e outros pigmentos. Já em resposta a alta intensidade de luz, os carotenoides secundários, como zeaxantina, b-caroteno e astaxantina, servem como agentes fotoprotetores. Em geral, a acumulação de carotenoides pode resultar na alternância de carbono e fluxos de nitrogênio dentro das células sob condições estressantes, assim altas intensidades de luz tendem a aumentar a produção de polissacarídeos em células algais. Estudos com microalgas sugerem que o teor de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados totais (PUFAs), incluindo ácido eicosapentaenóico (EPA), está inversamente relacionada com a intensidade de luz e crescimento celular (RICHMOND, 2004).

Ainda segundo Richmond (2004), o efeito da temperatura sobre as reações bioquímicas torna este um dos fatores mais importantes que influenciam a composição bioquímica de algas. A temperatura ideal para as culturas de fitoplâncton é geralmente entre 20 e 24 °C, podendo variar de acordo com a composição do meio de cultura, a espécie ou cepa cultivada. Espécies de microalgas que toleram temperaturas entre 16 e 27 °C são mais comumente cultivadas. Temperaturas abaixo de 16 °C desaceleram o crescimento, enquanto os superiores a 35 °C podem ser letais para algumas espécies.

Segundo Cuaresma et al. (2006), o consumo das formas inorgânicas de carbono pelas algas eleva o pH, devido ao aparato fotossintético desses organismos transportarem íons hidróxido para o exterior da célula, reação catalisada pela enzima anidrase carbônica, associado à captação de íons H⁺ para o interior das membranas do tilacóide. De acordo com Nurdogan & Oswald (1995), o pH influencia a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo através da volatilização da amônia pela reação: $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$, além da precipitação de ortofosfato. Em cultivos mixotrófico ou heterotrófico onde é adicionado uma fonte de carbono orgânico, o substrato adicionado ao meio e sua concentração pode alterar o pH do meio de cultivo.

Em cultivos autotróficos a única fonte de carbono disponibilizada é o CO₂ inorgânico. No meio de cultura, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO₂, ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) ou carbonato (CO₃⁻) e suas proporções dependem do pH (CHEN & CHEN, 1996; RICHMOND, 2004). Em cultivos heterotróficos, o metabolismo das microalgas utiliza uma rota específica na qual esses organismos crescem no escuro, suportados por uma fonte exógena de carbono orgânico, substituindo o tradicional aporte de dióxido de carbono e energia luminosa

em condições fotossintéticas. Nessa condição, algumas espécies podem não ser capazes de consumir certos compostos orgânicos ou sofrerem inibição do crescimento pelo seu excesso (CHEN & JOHNS, 1995; CHEN & CHEN, 1996). A inibição pelo substrato é um dos principais problemas que impedem elevadas densidades celulares de microalgas em culturas heterotróficas (CHEN & JOHNS, 1995).

3.1.4. Principais produtos obtidos a partir de microalgas

Os cultivos de microalgas industrialmente começaram a se destacar a partir de 1948 nos Estados Unidos, Alemanha e Japão (ANDRADE, 2009). Por volta do ano de 1960, no Japão, o cultivo de microalgas em grande escala foi realizado para fins comerciais com a microalga *Chlorella*. Em seguida, no início dos anos 1970, houve o estabelecimento de uma instalação de colheita e cultivo de *Arthrospira* no Lago Texcoco (Cidade do México, México). Entre os anos de 1970 e 1990, foi realizada a cultura de *Spirulina* no México, *Dunaliella salina* na Austrália e várias outras espécies para a aquicultura (BOROWITZKA, 1993).

Atualmente, os produtos produzidos a partir de algas abastecem principalmente os mercados de cosméticos, higiene pessoal, nutrição humana e animal. Diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico - EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenoides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina, etc.), (GILL & VALIVETY, 1997; TRIPATHI et al., 1999).

A *Chlorella*, por exemplo, é utilizada como suplemento alimentar para humanos e como alimento para a maricultura. Sua principal importância na suplementação alimentar é devido à sua alta concentração de proteínas, aminoácidos e pigmentos, como a clorofila e carotenoides. A *Spirulina* também é uma microalga utilizada como suplementação alimentar devido ao seu alto conteúdo proteico. Atualmente, muitos estudos apontam um alto potencial farmacêutico, indicando sua eficiência no tratamento de diabetes, perda de peso, diminuição do nível de colesterol, melhoramento do sistema imunológico, inibição da replicação de diversos vírus patológicos, prevenção do desenvolvimento de certos tipos de tumores, além de ajudar diversos distúrbios emocionais e mentais (RICHMOND, 2004).

O cultivo de *Dunaliella salina* em larga escala visa à produção de β -caroteno, uma vez que essa microalga pode apresentar 100 g/kg de peso seco quando cultivada em condições de estresse (COESEL et al., 2008). A *Haematococcus pluvialis* é outra espécie cultivada para a produção de carotenoides, especialmente a astaxantina, carotenoide que possui um alto valor de mercado (LUNDQUIST et al., 2010).

Os produtos comumente extraídos são carotenoides, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e nutracêuticos. No quadro 3, são apresentados alguns dos principais produtos obtidos a partir de microalgas e possíveis aplicações.

Quadro 3 - Principais aplicações de produtos obtidos a partir de algumas espécies de microalgas.

Espécies	Grupo	Principais produtos	Principais aplicações
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta	Carotenoides Lipídios Proteínas	Suplemento alimentar e Nutrição saudável
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyta	Carotenoides	Suplementos e Nutrição saudável Cosméticos
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Chlorophyta	Carotenoides	Nutrição saudável
<i>Odontella aurita</i>	Bacillariophyta	Ácido graxos	Cosméticos e produtos farmacêuticos
<i>Porphyridium cruentum</i>	Rhodophyta	Polissacarídeos	Cosméticos e produtos farmacêuticos
<i>Isochrysis galbana</i>	Chlorophyta	Ácido graxos	Nutrição animal Aditivos alimentares
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Bacillariophyta	Lipídios e ácido graxos	Nutrição e produção de combustível

Fonte: Adaptada PRIYADARSHAN,2010.

3.2. Lipídios

Os lipídios podem ser compreendidos como qualquer molécula de origem biológica solúveis em solventes apolares (ZORN, 2017). São considerados um grupo heterogêneo de compostos, mas apresentam características comuns, entre elas a não solubilidade na presença da água e solubilidade em solventes apolares, como éter, clorofórmio, óleos e as ceras.

Segundo Farrell (2011), os lipídios podem ser classificados de acordo com sua natureza química em dois grupos: um grupo que consiste em compostos de cadeia aberta e que apresentam uma parte apolar (cauda) e uma parte polar (cabeça), na

qual estão incluídos os ácidos graxos, os triglicerídeos (também denominados lipídios simples); os esfingolipídios, os fosfoacilgliceróis, e os glicolipídios (também denominados lipídios complexos); e um grupo que consiste em compostos de anéis (cadeias cíclicas) e inclui os esteroides, terpenos, eicosanóides (também denominados lipídios complexos).

Na figura 3, em **a** observa-se as cadeias de ácidos graxos, tem-se à esquerda um ácido graxo saturado, ácido esteárico (C18:0) e à direita, o ácido graxo insaturado, ácido oleico (C18:1) e em **b**, moléculas de lipídios: triacilglicerol (lipídio neutro) no lado esquerdo e fosfolipídio (lipídio polar) do lado direito. As letras R', R'', R''' na molécula de triacilglicerol representam cadeias de ácidos graxos. A molécula de fosfolipídio é carregada negativamente (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

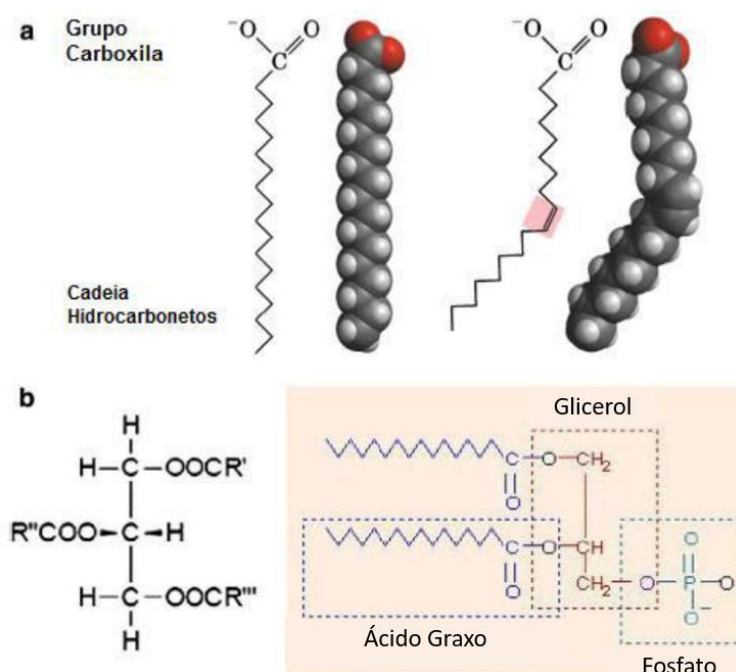


Figura 3 - Estruturas de diferentes tipos de lipídios.
Fonte: HALIM; DANQUAH; WEBLEY (2012).

As gorduras e óleos são as principais fontes de armazenamento de energia na maioria dos seres vivos; os fosfolipídios e os esteróis são elementos estruturais importantes nas membranas biológicas; e os outros lipídios, mesmo que em pequena quantidade, desempenham o papel de cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares (LEHNINGER, 2006).

Gorduras e óleos são triglicerídeos (triglicerídeos), substâncias nas quais os três grupos OH do glicerol são esterificados com ácidos graxos. Os fosfolipídios são fosfoacilgliceróis, o que significa que um dos grupos OH do glicerol é esterificado com ácido fosfórico em vez de ácidos graxos. Esfingolipídios possuem, em vez de glicerol, a esfingosina. Os esfingolipídios são divididos em esfingomielinas e cerebrosídeos. Os eicosanóides incluem prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Eles são derivados do ácido araquidônico, estão presentes em todos os tecidos do corpo e têm uma variedade de atividades fisiológicas. Os terpenóides são lipídios derivados de pirofosfato de isopentenila com o pirofosfato de dimetilalila. Eles são classificados de acordo com o número de carbonos em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, terterpenos, triterpenos e tetraterpenos. Esteróides são lipídios com uma estrutura de carbono tetracíclica. São esteróides os hormônios sexuais femininos e masculinos, os hormônios adrenocorticóides, as vitaminas D, os ácidos biliares e o colesterol. Os esteróides são amplamente encontrados nos tecidos do corpo e possuem uma grande variedade de atividades fisiológicas. Eles são biossintetizados a partir do triterpeno lanosterol.

As microalgas têm a capacidade de produzir dois tipos de lipídios, polares e não polares. Os lipídios polares são encontrados principalmente nas membranas das microalgas, enquanto os lipídios não polares (neutros), são armazenados em seus próprios compartimentos, sendo grandes quantidades geradas quando as microalgas são submetidas a situações de estresse. O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004). Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser saturados ou mono/poliinsaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os PUFA's representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1988; BROWN, 1991; BECKER, 2004). Na tabela 1 estão reunidas espécies de microalgas e suas respectivas quantidades de lipídios produzidos.

Tabela 1 - Conteúdo lipídico e suas respectivas produtividades para diferentes microalgas.

Espécies de Microalgas	Conteúdo lipídico (% de biomassa seca)	Produtividade lipídica (mg/L/dia)
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0
<i>Chlorella photothecoides</i>	14,6-57,8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0
<i>Chlorella sp.</i>	10,0-48,0	18,7
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5-67,0	33,5
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0-56,0	60,9-76,5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7	84,0-142,0
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0-53,0	37,6-90,9
<i>Neochloris oleaobundans</i>	29,0-65,0	90,0-134,0
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	44,8
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0-57,0	34,8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0	35,1
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6-21,1	26,3
<i>Skeletonema sp.</i>	13,3-31,8	17,4
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	27,0-36,4
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6-14,7	43,4

Fonte: Adaptada de ANDRADE, L. M. (2014).

As microalgas possuem alta capacidade de acúmulo de lipídios sob condições específicas, como em meios com alto teor de carbono e nitrogênio. Os lipídios obtidos a partir das microalgas são classificados em dois tipos de acordo com seus respectivos números de carbono: ácidos graxos contendo entre 14 e 20 carbonos, e PUFA's com mais de 20 carbonos. Tanto a velocidade de produção quanto o teor de lipídios da biomassa devem ser examinados em simultâneo para garantir uma produção de lipídios de microalgas mais eficiente (VOLKMAN et al., 1989; ZHUKOVA & AIZDAICHER, 1995; ROBLES MEDINA et al., 1998).

3.2.1. Extração de lipídios

De acordo com Salam et al. (2016), cerca de 10% da biomassa microalgal constitui-se do material da parede celular das microalgas. A composição desta parede celular, assim como a estrutura celular, varia entre as espécies. Para realizar o processo de fotossíntese, as microalgas verdes possuem organelas especiais, chamadas cloroplastos (organelas semiautônomas). São separados do citoplasma por duas a quatro membranas e o número de cloroplastos, seu tamanho e formato podem variar, de acordo com a espécie (KWIETNIEWSKA et al., 2012). Segundo Lourenço (2006), em quase todos os grupos de algas, o cloroplasto contém um pirenóide, estrutura proteica contendo a enzima RuBisCO, responsável pela fixação do dióxido de carbono durante o processo de fotossíntese.

As microalgas possuem também paredes celulares, cuja função é proteger as células contra danos físicos, mecânicos ou químicos. A espessura da parede celular na maioria das vezes é na faixa de 1-10 nm, mas em certas espécies do gênero *Oscillatoria* pode ser ainda de 200 nm. A parede celular de eucariotos situa-se sempre no lado de fora da membrana celular e é comparável com a parede celular das células das plantas. Basicamente, é construída de dois componentes - um componente fibrilar, formando a estrutura da parede, e um componente amorfo, que forma o enchimento entre as fibras. O componente fibrilar é na maioria das vezes celulose, embora possa ser substituído com manano, quitina ou xilano (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Há diversos métodos de extração que podem ser empregados para obtenção de lipídios: com água subcrítica, por pulso eletromagnético/diferença de potencial elétrico, por fluido supercrítico e extração via solventes orgânicos, que pode ser

assistida por ultrassom ou por micro-ondas. Cada um desses métodos pode apresentar vantagens e bons resultados. No entanto, alguns requerem alto investimento em equipamentos e em manutenção, demandando elevado consumo de energia (DU et al., 2015).

No processamento de microalgas para a obtenção de lipídios, a extração ocorre após as seguintes etapas: a) Cultivo (crescimento das microalgas em meio de cultivo apropriado), b) Colheita da biomassa microalgal, passando pelas seguintes operações: decantação/floculação ou centrifugação, c) Filtração, para obtenção da biomassa contendo ainda elevado teor de umidade; d) Pré-tratamento da biomassa, que pode ser por completa secagem/desidratação da biomassa em temperatura ambiente, ou em estufas, ou por liofilização, seguida de moagem/ trituração (redução do tamanho das partículas). Os lipídios podem ser extraídos da biomassa ainda úmida, o que representa significativa economia de tempo de processo e energia (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

3.2.2. Fatores que afetam a concentração de lipídios em microalgas

Autores apontam que a composição do meio de cultivo pode influenciar de forma direta a produção de lipídios e as concentrações de diferentes ácidos graxos em microalgas. Com frequência, o aumento no acúmulo de ácidos graxos é descrito como consequência aos efeitos da limitação de nutrientes e do tempo de cultivo (CHELLAMBOLI & PERUMALSAMY et al., 2014; MATA et al., 2010). Em condições onde o crescimento é limitado, é possível verificar uma queda na divisão celular, na taxa fotossintética e na síntese de proteínas. A energia fotossintética é desviada da divisão celular para o acúmulo de carboidratos e síntese de lipídios, ocorrendo também um aumento da síntese de enzimas específicas para a absorção de nutrientes (HU et al., 2008; YEH & CHENG, 2012).

BEN-AMOTZ (1995) relatou o cultivo comercial da alga *Dunaliella sp.* a fim de produzir uma grande quantidade de β -caroteno em duas etapas: primeiro, foi feito o uso de fotobiorreatores com excesso de nitrogênio e baixa salinidade para otimizar a síntese de biomassa; segundo, reduziu-se a concentração de N e usou-se alta salinidade para otimizar a produção. Em estudos com microalgas cultivadas sob baixa concentração de nitrogênio, PIORRECK et al. (1984) observaram que o conteúdo lipídico dessas microalgas aumentou, mas a distribuição de lipídios e ácidos graxos

não foi alterada. Em culturas de *Chlorella*, nas quais a divisão celular cessou devido à falta de nitrogênio no meio de cultura, o conteúdo lipídico das células aumentou de 28% para 70%, coincidente com um decréscimo no conteúdo protéico de 30% para 8% (ROUND, 1973).

Estudos envolvendo microalgas observaram que a baixos níveis de nitrogênio essas algas têm uma tendência a sintetizar lipídios neutros e ácidos graxos com um baixo grau de insaturação. Já em altos níveis de nitrogênio, as algas sintetizam predominantemente lipídios polares como os monoglactosil diacilglicerol, diagalactosil diacilglicerol, entre outros. A fonte de carbono para o crescimento celular e acúmulo de TAG pode variar, o que resulta na variabilidade da composição de ácidos graxos (ALVAREZ E STEINBÜCHEL, 2002). A *R. toruloides* demonstrou acumular mais de 60% de seu peso seco celular como lipídio usando glicose como fonte de carbono (TCHAKOUTEU et al., 2017).

3.2.3. Aplicações

Os lipídios são de grande importância na indústria de alimentos, uma vez que são fonte majoritária de energia na dieta e afetam os valores nutricionais, o gosto e a textura dos alimentos. Na área alimentícia, são usados em óleos de cozinha, margarinas, manteigas, maioneses, cremes e outros produtos.

Dentre os diversos ácidos graxos existentes, destacam-se os poliinsaturados de cadeia longa, e, em especial, os essenciais, assim denominados por sua importância na regulação do metabolismo celular, na produção de energia e no crescimento, e, principalmente, na prevenção de diversas doenças do sistema neurológico e cardiovascular. O metabolismo humano é incapaz de produzir os ácidos graxos insaturados das famílias ω -3 e ω -6, que, por serem indispensáveis à saúde, devem ser ingeridos através dos alimentos. Essas duas famílias de ácidos graxos são representadas, respectivamente, pelos seguintes ácidos essenciais: o ácido α -linolênico (C18:3) e o ácido linoléico (C18:2). A ingestão equilibrada de ácidos graxos essenciais previne reações inflamatórias, combate a depressão e o mal de Alzheimer, bem como a esclerose múltipla amiotrófica, protege o cérebro e a visão, dentre muitos outros benefícios (SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 2012).

EPA e DHA são conhecidos por regular a coagulação, o metabolismo das lipoproteínas, a pressão sanguínea e as funções endoteliais e plaquetárias. Em

particular, os PUFA são importantes para o crescimento e desempenho da retina, cérebro, tecidos reprodutivos e para a saúde cardiovascular (BHAKUNI E RAWAT, 2005, HORROCKS E YEO, 1999). Além disso, eles têm um efeito antiproliferativo em culturas de células epiteliais e broncopulmonares (MOREAU et al., 2006), causam supressão mieloide induzida por chumbo (QUEIROZ et al., 2003) e melhoram a glicogênese em camundongos diabéticos (CHERNG E SHIH, 2006).

As microalgas já são reconhecidas como fontes potencialmente boas para a produção de biocombustíveis devido ao seu alto teor de óleo e rápida produção de biomassa. Além disso, pesquisadores e empresários têm reconhecido vantagens no uso de algas, como:

- as algas apresentam um potencial de produção de 5000-15000 galões/acre/ano de cultivo segundo Mohammadi e Aliabadi (2013);
- não competem com a agricultura tradicional, uma vez que não são alimentos e podem ser cultivados em grandes lagos abertos ou em fotobiorreatores fechados;
- podem crescer em uma ampla variedade de condições climáticas e de água;
- podem ser processados em um amplo espectro de produtos.

Existem várias maneiras de converter biomassa microalgal em fontes de energia, que podem ser classificadas em conversão bioquímica, reação química, combustão direta e conversão termoquímica. Assim, as microalgas podem fornecer matéria-prima para combustíveis líquidos renováveis, como biodiesel e bioetanol.

3.3. Carotenoides

Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1995).

Carotenoides são isoprenóides lipofílicos sintetizados pelos microrganismos fotossintéticos, por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Duas classes de carotenoides são encontradas na natureza: os carotenos, tais como β -caroteno, e as xantofilas como a luteína, astaxantina, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (VALDUGA et al., 2009). Os carotenos, formados exclusivamente por hidrocarbonos, são precursores de vitamina A. Já as xantofilas são substâncias derivadas dos

carotenos e possuem átomos de oxigênio em suas moléculas (CARNEIRO, 2013). Dos mais de 750 carotenoides conhecidos (BRITTON et al., 2004), apenas 50 são precursores de vitamina A. Destes, o β -caroteno é o mais abundante nos alimentos e o que apresenta maior capacidade de síntese dessa vitamina (AMBRÓSIO et al., 2006). Segundo Varela et al. (2015) e Nisar et al. (2015), a maior parte dos carotenoides são encontrados nas membranas tilacoides, localizadas no interior dos cloroplastos das plantas e presentes nas cianobactérias. Assim, alguns dos carotenoides exercem funções importantes na fotossíntese. A figura 4 mostra as estruturas químicas do β -caroteno (caroteno), luteína e astaxantina (xantofilas).

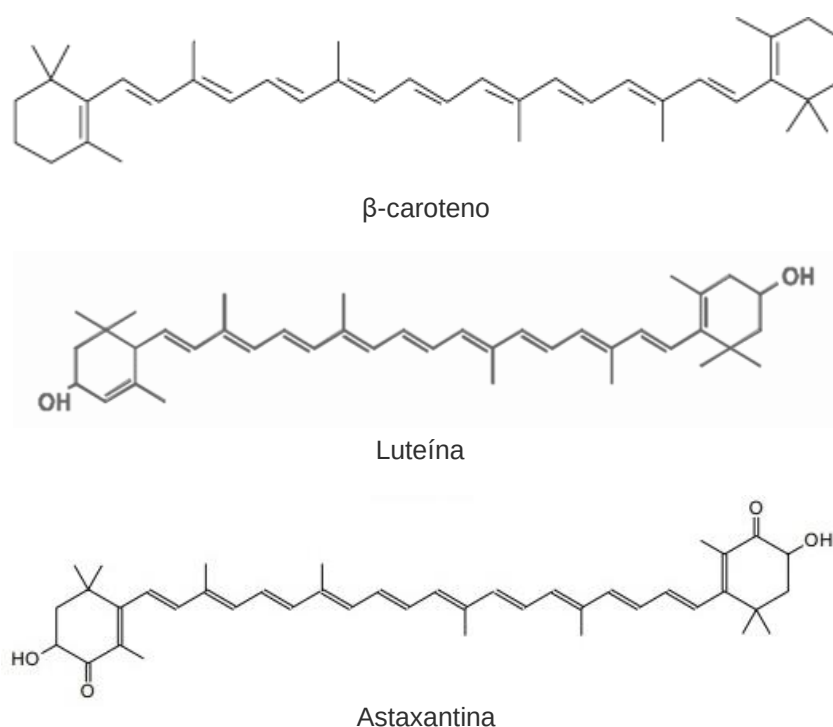


Figura 4 – Exemplos de estruturas de carotenoides.
Fonte: Adaptada Mesquita et al. (2017)

As moléculas de carotenoides absorvem luz com comprimentos de onda na faixa de 430-480 nm do espectro visível. Portanto, são responsáveis pelas cores amarela, vermelha e laranja das frutas, vegetais e alguns animais aquáticos. A cor dos carotenoides depende da quantidade de insaturação presente em sua cadeia de carbono. Para que a cor amarela apareça são necessárias, no mínimo, sete duplas ligações conjugadas. À medida que o número de ligações aumenta mais avermelhado os carotenoides se tornam. Aqueles com menos de sete ligações são incolores

(RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; CARNEIRO, 2013). O quadro 4 mostra exemplos de carotenoides encontrados e exemplos de fontes produtoras.

Quadro 4 - Exemplos de carotenoides encontrados na natureza, colorações e fontes produtoras.

Carotenoide	Coloração	Exemplos de fontes produtoras
Luteína	Amarela	<i>Chlorella sorokiniana</i> (microalga)
Zeaxantina	Amarela Laranja	<i>Dunaliella salina</i> (microalga) Milho verde
β -caroteno	Laranja	<i>Rhodotorula rubra</i> (levedura)
Bixina	Laranja	<i>Bixa orellana</i> (urucum)
Norbixina	Laranja	<i>Bixa orellana</i> (urucum)
Cantaxantina	Laranja Vermelha	<i>Haematococcus pluvialis</i> (microalga) <i>Rhodococcus maris</i> (bactéria)
Astaxantina	Vermelha	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (levedura) <i>Chlorella zofingiensis</i> (microalga)

Fonte: Adaptada de Mesquita et al. (2017).

Os carotenoides atuam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários. Cada espécie de microalga pode conter entre 5 e 10 tipos de aproximadamente 60 diferentes carotenoides presentes nas células de microalgas. Diversas espécies podem acumular grande concentração de betacaroteno, astaxantina ou cantaxantina, os quais têm uma ampla aplicação como corantes naturais e como antioxidantes combatendo a formação de radicais livres e consequentemente, prevenir doenças degenerativas e funcionando como agentes antitumorais e estimulantes do sistema imunológico (OROSA et al., 1997; BAKER; GUNTER, 2004; PULZ; GROSS, 2004). Como a geração de radicais livres no organismo constitui uma ação fisiológica contínua, quando a produção é elevada, eles se acumulam causando o chamado “estresse oxidativo” que pode lesar as células se esse acúmulo for mantido no organismo por período prolongado (CARNEIRO, 2013). Eles podem induzir o desenvolvimento de várias doenças, como cardiopatias, catarata, artrite reumatoide, Alzheimer, diabetes entre outras (SHAMI, 2004). Para se defender dos radicais livres, o organismo utiliza os antioxidantes endógenos como a enzima superóxido dismutase, ou os exógenos, como os carotenoides obtidos através da alimentação (MACHADO et al., 2006; LIMA et al., 2012; CARNEIRO, 2013).

Devido à vasta distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções, os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentantes naturais.

Comparados aos corantes sintéticos, são mais resistentes à presença de ácido ascórbico, ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades (SKULBERG, 2004).

3.3.1. Extração de carotenoides

Os carotenoides disponíveis no mercado podem ser obtidos por síntese química, extração a partir de fontes vegetais e até mesmo por rota biotecnológica como é o caso das microalgas. Os carotenoides de origem química são compostos majoritariamente da forma trans, enquanto os de origem natural normalmente são compostos por uma mistura complexa de vários isômeros com outros compostos bioativos. Os carotenoides a partir de vegetais depende de fatores como a variação climática, além da necessidade de uma grande área para plantio. Já os produzidos a partir de rotas biotecnológicas necessitam de pequenas áreas para produção, são independentes de estações do ano e composição do solo, e possuem maior facilidade de controle das condições de cultivo a fim de garantir maior produtividade. A produção pode ser originada de bactérias, algas e leveduras.

Extração é uma operação unitária com o objetivo de separar determinados compostos de uma matriz, sólida ou líquida, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (PRADO et al., 2014). Algumas das técnicas mais usuais são a extração por solventes orgânicos e a destilação. Como os carotenoides apresentam degradação térmica e alta massa molar, não é possível extraí-los por destilação. Dessa forma, a extração utilizando solventes orgânicos é a mais usual.

A extração por solventes orgânicos se baseia no princípio da difusão do solvente para a matriz, assim solubilizando os compostos de interesse, no caso os carotenoides. Esse processo é normalmente acompanhado da aplicação de calor e agitação. No caso das microalgas, o solvente precisa entrar na célula, e para isso é necessário passar pela membrana celular. A escolha do solvente adequado é vital para promover uma extração eficiente, pois além de determinar o grau de afinidade com o composto a ser extraído, irá promover determinada ruptura na parede da célula (HENRIQUES et al., 2007). Entre os solventes utilizados nessa extração, podemos citar os seguintes: hexano, acetona, etanol, metanol, éter de petróleo, éter dietílico, entre outros (PRADO et al., 2014). Quando o poder de ruptura celular do solvente não é suficiente, que pode ser intencional para evitar danos aos compostos que serão

extraídos, pode-se aplicar longos períodos de extração ou então uma tecnologia em paralelo, para ajudar a aumentar o rendimento de extração (HENRIQUES et al., 2007).

3.3.2. Fatores que afetam a concentração de carotenoides em microalgas

Os carotenoides também podem se distinguir entre primário e secundário. Primários, como β -caroteno e luteína, são componentes funcionais e estruturais da fotossíntese e participam diretamente na fotossíntese. Portanto, têm a função de captar a luz solar e proteger o sistema fotossintético da oxidação. Carotenoides secundários são sintetizados por cloroplastos e se acumulam no citoplasma. Dependendo das condições de cultivo e do ambiente, como luz, pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, concentração de sal, etc., esse tipo de carotenoide pode ser induzido a produzir maiores rendimentos. Portanto, sua função é filtrar a luz solar para proteger as células. Devido à imprevisibilidade das enzimas no metabolismo das microalgas, é difícil prever as condições para a produção de carotenoides primários e/ou secundários (KIM, 2015).

O tipo e a quantidade de carotenoides presentes em determinada planta dependem de várias variáveis, que vão desde fatores pré e pós-colheita, até genótipo, grau de amadurecimento, método de cultivo, condições climáticas e processamento. Ainda, diferentes partes de uma planta podem conter diferentes tipos de carotenoides (SAINI et al., 2015). Normalmente, o grau de amadurecimento tem efeito positivo na concentração de carotenoides, isto é, quanto mais a fruta estiver madura, maior será a quantidade. Mesmo após ser colhido, a concentração pode aumentar, pois os carotenoides podem continuar a ser sintetizados (FENNEMA, 2007).

Com relação ao processamento, tanto processos térmicos (secagem por aquecimento), como não térmicos (alta pressão, aplicação de campo elétrico pulsado, secagem por ultrassom) podem degradar significativamente o nível de carotenoides em frutas, vegetais e microalgas (SAINI et al., 2015). Para a maioria dos vegetais, o processo de secagem pode provocar uma perda de 10 a 20 % de carotenoides (SAINI et al., 2014). Além disso, processos térmicos podem causar mudança nos isômeros dos carotenoides. Segundo Colle et al. (2015), por exemplo, ocorre a isomerização de trans para cis do β -caroteno e da luteína conforme é aplicada temperatura, sendo prejudicial, pois isômeros cis apresentam atividade provitamina menos potente do que

os isômeros trans. O grau de degradação que processos térmicos impõe é maior do que em processos não térmicos. No entanto, a maioria das indústrias alimentícias preferem usar processos térmicos a processos mais avançados, uma vez que os últimos são caros e de difícil operação. No futuro, processos não térmicos tais como alta pressão e campo elétrico podem desempenhar um papel muito importante na preservação dos componentes bioativos dos alimentos, incluindo os carotenoides (SAINI et al., 2015).

3.3.3. Aplicações

Por muitos anos, a indústria de alimentos tem adotado o uso de corantes artificiais com o objetivo de intensificar a cor dos produtos processados, melhorando assim sua aparência. Entretanto, a ingestão dessas substâncias tem sido associada a efeitos nocivos como: hiperatividade, citotoxicidade, genotoxicidade e ansiedade. Esse cenário tem impulsionado o mercado consumidor a escolher produtos à base de corantes naturais. No grupo dos carotenoides, os mais usados para colorir produtos alimentícios são: astaxantina, cantaxantina, β -caroteno, licopeno, bixina e norbixina.

Na avicultura e aquicultura, os carotenoides têm sido usados como aditivos na alimentação de aves, com o objetivo de prover coloração às gemas dos ovos. Os mais usados são as xantofilas, pois são absorvidos e acumulados no organismo. Diversos frutos do mar com alto valor de mercado, como camarão, lagosta, lagostim, truta e salmão possuem carne com coloração que varia de laranja a vermelho devido à presença de carotenoides que são incorporados ao longo da cadeia alimentar. Quando peixes e crustáceos são criados em cativeiro para consumo humano, é necessária a adição de carotenoides em sua alimentação, a fim de intensificar a coloração da carne. Os principais carotenoides empregados são: astaxantina, cantaxantina e a mistura desses dois pigmentos.

Na indústria farmacêutica, nutracêutica e cosmecêutica, os carotenoides também se mostram benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios de visão, câncer (cólon, esofágico, bucal, faringe e laringe), distúrbios neurológicos e doenças imunológicas. O β -caroteno também tem sido usado como intensificador e prolongador do bronzeado, devido ao seu acúmulo no tecido hipodérmico que confere coloração dourada bronzeada à pele. Xantofilas, como a luteína, se acumulam na mácula lútea, protegendo os olhos contra a catarata e a

degeneração macular relacionadas à idade. Efeito similar foi relatado para a zeaxantina que também previne contra a degeneração macular. Alguns estudos indicam que a administração oral de luteína e zeaxantina é capaz de proteger a pele contra efeitos da radiação UVB.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho se baseou na coleta de dados por meio de pesquisas bibliográficas e online. Foi realizado o levantamento bibliográfico com a seleção de dissertações e artigos escritos a partir de 2015 que apresentam o tema de microalgas para a produção de lipídios e/ou carotenoides, usando as palavras chaves: “microalgae”, “lipids” e “carotenoids” no portal de periódicos CAPES.

Em seguida, realizou-se a primeira leitura exploratória de todo o material selecionado, que objetivava verificar se a obra consultada era de interesse para o trabalho. Determinados os materiais pertinentes ao tema desenvolvido, foi efetuada a leitura seletiva, com o intuito de aprofundar e coletar informações relevantes. Posteriormente, fez-se o registro das informações extraídas das fontes como: ano, autores, microalgas utilizadas, métodos, resultados e conclusões.

Após isso, foi feita uma leitura analítica com a finalidade de organizar e condensar as informações coletadas. Por fim, as informações foram analisadas, discutidas para a escrita do material teórico relativo à temática do estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção simultânea de carotenoides e lipídios por microalgas tem sido foco de muitos estudos, principalmente para viabilizar economicamente processos obtendo produtos de grande interesse no mercado. No entanto, sob diferentes condições de cultivo, são vistos resultados distintos relacionados a rendimento e ao comportamento desses microrganismos. A maquinaria de acumulação de lipídios e carotenoides pode ser desencadeada por condições de estresse, como limitação de nutrientes ou exposição a fatores físicos. Ao mesmo tempo, condições estressantes geralmente afetam adversamente o crescimento de microalgas e causam danos oxidativos às células, o que pode eventualmente reduzir o rendimento dos produtos desejados.

Estratégias de cultivo em dois estágios e suplementação de agentes promotores têm sido tradicionalmente utilizadas para viabilizar tais casos.

Levando em consideração a relevância dos métodos para otimizar esses processos, o quadro 5 reúne algumas espécies de microalgas em estudos atuais, a quantidade de carotenoides e lipídios produzidos por cada uma delas e a principal estratégia de cultivo utilizada.

Quadro 5 - Produção de carotenoides e lipídios de acordo com microalga e cultivo utilizada.

Artigo	Estratégia de cultivo	Carotenoides	Lipídios	Referência
Concurrent production of carotenoids and lipid by a filamentous microalga <i>Trentepohlia arborum</i>	Diferentes suplementações de nitrogênio e intensidade de luz	13,40 mg/g de β -Caroteno	263,3 mg/g	Chen et al., 2016
Effect of Supercritical Carbon Dioxide Extraction Parameters on the Biological Activities and Metabolites Present in Extracts from <i>Arthrospira platensis</i>	Extração supercrítica com dióxido de carbono	0,52446 mg/g de β -Caroteno	32,11 mg/g	Esquivel-Hernández et al., 2017
Production of carotenoids and lipids by <i>Dunaliella tertiolecta</i> using CO ₂ from beer fermentation	CO ₂ biológico a partir de fermentadores de cerveja	4,74 mg/g de β -Caroteno	135 mg/g	Chagas et al., 2015
Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga <i>Coccomyxa onubensis</i> under abiotic stress by salt or ultraviolet light	Estresse abiótico por sal ou luz ultravioleta	7,07 mg/g de luteína	487,26 mg/g	Bermejo et al., 2018
Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga <i>Chlorella zofingiensis</i>	Irradiância de alta luz e privação de nitrogênio	4,89 mg/g de astaxantina	387 mg/g	Liu et al., 2016

Fonte: Próprio autor.

Algumas das relações apresentadas nos artigos e informações complementares da literatura estão reunidas na figura 5, que apresenta etapas de cultivo em dois estágios. Essa estratégia de cultivo dedica o primeiro estágio com condições ótimas de crescimento para obter a produção máxima de biomassa, por

exemplo, enquanto reserva o segundo processo para o acúmulo de lipídios ou carotenoides sob várias condições de estresse.

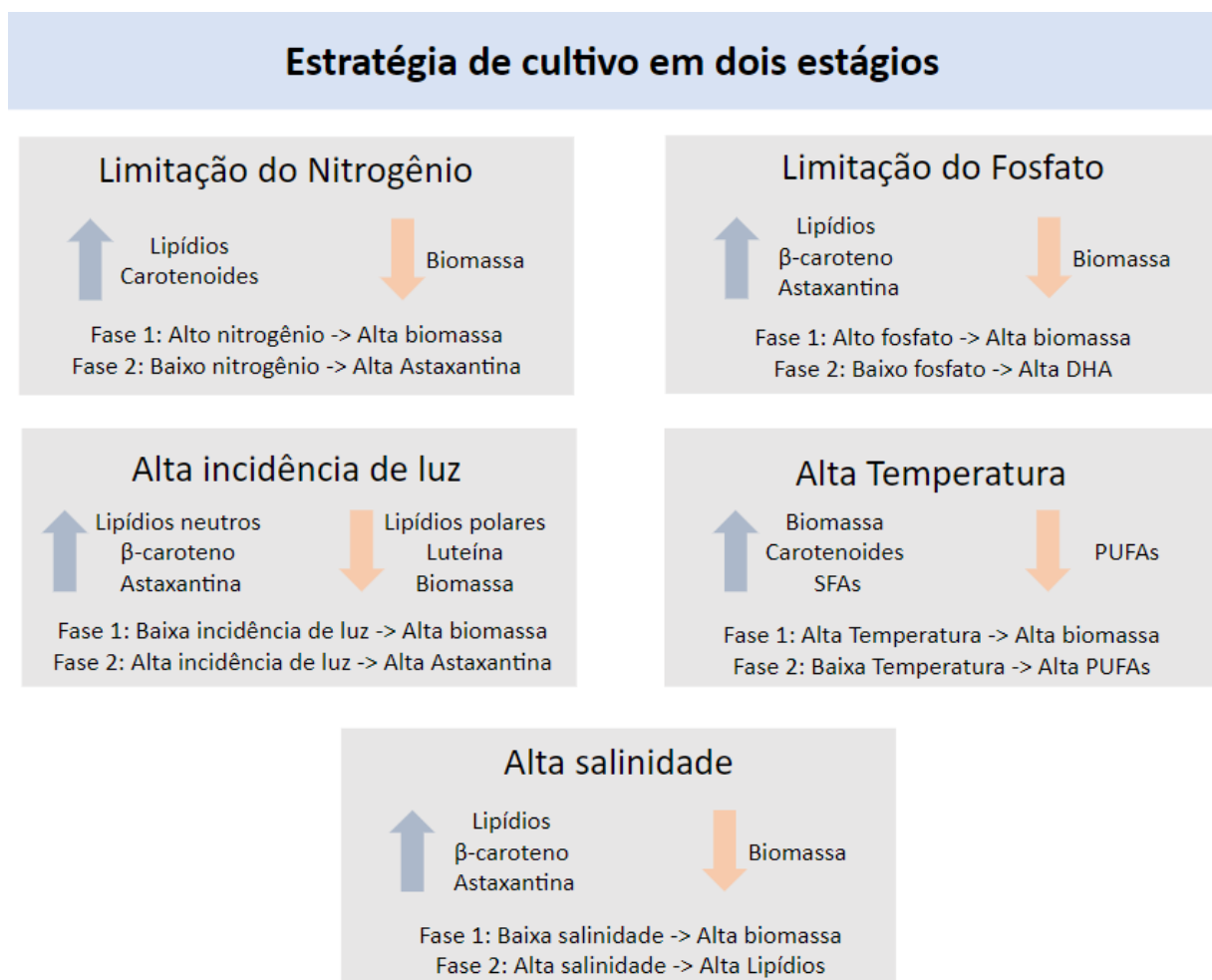


Figura 5 - Efeitos de estresses nutricionais e ambientais na produção de lipídios e carotenoides em cultivo de dois estágios.

Fonte: Adaptada de Sun et. al, 2018.

Sob condições ambientais extremas, as microalgas sintetizam e produzem vários metabólitos secundários para reter sua taxa de crescimento. Em geral, os lipídios agem como uma bateria de armazenamento de carbono rica em energia que permite que as células sobrevivam em condições ambientais adversas e transitórias (Hellier et al., 2015). Segundo Hu et al. (2008) e Shi et al. (2017), muitos estudos mostraram que as condições de estresse aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS), o que por sua vez mudou o fluxo metabólico de carbono da glicólise para a via da pentose fosfato oxidativa e subsequentemente, resultou no acúmulo excessivo de equivalentes intracelulares de redução excessiva, como NADPH. Para proteger as células de microalgas dos equivalentes de redução

excessivos produzidos sob estresse, lipídios, ao invés de proteínas ou carboidratos, foram acumulados em grandes quantidades devido às maiores demandas de NADPH. No entanto, altos níveis de ROS também podem causar danos a macromoléculas biológicas, como DNA, lipídios e proteínas (RUENWAI et al., 2011). Para combater esse perigo, as microalgas sintetizam quantidades adicionais de carotenoides para eliminar ROS sob condições de estresse.

Os carotenoides podem formar uma camada protetora para prevenir os radicais reativos e a peroxidação lipídica. Além disso, são importantes para manter a funcionalidade do aparato fotossintético e a integridade das membranas, o que é essencial para a sobrevivência celular. Os carotenoides podem ser divididos em classes primárias e secundárias. Carotenoides primários são metabólitos acoplados ao crescimento localizados nas membranas mitocondriais e cloroplastos que sofrem degradação sob estresse. Entre os carotenoides primários, a luteína é particularmente proeminente, pois atua para manter a integridade da membrana e protege as células sob muitas condições de estresse (SANCHEZ et al., 2008). Em contraste, os carotenoides secundários podem ser produzidos sob condições de estresse. A astaxantina é considerada um carotenoide secundário típico e está presente em corpos lipídicos citoplasmáticos fora dos cloroplastos (LEMOINE E SCHOEFS, 2010). Os carotenoides primários, como a luteína, são degradados sob estresse, enquanto os carotenoides secundários permanecem praticamente inalterados (DEL CAMPO et al., 2000). No entanto, vários carotenoides primários, como o β -caroteno, também se acumulam em condições de estresse e atuam como metabólitos secundários (HERMAWAN et al., 2018).

Existem muitas ligações inseparáveis entre a produção de lipídios e de carotenoides. Em primeiro lugar, suas vias de biossíntese compartilham o mesmo substrato precursor, acetil-CoA. Em segundo lugar, a eliminação de ROS da peroxidação lipídica é uma característica importante dos carotenoides. Por último, os carotenoides são tóxicos para a célula, portanto, as gotículas de lipídios podem atuar como "depósitos" para os carotenoides (MA et al., 2018).

De acordo com os artigos lidos, a maior produção simultânea de carotenoides e lipídios foi obtida a partir da microalga *Coccomyxa onubensis* e da microalga *Trentepohlia arborum*. Ainda que essas microalgas produzam diferentes carotenoides, ambas aplicaram condições de estresse relacionadas à variação na intensidade de luz.

A *Coccomyxa onubensis* é uma microalga eucariótica isolada de um ambiente ácido. Microalgas extremofílicas podem lidar com extremos de pH, temperatura, pressão, intensidade de luz, radiação UV (UVR), alta concentração de CO₂ ou salinidade. A *Dunaliella sp.*, por exemplo, é isolada de corpos d'água de alta salinidade com concentração de NaCl superior a 3M e a *Arthrospira (Spirulina platensis)* floresce em lagos alcalinos com pH alto, na faixa de 9 a 11. Microalgas poliextremofílicas podem prosperar em ambientes com mais de um fator de estresse.

O efeito tóxico do sal em microalgas eucarióticas pode ser atribuído a perda de água, desequilíbrio iônico, superprodução de espécies reativas de oxigênio ou inativação enzimática. No entanto, a *C. onubensis* pode ser usada para a produção de luteína usando um processo de duas etapas. Na primeira etapa, a cultura de células contendo 100 mM de sal foi utilizada para produzir biomassa da microalga e na segunda etapa, o sal 500 mM foi adicionado à cultura para induzir o acúmulo de luteína nas células. Estratégias semelhantes têm sido usadas com outras microalgas.

De acordo com Bermejo et al. (2018), a adição de NaCl (100 mM) à cultura de *C. onubensis* aumentou significativamente a taxa de crescimento e a produtividade da biomassa, devendo-se provavelmente a uma melhora na atividade fotossintética das células. O estresse salino produz alterações no metabolismo das microalgas, que por sua vez resulta no acúmulo de metabólitos osmorreguladores e no controle da troca iônica através da membrana celular. Sob estresse de alta salinidade, a produção de lipídios também aumentou, enquanto o teor de proteína e amido diminuiu. Foi descoberto que a ACCase (a enzima chave da síntese de lipídios) foi regulada positivamente e a AGPase (a enzima principal da síntese de amido) foi regulada negativamente. Além disso, os níveis de mRNA das principais enzimas envolvidas na degradação do amido foram fortemente reguladas positivamente, que provou ainda que a salinidade induziu a conversão de amido em lipídios. O estresse salino ainda induziu a geração de ROS, que pode aumentar a atividade da enzima ACCase e regular a autofagia celular (GOODSON et al., 2011).

Quando as células de *C. onubensis* foram cultivadas sob iluminação contínua com luzes PAR+UVA, a taxa de crescimento e a produtividade da biomassa aumentaram em comparação com uma cultura controle. Por outro lado, quando as culturas de microalgas foram iluminadas com luz PAR suplementada com radiações UVB, foi observada uma inibição significativa do crescimento celular e da atividade fotossintética. Alguns autores apontam que essa toxicidade pode levar à geração de

radicais de oxigênio em excesso, que por sua vez danificam proteínas e/ou o DNA. UVB é tóxico para células microalgais, sendo indicado por uma redução no conteúdo de clorofila intracelular.

Os carotenoides desempenham um papel importante na fotossíntese em termos de transferência de energia como pigmentos acessórios, principalmente quando o conteúdo de clorofilas intracelulares é baixo. Os carotenos possuem atividade antioxidante e protegem o aparato fotossintético contra danos foto-oxidativos. Ao mesmo tempo, a UVR (luz ultravioleta) induz mudanças metabólicas nas microalgas, o que altera a composição da biomassa e aumenta a fração lipídica.

O teor de lipídios totais para *T. arborum* com diferentes níveis de suprimento de nitrogênio sob baixa e alta intensidade de luz foi analisado e, independentemente da intensidade de luz considerada, quanto menor o suplemento de nitrogênio, maior o teor de lipídios totais foram produzidos. Embora tanto a deficiência de nitrogênio quanto a luz forte possam promover o acúmulo de lipídios em *T. arborum*, não houve efeito combinado no acúmulo de lipídios em resposta ao duplo estresse de alta luz e deficiência de nitrogênio. O acúmulo de lipídios em *T. arborum* foi provavelmente mais sensível ao estresse de fome de nitrogênio do que à forte irradiância de luz.

Triacilglicerol (TAG) foi a fração predominante em lipídios de culturas -N (sob deficiência de nitrogênio). As proporções de TAG entre os lipídios totais aumentaram 3,5 vezes e 10,5 vezes conforme o nitrogênio foi reduzido. O aumento geral em TAG sob deficiência de nitrogênio é provavelmente devido à expressão de biossíntese de ácidos graxos, além da conversão de lipídios polares, sendo fosfolipídios e glicolipídios (PLs e GLs), em TAG desencadeada pela privação de nitrogênio, que foi relatada em outras algas verdes (RECHT et al., 2014, XIA et al., 2015). Já o conteúdo volumétrico de carotenoides nas células aumentou mais rapidamente em cada nível de nitrogênio com alta luz do que se submetido a baixas intensidades de luz. O declínio do teor de clorofila é uma resposta geral à deficiência de nitrogênio em algas verdes (XIA et al., 2015, IKARAN et al., 2015), uma vez que o nitrogênio é um elemento importante nas moléculas de clorofila e a indisponibilidade desse nutriente pode impedir a síntese de clorofila.

A *Chlorella zofingiensis* foi submetida a quatro condições de cultivo: a condição de crescimento regular com pouca luz (LL) e três condições de estresse de privação de nitrogênio (ND), alta luz (HL), e a combinação de ND e HL (ND + HL). Os resultados comparativos revelaram que o TAG e a astaxantina foram induzidos por condições de

estresse e se acumularam de forma bem correlacionada. Examinando o crescimento e a morfologia de *C. zofingiensis* em resposta a LL e HL em condições de N-repleto e N-depletado, viu-se que, independentemente da intensidade da luz, *C. zofingiensis* cresceu muito mais rápido em condições repletas de N do que em condições de depleção de N. Geralmente, *Chlorella* executa fotossíntese proporcionalmente à intensidade da luz e torna-se saturada quando a intensidade da luz atinge um limite, acima do qual a fotossíntese das algas pode sofrer fotoinibição levando a um fenótipo de crescimento prejudicado (LIU E CHEN, 2014).

A privação de nitrogênio foi capaz de aumentar o conteúdo intracelular de TAG e astaxantina, mas às custas da produção de biomassa. Este conflito pode ser parcialmente resolvido pelo emprego de um par de estratégia de limitação de nitrogênio com um sistema de cultura semicontínuo. A limitação de nitrogênio fornece uma solução de compromisso para o crescimento celular e acúmulo de compostos de armazenamento (GRIFFITHS et al., 2014), enquanto a cultura semicontínua permite a produção relativamente estável.

Baixos níveis de nitrogênio reduzem a competição pelo carbono, que é necessário para a síntese de carotenoides e proteínas, uma vez que apenas os últimos requerem nitrogênio. Outra possível razão pode ser a degradação de compostos nitrogenados, como clorofila e proteínas, que podem fornecer carbono ou energia para o acúmulo de lipídios (LIU T. et al., 2016). Além disso, foi relatado que a deficiência de nitrogênio pode regular positivamente a diacilglicerol aciltransferase (DGAT), que catalisa a última etapa da montagem de TAG em muitas espécies de microalgas (LI-BEISSON et al., 2015).

No estudo de Chagas et al. (2015), foi avaliado o efeito do cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* usando CO₂ da fermentação na produção de biomassa rica em lipídios e carotenoides. Foi utilizado um sistema integrado de fotobiorreatores de microalgas e fermentadores de levedura, fornecendo assim CO₂ biológico continuamente para a cultura de microalgas. Em todas as culturas de microalgas enriquecidas com CO₂ da fermentação YPD (meio de cultura levedura-peptona-dextrose modificado médio), maiores biomassas, concentração de carotenoides e consumo de nitrogênio mais rápido foram observados em relação aos controles. A produtividade de carotenoides de culturas de microalgas aumentou à medida que a produção de CO₂ das fermentações de levedura começou mais cedo. As culturas enriquecidas com CO₂ também apresentaram maior teor de lipídios. No entanto, as

razões para as diferenças no perfil de acúmulo de amido e lipídios e na formação de carboidratos na parede celular seriam específicas da cepa e ainda não são claras.

Já por meio da extração supercrítica com dióxido de carbono (SFE-CO₂) combinado com variações de pressão (P), temperatura (T), co-solvente (CX), extração estática (SX), dispersante (Di) e extração dinâmica (DX) com a *Arthrospira platensis*, foi possível observar resultados mais relacionados a extração. A extração nos níveis mais altos de pressão, tempo e co-solvente deu eficiência máxima em relação ao rendimento total de extração. Ao trabalhar em condições supercríticas, o rendimento aumentou com a adição do co-solvente, pois os compostos extraídos possuíam polaridades diferentes e, portanto, o processo tornou-se menos seletivo. Em geral, o co-solvente (ou seja, etanol) foi o fator mais significativo em todas as respostas, pois aumentou a polaridade do CO₂ e permitiu a extração de maiores quantidades dos compostos. Além disso, o etanol e o CO₂ oferecem vantagens adicionais, como solventes baratos e ecologicamente corretos, podendo ser reutilizados no caso do dióxido de carbono.

Todos esses trabalhos buscaram entender os impactos de diferentes condições no cultivo de microalgas para a obtenção de lipídios e carotenoides, mas é importante salientar que as conclusões foram descritas com base em investigações em escala de laboratório e só foram comprovados em espécies de microalgas minoritárias. Ensaio em larga escala e estudos de viabilidade econômica dessas estratégias ainda são necessários e, ao mudar da unidade de produção do laboratório para uma grande escala, existem algumas variáveis relevantes, incluindo fotobiorreator de grande escala, disponibilidade de dióxido de carbono, fornecimento de energia, bem como a disponibilidade de nutrientes. O progresso de tecnologias inovadoras oferecerá mais chances de desvendar ainda mais os processos e reações celulares, o que pode oferecer orientação para a produção microbiana de lipídios e carotenoides em escala industrial.

6. CONCLUSÃO

Cada espécie de microalga tem diferentes condições ótimas de estresse para uma melhor produção dos metabólitos desejados. No total, a estratégia baseada no estresse é a maneira mais eficaz de aumentar a produção de lipídios ou carotenoides em microalgas, embora isso possa inibir o crescimento celular e induzir danos

oxidativos, aliado a uma produção em dois estágios, em que o primeiro tem o propósito do crescimento da biomassa e o segundo a indução da produção de carotenoides e lipídios.

Os principais mecanismos celulares que influenciam o crescimento celular e a produção de moléculas valiosas ainda precisam ser esclarecidos. Nos últimos anos, estudos vêm sendo feitos explorando elementos que impactam no crescimento da biomassa, levando em consideração, por exemplo, os tipos de cultivo e disponibilidade de nutrientes, mas também é necessário identificar os principais genes reguladores que são ativados sob condições de estresse.

A partir desses resultados será cada vez mais possível viabilizar economicamente a produção, uma vez que o uso de carotenoides e lipídios vem crescendo globalmente, sendo utilizados em indústrias alimentícia, cosmética, ração animal e farmacêutica.

7. REFERÊNCIAS

ABALDE, J. et al. Microalgas: cultivo y aplicaciones. 1995.

ALVAREZ, H.; STEINBÜCHEL, A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 367-376, 2002.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011. Doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.014

AMBROSIO, C. L.; CAMPOS, F. A.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243, 2006.

ANDRADE, L. M. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANDRADE, M. R. **Biossistema para produção de Biomassa Microalgal e Biometano**. 168f. Tese (Doutorado) Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

ANTAL, T. K.; KRENDELEVA, T. E.; RUBIN, A. B. Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 3-15, 2011.

ARAÚJO, B. V. S. **Metabólitos de interesse à indústria alimentícia, produzidos por microalgas isoladas da região nordeste do Brasil**. 143f. Tese (Doutorado) Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba, 2018.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 188 f. Dissertação de mestrado em Planejamento Energético. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BAKER, R.; GÜNTHER, C.. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BECKER, E. W. Micro-algae for human and animal consumption. **Micro-algal biotechnology**, p. 222-256, 1988.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Wiley Online Library, 2004.

BELL, G.. Experimental evolution of heterotrophy in a green alga. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 67, n. 2, p. 468-476, 2013.

BELL, Peter R.; BELL, Peter R.; HEMSLEY, Alan R. **Green plants: their origin and diversity**. Cambridge University Press, 2000.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. Algas de agua doce: Identificação e uso como bioindicadores. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1265-1266, 2010.

BEN-AMOTZ, Ami. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. **Journal of applied phycology**, v. 7, n. 1, p. 65-68, 1995.

BERMEJO, E. et al. Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 125, n. 6, p. 669-675, 2018.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Springer Science & Business Media, 2006.

BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.

BOROWITZKA, M. A. **Products from microalgae**. Editora: Infofish Int, 1993.

BOYLE, Nanette R.; MORGAN, John A. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. **BMC systems biology**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2009.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BROWN, Malcolm R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 145, n. 1, p. 79-99, 1991.

CARNEIRO, J. S. et al. Pigmentantes de gema: novo método de avaliação de cor e caracterização da produtividade e saúde das poedeiras. 2013.

CARVALHO, J. C. de; **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Manascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CHAGAS, A. L. et al. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 981-988, 2015.

CHELLAMBOLI, Chelladurai; PERUMALSAMY, Muthiah. Application of response surface methodology for optimization of growth and lipids in *Scenedesmus abundans* using batch culture system. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 22129-22140, 2014.

CHEN, Feng; JOHNS, Michael R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. **Journal of applied phycology**, v. 7, n. 1, p. 43-46, 1995.

CHEN, Guan-Qun; CHEN, Feng. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 9, p. 607-616, 2006.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011.

CHEN, Lin; ZHANG, Lanlan; LIU, Tianzhong. Concurrent production of carotenoids and lipid by a filamentous microalga *Trentepohlia arborum*. **Bioresource technology**, v. 214, p. 567-573, 2016.

CHERNG, Jong-Yuh; SHIH, Mei-Fen. Improving glycogenesis in Streptozocin (STZ) diabetic mice after administration of green algae *Chlorella*. **Life Sciences**, v. 78, n. 11, p. 1181-1186, 2006.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

COESEL, S. N. et al. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 602-611, 2008.

COLLE, I. et al. Carotene degradation and isomerization during thermal processing: a review on the kinetic aspects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 11, p. 1844-1855, 2016.

COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. Princípios de bioquímica. **São Paulo**, 2006.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J. M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 158-162, 2006.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Ed.). **Fennema's food chemistry**. CRC press, 2007.

DEL CAMPO, J. A. et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp.* (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.

DERNER, R. B.; OHSE S.; VILLELA M.; CARVALHO S. M.; FETT R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

DUBINSKY, Z.; MATSUKAWA, R.; KARUBE, I. Photobiological aspects of algal mass culture. **J. Mar. Biotechnol.**, v.2, p.61-65, 1995.

DU, Ying et al. Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: An energy evaluation. **Algal research**, v. 11, p. 271-283, 2015.

ERIKSEN, Niels T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2008.

ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, D. A. et al. Effect of supercritical carbon dioxide extraction parameters on the biological activities and metabolites present in extracts from *Arthrospira platensis*. **Marine drugs**, v. 15, n. 6, p. 174, 2017.

FARRELL, M. K. **Bioquímica volume único**. São Paulo: 2011.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, p.437-448, 2013.

GARCIA, MC Cerón et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 297-305, 2005.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GIDDEY, Sarb et al. A comprehensive review of direct carbon fuel cell technology. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 3, p. 360-399, 2012.

GILL, Iqbal; VALIVETY, Rao. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in biotechnology**, v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.

GOODSON, C. et al. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 12, p. 1592-1606, 2011.

GRIFFITHS, M. J.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. TL. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 2345-2356, 2014.

GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Nutritional value and uses of microalgae in Aquaculture. In: MUCHLISIN, Z. (Ed.) **Aquaculture**, InTech, 2012. p.60-68.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.

HARUN, R., DANQUAH K., FORDE G. M. (2010). "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production". **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, September 2009: 199–203. doi:10.1002/jctb.2287.

HELLIER, P.; PURTON, S.; LADOMMATOS, N. Molecular structure of photosynthetic microbial biofuels for improved engine combustion and emissions characteristics. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 49, 2015.

HENRIQUES, M.; SILVA, A.; ROCHA, J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatex**, v. 2, p. 586-593, 2007.

HERMAWAN, J. et al. Increasing β -carotene content of phytoplankton *Dunaliella salina* using different salinity media. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012034.

HO, S. H.; CHAN, M. C.; LIU, C. C.; CHEN, C.Y.; LEE, W. L.; LEE, D. J.; CHANG, J. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresour Technol**, v.152, p. 275–282. 2014.

HONG, S.-J.; LEE, C.-G. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis PCC6803*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 2, p. 165-173, 2007.

HORROCKS, L. A.; YEO, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological research**, v. 40, n. 3, p. 211-225, 1999.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERG, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

IKARAN, Z. et al. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. **Algal research**, v. 10, p. 134-144, 2015.

KIM, Se-Kwon (Ed.). **Handbook of marine microalgae: Biotechnology advances**. Academic Press, 2015.

KWIETNIEWSKA, E. et al. Microalgae-cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. **Acta Agrophysica. Monographiae**, n. 2, 2012.

LAVENS, Patrick et al. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Food and Agriculture Organization (FAO)., 1996.

LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. **Photosynthesis research**, v. 106, n. 1, p. 155-177, 2010.

LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.

LIMA, J. P. et al. Atividade e Biodisponibilidade dos Carotenoides no Organismo/Activity and Bioavailability of Carotenoids in Body. **Health Sciences Journal**, v. 2, n. 1, p. 65-73, 2012.

LI-BEISSON, Yonghua; BEISSON, Fred; RIEKHOF, Wayne. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 504-522, 2015.

LIU, J.; CHEN, F. Biology and industrial applications of *Chlorella*: advances and prospects. **Microalgae biotechnology**, p. 1-35, 2014.

LIU, J. et al. Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource technology**, v. 214, p. 319-327, 2016.

LORENZI, Adriana Sturion. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos potencialmente produtores de microcistinas**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

LUNDQUIST, Tryg J. et al. A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. **Energy Biosciences Institute**, p. 1, 2010.

MA, T. et al. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene. **Metabolic engineering**, v. 52, p. 134-142, 2019.

MACHADO, F. M. V. F.i; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 610-618, 2006.

MARTINEZ, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource technology**, v. 73, n. 3, p. 263-272, 2000.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MERCADANTE, A. Z. et al. Carotenoids handbook. **Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds**, 2004.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, aplicações e mercado. **Revista virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.

MILITÃO, F. P. **Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica**. 69 f. Dissertação de mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

MOHAMMADI, Mahya; AZIZOLLAHI-ALIABADI, Morteza. Biodiesel production from microalgae. *J Biol Today'S World*, v. 2, p. 76-84, 2013.

MORALES-SÁNCHEZ, D. et al. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2015.

MOREAU, D. et al. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 97-103, 2006.

NEILSON, A. H.; LEWIN, R. A. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. **Phycologia**, v. 13, n. 3, p. 227-264, 1974.

NISAR, N. et al. Carotenoid metabolism in plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 1, p. 68-82, 2015.

NURDOGAN, Y.; OSWALD, W. J. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. **Water science and technology**, v. 31, n. 12, p. 33-43, 1995.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p. 359-466, 2003.

OROSA, M. et al. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 553-556, 2000.

PALUDO, M. **Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico**. 89 p. 2012. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Alimentos), Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic Growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of phycology**, v. 47, N. 1, p.190-199, 2011.

PIENKOS, P.T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v.3, p. 431-440, 2009.

PINA, L. C. C. et al. Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37734-37777, 2021.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.; POHL, P.. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.

PRADO, J. M. et al. Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables-review. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 29-66, 2014.

PRIYADARSHANI, Indira; RATH, Biswajit. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

QUEIROZ, M. L. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 6, p. 889-900, 2003.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. CW; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynthesis research**, v. 60, n. 2, p. 111-150, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biologia vegetal. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830p.

REBOLLOSO-FUENTES, Ma M. et al. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2966-2972, 2001.

RECHT, L. et al. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green algae *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30387-30403, 2014.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2004. p. 155-157.

RICHMOND, A. (Ed.). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton, Florida: CRC press, 1986.

RICHMOND, A. Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phycology. Black Well Science Ltd. **J Appl Phycol**, v. 16, p. 159-160, 2004.

ROBLES MEDINA, A. et al. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v.16, n.13, p.517-580, 1998.

RODEN, E. E., ZACHARA, J. M. Microbial reduction of crystalline iron (III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth, **Environmental Science e Technology**, v. 30, n. 5, p. 1618-1628, 1996.

ROUND, F.E. (1973). Biology of the algae. Publishers Ltd, London, 263 p.

RUENWAI, R. et al. Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* causes a global transcriptional response resulting in reduced proteasomal activity and increased oxidative stress. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 3, p. 343-356, 2011.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-products: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 1179–1198, 2016.

SAINI, R. K. et al. Effect of dehydration methods on retention of carotenoids, tocopherols, ascorbic acid and antioxidant activity in *Moringa oleifera* leaves and preparation of a RTE product. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 9, p. 2176-2182, 2014.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735-750, 2015.

SÁNCHEZ, J. F. et al. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398-405, 2008.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 227-236, 2004.

SHI, K. et al. Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: the state of the art and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 793, 2017.

SIAUT, Magali et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2011.

SKULBERG, O. M. 30 Bioactive chemicals in microalgae. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, p. 485, 2004.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN C.; DURAN E.; ISAMBERT A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.2, p.87-96, 2006.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107f. Dissertação (Mestre em Ciências - Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arquivos do Mudi**, v. 2, n. 2, p. 102-107, 1998.

SUN, Z. et al. Microalgae as a source of lutein: Chemistry, biosynthesis, and carotenogenesis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 153: 37-58 p. 2016.

TCHAKOUTEU, Sidoine Sadjeu et al. *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 3, p. 237-248, 2017.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.3-19.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Effect of culture conditions on growth of green alga—*Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. **Acta physiologiae plantarum**, v. 24, n. 3, p. 323-329, 2002.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis research**, v. 125, n. 3, p. 423-436, 2015.

VIÊGAS, Carolina Vieira. **Extração e caracterização dos lipídios da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. 2010. Dissertação de Mestrado.

VOLKMAN, J. K. et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 128, n. 3, p. 219-240, 1989.

XIA, L. et al. Physiological responses of freshwater oleaginous microalgae *Desmodesmus* sp. *NMX451* under nitrogen deficiency and alkaline pH-induced lipid accumulation. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 649-659, 2015.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical engineering journal**, v. 6, n. 2, p. 87-102, 2000.

YEH, Kuei-Ling; CHANG, Jo-Shu. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource technology**, v. 105, p. 120-127, 2012.

ZHAO, Bingtao; SU, Yaxin. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121-132, 2014.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 351-356, 1995.

ZORN, S. M. F. E. **Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas**. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2017.