

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**ESCOLA DE QUÍMICA**

MARIA FERNANDA DOS SANTOS MOTA

**AVALIAÇÃO DE PROCESSOS PARA EXTRAÇÃO DE  
CAROTENOIDES DE UMA PREPARAÇÃO  
COMERCIAL DA MICROALGA *Chlorella* sp.**

Rio de Janeiro

2017

MARIA FERNANDA DOS SANTOS MOTA

“AVALIAÇÃO DE PROCESSOS PARA EXTRAÇÃO DE  
CAROTENOIDES DE UMA PREPARAÇÃO COMERCIAL DA  
MICROALGA *Chlorella* sp.”

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Processos Químicos e  
Bioquímicos, Escola de Química, da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de  
Mestre em Tecnologia de Processos  
Químicos e Bioquímicos.

Orientadores:

Suely Pereira Freitas, DSc.

Elba Pinto da Silva Bon, PhD

Rio de Janeiro 2017

Mota, Maria Fernanda dos Santos.

Extração de carotenoides de uma preparação comercial da microalga *Chlorella* sp./  
Maria Fernanda dos Santos Mota - Rio de Janeiro, 2017.

66f.

Orientadores: Suely Pereira Freitas, DSc.; e Elba Pinto da Silva Bon, PhD

1. Microalgas. 2. Carotenoides. 3. Proteínas. I. Freitas, Suely Pereira (Orient.). II. Bon, Elba Pinto da Silva (Orient.). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. V. Título.

# **Avaliação de processos para extração de carotenoides de uma preparação comercial da microalga *Chlorella* sp.**

*Maria Fernanda dos Santos Mota*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado por:

---

Bernardo dias Ribeiro, D.Sc.

---

Ricardo Sposina Sobral Teixeira, D.Sc.

---

Leda Maria Fortes Gottschalk, D.Sc.

---

Suely Pereira Freitas, D.Sc.

---

Elba Pinto da Silva Bon, PhD.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto de 2017

Aos meus pais, Barbara e Claudio, e à minha irmã,  
Maria Beatriz.

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o sino que ressoa ou como o prato que retine. Ainda que eu tenha o dom de profecia e saiba todos os mistérios e todo o conhecimento, e tenha uma fé capaz de mover montanhas, mas não tiver amor, nada serei. Ainda que eu dê aos pobres tudo o que possuo e entregue o meu corpo para ser queimado, mas se não tiver amor, nada disso me valerá. O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor nunca perece; mas as profecias desaparecerão, as línguas cessarão, o conhecimento passará. Pois em parte conhecemos e em parte profetizamos; quando, porém, vier o que é perfeito, o que é imperfeito desaparecerá. Quando eu era menino, falava como menino, pensava como menino e raciocinava como menino. Quando me tornei homem, deixei para trás as coisas de menino. Agora, pois, vemos apenas um reflexo obscuro, como em espelho; mas, então, veremos face a face. Agora conheço em parte; então, conhecerei plenamente, da mesma forma como sou plenamente conhecido. Assim, permanecem agora estes três: a fé, a esperança e o amor. O maior deles, porém, é o amor.”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Salvador, por estar comigo em todos os momentos, por guiar a minha vida conforme a sua perfeita vontade e por dar sentido a tudo que faço. Obrigada por me guiar na verdade e por me dar a força que preciso nos momentos difíceis.

À Professora Suely P. Freitas por toda a atenção, dedicação e ajuda durante o meu mestrado, muito obrigada por me orientar em todas as minhas dúvidas, pelo conhecimento que me passou e por tantas conversas agradáveis.

À Professora Elba P. S. Bon pela orientação e pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório desde a iniciação científica, muito obrigada por toda atenção e pela oportunidade de atuar em diferentes áreas de pesquisa.

Ao Professor Marcoaurélio A. Rodrigues que foi meu orientador na iniciação científica e me passou preciosos ensinamentos sobre microalgas tanto na parte teórica quanto experimental.

Ao Professor Joaquim F. M. da Silva por toda atenção, pelo treinamento no reator de micro-ondas e por ter cedido o aparelho e o laboratório para os experimentos.

Ao Professor Bernardo Dias pela ajuda com a parte de análise dos carotenoides e por ter cedido uma enzima comercial, muito obrigada por toda a atenção.

Aos amigos do Laboratório, pela ajuda tanto na parte teórica quanto na parte experimental e pelo agradável ambiente de trabalho. Agradeço em especial à Marcella F. Souza por todos os conhecimentos passados e por ter ajudado na minha formação profissional desde a iniciação científica; e à Thais (Thaty), Christina e Alexandra pela ajuda na elaboração do trabalho, muito obrigada por sempre se disporem a me ajudar na parte experimental e na análise dos resultados.

Aos meus amigos de graduação e mestrado, por tornarem a Escola de Química um ambiente alegre e bem mais acolhedor.

À família IBA, obrigada pela amizade, pelas risadas, pelos momentos de desabafo, por fazerem parte da minha vida e por tornarem as minhas sextas-feiras sempre muito especiais. Agradeço em especial: Mari, Rapha, Nichole, Renata, Karen, Karine, Aninha, Lelê, Nandy e Junior. Vocês estão eternamente em meu coração e nas minhas orações.

Às minhas avós Haydee e Cordeli, que apesar de não estarem mais presentes em vida, estão eternamente presentes na minha memória e no meu coração. Não existem palavras para expressar a saudade que sinto de vocês.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo suporte, incentivo e amor incondicional. Muito obrigada por sempre me apoiarem, não tenho palavras para descrever o quanto sou grata a Deus pela família maravilhosa que tenho. Amo vocês!

## RESUMO

Título: Avaliação de processos para extração de carotenoides de uma preparação comercial da microalga *Chlorella* sp.

Autor: Maria Fernanda dos Santos Mota

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Pereira Freitas e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elba Pinto da Silva Bon.

As microalgas possuem uma composição química diversificada e podem se tornar fonte de ingredientes nutricionais como lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos bioativos tais como carotenoides e clorofilas e de minerais para aplicações na indústria de produtos naturais, alimentícia e farmacêutica. As microalgas têm sido também avaliadas como fonte de energia renovável tanto para produção de bioetanol quanto de biodiesel. Dessa forma, a utilização da biomassa algal vai ao encontro do conceito de biorrefinaria, no qual a biomassa deve ser utilizada para produção de energia e de novos ingredientes que possam substituir, no futuro, as matérias primas utilizadas no setor petroquímico. A produção de ingredientes funcionais e de energia a partir das microalgas é mais vantajosa quando comparada ao uso de vegetais superiores, pois a biomassa algal apresenta maior taxa de crescimento, não está sujeita a sazonalidade e requer um menor espaço para sua produção. O maior impacto econômico para o uso de microalgas no setor industrial se deve aos processos de separação da biomassa, ruptura da parede celular, fracionamento e purificação dos extratos. O processo de ruptura da parede celular, visando aumentar a difusão dos compostos de interesse para o meio extrator, pode ser ou não simultâneo à sua extração. O presente trabalho propõe um rota sustentável para o processamento da biomassa da microalga *Chlorella* sp. visando a extração de compostos bioativos e em particular dos carotenoides e de hidrolisados de proteína. Neste estudo a ruptura celular foi avaliada utilizando-se os métodos físicos micro-ondas e moinho de bola vibratório e as extrações foram realizadas com etanol e soluções hidroetanólicas. A biomassa residual, nas melhores condições operacionais de extração, foi submetida à hidrólise com protease visando à obtenção de um extrato aquoso rico em peptídeos solúveis. No extrato etanólico obtido com a microalga pré-tratada em moinho de bola e incubada em etanol 99,99 °GL obteve-se um teor de carotenoides até duas vezes maior ao obtido com o uso de micro-ondas, em condições otimizadas. O uso de etanol puro como solvente promoveu a maior recuperação de carotenoides totais.. A hidrólise enzimática com proteases da biomassa residual deste processo gerou um extrato aquoso com  $53 \pm 2$  g.L<sup>-1</sup> de proteínas e peptídeos solúveis, valor quase nove vezes superior ao extrato obtido sem a adição de proteases, de  $6,1 \pm 0,5$  g.L<sup>-1</sup>. As condições de proteólise com a preparação comercial ProteaseMax<sup>TM</sup> (1% de enzima por grama de proteína e incubação por 3 horas) resultaram em um rendimento de extração de  $79 \pm 3\%$ . Os resultados deste trabalho indicam que, pela sua efetividade, o uso do moinho de bola vibratório para o pré-tratamento da preparação comercial da microalga *Chlorella* sp. aumenta o seu potencial como fonte de compostos bioativos de interesse industrial.



## ABSTRACT

Title: Evaluation of processes for extracting carotenoids from a commercial preparation of the microalga *Chlorella* sp.

Author: Maria Fernanda dos Santos Mota

Supervisors: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Pereira Freitas and Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elba Pinto da Silva Bon.

Microalgae have a diverse chemical composition, and can be a source of nutritional ingredients such as lipids, proteins and carbohydrates, bioactive pigments such as carotenoids and chlorophylls and minerals for applications in the natural products, food and pharmaceutical industry. As microalgae it has also been evaluated as a potential source of renewable energy for both bioethanol and biodiesel production. Thus, the use of algal biomass meets the concept of biorefinery, in which biomass should be used for applications in different industrial sectors, in particular for energy and new ingredients production to replace, in the future, petrochemical feedstocks. The obtention of ingredients and energy from microalgae have additional advantages as compared to the use of higher plants, as an algal biomass presents higher growth rates, is not subject to seasonality and requires a smaller space for its production. The greatest economic impact for the use of microalgae in the industrial sector is due to the biomass harvesting process, cell wall rupturing, fractionation and purification of the extract. The cell wall disruption process, aiming to increase the diffusion of the compounds of interest to the extracting medium, may or may not be simultaneous to their extraction. The present work studied a sustainable route for the processing of the microalga *Chlorella* sp. aiming the extraction of bioactive compounds in particular carotenoids and water soluble proteins. For this study two methods of cell rupture were evaluated: microwave or vibratory ball mill. In both, the extractions were conducted using ethanol or hydroethanolic solutions as solvents. The residual biomass, under the best operational conditions of extraction, was submitted to hydrolysis with protease aiming to obtain an aqueous extract rich in soluble peptides. In the ethanolic extract (obtained with the microalga pre-treated in ball mill and incubated in ethanol 99.99 ° GL) a carotenoid content of up to two times greater than the one obtained with the aid of microwaves was obtained. The use of pure ethanol as solvent was the condition that promoted the highest recovery of total carotenoids. Enzymatic hydrolysis with proteases of the residual biomass generated an aqueous extract with  $53 \pm 2 \text{ g.L}^{-1}$  of proteins and soluble peptides, which was over eight-fold higher than that observed without the enzymatic hydrolysis, of  $6.1 \pm 0.5 \text{ g.L}^{-1}$  of soluble proteins. The proteolysis experimental conditions using the preparation ProteaseMax<sup>TM</sup> (1% enzyme / g of protein and 3 hours incubation) resulted in an extraction yield of  $79 \pm 3\%$ . The results indicated that pretreatment of the cell wall with the use of ball milling increases the potential of the microalga *Chlorella* sp. as a source of proteins and bioactive compounds.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Produção de <i>Dunaliella salina</i> na lagoa Hutt, Austrália. Fonte: BEAM, An Australian Research Network. ....	7
Figura 2 - Produção de <i>Chlorella</i> na Ilha de Ishigaki, Japão. Fonte: Yaeyama Shokusan Co., Ltd. ....	8
Figura 3 - Produção de <i>Spirulina</i> no Havaí. Fonte: Cyanotech Co. ....	8
Figura 4 - Produção de <i>Haematococcus pluvialis</i> no deserto de Negev em Israel. Fonte:Alga Technologies. ....	10
Figura 5 - Estrutura de alguns carotenoides encontrados em microalgas. Fonte: Adaptado de DUFOSSÉ <i>et al.</i> ,2005. ....	16
Figura 6 - Clivagem do $\beta$ -caroteno. Fonte: Adaptado de AMBRÓSIO <i>et al.</i> (2006).....	20
Figura 7 - Imagem de microscopia ótica da microalga <i>Chlorella</i> sp. presente no preparado comercial (aumento de 400 x). Fonte: Própria autora. ....	34
Figura 8 - Micro-ondas MARS 6 da CEM Corporation em funcionamento. ....	38
Figura 9 – Gráfico de pareto do planejamento DCCR realizado a 40°C. ....	43
Figura 10 - Superfície de contorno do DCCR a 40 °C. ....	44
Figura 11 - Gráfico de pareto obtido a partir do planejamento DCCR conduzido a 50°C. ....	45
Figura 12 - Extrato seco obtido na extração etanólica com a microalga: a) não moída; b) moída. ....	46
Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da microalga não moída (a direita) e da microalga moída (a esquerda). ....	47
Figura 14 - Extrato rico em carotenoide obtido após extração da biomassa com etanol: a) em solução; b) seco. ....	51
Figura 15 - Diagrama de blocos do processamento da microalga <i>Chlorella</i> sp. ....	52

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Equações para determinação do teor de clorofila e carotenoides. ....	35
Tabela 2 – Níveis estudados para as variáveis independentes do DCCR. ....	38
Tabela 3 - Composição de açúcares presentes em hidrolisados ácidos da biomassa da preparação comercial de <i>Chlorella</i> sp.....	42
Tabela 4 - Resultados obtidos a partir do planejamento DCCR realizado no reator de micro-ondas a 40 °C.....	43
Tabela 5 - Resultados do planejamento realizado no reator de micro-ondas a 50 °C. ...	45
Tabela 6 - Resultados do experimento em agitador orbital com a microalga moída e não moída.....	46
Tabela 7 - Resultados de teor de carotenoides obtidos em agitador orbital com a microalga moída. ....	48
Tabela 8 - Teor de carotenoides, de extrato lipídico e de clorofila extraída em agitador orbital na temperatura de 30 °C.....	49
Tabela 9 - Caracterização do extrato etanólico obtido nos diferentes estágios de extração. ....	50

## Lista de Quadros

Quadro 1 - Composição de aminoácidos da microalga <i>Chlorella</i> em comparação com a do ovo e da soja expressa grama em 100 g de proteínas.....	14
Quadro 2 – Exemplos de fontes produtoras e principais carotenoides .....	22
Quadro 3- Características dos diferentes métodos de ruptura celular .....	26

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1	Microalgas.....	4
3.2	Sistemas de cultivo de microalgas.....	6
3.2.1	Sistemas abertos.....	6
3.2.2	Sistemas fechados.....	9
3.2.3	Sistemas híbridos.....	10
3.3	Métodos para colheita das microalgas.....	11
3.4	Aplicação comercial das microalgas.....	12
3.5	Microalga <i>Chlorella</i> .....	13
3.6	Carotenoides.....	16
3.7	Mercado de carotenoides.....	18
3.8	Aplicações dos carotenoides.....	19
3.8.1	Em alimentos e ração.....	19
3.8.2	Na saúde humana.....	20
3.9	Obtenção dos carotenoides.....	21
3.9.1	Por via química.....	21
3.9.2	Obtenção dos carotenoides por via biotecnológica.....	21
3.10	Fatores que influenciam na bioprodução de carotenoides por microalgas.....	22
3.10.1	Temperatura.....	23
3.10.2	Intensidade luminosa.....	23
3.10.3	Concentração de nutrientes.....	24
3.10.4	Salinidade.....	25
3.11	Extração de carotenoides.....	25
3.12	Ruptura celular.....	26

3.12.1	Homogeneização a alta pressão .....	26
3.12.2	Moinho de bolas/moinho de pérolas .....	27
3.12.3	Ultrassom .....	28
3.12.4	Micro-ondas.....	28
3.12.5	Tratamento enzimático.....	29
3.12.6	Tratamento químico .....	29
3.13	Extração.....	30
3.13.1	Extração com solventes orgânicos.....	30
3.13.2	Fluidos supercríticos .....	31
3.14	Microalgas para produção de peptídeos bioativos.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1	Matéria-prima .....	34
4.1	Tratamento em moinho de bola vibratório .....	34
4.2	Métodos analíticos .....	34
4.3	Experimentos em reator de micro-ondas.....	37
4.4	Experimentos em agitador orbital.....	39
4.5	Extração em dois estágios .....	39
4.6	Extração de proteínas .....	39
4.7	Análise Estatística.....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>41</b>
5.1	Caracterização da biomassa .....	41
5.2	Composição em carboidratos da biomassa .....	42
5.3	Experimentos no reator de micro-ondas.....	42
5.4	Experimentos em agitador orbital .....	46
5.5	Biorrefinaria de microalga .....	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARATRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>53</b>

**8 BIBLIOGRAFIA ..... 54**

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos, em sua maioria, unicelulares, fotossintéticos e coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, como a clorofila “a” e os carotenoides. Esses microrganismos podem apresentar alta quantidade de proteínas rica em aminoácidos essenciais, alta concentração de carboidratos e lipídios, além de ser uma excelente fonte de pigmentos com propriedades funcionais, tais como os carotenoides. Quanto comparada aos vegetais superiores, às microalgas apresentam vantagens como: não estar sujeita à sazonalidade, não necessitar de terra aráveis e nem de água potável (SHEEHAN, 2009).

Dessa forma, a biomassa de microalgas pode ter aplicação comercial em setores prioritários em espacial o de saúde humana, alimentação animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e obtenção de compostos de interesse das indústrias de alimentos, química e farmacêutica (MORAIS; COSTA, 2008).

A microalga *Chlorella* sp. pode vir a ser uma fonte promissora de hidrolisados protéicos e compostos bioativos, como os carotenoides. Segundo a ANVISA, os compostos bioativos são aqueles que possuem ação metabólica ou fisiológica específica benéfica á saúde dos seres humanos.

Os carotenoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza que podem ser de coloração vermelha, laranja e amarela. Esses compostos possuem propriedade antioxidante bastante importante para a proteção da célula contra radicais reativos (GROSSMAN *et al.*, 2004). Nas indústrias alimentícia e farmacêutica, são empregados como fonte de provitamina A, antioxidantes, corantes e precursores de aromas.

A *Chlorella* apresenta uma composição de carotenoides rica em luteína, um importante antioxidante reportando por ter efeitos comprovados na prevenção de cataratas e da degeneração macular (HO *et al.*, 2014; LIMÓN *et al.*, 2015). Além da composição dos carotenoides, diversos estudos apontam as propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas dos hidrolisados proteicos derivados dessa microalga, ressaltando a potencial utilização para elaboração de bebidas funcionais com ação hipertensiva (EJIKE *et al.*, 2017).



A produção de carotenoides por microalgas apresentam diversas vantagens em relação aos vegetais superiores e animais, pois estas possuem uma taxa de crescimento mais rápida e requer menor espaço para produção (DERNER *et al.*, 2006; SILVA, 2008 e VALDUGA *et al.*, 2009).

Para viabilizar a extração dos compostos de interesse, a parede celular de microalgas necessita, em geral, ser rompida. A escolha do pré-tratamento adequado depende da espécie de microalga. As técnicas de ruptura celular podem ser aplicadas simultaneamente com a extração, como no caso de micro-ondas e do ultrassom, ou previamente, como no caso da quebra usando o moinho de bolas vibratório, utilizado com sucesso desde a década de 70 para rompimento de parede celular (MILLET; M.A.; BAKER, A.J.; SATTER, L.D., 1976).

A extração dos carotenoides é geralmente realizada por solventes orgânicos, esse método visa gerar um extrato rico em carotenoides que pode ser utilizado em suplementos alimentares antes ou após ser submetido a processos de purificação. Atualmente, a substituição destes solventes tradicionais por solventes renováveis é uma tendência para minimizar os impactos ambientais e aumentar a qualidade dos produtos com potencial bioativo. Dentre os solventes mais favoráveis ambientalmente o etanol se destaca devido ao seu custo e à sua afinidade com carotenoides e com os lipídios de cadeias longas e poli-insaturados, geralmente encontrados em microalgas, sendo capaz de solubilizar tanto os lipídios polares como aqueles não polares com mais alta eficiência que os solventes tradicionais (YANG *et al.*, 2014).

## 2 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma rota tecnológica sustentável para o processamento de uma preparação comercial da microalga *Chlorella* sp., visando aumentar a eficiência de extração de carotenoides e a obtenção de hidrolisados de proteína. A sustentabilidade dos procedimentos experimentais alicerçaram-se no uso de métodos físicos de ruptura da parede celular da microalga, no uso de solventes renováveis para a extração dos carotenoides e na hidrólise enzimática para a obtenção dos hidrolisados proteicos a partir da biomassa residual.

Para alcançar estes objetivos as seguintes atividades foram desenvolvidas:

- Caracterizar a microalga comercial *Chlorella* sp. quanto ao teor de carboidratos, lipídios, proteínas e carotenoides.
- Avaliar a extração assistida em reator de micro-ondas, com soluções de etanol e água em diferentes concentrações, na extração de carotenoides.
- Avaliar o pré-tratamento da biomassa da microalga com moinho de bola na extração de carotenoides e na obtenção de hidrolisados proteicos.
- Analisar a influência da polaridade da mistura etanol água e da temperatura na extração dos carotenoides da microalga.
- Analisar a atividade antioxidante do extrato etanólico rico em carotenoides obtido na melhor condição de extração.
- Conduzir experimentos preliminares para avaliar a efetividade da hidrólise enzimática da biomassa residual com proteases na obtenção de um extrato aquoso rico em proteínas e peptídeos solúveis.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microalgas

As microalgas são microrganismos, em sua maioria, unicelulares, fotossintéticos e coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, como a clorofila e os carotenoides. Esses microrganismos podem ser eucarióticos ou procarióticos e geralmente são encontrados em ambientes aquáticos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1993; OLAIZOLA, 2003). As estruturas celulares e o mecanismo para a fotossíntese nestes organismos são semelhantes ao dos vegetais (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Entretanto, diferente das plantas superiores, as microalgas não necessitam de sistema vascular para transportar nutrientes, absorvendo-os diretamente do meio de cultivo (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1993).

As microalgas 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 (HENRIKSON, 1994). Estima-se a existência de mais de 50.000 espécies de microalgas no mundo, porém somente 30.000 espécies foram identificadas e estudadas. Estas fazem parte de um grupo heterogêneo de microrganismos fotossintetizantes, que tem a capacidade de desenvolver-se rapidamente em condições adversas devido a sua estrutura celular simples (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; RICHMOND, 2004). As microalgas, quando submetidas a condições físicas e químicas específicas, são capazes de produzir grandes quantidades de biocompostos como proteínas, lipídeos e carboidratos. Além de produzirem moléculas bioativas de alto valor agregado como antioxidantes, carotenoides, polissacarídeos, ácidos graxos e vitaminas (COSTA & MORAIS, 2014).

As microalgas também 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  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$ , para obtenção de energia através da fotossíntese. Nesse caso, o crescimento das microalgas é diretamente afetado pela disponibilidade e intensidade luminosa e pela concentração dos nutrientes, como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , fósforo e nitrogênio, necessários para o crescimento celular. Além disto, a disponibilidade e concentração de nutrientes e a

intensidade luminosa também afetam a composição química da microalga. 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 não há a necessidade de luz, as microalgas utilizam compostos orgânicos, como a glicose, como fonte de carbono e energia. O metabolismo mixotrófico é uma união do fotoautotrófico e heterotrófico, havendo necessidade de luz e de uma fonte de carbono orgânico (BRENNAN & OWENDE, 2010). O cultivo de microalgas mixotróficamente e heterotróficamente geralmente resulta em maior produção de biomassa algal, porém, devido à presença de carbono orgânico, são mais propícios a contaminação. Além disso, no cultivo fotoautotrófico as microalgas produzem mais pigmentos devido à necessidade de realizar fotossíntese.

A exploração comercial das microalgas apresentam diversos atrativos, uma vez que as microalgas são capazes de produzir metabólitos com alto valor agregado, como os carotenoides e as proteínas, além de poder apresentar alta concentração lipídica e/ou alta concentração de carboidratos dependendo da espécie e das condições de cultivo (OLAIZOLA, 2000). O seu cultivo não compete com a produção de alimentos, não necessita de terras aráveis e nem de água potável (SHEEHAN, 2009). Além disso, as microalgas podem ser utilizadas para a captura de carbono, podendo reduzir os níveis de CO<sub>2</sub> na atmosfera.

A utilização da biomassa algal vai ao encontro do conceito de biorrefinaria, na qual os bens de consumo e energia são derivados do processamento sustentável de matérias primas renováveis. As microalgas possuem uma composição química bastante rica, podendo ser utilizados para obtenção de produtos de alto valor agregado bem como para produção energia (JONG & JUNGMEIER, 2015; SPOLAORE *et al.*, 2006). Sendo assim, a integração desses processos se torna essencial para a viabilização da produção e redução dos custos dos derivados de microalgas (POWELL & HILL, 2009).

## 3.2 Sistemas de cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos (lagoas), em os sistemas fechados (fotobiorreatores) ou em sistemas híbridos. Nos sistemas abertos a produção de microalgas se dá em ambientes externos, não possibilitando o controle de nenhum parâmetro do meio de cultivo. Os sistemas fechados foram desenvolvidos para solucionar os problemas existentes nos sistemas abertos, porém apresentam um alto custo de construção e manutenção. Os sistemas híbridos empregam tanto os sistemas abertos quanto os fechados, visando aproveitar o melhor dos dois.

### 3.2.1 Sistemas abertos

Os sistemas abertos de produção de microalgas, comumente chamados de lagoas, são os mais utilizados para o cultivo de microalga em larga escala por serem mais econômicos, de mais fácil construção e operação quando comparado com os sistemas fechados. Existem diversos tipos de sistemas abertos para a produção de microalgas que podem ser classificados em: (i) extensivos, onde não há nenhum esforço para o manejo da cultura, como as lagoas abertas simples; (ii) intensivos, onde há algum tipo de manejo para melhorar o crescimento da microalga, como as lagoas circulares, que possuem um braço giratório no centro para agitar a cultura, e as lagoas do tipo raceway (*high rate ponds*), que possuem rodas de pás ou bombas de ar comprimido que mantêm o fluxo e melhoram a transferência de CO<sub>2</sub> para o meio líquido (COPLIN, 2012).

Os principais parâmetros que devem ser levados em consideração no “design” de construção dessas lagoas são: a profundidade e a área superficial. Essas lagoas devem ter a menor profundidade possível para maximizar o aproveitamento da luz solar e, conseqüentemente, a produtividade de biomassa (BENEMANN & OSWALD, 1996). Entretanto, ao contrário da profundidade, a lagoa deve apresentar grande área superficial de modo a aumentar o aproveitamento a luz solar. Por isso, esses sistemas necessitam de grandes áreas planas com baixo custo para tornar a planta economicamente viável. Entretanto, mesmo minimizando a profundidade e maximizando a área superficial, os sistemas abertos esbarram em limitações operacionais, como grandes perdas de CO<sub>2</sub> para a atmosfera, alta variação de temperatura, evaporação e falta de controle da luminosidade. Além disso, nesse tipo de sistema as microalgas ficam muito susceptíveis a contaminação, por isso é preferível o

cultivo de espécies que possuem a habilidade de se desenvolver em ambientes com características seletivas, como alta salinidade ou alto pH, reduzindo a possibilidade de desenvolvimento de organismos contaminantes como protozoários ou outras espécies de microalgas (COPLIN, 2012).

A microalga *Dunaniella salina* é uma das que melhor se adaptaram ao cultivo em larga escala em sistemas abertos, uma vez que possuem tolerância às altas e baixas temperaturas e à alta salinidade. O cultivo da *D. salina* é, geralmente, realizado em áreas ensolaradas e com baixa densidade de nuvens, devido à necessidade de alta incidência luminosa para a uma maior produção de  $\beta$ -caroteno (Figura 1). Atualmente, a produção de *Dunaniella salina* gira em torno de 1.200 t.ano<sup>-1</sup> e o seu cultivo é realizado em escala industrial em regiões da Austrália, Estados Unidos e Israel (EMEISH, 2012; FAO, 2010).



Figura 1 - Produção de *Dunaniella salina* na lagoa Hutt, Austrália. Fonte: BEAM, An Australian Research Network.

Outra microalga cultivada com sucesso em sistemas abertos é a *Chlorella*, essa microalga foi a primeira a ser produzida comercialmente, tendo o seu início na década de 60 no Japão (BENEMANN; OSWALD, 1996). Atualmente, o cultivo de *Chlorella* expandiu para outros países, especialmente no Sudeste Asiático, tendo o Japão e Taiwan como seus maiores produtores. A produção de *Chlorella* cresceu bastante nas últimas décadas, passando de 200 t.ano<sup>-1</sup> nos anos 70 para 1.000 t.ano<sup>-1</sup> nos anos 80 e 2.000 t.ano<sup>-1</sup> nos anos 90 (RICHMOND, 2004). Atualmente, a produção de *Chlorella* está em torno de 5.000 t.ano<sup>-1</sup> e é vendida a um preço de US\$ 20.000 t<sup>-1</sup> (LUNDQUIST *et al.*, 2010). O sistema de produção varia desde fotobiorreatores fechados a sistemas abertos como lagoas circulares, sistema mais tradicional (Figura 2).



Figura 2 - Produção de *Chlorella* na Ilha de Ishigaki, Japão. Fonte: Yaeyama Shokusan Co., Ltd.

A *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) é outra microalga produzida em larga escala, seu cultivo teve início na década de 70 e tem os Estados Unidos e a Ásia como seus principais produtores. Atualmente, com o crescimento de plantas industriais de *Spirulina* na China e na Índia, a produção passou de cerca de 1.000 t.ano<sup>-1</sup> nos anos 90 para 5.000 t.ano<sup>-1</sup>, com preço da tonelada girando em torno de US\$ 10.000 (LUNDQUIST *et al.*, 2010), sua produção é comumente realizada em *raceway*.



Figura 3 - Produção de *Spirulina* no Haváí. Fonte: Cyanotech Co.

### 3.2.2 Sistemas fechados

Os sistemas fechados de cultivo de microalgas, comumente chamado de fotobiorreatores, foram criados com a intenção solucionar os problemas existentes nas lagoas abertas. Esse tipo de cultivo pode ser realizado em ambientes externos ou internos, onde se pode controlar a intensidade luminosa e o fotoperíodo.

Diversos critérios devem ser levados em consideração no projeto de um fotobiorreator, dentre os quais podemos destacar: configuração, geometria, a razão superfície-volume; a orientação e inclinação; presença de dispositivos para mistura e troca gasosa, de sistema de limpeza, de controle de pH, temperatura e intensidade luminosa, transparência e durabilidade do material de construção, a estabilidade e confiabilidade do sistema e os custos envolvidos para a sua construção e operação (RICHMOND, 2004; BEHRENS, 2005).

A relação superfície-volume está diretamente relacionada com a absorção de luz e com a produtividade das microalgas, quanto maior a razão superfície-volume, geralmente maiores concentrações celulares são obtidas, reduzindo os custos de colheita. A mistura ou circulação da cultura é essencial para promover uma eficiente troca gasosa no sistema de cultivo. É importante que seja fornecido  $\text{CO}_2$ , para permitir a realização da fotossíntese, e retirado  $\text{O}_2$ , para evitar a fotooxidação e o aumento da taxa de respiração, parâmetros que prejudicam a produtividade. Além disso, a homogeneização é fundamental para evitar a sedimentação e/ou acúmulo das células nas paredes, promover uma distribuição eficiente dos nutrientes, garantir que as células sejam submetidas a períodos adequados de claro e escuro e para garantir uma temperatura e um valor de pH uniforme em todo o reator. Porém, altas taxa de mistura e aeração provocam alta turbulência e estresse de cisalhamento, o que pode danificar as células (BEHRENS, 2005; RICHMOND, 2004).

Os fotobiorreatores permitem o controle de praticamente todas as variáveis de cultivo, como temperatura e pH; reduzem os riscos de contaminação, possibilitando obter cultivos com alto grau de pureza; e praticamente eliminam a evaporação e a perda de  $\text{CO}_2$ , permitindo um maior controle das trocas gasosas através da injeção de ar atmosférico ou dióxido de carbono e a remoção de oxigênio do cultivo. Além disso, esse tipo de sistema geralmente ocupa um menor espaço, apresenta maior facilidade na



colheita de biomassa e um maior rendimento de biomassa por unidade de área e volume em relação aos sistemas abertos (PULZ, 2001).

Os fotobiorreatores tubulares e os em placas são os mais utilizados (COPLIN, 2012), porém existem inúmeras pesquisas relacionadas ao design e às configurações dos fotobiorreatores, visando aumentar a produtividade de biomassa e reduzir os custos do processo. Os materiais de construção podem ser rígidos, como o vidro, ou flexíveis, como sacos plásticos.

Entretanto, apesar de apresentarem diversas vantagens em relação aos sistemas abertos, não são muito utilizados industrialmente devido ao alto custo de construção e operação, tendo sua utilização restrita a microalgas que não se adaptam aos sistemas abertos, tal como a *Haematococcus pluvialis*. Essa microalga requer meios neutros e com baixa salinidade para se desenvolver, necessitando de um cultivo altamente controlado. Sendo assim, os sistemas abertos não são indicados para o cultivo de *Haematococcus pluvialis*, apresentando alta probabilidade de contaminação. Os principais sistemas de produção são fotobiorreatores fechado e os sistemas híbridos (Figura 4).



Figura 4 - Produção de *Haematococcus pluvialis* no deserto de Negev em Israel.

Fonte:Alga Technologies.

### 3.2.3 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos combinam tanto os sistemas abertos quanto os fechados para o cultivo de microalgas, visando maximizar as vantagens e minimizar as desvantagens de ambos os sistemas. A operação dos sistemas híbridos ocorre em duas fases. A primeira fase consiste em cultivar a biomassa de forma controlada em

fotobiorreatores com um meio de cultura rico em nutrientes. Na segunda etapa, a biomassa produzida na primeira fase é cultivada em lagoas abertas, como o *raceway*, sob estresse ambiental, como alta luminosidade, deficiência de nitrogênio e alta salinidade. Dessa forma, é possível obter uma maior produtividade de biomassa e maior biossíntese do produto de interesse.

Esse sistema de cultivo foi desenvolvido para o cultivo de *Haematococcus pluvialis* (HUNTLEY & REDALJE, 2007). Essa microalga já havia sido cultivada sem sucesso em lagoas abertas, entretanto o seu cultivo em sistema híbrido permitiu uma produção contínua e ininterrupta por anos. Os autores explicam que o motivo do sucesso do cultivo é devido à redução do tempo de permanência em lagoas abertas, onde as culturas são suscetíveis à contaminação. Tal fato só pode ser atingido através do fornecimento contínuo de inóculo não contaminado em grande volume, o que requer a produção inicial em fotobiorreatores em escala industrial. Os seja, como a primeira fase consiste do cultivo é realizada em fotobiorreatores, a concentração de microalgas no meio de cultivo é alta, permitindo uma rápida colonização e dominância nos *raceway*, minimizando os riscos de contaminação.

### **3.3 Métodos para colheita das microalgas**

A etapa de recuperação da microalga representa cerca de 20 a 30% do custo total da produção da biomassa (GUDIN e THERPENIER, 1986; DAVIS *et al.*, 2011) e, por isso, é considerada uma etapa crucial para a viabilidade do processo. Os principais métodos para a recuperação das microalgas são: centrifugação, floculação, coagulação e filtração. A escolha do método ideal para a colheita de microalgas depende do tamanho da espécie, da concentração atingida no sistema de produção, do produto desejado e dos gastos de energia envolvidos. A recuperação da microalga geralmente envolve duas etapas, a primeira etapa visa separar a biomassa do restante do meio de cultura, enquanto a segunda etapa consiste em aumentar a concentração da microalga no lodo obtido na primeira etapa, etapa que envolve um maior gasto energético.

A floculação geralmente é empregada na primeira etapa de colheita da microalga, consistindo na adição de floculantes químicos, como cloreto férrico e sulfato férrico. Esses floculantes promovem a agregação das microalgas em “flocos” de maior massa que decantam mais rapidamente, aumentando a eficiência da segunda etapa de

colheita (ELMALEH *et al.*, 1991). A coagulação tem a mesma finalidade da floculação, entretanto a agregação das microalgas ocorre por ajustes de pH e adição de eletrólitos.

A centrifugação e a filtração são geralmente aplicadas na segunda etapa de recuperação da biomassa. A centrifugação é um método bastante eficiente e rápido para separar a biomassa da água, porém possui alto consumo de energia. A filtração é mais indicada para microalgas relativamente grandes, pois microalgas com diâmetros muito pequenos necessitam de membranas com poros também muito pequenos, que são mais caras, e necessitam de alta pressão para promover o escoamento, tornando essa etapa lenta e de alto custo.

### **3.4 Aplicação comercial das 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, com a microalga *Chlorella*, o cultivo de microalgas em grande escala foi realizado para fins comerciais. 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).

A principal aplicação comercial das microalgas consiste na produção de biomassa com alta concentração de proteínas e de compostos nutracêuticos para a suplementação alimentar. As principais espécies cultivadas para esse fim são: *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* e *Haematococcus*.

A *Chlorella* é utilizada principalmente como suplemento alimentar para humanos e como alimento para a maricultura. A principal importância da suplementação alimentar com *Chlorella* é devido à sua alta concentração de proteínas, aminoácidos e pigmentos, como a clorofila e carotenoides. Estudos apontam que a biomassa da *Chlorella* pode auxiliar no emagrecimento, na diminuição dos níveis de colesterol, no controle da pressão arterial e na atividade antitumoral (OKUDO *et al.*, 1975, MIYAZAWA *et al.*, 1988, MERCHANT *et al.*, 2002).

A *Spirulina* também é uma microalga é utilizada como suplementação alimentar devido ao seu alto conteúdo proteico. Atualmente, muitos estudos apontam que a *Spirulina* apresenta 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; KURMAN *et al.*, 2009).

O cultivo de *Dunaliella salina* em larga escala visa à produção de  $\beta$ -caroteno, uma vez que essa microalga acumula alto conteúdo de 9-cis  $\beta$ -caroteno podendo 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 (US\$ 100.000 t<sup>-1</sup>) (LUNDQUIST *et al.*, 2010).

### **3.5 Microalga *Chlorella***

A microalga *Chlorella* é uma das microalgas mais estudadas e comercializadas atualmente, essa microalga é esférica e microscópica com diâmetro de 2-10  $\mu$ m e não possui flagelo. Esse microrganismo se reproduz assexuadamente por autosporeação, dessa forma quatro células filhas com parede celular individualizada se formam dentro da parede celular da célula mãe que se rompe permitindo a liberação das células filhas (YAMAMOTO *et al.*, 2004).

A biomassa de *Chlorella* geralmente apresenta alta quantidade de proteínas (40 - 60% em base seca) que são em grande parte constituídas por aminoácidos essenciais, com um perfil adequado à nutrição humana o que faz dessa biomassa uma ótima fonte de suplemento proteico (SAFI *et al.*, 2014). No quadro 1 apresenta-se a composição de aminoácidos essenciais e não essenciais em diferentes alimentos convencionais e em microalgas.

Quadro 1 - Composição de aminoácidos da microalga *Chlorella* em comparação com a do ovo e da soja expressa grama em 100 g de proteínas.

Aminoácido	<i>C. vulgaris</i>	Recomendado pela FAO/WHO	Ovo	Soja
Ácido aspártico	10,94	N/A	11,00	1,30
Treonina	6,09	4,00	5,00	4,00
Serina	7,77	N/A	6,90	5,80
Ácido Glutâmico	9,08	N/A	12,60	19,00
Glicina	8,60	N/A	4,20	4,50
Alanina	10,90	N/A	n.d	5,00
Cisteína	0,19	3,50	2,30	1,90
Valina	3,09	5,00	7,20	5,30
Metionina	0,65	N/A	3,20	1,30
Isoleucina	0,09	4,00	6,60	5,30
Leucina	7,49	7,00	7,00	7,70
Tirosina	8,44	6,00	4,20	3,20
Fenilalanina	5,81	N/A	5,80	5,00
Histidina	1,25	N/A	2,40	2,60
Lisina	6,83	5,50	5,30	6,40
Arginina	7,38	N/A	6,20	7,40
Triptofano	2,21	1,00	1,70	1,40
Ornitina	0,13	N/A	n.d	n.d
Prolina	2,97	N/A	4,20	5,30

n.d.: não detectável; N/A: não disponível; FAO: Food and Agricultural Organisation; WHO: World Health Organisation. Fonte: adaptado de SAFI *et al.*, (2014).

Por esse quadro pode-se observar que a biomassa de *Chlorella* contém proteínas ricas em aminoácidos essenciais e não essenciais caracterizando-se como uma biomassa

tão rica quanto o ovo e a soja, além de ter um perfil conforme o recomendado pela FAO e pela WHO.

Além de proteínas, essa microalga também pode acumular amido ou lipídios como reserva energética. Geralmente, quando há alguma condição de crescimento desfavorável, como limitação de nutrientes e/ou excesso de luz/temperatura, por exemplo, há uma competição entre a síntese de lipídios e carboidratos, ocorrendo, primeiramente, a biossíntese de carboidratos de reserva e, posteriormente, a de lipídios como compostos de reserva de longo prazo (SIAUT *et al.*, 2011). Sendo assim, há uma alta correlação entre a quantidade e o tipo de compostos de reserva com a duração do período de stress (HO *et al.*, 2011). O carboidrato de reserva dessa microalga é o amido, uma vez que a *Chlorella* não apresenta quantidade significativa de celulose (SOUZA *et al.*, 2017).

A biomassa de *Chlorella* pode atingir de 5-58% de lipídios por peso seco, a quantidade de lipídios vai variar de acordo com a condição de cultivo aplicada, sendo maior em condições de estresse (MATA *et al.*, 2010). Nas microalgas os ácidos graxos mais comuns possuem entre 16-18 átomos de carbono e podem ser tanto saturados quanto insaturados. Os lipídios podem ser classificados como polares, como os fosfolipídios e glicolipídios, e apolares, como os mono-, di- e triacilgliceróis (AZEVEDO, 2012). A composição dos ácidos graxos da *Chlorella* é variável de acordo com a condição de cultivo, de modo geral ácidos graxos mais saturados são mais indicados para a produção de biodiesel, enquanto que ácidos graxos mais insaturados possuem importância nutricional e devem ser consumidos na dieta de seres humanos (LEMAHIEU *et al.*, 2013).

A biomassa de *Chlorella* também apresenta uma importante quantidade de pigmentos como carotenoides e clorofila, sendo a clorofila o pigmento mais abundante podendo atingir de 1-2% por peso seco. Essa micgroalga também apresenta grande potencial para a extração de carotenoides, sendo reportada por produzir considerável quantidade de luteína,  $\beta$ -caroteno, astaxantina, cantaxantina e violaxantina. (GONZALEZ & BASHAN, 2000; LEBSKY *et al.*, 2001; DE-BASHAN, 2002; MENDES *et al.*, 2003; KITADA *et al.*, 2008; CHA *et al.*, 2010; CHACÓN-LEE & GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010; SINGH & GU, 2010; KONG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012).

Dentre os carotenoides presente na biomassa da *Chlorella* a luteína é o de maior interesse como ingrediente funcional. . Esse carotenoide é um importante antioxidante e se destaca por ter efeitos comprovados na prevenção de cataratas e da degeneração macular, além disso existem estudos que relatam na atividade desse carotenoide na prevenção de doenças cardiovasculares (HO *et al.* ,2014; LIMÓN *et al.*, 2015). A luteína é produzida comercialmente a partir do calêndula, mas o teor de luteína das flores de calêndula é muito baixo, de 0,03% (peso seco). Sendo assim, a produção de luteína a partir de microalgas pode se tornar uma alternativa economicamente competitiva para a obtenção desse composto (HO *et al.* ,2014; LIMÓN *et al.*, 2015).

### 3.6 Carotenoides

Carotenoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza que podem ser de coloração vermelha, laranja e amarela. Esses compostos são de natureza lipofílica e possuem uma estrutura básica comum de 40 carbonos que é formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente (Figura 5). Estima-se que existam 600 diferentes carotenoides na natureza que derivam dessa estrutura básica através de modificações químicas como extensão ou encurtamento de cadeia, hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de duplas ligações, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou combinação desses e de outros processos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; GONG, BASSI, 2016; UENOJO, MARÓSTICA JUNIOR & PASTORE, 2007).

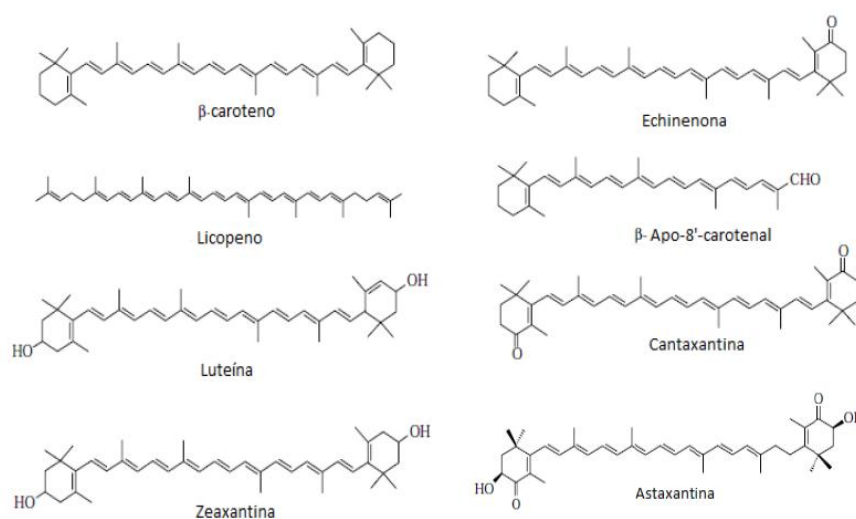


Figura 5 - Estrutura de alguns carotenoides encontrados em microalgas.  
Fonte: Adaptado de DUFOSSÉ *et al.*,2005.

Os carotenoides podem ser divididos em dois grupos: carotenos, compostos apenas por carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos), e as xantofilas, que são sintetizadas a partir dos carotenos por meio de reações de hidroxilação e epoxidação e apresentam moléculas de oxigênio como grupos funcionais (AMBRÓSIO; CAMPOS, FARO, 2006; BARBOSA, 2010).

A maioria dos carotenoides encontra-se localizados nas membranas tilacoides e estima-se que menos de 30 deles desempenhem papéis importantes na fotossíntese (VARELA *et al.*, 2015; NISAR *et al.*, 2015). Os carotenoides primários são componentes estruturais e funcionais do aparelho fotossintético celular, sendo essenciais para a sobrevivência. Alguns carotenoides primários, como a luteína, servem como pigmentos acessórios que podem transferir energia absorvida para as clorofilas, expandindo assim o espectro de absorção de luz de algas ou plantas (YE *et al.*, 2008). Carotenoides secundários como astaxantina e cantaxantina desempenham um papel nos mecanismos de proteção celular. Esse tipo de carotenoides é produzido por microalgas em grandes níveis, após exposição a estímulos ambientais específicos, e são dispensados em gotículas oleosas, tendo como função formar uma camada protetora quando as células são expostas a condições de estresse, fornecendo a cor característica rosa / vermelho de algumas algas estressadas (BEGUM *et al.*, 2015, WANG *et al.*, 2015).

Devido a sua propriedade antioxidante, os carotenoides são sensíveis à luz, oxigênio e aquecimento, dificultando a sua manipulação e armazenamento (GONG & BASSI, 2016). Essa propriedade constitui a base para sua ação protetora contra o estresse oxidativo e protege a célula de radicais reativos, prevenindo a peroxidação lipídica e promovendo a estabilidade e funcionalidade do aparelho fotossintético (GROSSMAN *et al.*, 2004). Os carotenoides também promovem a integridade das membranas, que é essencial para a sobrevivência celular; melhoram a fluidez da membrana celular em condições de elevada temperatura ou luz elevada (CAMEJO *et al.*, 2006); auxiliam na estabilização em baixa temperatura também quando os lipídeos se tornaram mais insaturados (RAMEL *et al.*, 2012); contribuem para estabilizar a estrutura e auxiliar o funcionamento dos complexos fotossintéticos, as espécies reativas de oxigênio e dissipando o excesso de energia.



### 3.7 Mercado de carotenoides

Na indústria de alimentos e na aquicultura, a utilização de corantes se tornou indispensável na conquista de mercado, garantindo um aumento da aceitação e do aspecto do produto, além de acarretar em um maior valor de mercado. A manutenção da cor natural do produto é considerada essencial, tornando a utilização de corantes uma ferramenta muito importante para essas indústrias, pois existem alterações na cor natural de alimentos depois do armazenamento e, principalmente, no processamento quando são expostos a altas temperaturas e variações no nível de acidez (PRADO & GODOY, 2003; SATO *et al.*, 1992). Na aquicultura a adição de pigmentos é bastante utilizada na criação de salmões, trutas e crustáceos, uma vez que esses organismos não são produtores de carotenoides, necessitando da adição de pigmentos à sua alimentação para viabilizar sua incorporação e deposição na carne, conferindo a coloração característica da espécie e aumentando sua aceitação e valor de mercado (TORRISEN, 2005).

Os corantes utilizados na indústria de alimentos podem ser de origem natural, como os carotenoides, ou artificial. A adição de corantes artificiais é assunto bastante polêmico, uma vez que sua utilização não confere valor nutricional, sendo utilizada apenas para melhorar a aparência dos alimentos (PRADO & GODOY, 2003). Já os carotenoides fornecem coloração aos alimentos e vantagens nutricionais, uma vez que há evidências de que alguns carotenoides desempenham papéis importantes nos seres humanos e que sua ingestão adequada previne doenças degenerativas (ASTORG, 1997; DEMMING-ADAMS & ADAMS 2002; KRINSKY & JOHNSON 2005).

Atualmente, observa-se uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e a implementação de dietas mais saudáveis, tal fato tem acarretado no aumento do mercado dos carotenoides. Atualmente os carotenoides têm sido muito empregados como pigmentos para produtos alimentares, cosméticos, suplementos vitamínicos e como aditivos para aves, gado, peixes e crustáceos. De acordo com um relatório recente da Business Communications (BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, 2015), mercado global de carotenoides totalizou US \$ 1,5 bilhão em 2014 e estima-se que deverá atingir perto de US \$ 1,8 bilhão em 2019, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 3,9 %.

A América do Norte e a Europa juntos representam mais de 65% da participação no mercado mundial de carotenoides. Entretanto, estima-se um crescimento nos países

da Ásia-Pacífico a uma CAGR 4,9 % nos próximos seis anos (ABNewswire, 2017). Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio (MDIC), grande parte dos carotenoides comercializados nos últimos anos no Brasil foram provenientes de importação.

O mercado global de carotenoides é altamente consolidado, com a DSM e a BASF representando 55 % do mercado. Entretanto, o número de produtores de carotenoides sintéticos e derivados de algas aumentou acentuadamente, e, além disso, os principais produtores internacionais no mercado de carotenoides estão sendo ameaçados por importações mais baratas da China e da Índia (ABNewswire, 2017).

Atualmente os carotenoides sintéticos dominam o mercado global, representando 70 % do mercado em 2014, esses produtos são menos caros e requerem menos trabalho quando comparados aos naturais. Entretanto, o mercado de carotenoides naturais tem crescido muito atualmente (ABNewswire, 2017).

O  $\beta$ -caroteno é o carotenoide mais produzido, seguido da luteína e da astaxantina. Astaxantina é o principal pigmento utilizado na aquicultura, especialmente na criação de salmões, truta e crustáceo, esse pigmento foi avaliado em US\$ 369 milhões em 2014 e estima-se obter um valor de US\$ 423 milhões em 2019, aumentando a uma CAGR de 2,3 % (BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, 2015). A luteína, por sua vez, é um carotenoide com potencial antioxidante e bastante recomendado para uma dieta saudável. Em 2015 o mercado da luteína foi de US \$ 135 milhões e estima-se que esse valor cresça consideravelmente até 2024, uma vez que esse pigmento tem importante aplicação na saúde ocular (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016).

### **3.8 Aplicações dos carotenoides**

#### **3.8.1 Em alimentos e ração**

Os carotenoides são amplamente utilizados na indústria de alimentos e na alimentação animal devido a sua propriedade de pigmentação. A coloração característica de salmão e outros pescados é devido à presença de carotenoides como a astaxantina, absorvida pela ingestão de zooplâncton e crustáceos. Na produção em cativeiro, é necessário adicionar esse carotenoide a alimentação dos pescados para aumentar o valor nutricional do produto (GHIGGI, 2007).

A maioria das reações de oxidação em alimentos provocam perdas nutricionais, como degradação de vitaminas e proteínas, e de coloração (FENNEMA, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Sendo assim, os carotenoides são utilizados em alimentos para repor a cor perdida durante o processamento, colorir alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Além disso, devido a sua ação antioxidante, os carotenoides podem inibir reações de oxidação aumentando a vida de prateleira dos alimentos. Outra vantagem dos carotenoides é que eles não são afetados pela presença de ácido ascórbico, frequentemente usado como acidulante para restringir o crescimento microbiano não desejado (GUEDES, 2011). Existem corantes sintéticos para alimentos que são permitidos pela legislação, entretanto a sua utilização tem diminuído devido a suspeita de serem carcinogênicos e de alegações de toxicidade hepática e renal (EL-BAKY *et al.*, 2003).

### 3.8.2 Na saúde humana

Carotenoides que possuem estrutura cíclica e anel  $\beta$  apresentam atividade como precursores de vitamina A. Dentre os carotenoides que possuem essa propriedade, o  $\beta$ -caroteno é o que possui mais atividade, uma vez que pode ser clivado enzimaticamente gerando duas moléculas de retinol (Figura 6) (RIBEIRO *et al.*, 2011). A vitamina A tem um papel importante relacionado às funções visuais, à integridade epitelial e ao funcionamento do sistema imunológico. A hipovitaminose A tem como consequências frequentes a xerofthalmia (deficiência na produção de lágrimas) e a cegueira, particularmente em crianças. A deficiência de vitamina A é um dos maiores problemas nutricionais em regiões menos desenvolvidas do mundo, sendo configurada como um problema de saúde pública nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2011; QUEIROZ, 2013).

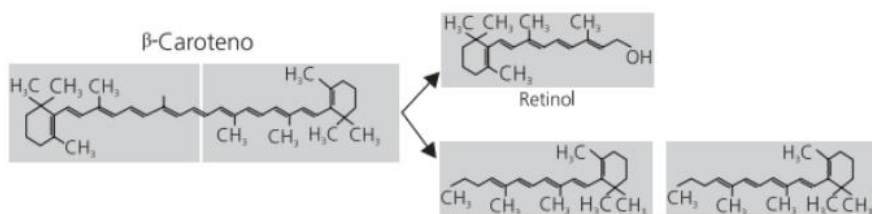


Figura 6 - Clivagem do  $\beta$ -caroteno. Fonte: Adaptado de AMBRÓSIO *et al.* (2006).

Os carotenoides são moléculas com capacidade antioxidante, a ingestão tipo de molécula é considerada benéfica para a saúde humana devido a sua habilidade de agir

contra espécies reativas de oxigênio (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Em humanos, as reações de oxidação causadas por espécies reativas de oxigênio podem gerar danos a proteínas e ao DNA, bem como mutações no mesmo. Como antioxidantes, os carotenoides conseguem absorver a energia de excitação dessas espécies reativas, promovendo a dissipação de energia e protegendo contra aos possíveis danos químicos, podendo prevenir alguns tipos de câncer, doenças degenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes, neurodegeneração, catarata e degeneração macular (KOHEN & NYSKA, 2002; DUFOSSÉ *et al.*, 2005; GUEDES, 2011; VARELA *et al.*, 2015; GONG & BASSI, 2016). Já a deficiência dessas moléculas pode resultar em problemas como cegueira noturna, exoftalmia e, em casos mais graves, queratinização da conjuntiva e da córnea (BRITTON, 1995).

### **3.9 Obtenção dos carotenoides**

#### **3.9.1 Por via química**

A síntese química dos carotenoides teve início em 1950 com a produção do  $\beta$ -caroteno (BRITTON *et al.*, 1996; GONG & BASSI, 2016). Atualmente diversas sínteses estão disponíveis e o mercado de produção de carotenoides por via química é bastante estabilizado. Entretanto a sua utilização para consumo humano é limitado devido a preocupações para saúde humana, tendo a sua utilização mais restrita à área de alimentação animal, corantes e conservantes (GONG & BASSI, 2016).

Os carotenoides naturais são geralmente uma mistura complexa de vários isômeros e se encontram misturados com outros compostos bioativos, entretanto os carotenoides sintéticos são compostos predominantemente da forma trans. A ingestão de certos isômeros sintéticos não é considerada tão segura quanto à ingestão dessas misturas naturais (PATRICK, 2000). Devido a esses fatores e ao alto custo da síntese química, os carotenoides naturais vêm ganhando cada vez mais atenção e são preferencialmente utilizados em suplementos alimentares e em medicamentos (GONG & BASSI, 2016).

#### **3.9.2 Obtenção dos carotenoides por via biotecnológica**

A produção biotecnológica de carotenoides pode ser realizada utilizando bactérias, algas, leveduras e vegetais, alguns exemplos de fontes produtoras e os principais carotenoides extraídos encontra-se no Quadro 3.

Quadro 2 – Exemplos de fontes produtoras e principais carotenoides

Espécies	Carotenoides principais
<b>Cianobactérias</b>	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
<b>Algas</b>	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cantaxantina, astaxantina
<i>Coelastrrella striolata</i> var. <i>multistriata</i>	Cantaxantina, astaxantina, $\beta$ -caroteno
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -caroteno
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	$\beta$ -caroteno
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina, cantaxantina, luteína
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Luteína, $\beta$ -caroteno
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína
<b>Fungos e leveduras</b>	
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -caroteno e licopeno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e $\beta$ -caroteno
<i>Rhodospiridium</i> sp.	Toruleno, $\beta$ -caroteno
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularrodina, $\beta$ -caroteno, toruleno
<i>Sporidiobolus</i> sp.	Toruleno, torularrodina, $\beta$ -caroteno
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularrodina, $\beta$ -caroteno, toruleno
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina
<b>Bactérias</b>	
<i>Mycobacterium brevicaille</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
<i>Streptomyces chrestomycticus</i>	Xantofilas

Fonte: Adaptado de GUEDES *et al.* (2011) e VALDUGA *et al.* (2009).

### 3.10 Fatores que influenciam na bioprodução de carotenoides por microalgas

A produção de carotenoides tende a aumentar quando ocorre um aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). Algumas condições ambientais como deficiência de nutrientes, irradiação intensa e fotossíntese excessiva, reduzem a taxa de transferência de elétrons e, por sua vez, foto-oxidação (SOLOVCHENKO *et al.*, 2011). O conteúdo de carotenoides e o seu acúmulo em alta concentração na biomassa total variam de acordo com o carotenoide de interesse, com a microalga escolhida e com o fator de estresse aplicado.

### 3.10.1 Temperatura

A temperatura do cultivo das microalgas pode influenciar o acúmulo de carotenoides, normalmente, temperaturas altas aumentam o acúmulo de carotenoides devido ao aumento do estresse foto-oxidativo (TRIPATHI *et al.*, 2002). O efeito da temperatura na produção dos carotenoides ainda não está elucidado, entretanto muitas pesquisas apontam um aumento significativo da luteína com a temperatura, fato não muito observado para a astaxantina e o  $\beta$ - caroteno (MINHAS *et al.*, 2016).

Sánchez *et al.* (2008), estudou o efeito do aumento da temperatura na produção de luteína pela microalga *Scenedesmus almeriensis* e observou que aumentando a temperatura de 20°C para 30°C o acúmulo de luteína e a produção de biomassa aumentaram significativamente. Temperaturas acima de 30°C influenciaram negativamente o crescimento da microalga e o acúmulo de luteína. Del Campo *et al.* (2004), observou o efeito de diferentes temperaturas no crescimento e na produção de luteína, astaxantina e carotenoides totais para a *Chlorella zofingiensis*. O crescimento ótimo da microalga e o maior acúmulo de carotenoides foram obtidos na faixa de 24 – 28 °C, com um conteúdo máximo de luteína a 28 °C e de astaxantina em 24 °C. Temperaturas maiores que 28 °C diminuíram consideravelmente a crescimento da microalga.

### 3.10.2 Intensidade luminosa

Nos cultivos fotoautotróficos as microalgas utilizam luz como fonte de energia, logo, a disponibilidade e intensidade luminosa afeta bastante a produção de biomassa algal. O crescimento celular e a velocidade de fotossíntese aumentam com o aumento da intensidade luminosa até que seja alcançado o ponto de saturação, a partir do qual o aparato fotossintetizante fica incapaz de transformar mais energia luminosa em energia química e a velocidade de fotossíntese para de crescer. Esse fenômeno é conhecido como fotoinibição, fenômeno que pode acarretar em danos aos receptores de luz nas células, causando diminuição das velocidades de fotossíntese e de crescimento (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

De um modo geral, a diminuição da intensidade luminosa gera uma diminuição da produção dos pigmentos diretamente envolvidos com a fotossíntese, como a

clorofila-*a*. Entretanto, o aumento da intensidade luminosa acarreta em um aumento da produção dos pigmentos fotoprotetores, como os carotenoides (RICHMOND, 2004).

Sánchez *et al.* (2008), estudou o efeito do aumento da intensidade luminosa no acúmulo de luteína pela microalga *Scenedesmus almeriensis*, observando que a variação da irradiância de 700 para 1700 mE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> acarretou em um aumento da produtividade de biomassa e um ligeiro aumento do acúmulo de luteína. Lamers *et al.* (2010), avaliou a variação da intensidade luminosa de 100 a 1000 μmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e observou um aumento do conteúdo de β-caroteno em *Dunaliella salina*. Del Campo *et al.* (2004), observou o efeito de diferentes intensidades luminosas no crescimento e na produção de luteína e astaxantina para a *Chlorella zofingiensis*, o crescimento em 460 e 920 μmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> foram similares e superiores que a 90 μmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, a concentração de astaxantina foi 3 vezes maior nas irradiâncias de 460 e 920 μmol fóton. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> em comparação com a de 90 μmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, entretanto a concentração de luteína foi maior a 90 μmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### 3.10.3 Concentração de nutrientes

O meio de cultivo para crescimento de microalgas deve conter os macronutrientes inorgânicos e os micronutrientes orgânicos e inorgânicos necessários para as células, sendo necessário fornecimento de uma fonte de carbono, geralmente CO<sub>2</sub>, nitrogênio, fósforo e enxofre, além de sais inorgânicos e elementos traços (ZENG *et al.*, 2011). O excesso ou a limitação de algum nutriente podem modificar bastante a composição da microalga cultivada. A maior produção de carotenoides pode ser induzida na limitação de determinados nutrientes, tais como: nitrogênio, fosforo e enxofre.

A limitação de nitrogênio no meio de cultivo inibe a síntese proteica e a produção de clorofila. Sendo assim, a produção de carotenoides é induzida como forma de proteger a clorofila contra possíveis danos causados pela incidência de luz (BEN-AMOTZ; POLLE; RAO, 2009). Lamers *et al.* (2010) verificou que todas as condições com alta intensidade luminosa induziam a produção de β-caroteno pela *Dunaliella salina*, entretanto em baixa intensidade luminosa, apenas em situação de limitação de nitrogênio foi atingido alto conteúdo de β-caroteno. Del Campo *et al.* (2004), avaliou o efeito de diferentes concentrações iniciais de nitrato de sódio no acúmulo de luteína e astaxantina para a *Chlorella zofingiensis*, observando que a luteína e a astaxantina

possuem respostas opostas em relação a concentração de nitrato, o máximo de luteína foi obtido na maior concentração de nitrato, enquanto que o máximo de astaxantina foi obtido na menor, o total de carotenoides diminuiu com o aumento da concentração de nitrato. Forján *et al.* (2007) avaliou a produção e o perfil de carotenoides pela microalga *Nannochloropsis gaditana* sob condição de limitação e ausência de sulfato e fosfato, observando que em condições de limitação e ausência de fosfato ocorreu um aumento do acúmulo de violaxantina, zeaxantina e cantaxantina e uma diminuição do  $\beta$ -caroteno, enquanto que em condições de limitação e ausência de enxofre ocorreu um aumento do acúmulo de zeaxantina e não houve mudanças significativas na produção de violaxantina, cantaxantina e  $\beta$ -caroteno.

### 3.10.4 Salinidade

Algumas espécies de microalgas podem tolerar altos níveis de salinidade devido a um sistema eficiente de osmorregulação. Em geral, o aumento da salinidade pode estimular o maior acúmulo de carotenoides, entretanto, salinidade em excesso pode danificar o sistema metabólico da microalga (MINHAS *et al.*, 2016).

Sánchez *et al.* (2008), estudou o aumento da salinidade (aumento da concentração de NaCl) no acúmulo de luteína pela microalga de água doce *Scenedesmus almeriensis*, observando que essa microalga pode tolerar uma concentração de NaCl de até 5 g.L<sup>-1</sup>, concentração onde ocorre um aumento do crescimento celular e da produção de luteína em relação ao cultivo em água doce. Concentrações mais elevadas de NaCl causaram uma vigorosa diminuição do crescimento celular e uma pequena diminuição do conteúdo de luteína. Del Campo *et al.* (2004), analisou o efeito do aumento da salinidade (aumento da concentração de NaCl) no acúmulo de luteína e astaxantina para a microalga *Chlorella zofingiensis*, observando que não houve muita diferença na produção desses carotenoides entre as concentrações de 0, 50 e 100 mM de NaCl, entretanto na concentração de 200 mM de NaCl houve um aumento da produção astaxantina e de carotenoides totais, na concentração de 400 mM de NaCl houve uma diminuição do conteúdo de carotenoides.

### 3.11 Extração de carotenoides

A parte de cultivo e biossíntese de carotenoides pela microalga é crucial para a produção biotecnológica desses pigmentos, entretanto, a maior parte dos custos são



devido ao processo de downstream da biomassa, incluindo colheita, ruptura da parede celular, extração com solvente e purificação (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011).

Microalgas que possuem parede celular necessitam de processo para rompimento da parede celular para melhorar a eficiência de extração dos carotenoides. Existem diversas maneiras para tal, dentre as quais podemos citar: moinho de pérolas, homogeneização de alta pressão, ultrassom, micro-ondas, tratamento enzimático, tratamento químico. A escolha do pré-tratamento adequado depende da espécie de microalga escolhida. No Quadro 4 apresenta-se resumidamente algumas características desses diferentes métodos de ruptura celular.

Quadro 3- Características dos diferentes métodos de ruptura celular

Método de ruptura celular	Brandura	Seletividade ao produto	Peso seco de biomassa	Consumo de energia	Aumento de escala	Repetitividade
Moinho de pérolas	Depende	Não	Concentrado	Alto/médio	Fácil	Alta
Homogeneização de alta pressão	Depende	Não	Diluído/ concentrado	Alto/médio	Fácil	Alta
Ultrassom	Depende	Não	Diluído	Médio/ baixo	Fácil/difícil	Média
Micro-ondas	Depende	Não	Diluído	Alto/médio	Fácil/difícil	Média
Tratamento enzimático	Sim	Sim	Diluído	Baixo	Sim	Alta
Tratamento químico	Depende	Sim/Não	Diluído/ concentrado	Médio/ baixo	Sim	Alta

Fonte: modificado de GÜNERKEN *et al.* (2015)

### 3.12 Ruptura celular

#### 3.12.1 Homogeneização a alta pressão

A homogeneização a alta pressão consiste em bombear uma suspensão de células de modo sua passagem através do orifício da válvula, causando a colisão com a parede do anel de impacto. Neste caso o rompimento celular ocorre devido ao atrito, turbulência, impacto e cavitação (MILLER *et al.*, 2002; KELLY & MUSKE, 2004; CLARKE *et al.*, 2010). Existem diferentes designs de válvulas que visam maximizar o

rompimento celular. Esse método tem a capacidade de processar suspensões concentradas de algas e é facilmente escalonado, entretanto requer uma alta demanda energética.

### 3.12.2 Moinho de bolas/moinho de pérolas

O moinho de pérolas consiste no rompimento celular por meio do impacto das pérolas da moagem com a microalga, após o processo as pérolas podem ser separadas por sedimentação. Característica análoga ao do moinho de bolas, que ao invés de pérolas provoca a ruptura celular devido ao cisalhamento causado pelo impacto das bolas com a célula. Os parâmetros importantes do processo são tamanho e material das pérolas ou das bolas, tempo de residência e características da suspensão de células como concentração e viscosidade. Esses sistemas podem ser escalonados e têm capacidade de processar suspensões concentradas, podendo ser associados à utilização de solventes. Entretanto ambos requerem uma alta demanda energética (GONG & BASSI, 2016). O moinho de bolas simples ou vibratório, Kumar *et al.* (2017) destacaram que o moinho vibratório é mais eficiente na desestruturação celular.

Taucher *et al.* (2016) comparou diferentes técnicas de ruptura celular, dentre elas a homogeneização a alta pressão, o moinho de bolas e o ultrassom em três diferentes espécies de microalgas: *Haemotococcus pluviialis*, *Chromochloris zofingiensis* e *Chlorella sorokiniana*. Para as três espécies estudadas a homogeneização a alta pressão e o moinho de bolas foram os que geraram um maior teor de carotenoides.

Chan *et al.* (2013) estudou a extração de luteína da microalga *Scenedesmus obliquus* utilizando três diferentes métodos de ruptura celular: autoclave, ultrassom e moinho de pérolas. Nesse estudo, o moinho de pérolas resultou na maior ruptura celular e em uma maior extração de luteína. O sonicador não promoveu uma boa ruptura celular, já a autoclave resultou numa ruptura celular razoável, entretanto a extração de luteína foi muito baixa possivelmente devido à termodegradação desse componente.

A extração de lipídeos das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Chlorella protothecoides* foi estudada utilizando diferentes tipos de ruptura celular, dentre elas moinho de pérolas, o ultrassom e moagem úmida. *S. dimorphus* apresentou melhor resultado de extração com a moagem úmida, enquanto a *C. protothecoides* apresentou melhores resultados com o moinho de bolas (SHEN *et al.*, 2009).

### 3.12.3 Ultrassom

O método de ultrassom consiste da aplicação de ciclos de alta e baixa pressão criando o fenômeno de cavitação, onde há a formação e colapso de bolhas de vapor próximas às células, criando uma turbulência responsável pelo rompimento celular. Existem basicamente dois tipos de ultrassom: o banho e a ponteira. Esse processo pode ser realizado em associação com material particulado, como pérolas, ou solventes para aumentar a eficiência da ruptura celular. A grande desvantagem desse método é que requer suspensões diluídas, entretanto possui alta eficiência e não possui alto custo (GONG & BASSI, 2016).

### 3.12.4 Micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas com comprimento variando de 1 mm e 1 m. A radiação de micro-ondas possui uma faixa de frequência entre 0,3 a 300 GHz. O aquecimento nos fornos de micro-ondas ocorre de uma maneira diferente dos banhos de aquecimento e dos fogões tradicionais que ocorrem por condução, irradiação e convecção. Nos fornos micro-ondas o aquecimento dependerá da constante dielétrica do material de interesse (SANSEVERINO, 2002). Em geral, substâncias polares, como etanol e água, absorvem bem micro-ondas e substâncias menos polares, como hidrocarbonetos alifáticos, ou substâncias com momento de dipolo nulo, o gás carbônico, absorvem micro-ondas fracamente (SANSEVERINO, 2002).

O aquecimento por micro-ondas, também chamado de aquecimento dielétrico, pode ser obtido por dois mecanismos principais: rotação de dipolo e condução iônica. Quando a frequência de micro-ondas é aplicada, as moléculas se alinham ao campo elétrico aplicado, e quando esse campo é removido às moléculas voltam a um estado desordenado e a energia que foi absorvida para esta orientação é dissipada na forma de calor. Já o mecanismo de condução iônica envolve a geração de calor através de perdas por fricção, que se dão através da migração de íons dissolvidos sob a ação das micro-ondas. Essas perdas dependem de fatores como: tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente empregado (SANSEVERINO, 2002).

O rompimento celular por micro-ondas ocorre devido ao aumento da pressão interna causada pelo campo elétrico oscilatório aplicado. Esse processo possui facilidade de escalonamento, entretanto requer o uso de suspensões diluídas e possui

alta demanda energética. A extração assistida por micro-ondas ocorre em associação com solventes, a escolha do solvente depende da constante dielétrica do mesmo, geralmente altas constantes dielétricas facilitam o processo de extração (ZHENG, 2011). Como os carotenoides são degradados a altas temperaturas, o controle da temperatura é necessário para realizar a extração em micro-ondas.

McMillan *et al.* (2013) avaliou a ruptura celular com diferentes pré-tratamentos, dentre eles, o moinho, o micro-ondas e o ultrassom. As maiores eficiências de ruptura celular foram encontradas no tratamento em moinho, micro-ondas e laser. Quanto ao consumo de energia, o autor constatou que o moinho provou ser o de menor consumo, fato que o torna bastante atraente do ponto de vista industrial.

Lee *et al.* (2010) testou a extração de lipídeos das microalgas *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. utilizando diferentes métodos de ruptura celular, tais como: autoclave; moinho de pérolas, ultrassom, método químico (solução de 10% de NaCl) e micro-ondas, concluindo que o método de micro-ondas foi o mais simples e efetivo para a extração de lipídeos de microalgas.

Menéndez *et al.* (2014) estudou a extração de lipídios da microalga *Nannochloropsis gaditana* utilizando ultrassom e micro-ondas. O maior rendimento de extração e o menor consumo de energia ocorreram sob irradiação de micro-ondas.

### **3.12.5 Tratamento enzimático**

O tratamento enzimático consiste na utilização de enzimas para o rompimento da parede celular, esse método possui alta especificidade, pode ser escalonável e atingir altos rendimentos e utiliza condições brandas, o que é bastante importante para a extração de carotenoides (GONG & BASSI, 2016). Dentre as enzimas empregadas podemos destacar as amilases, proteases e celulasas (CHOI *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2010). Entretanto, esse método possui um alto custo relacionado às enzimas e é comparativamente mais lento.

### **3.12.6 Tratamento químico**

Os tratamentos químicos para a ruptura celular podem ser conduzidos por diferentes compostos químicos, tais como: antibióticos, agentes quelantes, agentes caotrópicos, solventes orgânicos, detergentes, líquidos iônicos, ácidos e bases. A

seletividade e a eficácia do processo dependem da composição da parede celular da microalga (MIDDELBERG, 1995). Existem diversas pesquisas sobre a ruptura celular das microalgas utilizando esses agentes, entretanto, a qualidade do produto pode ser altamente afetada.

### **3.13 Extração**

A extração de carotenoides das microalgas é uma etapa crucial para a produção desses compostos. A extração por solventes orgânicos é a mais utilizada, entretanto existem muitas pesquisas relacionadas à extração por fluidos supercríticos. Esses métodos visam gerar um extrato rico em carotenoides que pode ser utilizado diretamente em suplementos alimentares ou passar por processos de purificação.

#### **3.13.1 Extração com solventes orgânicos**

A polaridade do solvente é o fator preponderante para a escolha do solvente ideal. Mojaat *et al.* (2008), testou a extração do  $\beta$ -caroteno da microalga *Dunaliella salina* por diferentes solventes e combinações deles, concluindo que a combinação de um solvente apolar (como o decano) com um solvente mais polar (como o diclorometano ou a butanona) confere a melhor extração.

O processo tradicional de extração por solventes orgânicos é relativamente barato e facilmente escalonável, entretanto utiliza, em geral, uma etapa posterior de evaporação, para concentrar o extrato com impactos negativos no perfil dos carotenoides (GONG & BASSI, 2016). Além disso, o processo de extração dos pigmentos, geralmente, utiliza hexano, clorofórmio e metanol que são solventes poluidores e tóxicos, o que agrega um problema ambiental ao processo (GUEDES *et al.*, 2011). Sendo assim, o uso de solventes mais favoráveis ambientalmente vem sendo considerado, dentre esses solventes o etanol se destaca devido ao seu custo e à sua afinidade com os lipídios, sendo capaz de extrair tanto os lipídios polares como os não polares com eficiência (YANG *et al.*, 2014). Os carotenoides em solução etanólica podem ser posteriormente fracionados pelo método de extração líquido-líquido usando soluções hidroetanólicas com diferentes polaridades (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Chen *et al.* (2016), estudou a extração da luteína da microalga *Chlorella Sorokiniana* utilizando etanol, éter, THF, acetona e hexano. Para esse estudo o etanol, o éter e o THF foram eficientes para a extração da luteína, entretanto o hexano, solvente

usado para extração de luteína da calêndula, foi o que resultou na pior extração. Utilizando etanol como solvente, esse autor obteve um melhor rendimento de extração de luteína sob pressão de 450 mbar, 35 °C e 40 min de tempo de extração. O autor obteve significativa degradação em extração conduzida com temperaturas acima de 55°C.

Fajardo *et al.* (2007), estudou a extração de lipídios da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em duas etapas, primeiro foi realizada a extração dos lipídios da microalga liofilizada utilizando etanol 96% a temperatura ambiente por 24h, posteriormente foi adicionada hexano e água no extrato para separar os lipídios de interesse. Dessa forma foi possível extrair e separar eficientemente os lipídios utilizando menos solventes tóxicos e menor quantidade de solventes.

Goiris *et al.* (2012), avaliou a extração de carotenoides de 32 espécies de microalgas com diferentes solventes como: mistura etanol água (3:1), hexano, acetato de etila e água. Para a maioria das espécies a mistura etanol água foi a que gerou uma maior extração de carotenoides.

Yang *et al.* (2014) testaram a extração de lipídios da microalga úmida *Picochlorum* sp. em temperatura ambiente e obtiveram resultados similares aos encontrados utilizando clorofórmio e metanol.

### **3.13.2 Fluidos supercríticos**

Os solventes supercríticos também têm sido bastante estudados como uma alternativa ambientalmente mais amigável a extração por solventes orgânicos. Esse método se baseia em submeter um fluido a temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, onde este torna supercrítico e passa a apresentar propriedade físico-químicas intermediárias ente gás e líquido. A extração utilizando solvente supercrítico é relativamente rápida e eficiente devido à baixa viscosidade e alta difusividade característica dos fluidos supercríticos. Além disso, após a despressurização, o fluido supercrítico volta à sua forma gasosa e o extrato pode ser recuperado sem nenhum (ou com muito pouco) solvente residual, diminuindo custos relacionados à purificação do extrato (BRAVI *et al.*, 2007). O CO<sub>2</sub> supercrítico tem sido o solvente mais estudado nesse tipo de extração por ser: não inflamável, não tóxico, pouco custoso e relativamente inerte do ponto de vista químico (GUEDES *et al.*, 2011). Além disso, o

CO<sub>2</sub> se torna supercrítico em temperaturas e pressões relativamente baixas, o que é vantajoso do ponto de vista técnico-operacional e de custo. Entretanto, esse tipo de extração tem como desvantagens o alto custo associado aos equipamentos e ao gasto de energia.

### **3.14 Microalgas para produção de peptídeos bioativos**

Peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas específicos que apresentam um efeito benéfico sobre algumas funções do corpo humano. Uma vez ingeridos, os peptídeos bioativos podem afetar os principais sistemas do corpo (sistemas cardiovascular, digestivo, imune e nervoso) dependendo da sequência de aminoácidos apresentada (KORHONEN & PIHLANTO, 2006). Sendo assim, esses peptídeos apresentam um grande potencial de uso na formulação de alimentos funcionais para prevenção de diferentes doenças, especialmente doenças cardiovasculares (DCV) (EJIKE *et al.*, 2016).

As microalgas podem apresentar grande quantidade de proteínas com perfil de aminoácidos balanceado, comparáveis aos do ovo e da soja (EJIKE *et al.*, 2016). As microalgas sintetizam os 20 aminoácidos proteínogênicos e podem ser fontes não convencionais de aminoácidos essenciais para a nutrição humana (SPOLAORE *et al.*, 2006). Além disso, vários estudos demonstraram que os peptídeos derivados da hidrólise enzimática de proteínas de microalgas possuem propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas que podem ser aplicadas na prevenção de doenças em humanos. Peptídeos derivados da microalga *Chlorella* já foram relatados por apresentarem tanto poder antioxidante como anti-hipertensivo (EJIKE *et al.*, 2016).

Esses peptídeos são geralmente obtidos por meio da hidrólise enzimática das proteínas microalgais. As proteases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases (EC 3.4) e catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Essas enzimas podem ser classificadas quanto a: origem (animal, bacteriana, fúngica ou vegetal); a ação catalítica (endopeptidases atuam no interior das cadeias polipeptídicas ou exopeptidases atuam na extremidade das cadeias polipeptídica); e quanto à natureza do sítio catalítico (endopeptidases como serina-, cisteína-, metalo- e aspartato-proteinases; e exopeptidases amino- ou carboxi-peptidases).

Devido às suas propriedades bioativas, as proteínas hidrolisadas de microalgas possuem uma potencial aplicação para formulação de bebidas funcionais com ação hipertensiva e suplementos encapsulados (EJIKE *et al.*, 2016).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Matéria-prima

Neste trabalho foi utilizada uma preparação comercial da microalga *Chlorella* sp. na forma de um pó comercializada no sul do Brasil e produzida por Fuqing King, Drarmsa Spirulina Co, Ltd, China. De acordo com o fabricante, essa alga foi submetida à secagem ao sol e esterilização. A Figura 7 apresenta a imagem de microscopia ótica da microalga *Chlorella* sp. comercial.

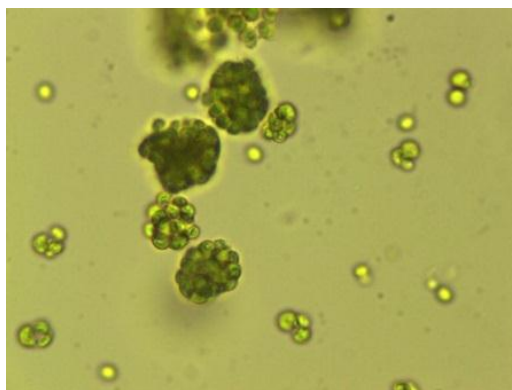


Figura 7 - Imagem de microscopia ótica da microalga *Chlorella* sp. presente no preparado comercial (aumento de 400 x). Fonte: Própria autora.

Os reagentes utilizados nesse trabalho eram de grau de pureza P.A.. Utilizou-se uma protease bacteriana comercial liofilizada (ProteaseMax<sup>TM</sup>; Promega).

### 4.1 Tratamento em moinho de bola vibratório

O tratamento em moinho de bola foi realizada em um moinho vibratório (Fritsch, Alemanha) contendo 1 bola com amplitude 1,5 mm, por 90 minutos.

## 4.2 Métodos analíticos

### 4.2.1 Determinação de lipídios totais

Para a determinação dos lipídeos totais foi utilizado o método de Bligh & Dyer (1959) modificado. Esse método padrão consiste em extrair os lipídeos da microalga com uma mistura de clorofórmio e metanol (1:2). Para este fim 1 g da microalga moída foi incubada com 17,0 mL de metanol e 8,5 mL de clorofórmio homogeneizando-se a cada 5 minutos por 1 h em temperatura de ambiente (~25°C). A seguir, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante coletado. A fração sólida foi submetida a uma nova etapa

de extração por 1h utilizando-se mesmo volume da solução clorofórmio/metanol e, novamente, o sobrenadante foi coletado e misturado ao anterior. Para a separação das fases apolar e polar foi adicionado 6,8 mL de água e, após centrifugação, a fase orgânica (fase inferior) foi coletada. O solvente foi evaporado para o cálculo do percentual de lipídeos totais na biomassa.

#### 4.2.2 Determinação de clorofila e carotenoides totais

Os carotenoides totais foram determinados utilizando-se a metodologia de LICHTENTHALER (1987) modificada. A determinação de pigmentos por essa metodologia consistiu em incubar 4 mg da microalga moída em moinho de bola com 20 mL de etanol 95% por 2h em agitador orbital a 25 °C e 110 rpm. Após a extração dos carotenoides, a suspensão foi centrifugada para separação da biomassa residual. A fase líquida foi analisada em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 664,2; 648,6; 470 e 750 nm. A leitura a 750 nm representa a turbidez a ser descontada das outras absorvâncias. As equações utilizadas para quantificar o teor de clorofila e carotenoides estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Equações para determinação do teor de clorofila e carotenoides.

Fonte: LICHTENTHALER (1987).

Pigmentos (µg/mL)	Equações
Clorofila total	$C_{cl} = 5,24 \times A_{664,2} + 22,24 \times A_{648,6}$
Carotenoides totais	$C_{car} = \frac{1000 \times A_{470} - 2,13 \times C_a - 97,64 \times C_b}{209}$

#### 4.2.3 Determinação de carboidratos totais

A determinação da composição da parede celular da microalga *Chlorella* sp. foi realizada por meio de hidrólise ácida utilizando-se o método descrito por Northcote *et al.* (1958). Esse método consiste na hidrólise de 4,0 mg de microalga com 2,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L a 100 °C durante 6 horas. Decorrida esta etapa, a amostra foi neutralizada com carbonato de cálcio até pH entre 4 e 6, centrifugada e o sobrenadante analisado por HPAEC-PAD (*high-performance anion-exchange chromatography and pulse amperometric detection*) para quantificação dos carboidratos presentes na parede celular. A determinação de glicose da biomassa, após extração de pigmentos, foi realizado pelo método de Souza *et al.* (2017), esse é análogo ao descrito por Northcote

*et al.* (1958) tendo como única diferença a redução de tempo de hidrólise de 6h para 2h, o sobrenadante obtido foi analisado em analisador bioquímico YSI 2700, para determinação da concentração de glicose.

A determinação dos açúcares da biomassa algal utilizado o sistema de *high-performance anion-exchange chromatography and pulse amperometric detection* (HPAEC-PAD) foi realizada no equipamento *Ion Chromatography System 5000* (ICS-5000, Dionex Ltd, Canada), com o *software Chromeleon 6.8* (Dionex Ltd., Canada) e um sistema de colunas composto pela pré-coluna CarboPac PA1 (4 x 50 mm, Thermo Scientific Ltd., USA) e a coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm, Thermo Scientific Ltd., USA). A temperatura do forno e do detector foi de 30 °C e o tempo de corrida de 50 minutos. Foi utilizado um detector eletroquímico (amperometria). O gradiente utilizado consistiu em NaOH 300 mM e água deionizada (Milli-Q) grau reagente tipo I (18 ou mais megaohm-cm de resistividade), descarbonatada e filtrada em filtro 0,2 µm com fluxo de 1,0 mL por minuto. Para a detecção de celobiose na pós-coluna, foi utilizada uma solução de NaOH 400 mM com fluxo de 0,3 mL por minuto.

#### **4.2.4 Determinação de proteínas**

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (1951), uma metodologia colorimétrica que se baseia na redução do reagente Folin Ciocalteau ao reagir com as proteínas na presença de cobre, gerando um complexo de cor azul que possui absorção máxima a 750 nm. Como as microalgas possuem elevada quantidade de proteínas de membrana, torna-se necessário um pré-tratamento para a solubilização e quantificação destas. O protocolo, concebido no Laboratório de Bioquímica do IQ-UFRJ (RODRIGUES, 2016), consistiu em incubar 6,0 mg da microalga previamente moída com 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (p/v) por 5 minutos a 100 °C, posteriormente a amostra foi centrifugada para realização da análise colorimétrica.

Para análise colorimétrica foram preparados os seguintes reagentes: i) reagente A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% p/v em NaOH 0,1 mol/L; ii) reagente B1: CuSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 0,5% p/v; iii) reagente B2: Tartarato de sódio e potássio tetra hidratado 1% p/v; iv) reagente B: Mistura de 1 volume de B1 com 1 volume de B2 (preparado no momento da análise); v) reagente C: Mistura de 50 volumes de A com 1 volume de B. O reagente de Folin Ciocalteau foi diluído em água no momento da análise na proporção de 1:3.

Essa análise foi realizada incubando-se 1,0 mL do sobrenadante previamente diluído a 5,0 mL de reagente C por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 0,5 µL do reagente de Folin diluído e a reação ocorreu por 30 minutos no escuro. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 750 nm. Para a curva padrão foi utilizada uma solução de albumina 120 µg/mL.

#### **4.2.5 Análise de atividade antioxidante pelo método Trolox equivalente (TEAC)**

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de TROLOX equivalente (TEAC) foi utilizado metodologia descrita por RE *et al.* (1999). Inicialmente, foi preparado o radical ABTS<sup>+</sup>, a partir da reação de uma solução estoque de ABTS (2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) 7 mM com uma solução de persulfato de potássio 140 mM, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz por, pelo menos, 16 horas. Transcorrido o tempo de incubação, a solução de ABTS<sup>+</sup> foi diluída em etanol 95% até a obtenção de uma solução com absorvância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Para as análises das amostras, foram adicionados 30 µL da amostra diluída a 3 mL da solução contendo o radical ABTS<sup>+</sup>, a mistura foi homogeneizada e, transcorrido 6 minutos de reação, foi realizado a leitura a 734 nm. Como solução-padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) análogo a vitamina E nas concentrações de 339; 424; 635; 847 e 1059 µmol em etanol 95%. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por grama de extrato.

#### **4.3 Experimentos em reator de micro-ondas**

Para avaliar a extração de lipídios e carotenoides da microalga do gênero *Chlorella* utilizando micro-ondas foi adotado o delineamento experimental do tipo fatorial completo 2k (DCCR). O *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) foi utilizado para gerar a matriz de experimentos. As variáveis independentes utilizadas foram razão solvente biomassa (Rs/b) e grau Gay Lussac (°GL) (quantidade em mililitros de etanol absoluto contida em 100 mililitros de mistura hidro-alcoólica), os níveis estudados no DCCR encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Níveis estudados para as variáveis independentes do DCCR.

	-1,41	-1	0	1	1,41
°GL	88	90	95	Absoluto	Absoluto
Rs/b	2:1	3:1	6:1	9:1	10:1

O planejamento foi realizado nas temperaturas de 40 °C e 50 °C sob agitação magnética. Para padronizar a escala dos experimentos, todos os ensaios foram realizados com 20 mL de etanol, variando-se a quantidade de biomassa para cada condição estabelecida. Para atingir a temperatura desejada foi utilizada uma rampa de aquecimento de 10 minutos e, após os 15 minutos de reação na temperatura desejada, esperou-se 15 min para o sistema resfriar. A potência máxima utilizada foi de 100 watts. Todos os experimentos foram realizados no reator de micro-ondas MARS 6 da CEM Corporation (Figura 8). As temperaturas de 40° e 50°C foram selecionadas devido à impossibilidade do reator de micro-ondas manter temperaturas abaixo de 40 °C e acima de 50 °C ocorrer, com maior probabilidade, a degradação dos carotenoides.



Figura 8 - Micro-ondas MARS 6 da CEM Corporation em funcionamento.

Após a reação no reator de micro-ondas, a amostra foi filtrada em membrana de acetato de celulose com diâmetro do poro 0,45 µm. O filtrado foi utilizado para determinação de pigmentos e de lipídios, em base seca, após evaporação do solvente.

#### 4.4 Experimentos em agitador orbital

Os experimentos em agitador orbital foram realizados com a microalga moída e não moída, na faixa de 30 a 50 °C sob agitação de 110 rpm para garantir a homogeneização do meio. A razão solvente biomassa utilizada foi de 9:1 mantendo-se escalão volume de etanol em 20 mL. As misturas etanol/água nas proporções 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 foram avaliadas como solvente para a extração dos carotenoides. Os erlenmeyers foram protegidos da luz para evitar a degradação dos pigmentos. O tempo de extração foi de 15 e 30 minutos. Após a extração, a biomassa foi centrifugada e o filtrado foi utilizado para determinação de pigmentos e de lipídios, em base seca, após evaporação do solvente.

#### 4.5 Extração em dois estágios

Finalmente foi proposto um diagrama de processamento da microalga *Chlorella* sp. comercial moída, inserido no conceito de uma biorrefinaria. A primeira etapa do processo consistiu, portanto, na extração com etanol 100% visando obter um extrato rico em lipídios e carotenoides. Esta etapa foi realizada em dois estágios e a escala dos experimentos foi ampliada de 20 para 200 mL. A biomassa moída foi extraída com 200 mL de etanol na proporção 9:1 a 30 °C por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi reservado e a biomassa residual foi ressuspensa em 200 mL de etanol para uma segunda etapa de extração nas mesmas condições experimentais.

#### 4.6 Extração de proteínas

A extração de proteínas da biomassa residual da microalga, pós extração dos carotenoides, foi conduzida com e sem adição de protease. A extração sem protease foi conduzida a 30 °C, razão solvente biomassa 9:1 por 30 minutos. A extração com adição do catalisador enzimático foi realizada com uma protease comercial (ProteaseMAX™) por 3 h em água com razão solvente biomassa 9:1. A hidrólise enzimática foi conduzida a 37 °C (temperatura ótima de ação da enzima conforme catálogo do fabricante) utilizando-se 1%, em massa, de enzima em relação à quantidade de proteína da biomassa. A proteína extraída foi quantificada pelo método de Lowry. Ambos os experimentos foram realizados com 20 mL de água destilada.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata. As médias foram comparadas usando teste de Fisher LSD ( $p < 0.05$ ) para os resultados analíticos. O desvio padrão foi expresso com um algarismo significativo para todos os dados experimentais. Os resultados de processo foram avaliados pela técnica de superfície de resposta, considerando o gráfico de pareto para análise de parâmetros significativos ou ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização da biomassa

Na Tabela 3 apresenta-se os resultados de caracterização e o teor de pigmentos determinados na microalga comercial *Chlorella* sp. moída em moinho de bolas.

Tabela 3 – Caracterização da biomassa

Caracterização da biomassa	Quantidade	Método
Lipídios (g.(100 g) <sup>-1</sup> de biomassa seca)	17,2 ± 0,4	BLIGH & DYER (1959)
Proteínas (g.(100 g) <sup>-1</sup> de biomassa seca)	52 ± 1	LOWRY <i>et al.</i> (1951)
Carboidratos (g.(100 g) <sup>-1</sup> de biomassa seca)	12 ± 1	NORTHCOTE <i>et al.</i> (1958)
Clorofila total (mg.g <sup>-1</sup> de biomassa seca)	17,2 ± 0,3	LICHTENTHALER (1987)
Carotenoides totais (mg.g <sup>-1</sup> de biomassa seca)	3,83 ± 0,04	LICHTENTHALER (1987)

O teor de lipídeos foi superior (cerca de 41%) aos resultados obtidos por Viêgas (2015) para a biomassa de *Chlorella* sp. usando o mesmo método de extração. O teor de carotenoides foi superior (cerca de 20%) ao encontrado por Goiris *et al.* (2012) com a microalgas *Chlorella* sp. submetida a extração com mistura de etanol água 3:1 (v/v). Nos dois casos, a diferença nos resultados ocorreu, provavelmente, devido a maior eficiência do rompimento celular da parede da microalga após processamento em moinho de bolas. Adicionalmente, no caso dos carotenoides, as diferenças no cultivo dessas microalgas e na polaridade do etanol recomendado pelo método de Lichtenthaler (1987) podem ter contribuído para uma melhor eficiência de recuperação destes compostos.



## 5.2 Composição em carboidratos da biomassa

A composição de carboidratos da biomassa determinada por dois métodos baseados em hidrólise ácida encontra-se representada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição de açúcares presentes em hidrolisados ácidos da biomassa da preparação comercial de *Chlorella* sp.

%	Glicose	Galactose	Arabinose	Manose	Total de carboidratos
Média	6,4 ± 0,7	2,8 ± 0,3	2,0 ± 0,2	0,44 ± 0,05	12 ± 1

A caracterização dos carboidratos confirmou que a glicose é o açúcar majoritário da microalga, indicando claramente a presença de glucana como um importante componente da parede da alga. Sendo uma microalga do gênero *Chlorella*, a glucana em questão é referente ao amido, uma vez que esse gênero de microalga não possui quantidade significativa de celulose (SOUZA *et al.*, 2017).

## 5.3 Experimentos no reator de micro-ondas

Os experimentos no reator de micro-ondas foram conduzidos de forma a maximizar a extração dos carotenoides. Na Tabela 5 apresentam-se os resultados do planejamento experimental a 40 °C.

A condição na qual se alcançou um maior teor de carotenoides no extrato foi quando se utilizou a razão solvente biomassa 9:1 e etanol 90 °GL. Nesta condição obteve-se 1,63 mg.g<sup>-1</sup> (base seca) de carotenoides e 4,86 mg.g<sup>-1</sup> (base seca) de clorofila, ou seja, extraiu-se cerca de 43% dos carotenoides totais e 28,17% das clorofilas totais. Os baixos rendimentos para extração de carotenoides, inferior a 50%, indicaram que a ruptura da parede celular da microalga por micro-ondas não foi eficiente, além de possíveis dificuldades na homogeneização do meio nos tubos de reação. Adicionalmente, a extração da clorofila aumentou nas mesmas condições experimentais que as dos carotenoides, não sendo possível um bom fracionamento destes pigmentos como desejado.

Tabela 5 - Resultados obtidos a partir do planejamento DCCR realizado no reator de micro-ondas a 40 °C.

°GL	R <sub>S/B</sub> *	Lipídeos totais extraídos	Clorofila total**	Carotenoides totais*
		g.(100 g) <sup>-1</sup> de biomassa seca	mg.(100 g) <sup>-1</sup> de biomassa seca	
90	3:1	4,63	238,70	85,47
90	9:1	10,13	486,10	162,85
100	3:1	1,95	268,52	81,30
100	9:1	1,81	227,15	69,35
88	6:1	4,12	172,60	62,35
100	6:1	1,54	197,91	57,40
95	2:1	2,37	149,94	54,07
95	10:1	7,09	451,38	151,73
95	6:1	4,12	332,65	106,82
95	6:1	4,67	299,65	98,09

- \* razão solvente/biomassa; \*\* expresso em massa seca

Na Figura 9 apresenta-se o gráfico de pareto obtido a partir da análise dos resultados no *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), para 5% de nível de significância.

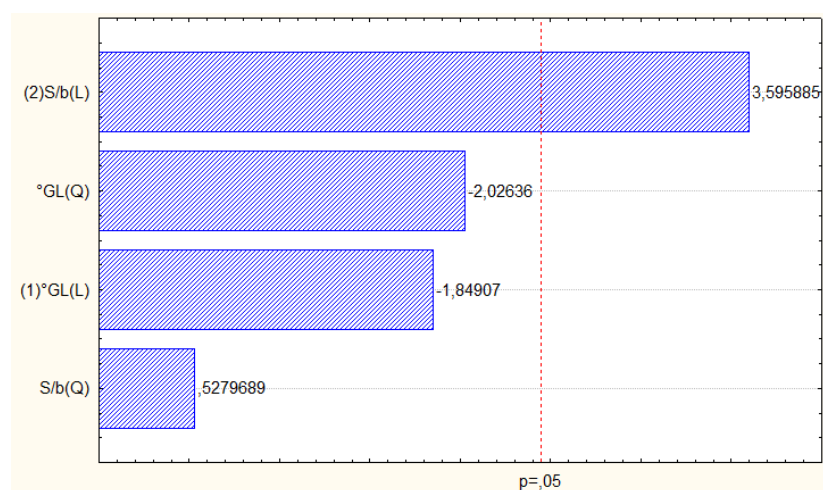


Figura 9 – Gráfico de pareto do planejamento DCCR realizado a 40°C.

Pelo gráfico de pareto ( $p < 0,05$ ) pode-se observar que a razão solvente biomassa foi a única variável significativa do processo, confirmando a dificuldade na ruptura da parede celular da biomassa, restringindo a difusão dos compostos intracelulares. A

polaridade do meio foi considerada marginalmente significativa, possivelmente o seu efeito não pode ser avaliado devido, ainda, aos problemas de difusão através da parede celular.

A superfície de contorno (Figura 10) obtida indicou que os melhores resultados se encontram nos extremos positivos da razão solvente biomassa, confirmando que soluções mais diluídas e uma fração de água da ordem de 10% favorecem a extração dos carotenoides.

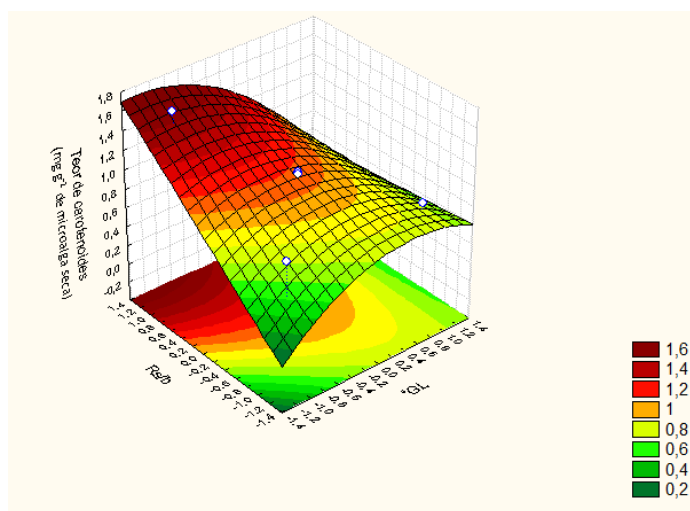


Figura 10 - Superfície de contorno do DCCR a 40 °C.

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados do planejamento experimental DCCR conduzido no reator de micro-ondas a 50 °C. A condição na qual se obteve um maior teor de carotenoides foi observada com a razão solvente biomassa 6:1 e etanol 88 °GL. Nesta condição obteve-se  $1,44 \text{ mg.g}^{-1}$  (biomassa seca), inferior ao  $1,63 \text{ mg.g}^{-1}$  p.s. encontrado a 40 °C. Embora as condições que geraram um maior teor de carotenoides foram similares às observadas a 40 °C, a temperatura mais baixa favoreceu o rendimento. Este resultado ocorreu possivelmente devido à sensibilidade térmica dos carotenoides. A análise dos resultados no software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) permitiu avaliar as variáveis mais significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6 - Resultados do planejamento realizado no reator de micro-ondas a 50 °C.

°GL	R <sub>S/B</sub> *	Lipídeos totais Extraídos		Clorofila total**	Carotenoides totais**
		g	g.(100 g) <sup>-1</sup> de biomassa seca	mg.(100g) <sup>-1</sup> de biomassa seca	
90	3:1	0,25	4,74	269,47	108,91
90	9:1	0,14	7,84	381,35	127,15
100	3:1	0,06	1,17	159,55	48,45
100	9:1	0,04	2,19	192,38	54,69
88	6:1	0,27	11,40	375,35	144,70
100	6:1	0,04	1,73	174,52	49,87
95	2:1	0,15	2,02	134,74	45,69
95	10:1	0,08	5,85	394,21	133,27
95	6:1	0,09	3,76	256,26	83,19
95	6:1	0,10	4,33	267,09	90,34

- \*razão solvente/biomassa; \*\*expresso em massa seca

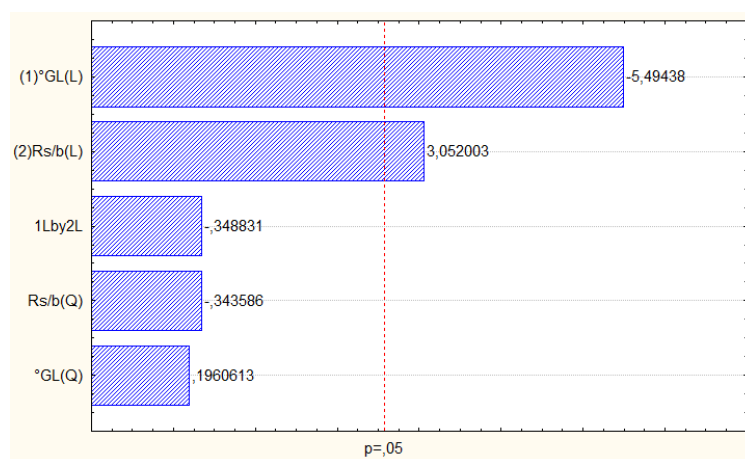


Figura 11 - Gráfico de pareto obtido a partir do planejamento DCCR conduzido a 50°C.

Por meio do gráfico de pareto pode-se concluir que os efeitos lineares a polaridade da solução hidroetanólica foi é o parâmetro mais significativo (impacto negativo), seguido pela razão solvente biomassa (impacto positivo). Sendo assim soluções mais diluídas e uma quantidade de água específica favorecem maiores rendimentos a 50 °C.

#### 5.4 Experimentos em agitador orbital

Os experimentos conduzidos em agitador orbital a 40 °C, 90 °GL e razão solvente biomassa de 9:1, a partir da microalga moída e não moída em moinho de bola vibratório estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do experimento em agitador orbital com a microalga moída e não moída.

Microalga não moída			Microalga moída		
Total de carotenoides extraídos (mg g <sup>-1</sup> )	Total de clorofila extraída (mg g <sup>-1</sup> )	Lipídios extraídos g.(100 g) <sup>-1</sup>	Total de carotenoides extraídos (mg.g <sup>-1</sup> )	Total de clorofila extraída (mg.g <sup>-1</sup> )	Lipídios extraídos g.(100 g) <sup>-1</sup>
1,5 ± 0,02	4,8 ± 0,2	11,4 ± 0,6	2,0 ± 0,09	8,2 ± 0,3	17,2 ± 0,1

Resultados expressos em biomassa seca

Os resultados obtidos em agitador orbital não apresentaram diferenças significativas se comparados aos encontrados no reator de micro-ondas para a microalga não moída. Entretanto quando o processo foi conduzido com a microalga moída obteve-se um maior rendimento de extração tanto dos lipídeos totais quanto de carotenoides e clorofila. Na Figura 12 ilustra-se o extrato seco obtido a partir da extração etanólica da biomassa não moída e moída. Pode-se observar a olho nu que o extrato obtido com a microalga moída apresenta um aspecto mais oleoso e uma coloração verde mais intensa, devido a maior extração de lipídeos e clorofila.

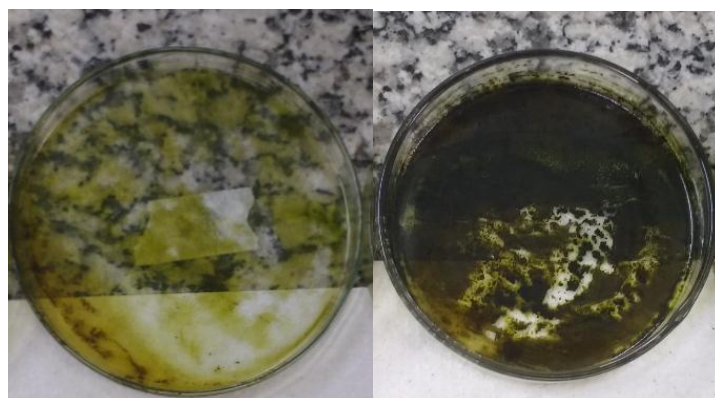


Figura 12 - Extrato seco obtido na extração etanólica com a microalga: a) não moída; b) moída.

Esses resultados possivelmente são decorrentes da eficiência do moinho de bola vibratório que desestrutura a biomassa ao mesmo tempo em que aumenta a área

superficial da mesma. Esse resultado indicou uma eficiência maior do moinho de bola vibratório, se comparado ao reator de micro-ondas, na ruptura da parede celular da microalga, permitindo uma melhor difusão dos compostos bioativos em agitador de mistura convencional. As imagens de microscopia eletrônica de varredura comprovam a eficiência da moagem em moinho de bola (Figura 13).

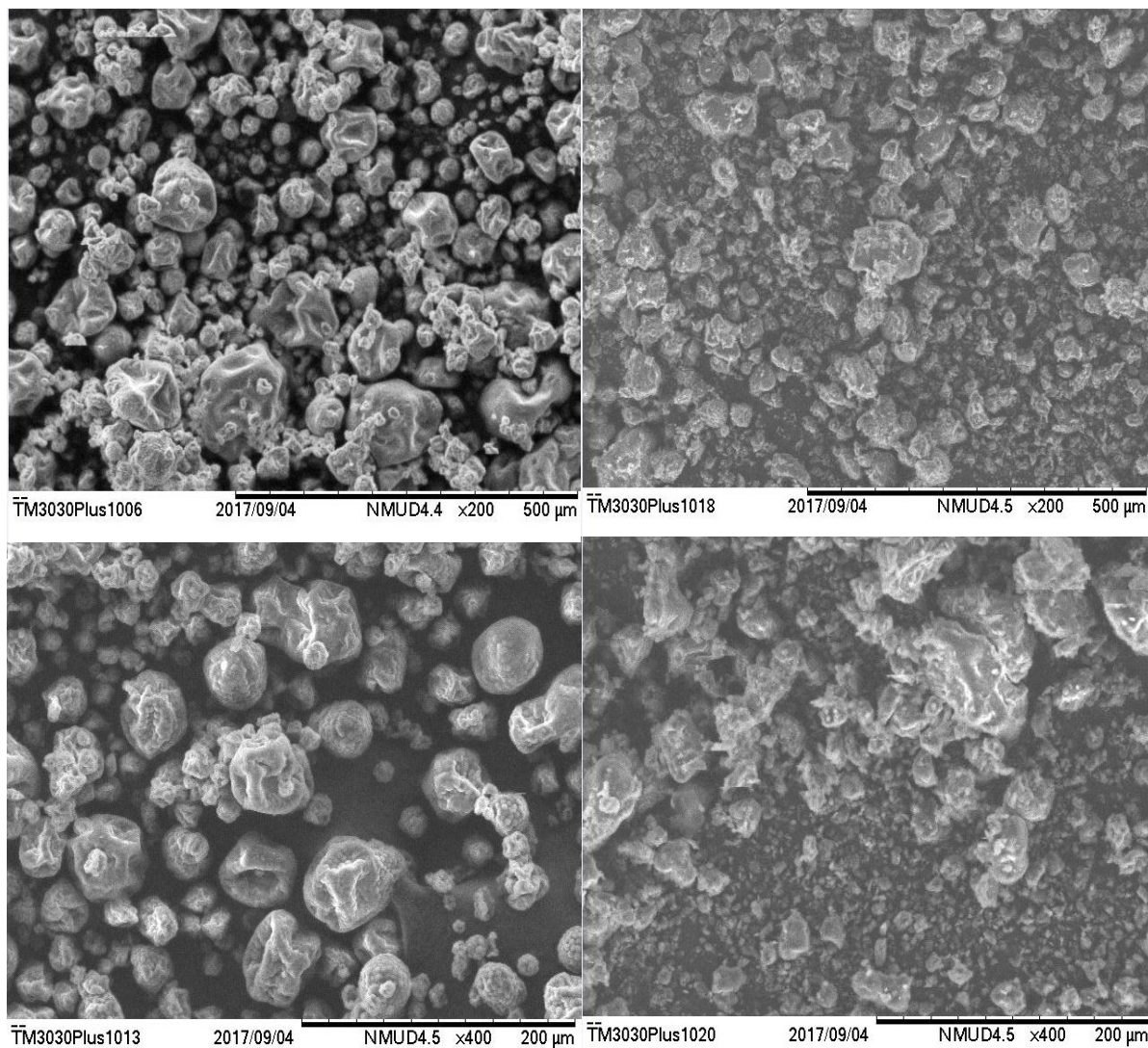


Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da microalga não moída (a direita) e da microalga moída (a esquerda).

Pela microscopia eletrônica de varredura podemos perceber que a microalga não moída possui uma distribuição de tamanho de partículas bem mais uniforme, apresentando-se na forma de aglomerados bem estruturados. Esta estrutura mais organizada dificulta o acesso do solvente ao conteúdo lipídico, onde se encontram os

carotenoides. A microalga após a moagem apresentou uma distribuição de tamanhos pouco uniforme e desordenada, comprovando a ruptura celular causada pelo moinho de bola, o que favoreceu a difusão do solvente e, como consequência, o aumento da eficiência de extração.

Os efeitos fenomenológicos da polaridade da mistura etanol/água nas proporções 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100, na eficiência de extração de compostos bioativos da microalga. A 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C, mantendo-se a razão solvente biomassa de 9:1 estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de teor de carotenoides obtidos em agitador orbital com a microalga moída.

Temperatura (°C)	Total de carotenoides extraídos (mg.g <sup>-1</sup> biomassa seca)				
	Solução Extratora				
	Etanólica	70/30	50/50	30/70	Aquosa
30	4,904	1,136	0,211	0,254	0,024
35	4,459	1,630	0,138	0,114	0,022
40	2,827	1,585	0,189	0,298	0,023
45	3,921	1,439	0,197	0,231	0,021
50	4,367	1,514	0,255	0,253	0,022

A extração de carotenoides não apresentou correlação linear com o inverso da temperatura ( $T^{-1}$ ), indicando que a extração de carotenoides da biomassa algal não segue o comportamento descrito pela clássica equação de Arrhenius. Para todas as temperaturas avaliadas, o etanol puro apresentou uma maior eficiência de extração, confirmando uma maior afinidade dos carotenoides com este solvente. Neste caso, obteve-se um rendimento acima do obtido pelo Protocolo de quantificação descrito no item 4.2.2, o qual recomenda etanol 95% para extração de carotenoides de plantas. Como já reportado na literatura (GOIRIS *et al.* 2012; YANG *et al.*, 2014), os protocolos usados para extração de lipídeos a partir dos vegetais não são recomendados para microalgas devido, provavelmente, às diferenças na estrutura da parede celular que limita, em muitos casos, a difusão de solventes apolares através da parede da biomassa algal. A redução do total de carotenoides extraídos entre 40 e 45 °Cs e deve devido, provavelmente, à extração competitiva, de outros compostos, não analisados, presentes na matéria insaponificável do óleo.

Dentre todas as condições avaliadas com etanol 100%, os experimentos a 30 °C favoreceu a maior rendimento de extração dos carotenoides, fato bastante positivo uma vez que temperaturas mais brandas, além de consumir menor energia, são ideais para processos de obtenção de compostos bioativos, particularmente de compostos termolábeis. Na Tabela 9 apresenta-se o teor de clorofila e de extrato lipídico, obtidos a 30 °C.

Tabela 9 - Teor de carotenoides, de extrato lipídico e de clorofila extraída em agitador orbital na temperatura de 30 °C.

Solvente	Total de carotenoides extraídos (mg.g <sup>-1</sup> )	Total de extrato g(100g) <sup>-1</sup>	Total de clorofila extraída (mg.g <sup>-1</sup> )
Etanol 100%	4,90	15,54	18,9
Etanol 70%	1,14	11,44	1,83
Etanol 50%	0,211	14,42	0,295
Etanol 30%	0,254	15,33	0,422
Água pura	0,024	19,93	0,023

Resultados expressos em base seca

Na temperatura de 30 °C pode-se observar que no ensaio com etanol 100% obteve-se um extrato rico em lipídios e carotenoides. Conforme se aumenta o teor de água no solvente extrator, ocorre uma redução na extração dos carotenoides e da clorofila, devido a menor afinidade química desses compostos com a água se comparado ao etanol. Entretanto, a porcentagem de extrato no meio reduziu quando se utilizou a solução 70/30 e voltou a aumentar, a partir da solução 50/50. ao caracterização do extrato indicou uma redução do peso seco quando o etanol etanol 100% foi para 70% ocorre, já do etanol 70% ate a água pura ocorre um aumento, estes resultados, provavelmente, ocorrem devido aos fenômenos físico-químicos competitivos entre lipídeos, solúveis em etanol, e proteínas e carboidratos solúveis em água, quando a polaridade do meio se altera.

Pode-se observar na Tabela 10 que o processo conduzidos em dois estágios de extração forneceu um extrato rico em lipídeos, correspondendo a cerca de 18% da



biomassa seca. Este resultado indicou uma eficiência de extração de 100% se comparada com resultados da caracterização obtida pelo método de Bligh & Dyer (1959). Yang *et al.* (2014) também obteve rendimentos de extração de lipídios com etanol semelhantes ao obtido pelo método de Bligh & Dyer (1959) com a microalga *Picochlorum* sp. úmida. Na Tabela 10 ilustra-se a eficiência de extração dos pigmentos no processo conduzidos em dois estágios.

Tabela 10 - Caracterização do extrato etanólico obtido nos diferentes estágios de extração.

	Total de clorofila (mg.g <sup>-1</sup> )	Total de carotenoides (mg.g <sup>-1</sup> )	Razão de carotenoides/ clorofila (g/g)	Razão de carotenoides/ lipídios (mg/g)
Após 1ª extração	13 ± 3	3,3 ± 0,8	0,30 ± 0,01	18 ± 5
Após 2ª extração	3,2 ± 0,9	0,7 ± 0,2	0,20 ± 0,002	4 ± 1
Total nos dois estágio	17 ± 2	4,0 ± 0,5	0,20 ± 0,01	23 ± 3

O segundo estágio de extração aumentou em quase 20% o teor de carotenoides no extrato lipídico, se comparado com dados obtidos em um só estágio, sem alterar de forma significativa a razão carotenoides/clorofila, comprovando a importância da re-extração. O extrato final obtido tem coloração verde bastante forte, devido à clorofila (Figura 14). Millao & Uquice (2016) analisaram a extração de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana* usando extrator com CO<sub>2</sub> supercrítico e obtiveram cerca de 0,75 mg de carotenoides/g de biomassa seca e 4,487 mg de carotenoides/g lipídios. Portanto, os resultados obtidos com a microalga pré-tratada em moinho de bola vibratório no qual se obteve um extrato com 23 ± 3 mg de carotenoides por grama de lipídios extraídos, foi cinco vezes maior que a encontrada por Millao & Uquice (2016), indicando que o rompimento da parede celular foi mais efetivo que o uso de fluídos supercríticos quando se trata de extração de compostos bioativos a partir de microalgas.

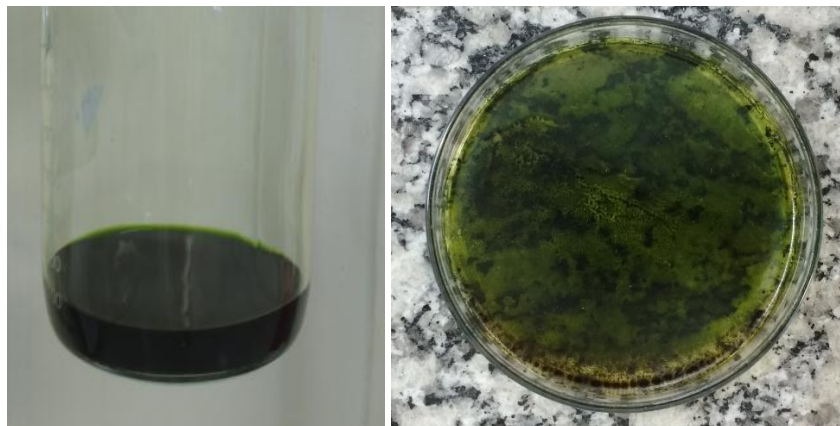


Figura 14 - Extrato rico em carotenoide obtido após extração da biomassa com etanol: a) em solução; b) seco.

A medida de capacidade antioxidante do extrato etanólico por espectrometria apresentou como resultado  $25 \pm 2 \mu\text{mol}$  de Trolox. $\text{g}^{-1}$  de biomassa utilizada na análise. Goiris *et al.* (2012) analisou a capacidade antioxidante do extrato obtido com etanol/água em diferentes microalgas e obteve o valor médio de  $25 \mu\text{mol}$  de Trolox. $\text{g}^{-1}$  de biomassa. Esse mesmo autor destaca de amostras com valor de TEAC acima de  $10 \mu\text{mol}$  de Trolox. $\text{g}^{-1}$  de biomassa são consideradas ricas em antioxidantes naturais, o que comprova o potencial antioxidante do extrato obtido a partir da *Chlorella sp.*.

A biomassa após primeiro estágio da extração apresentou uma quantidade de  $3,4 \pm 0,2$  de clorofila total e  $0,7 \pm 0,3$  de carotenoides. A biomassa residual apresentou a seguinte composição em base seca:  $65 \pm 4 \%$  de proteínas;  $4,7 \pm 0,3 \%$  de lipídios e  $6,9 \pm 0,5 \%$  de glicose. Por essa caracterização pode-se observar que não houve redução nas proporções de proteínas e de carboidratos da biomassa.

Na extração das proteínas com água obteve-se no extrato aquoso  $6,1 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de proteínas solubilizadas. A biomassa residual desse processo, após secagem por liofilização, apresentou, em base seca,  $61 \pm 5 \%$  de proteínas e  $6,7 \pm 0,3 \%$  de glicose. A partir deste resultado pode-se observar que o teor de glicose não foi modificado após extração aquosa e que o teor de proteína foi muito baixo, indicando um baixo percentual de proteínas solúveis.

Após hidrólise enzimática da microalga com a protease comercial ProteaseMax<sup>TM</sup>, contendo enzimas responsáveis por quebrar ligações peptídicas, obteve-se um rendimento de  $79 \pm 3 \%$ , gerando um extrato aquoso com  $53 \pm 2 \text{ g.L}^{-1}$ . A partir destes resultados pode-se observar a eficiência da hidrólise enzimática com a

enzima selecionada, que em pouco tempo de incubação (3 h) e com baixa carga enzimática (1%) obteve-se um alto rendimento além de um extrato aquoso rico em proteínas hidrolisadas.

A biomassa de *Chlorella* é rica em aminoácidos essenciais o que torna o extrato aquoso obtido na hidrólise com proteases um ingrediente potencial para aplicação e na área farmacêutica, para tratamento de doenças como fenilcetonúria e doença de Crohn, e em alimentos funcionais, para elaboração de bebidas energéticas por exemplo (CLEMENTE, 2000).

### 5.5 Biorrefinaria de microalga

A Figura 15 apresenta um diagrama simplificado para o processamento da preparação comercial de *Chlorella* sp. e o balanço de massa do processo.

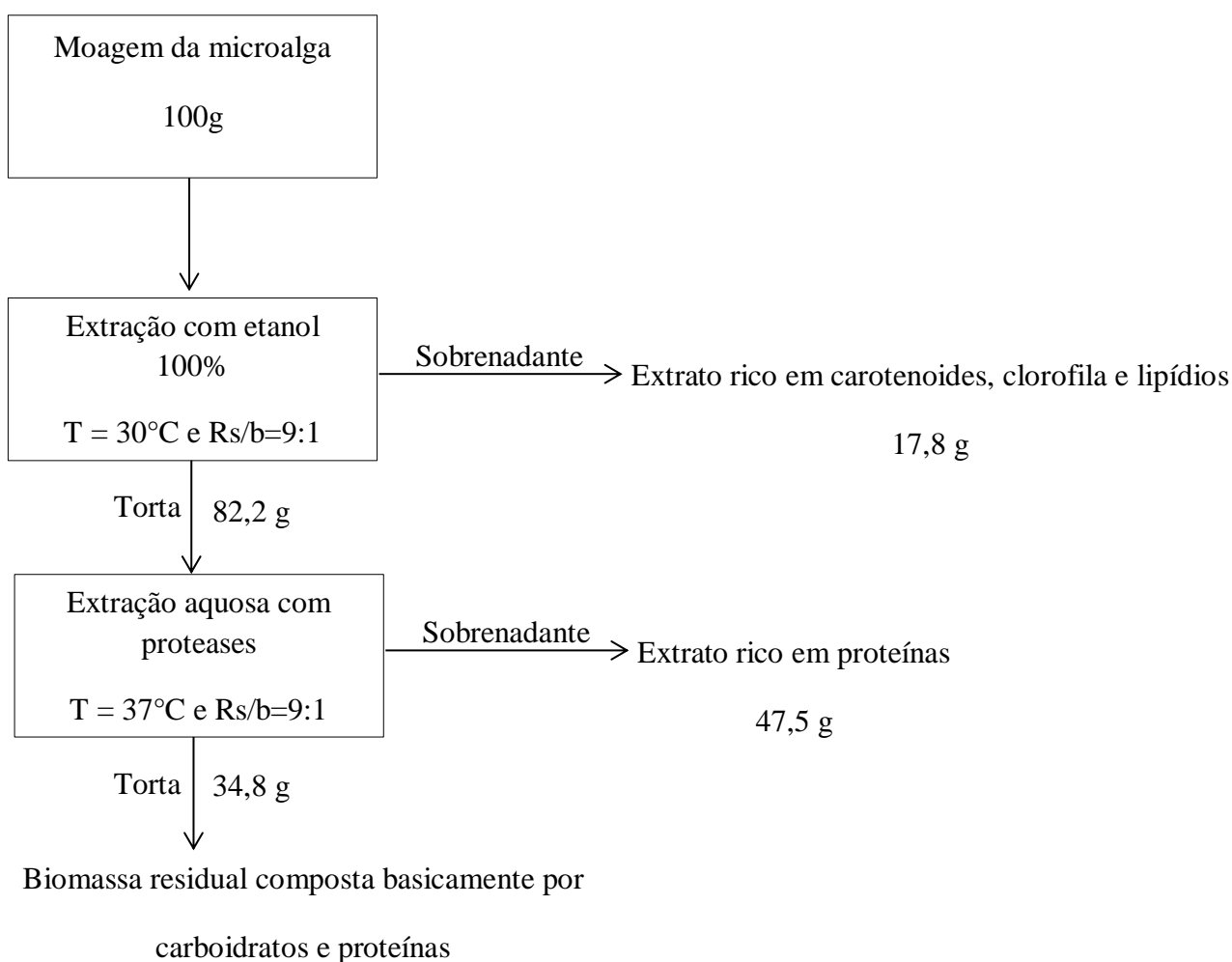


Figura 15 - Diagrama de blocos do processamento da microalga *Chlorella* sp.

## 6 CONCLUSÕES

- A preparação comercial de *Chlorella* sp. apresentou uma composição química percentual de:  $17,2 \pm 0,4$  de lipídios;  $52 \pm 1$  de proteínas e  $12 \pm 1$  de carboidratos.
- A extração dos carotenoides em reator de micro-ondas foi mais eficiente a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  que a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e que a razão solvente biomassa é um parâmetro significativo para a extração dos carotenoides, sendo assim, soluções mais diluídas resultam em extratos mais concentrados em carotenoides. Além disso, nas duas temperaturas um teor de água no etanol da ordem de 10% auxilia na extração dos carotenoides em reator de micro-ondas.
- A extração de carotenoides a partir da microalga moída apresentou resultados significativamente maiores, confirmando que o pré-tratamento em moinho de bolas é eficaz para ruptura da parede celular.
- O experimento em agitador orbital com a microalga moída indicaram que a temperatura mais branda ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), usando-se etanol absoluto, foi mais eficiente para a extração dos carotenoides da biomassa comercial.
- O extrato etanólico obtido apresentou um rendimento de  $4,0 \pm 0,5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de carotenoides e uma elevada atividade antioxidante ( $25 \pm 2\text{ }\mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  de biomassa), o que comprova seu potencial como ingrediente funcional.
- A hidrólise enzimática do resíduo protéico apresentou um rendimento superior a 78% indicando um potencial elevado de utilização do mesmo para produção de peptídeos funcionais.

## 7 SUGESTÕES PARATRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a cinética de moagem.
- Avaliar a cinética da hidrólise com proteases
- Identificar os carotenoides do extrato etanólico.
- Microencapsular o extrato etanólico obtido.
- Determinar a composição em peptídeos e aminoácidos do extrato aquoso obtido após hidrólise com a protease.
- Avaliar a quantidade de compostos fenólicos e fibras alimentares no extrato aquoso e na biomassa residual.

## 8 BIBLIOGRAFIA

ABNewswire - Global Carotenoids Market Is Projected To Reach US\$ 1,710.92 By 2022 – Credence Research <[http://www.abnewswire.com/pressreleases/global-carotenoids-market-is-projected-to-reach-us-171092-by-2022-credence-research\\_106665.html](http://www.abnewswire.com/pressreleases/global-carotenoids-market-is-projected-to-reach-us-171092-by-2022-credence-research_106665.html)>. Acessado em 19/04/2017.

AGUILAR, C.P.; GONZÁLEZ, M.; CIFUENTES, A.S.; SILVA, M. Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyceae) from the northern and central coast of Perú. **J. Chil. Chem. Soc.**, v.49 n.1, 2004.

ALABI, A. O.; TAMPIER, M.; BIBEAU, E. Microalgae technologies & processes for biofuel/bioenergy production in british columbia. [S.l.]: **Seed Science**, 2009.

AMBRÓSIO, C. L.; CAMPO, F. de A. C. e S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 2, n. 19, p. 233-243, 2006.

ANDRADE, M. R. **Biosistema para produção de Biomassa Microalgal e Biometano**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. **Trends Food Sci Technol**, 8:406–413, 1997.

AZEVEDO, V.B.S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o brasil**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BARBOSA, M. M. **Obtenção de carotenoides de flavonoides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática e prensagem**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, The Global Market for Carotenoids, 2015. Disponível em: <[https://cdn2.hubspot.net/hubfs/308401/FOD%20Report%20Overviews/FOD025E\\_Report%20Overview.pdf?utm\\_campaign=FOD025E&utm\\_source=hs\\_automation&utm\\_me](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/308401/FOD%20Report%20Overviews/FOD025E_Report%20Overview.pdf?utm_campaign=FOD025E&utm_source=hs_automation&utm_me)

dium=email&utm\_content=39596766&\_hsenc=p2ANqtz-8z7Mvjy-mj8UbWfRO9wGZQTOb0XGfVh0H8Qlkxysw\_9U6RArUFGSXTiJW-fLXyoiyEVhIpDgRbimnpSJEbmURwH-bBPQ&\_hsmi=39596766> Acessado em 19/04/2017

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, 1994.

BEGUM, H.; YUSOFF, F.M.; BANERJEE, S.; KHATOON, H.; SHARIFF, M. Availability and utilization of pigments from microalgae. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 2015.

BEHRENS, PW. Photobioreactors and fermentors: the light and dark sides of growing algae. In: ANDERSEN, R.A. **Algal culturing techniques**. Oxford: Elsevier; pp. 189–204, 2005.

BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J. E. W.; RAO, D. V. S. The Alga *Dunaliella*. **Science publishers**, 555 p, 2009.

BENEMANN, J.R.; OSWALD, W.J. **Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO<sub>2</sub> to biomass**. Final Report to US Department of Energy, National Energy Technology Laboratory, Pittsburgh, PA, USA, 1996.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Physiol.** 37, 911–917, 1959.

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

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, 70(1-3): 313-321, 1999.

BRAVI, E.; PERRETTI, G.; MOTANARI, L.; FAVATI, F.; FANTOZZI, P. Supercritical fluid extraction for quality control in beer industry. **J. Supercrit. Fluids**, 42, 342–346, 2007.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14, 557–577, 2010.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, 9, 1551–1558, 1995.

CAMEJO, D.; JIMÉNEZ, A.; ALARCÓN, J.J.; TORRES, W.; GÓMEZ, J.M.; SEVILLA, F. Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants. **Funct. Plant Biol.**, 33, 177–187, 2006.

CHA, K.H.; LEE, H.J.; KOO, S.Y.; SONG, D.G.; LEE, D.U.; PAN, C.H. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. **J. Agric. Food Chem.** 58:793–7, 2010.

CHACÓN-LEE, T.L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G.E. Microalgae for “Healthy” foods – possibilities and challenges. **Compr. Rev. Food Sci. Saf.** 9:655–75, 2010.

CHAN, M-C; HO, S-H; LEE, D-J; CHEN, C-Y; HUANG, C-C; CHANG, J-S. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Biochemical Engineering Journal**, 78, 24–31, 2013.

CHEN, C-Y; JESISCA; HSIEH, C.; LEE, D-J; CHANG, C-H; CHANG, J-S. Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. **Bioresource Technology**, 200, 500–505, 2016. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25(3), 294–306, 2007.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 254-262, 2000.

COPLIN, L. G. **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington: The National Academies Press, 2012.

COSTA, J. V.; MORAIS, M. G. An Open Pond System for Microalgal cultivation. In: PANDEY, A.; LEE, D.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. **Biofuels from Algae**. Elsevier, São Diego, 2014.

CYANOTECH CO. < <http://www.cyanotech.com/>> Acessado em: 22/11/2015

QUEIROZ, D.; PAIVA, A.A.; PEDRAZA, D.F.; CUNHA, M.A.L.; ESTEVES, G.H.; LUNA, J.G.; DINIZ, A.D. Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. **Rev Saúde Pública**, 47(2):248-56, 2013.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed, São Paulo, 2010.

DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y.; MORENO, M.; LEBSKY, V.K.; BUSTILLOS, J.J. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. When co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Can J Microbiol**. 48:514–21, 2002.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technol. Biotechnol**. 44 (3) 313–321, 2006.

DEL CAMPO, J.A.; RODRÍGUEZ, H.; MORENO, J.; VARGAS, M.A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M.G. Accumulation of astaxanthin and luteinin *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 64: 848–854 DOI 10.1007/s00253-003-1510-5, 2004.

DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. **Science**, 298:2149–2153, 2002.

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

DUARTE, D. R. S. **Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ômega 3**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S.M.; BLANC, P.; MURTHY, K.N.C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? **Trends Food Sci. Technol**. 16, 389–406, 2005.



EL-BAKY, H.H.A.; EL-BAZ, F.K.; EL-BAROTY, G.S. *Spirulina* species as a source of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol and its anticarcinoma factors. **Biotechnology**, 2, 22–240, 2003.

EONSEON, J.; POLLE, J.E.W.; LEE, H.K.; HYUND, S.M.; CHANG, M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Microb. Biotechnol.** 13, 165–174, 2003.

ERIKSEN, N. "The technology of microalgal culturing." **Biotechnology Letters**, 30(9): 1525-1536, 2008.

FAJARDO, A.R.; CERDAN, L.E.; MEDINA, A.R.; FERNANDEZ, F.G.A.; MORENO, P.A.G.; GRIMA, E.M. Lipid extraction from the microalga *Phaedactylum tricornutum*. **European Journal of Lipid Science Technology**, 109:120–6, 2007.

FENNEMA, O.R. Food Chemistry; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1999.

FORJÁN, E.; GARBAYO, I.; CASAL, C.; VÍLCHEZ, C. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.**, 2007.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GLOBAL MARKET INSIGHTS < <https://www.gminsights.com/industry-analysis/lutein-market>> Acessado em: 23/08/2017.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, 2016.

GONZALEZ, L.E.; BASHAN, Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when co immobilized and co cultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:1527–31, 2000.

JONG, E.D.; JUNGMEIER, G. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. In: PANDEY, A. HÖFER, R.; TAHERZADEH, M.; NAMPOOTHIRI,

K.M.; LARROCHE, C. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier, Netherlands, 2015.

GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; BRABANTER, J.D.; COOMAN, L.D. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **J. Appl. Phycol.**, 2012.

GROSSMAN, A.R., LOHR, M., IM, C.S. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. **Annu. Rev. Genet.** 38, 119–173, 2004.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M.H.M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, 33 243–260, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: New York, NY, USA, 2007.

HARRISON, P. J., BERGES, J.A. Marine Culture Media. In: ANDERSEN, R.A. **Algal culturing techniques**. Oxford: Elsevier; pp. 21-33, 2005.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Ediciones S.A. Urano, Barcelona, 1994.

HO, S-H., CHEN, C-Y., CHANG, J-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology** 113, 244–252.

HO, S-H; CHAN, M-C; LIU, C-C; CHEN, C-Y; LEE, W-L; LEE, D-J; CHANG, J-S. Enhancing Lutein Productivity of an Indigenous Microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 Using Light-Related Strategies. **Bioresource Technology**, 152, 275-282, 2014.

HUNTLEY, M., REDALJE, D. CO<sub>2</sub> Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, 12(4): 573-608, 2007.

TAUCHER, J.; BAER, S.; SCHWERNA, P.; HOFMANN, D.; HÜMMER, M.; BUCHHOLZ, R.; BECKER, A. Cell Disruption and Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids from Microalgae. **J. Thermodyn Catal**, 7: 158, 2016.

KITADA, K.; MACHMUDAH S.; SASAKI, M.; GOTO, M.; NAKASHIMA, Y.; KUMAMOTO, S.; HASEGAWA, T. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment component with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 84:657–61, 2009.

KONG, W.; LIU, N.; ZHANG, J.; YANG, Q.; HUA, S.; SONG, H.; XIA, C. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. **J. Food Sci. Technol.** 1–8, 2012.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, 30, 620–650, 2002.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol. Aspects Med.**, 26:459–516, 2005.

KUMAR, D.; SINGH, B.; KORSTAD, J. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 73:654–671, 2017.

LAMERS, P. P.; VAN DE LAAK, C. C. W.; KAASENBROOD, P. S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, v. 106, p. 638-648, 2010.

LEBSKY, V.K.; GONZALEZ-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Can J. Microbiol.** 47:1–8, 2001.

LEE, J-Y; YOO, C.; JUN, S-Y; AHN, C-Y; OH, H-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, 101, S75–S77, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4 ed. Sarvier, São Paulo, SP, 2006.

LEMAHIEU, C.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; MUYLAERT, K.; BUYSE, J.; FOUBERT, I.; Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. **Food chemistry**, 141(4), 4051–4059, 2013.

LI, H-B; JIANG, Y.; CHEN, F. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. **J. Agric. Food Chem.** 50:1070–2, 2002.

LICHTENTHALER, H.K. **Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes.** Methods in Enzymology, 148: 350-382, Academic Press Inc., New York, 1987.

LIMÓN, P.; MALHEIRO, R.; CASAL, S.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; RODRIGUES, N.; CRUZ, R.; BERMEJO, R.; PEREIRA, J.A. Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. **Food Chemistry**, 175, 203-211, 2015.

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

MENDES, R.L.; NOBRE, B.P.; CARDOSO, M.T.; PEREIRA, A.P.; PALAVRA, A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorg. Chim. Acta.** 356:328–34, 2003.

MENÉNDEZ, J.M.B; ARENILLAS, A.; DÍAZ, J.A.M.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G. Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnolog**, 89 (11), 1779-1784, 2014.

MILLET; M.A.; BAKER, A.J.; SATTER, L.D. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology Bioengineering Simp.* V.6, p. 125 – 153, 1976

MILLAO, S.; Uquiche, E. Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids.** 116, 223–231, 2016.

MINHAS, A.K.; HODGSON, P.; BARROW, C.J.; ADHOLEYA, A. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, 2016.

MOJAAT, M.; FOUCAULT, A.; PRUVOST, J.; LEGRAND, J. Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina*. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 433-441, 2008.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renew Sustain Energy Rev.** 14:578–97, 2010.

NISAR, N., LI, L., LU, S., KHIN, N.C., POGSON, B.J. Carotenoid metabolism in plants. **Mol. Plant.**, 8:68–82, 2015.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photo-bioreactors. **J. Appl. Phycol.**, 12, 499–506, 2000.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, 20(4–6): 459-466, 2003.

PATRICK, L. The controversy continues beta carotene. **J. Altern.Med.**, Rev. 5, 530–545, 2000.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology concepts and applications**. Copyright, EUA, 1993.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 26, N. 9/10, p. 1231–1237, 1999

PETROALGAE <<http://www.parabel.com/>> Acessado em: 28/11/2015

PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B. de; SOUSA, M. B. de; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Teores de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno em macroalgas marinhas desidratadas. **Revista de Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 257-262, 2008.

POWELL, E.E.; HILL, G.A. Economic assessment of an integrated bioethanol-biodiesel-microalgal fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. **Chemical Engineering Research and Design**, 87, 1340-1348, 2009.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e nutrição**, v. 14, p. 237-250, 2003.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57: 287-293, 2001.

RAMEL, F.; BIRTIC, S.; GINIES, C.; SOUBIGOU-TACONNAT, L.; TRIANTAPHYLIDES, C.; HAVAUX, M. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 109, 5535–5540, 2012.

RIBEIRO, B.D.; NASCIMENTO, R.F.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z.; FREITAS, S.P. An ethanol-based process to simultaneously extract and fractionate carotenoids from *Mauritia flexuosa* L. Pulp. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 32, n. 3, p. 657-663, 2010.

RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z. Technological Aspects of  $\beta$ -Carotene Production. **Food Bioprocess Technol.**, 4:693–701, 2011.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell science, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.

SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; SILVESTRE, F.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P-Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **J Appl Phycol**. 25:523–9, 2013.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 35, 265–278, 2014.

SÁNCHEZ, J.F.; FERANADEZ, J.M.; ACIÉN ,F.G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, 43 398–405, 2008.

SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; CARVALHO, F. C.; NETO, A. N.; MARQUES, S. A. Tendências de mercado para corantes na indústria de alimentos. **Agricultura em São Paulo**, v. 39, p. 1-50, 1992.

SCHROEDER, W.A.; JOHNSON, E.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.270, p. 18374-18379, 1995.

SHEEHAN, J. Engineering direct conversion of CO<sub>2</sub> to biofuel. **Nature Biotechnology**, 27, 1128–1129, 2009.

SIAUT, M., CUINÉ, S., CAGNON, C., FESSLER, B., NGUYEN, M., CARRIER, P., BEYLY, A., BEISSON, F., TRIANTAPHYLIDÈS, C., LI-BEISSON, Y., PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, 11:7, 2011.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renew Sustain Energy Rev**.14:2596–610, 2010.

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOUZA, M.F.; PEREIRA, D.S.; FREITAS, S.P.; BOM, E.P.S; RODRIGUES, M.A. Neutral sugars determination in *Chlorella*: Use of a one-step dilute sulfuric acid hydrolysis with reduced sample size followed by HPAEC analysis. **Algal Research**, 24 130–137, 2017.

SPOLAORE, P., JOANISS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101(2), 87–96, 2006.

Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101, 87:96, 2006.

TAIWAN *Chlorella* MANUFACTURING COMPANY  
<<http://www.taiwanchlorella.com/>> Acessado em: 28/11/2015

TORRISEN, O. J. Strategies for Salmonid pigmentation. **Journal of Applied Research and Technology**, n. 11, p. 276-278, 2005.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. Effect of culture conditions on growth of green alga *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. **Acta Physiologiae Plantarum**, Volume 24, Issue 3, pp 323-329, 2002.

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

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VARELA, J.C.; PEREIRA, H.; VILA, M.; LEÓN, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynth. Res.**, 125, 423–436, 2015.

VIÊGAS, C.V. **Produção de biodiesel e de coprodutos a partir de microalgas comerciais: abordagem de biorrefinaria**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

YAMAMOTO, M.; FUJISHITA, M.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **J. Plant Res.** 117, 257–264, 2004.

YE, Z.W.; JIANG, J.G.; WU, G.H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. **Biotechnol. Adv.**, 26, 352–360, 2008.

YING SHEN, Y.; PEI, Z.; YUAN, W.; MAO, E. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. **Int. J. Agric. & Biol. Eng.**, Vol. 2 No.1, 2009.



WANG, Q.; FENG, L.; LUO, W.; LI, H.; ZHOU, Y.; YU, X. Effect of inoculation process on lycopene production by *Blakeslea trispora* in a stirred-tank reactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 175, 770–779, 2015.

ZENG, X.; DANQUAH, M.K.; CHEN, X.D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 5 n. 6, p. 3252-3260, 2011.

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwave. **Appl Biochem Biotechnol**, 164:1215-1224, 2011.