

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

ANA LUISA KIRSTEN DA SILVA

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE PIGMENTOS CAROTENOIDES:

Tendências, novas tecnologias e aplicações

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO – PR

2021

ANA LUISA KIRSTEN DA SILVA

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE PIGMENTOS CAROTENOIDES:

Tendências, novas tecnologias e aplicações

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscila Vaz de Arruda.

TOLEDO – PR

2021

ANA LUISA KIRSTEN DA SILVA

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE PIGMENTOS CAROTENOIDES:

Tendências, novas tecnologias e aplicações

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscila Vaz de Arruda.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tatiana Shioji Tiuman
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Cleverson Busso
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Priscila Vaz de Arruda
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Marcia e Sergio, aos quais sou eternamente grata por todo apoio, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo durante essa caminhada chamada de vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Priscila Vaz de Arruda, por estar ao meu lado ao longo da graduação e por todas as orientações durante esse percurso, pelo apoio, paciência, confiança e incentivo que sempre demonstrou comigo, e também por todo o ensinamento e contribuições para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu psicólogo, Raphael Klein, por acalmar meus ânimos e sempre me atender com seu bom humor característico.

Aos meus amigos — vocês sabem quem são — por me ouvirem falar sobre meu TCC de forma constante, por me ajudarem com conversas construtivas e por sempre me incentivarem a continuar.

Para todos aqueles que, direta ou indiretamente, têm me ouvido falar sobre carotenoides desde que minhas pesquisas sobre o assunto me encantaram de tal forma que levaram ao desenvolvimento deste trabalho, permita-se viver o colorido do mundo mesmo que os dias estejam nublados.

Agradeço também à banca, professor Cleverson e professora Tatiana, pelas excelentes considerações, que proporcionaram enriquecimento do trabalho.

“Na natureza, a luz cria a cor. Na imagem, a cor cria a luz”.
-Hans Hofmann

RESUMO

A produção de carotenoides tem se mostrado cada vez mais relevante, seja para sua utilização como pigmentos ou como bioativos para tratamento de doenças e suplementação alimentar, tanto humana quanto animal. Esses compostos são naturalmente produzidos por plantas ou por algumas espécies de microrganismos, como resposta a alguns tipos de estresse ambiental, como excesso de luminosidade, e cuja coloração varia entre o amarelo e o vermelho. Em âmbito industrial, os carotenoides podem ser produzidos por síntese química ou por extração de plantas, algas e microrganismos, sendo o último com grande potencial, mas ainda pouco explorado. Esses pigmentos podem gerar diversos benefícios à saúde humana, como atividade antioxidante, atuarem como precursores de vitamina A e regulação do sistema imunológico. Neste sentido, o presente trabalho visou realizar uma revisão da bibliografia a respeito das pesquisas envolvendo o tema, em relação ao mercado, às tendências, à produção biotecnológica, à utilização de resíduos agroindustriais para sua produção e às novas descobertas envolvendo a utilização desses compostos na prevenção e tratamento de doenças.

Palavras-chave: Microrganismos. Biotecnologia. Resíduos agroindustriais. Biopigmentos.

ABSTRACT

The production of carotenoids has been shown to be increasingly relevant, either for their use as pigments or as bioactives for the treatment of diseases and food supplementation, both human and animal. These compounds are naturally produced by plants or by some species of microorganisms, in response to some categories of environmental stress, such as excessive light, and whose color varies between yellow and red. In the industrial scope, carotenoids can be produced by chemical synthesis or by extraction from plants, algae and microorganisms, the latter with great potential, but still little explored. These pigments can generate several benefits to human health, such as antioxidant activity, acting as vitamin A precursors and regulating the immune system. In this sense, the present work aimed to carry out a review of the bibliography regarding research involving the subject, in relation to the market, trends, biotechnological production, the use of agro-industrial residues for its production and the new discoveries involving the use of these compounds in prevention and treatment of diseases.

Keywords: Microorganisms. Biotechnology. Agro-industrial waste. Biopigments.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular do (a) licopeno, (b) α -caroteno e (c) β -caroteno..... | 16 |
| Figura 2 – Estrutura química da luteína, um exemplo de xantofila..... | 17 |
| Figura 3 – Comparação entre espectros de UV/Vis das moléculas de licopeno e β -caroteno..... | 18 |
| Figura 4 - Síntese química dos carotenoides e possíveis radicais presentes nos sais de fosfônio..... | 20 |
| Figura 5 – Laguna Hutt, em Mid Western, Austrália, lago de água salgada utilizado para produção comercial de <i>D. salina</i> | 25 |
| Figura 6 – Presença de astaxantina em células de <i>Haematococcus pluvialis</i> | 26 |
| Figura 7 – Presença de β -caroteno nos micélios do fungo <i>B. trispora</i> | 27 |
| Figura 8 – Mutantes de <i>X. dendrorhous</i> obtidas após tratamento com NTG: A) espécie selvagem, B) vermelho, C) alaranjado pálido, D) branco, E) amarelo e F) cor-de rosa pálido..... | 28 |
| Figura 9 – Placa de Petri contendo colônias de <i>Micrococcus luteus</i> | 29 |
| Figura 10 – Colônias de <i>Kocuria rhizophila</i> , mostrando sua pigmentação amarela..... | 30 |
| Figura 11 - Via do mevalonato..... | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Microrganismos e carotenoides produzidos..... | 31 |
| Tabela 2 – Noroisoprenoides e sua ocorrência em plantas e microrganismos..... | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| DLC | Duplas ligações conjugadas |
| DMAPP | Dimetilalil-pirofosfato |
| HAT | Ensaio antioxidante baseado em transferência de átomo de hidrogênio |
| HCl | Ácido clorídrico |
| IPP | Isopentenil-pirofosfato |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| MEP | 2-C-metil-D-eritrol |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NTG | N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SET | Ensaio antioxidante baseado em transferência de elétron único |
| TAB | Tecido adiposo branco |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 13 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 13 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 3.1 | Carotenoides | 14 |
| 3.1.1 | Estrutura, classificação e nomenclatura..... | 16 |
| 3.1.2 | Propriedades físico-químicas..... | 17 |
| 3.1.3 | Mercado | 18 |
| 3.1.4 | Síntese química..... | 19 |
| 3.1.5 | Produção de carotenoides por plantas | 20 |
| 3.1.6 | Produção de carotenoides por algas..... | 22 |
| 3.2 | Produção de carotenoides por microrganismos..... | 23 |
| 3.2.1 | <i>Dunaliella salina</i> | 24 |
| 3.2.2 | <i>Haematococcus pluvialis</i> | 26 |
| 3.2.3 | <i>Blakeslea trispora</i> | 27 |
| 3.2.4 | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | 27 |
| 3.2.5 | <i>Micrococcus sp.</i> | 28 |
| 3.2.6 | <i>Kocuria rhizophila</i> | 29 |
| 3.2.7 | <i>Archaea</i> | 30 |
| 3.2.8 | Engenharia metabólica de microrganismos | 31 |
| 3.2.9 | Engenharia genética de microrganismos | 32 |
| 3.2.10 | Nutrição microbiana e meios de cultivo alternativos para produção de carotenoides | 33 |
| 3.2.10.1 | Melaço de cana | 34 |
| 3.2.10.2 | Resíduos de arroz..... | 35 |
| 3.2.10.3 | Outros resíduos | 35 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.11 | Biossíntese de carotenoides | 36 |
| 3.2.12 | Processos de extração e purificação | 38 |
| 3.2.13 | Ampliação de escala | 39 |
| 3.3 | Funções e Aplicações dos carotenoides | 40 |
| 3.3.1 | Atividade pró-vitamínica..... | 40 |
| 3.3.2 | Atividade antioxidante..... | 42 |
| 3.3.3 | Atividade anti-obesidade | 43 |
| 3.3.4 | Carotenoides no combate ao câncer | 44 |
| 3.3.5 | Carotenoides na saúde embrionária e neonatal..... | 45 |
| 3.3.6 | Produção de compostos de aroma a partir de carotenoides | 46 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 49 |
| | REFERÊNCIAS | 50 |

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos são seres vivos individualmente muito pequenos para serem visualizados a olho nu, que podem ser encontrados em praticamente todos os ecossistemas, até mesmo nos locais mais extremos. Dessa forma, eles se adaptam às condições existentes no nicho em que se encontram, produzindo compostos que permitem sua sobrevivência. Entre esses compostos, estão os carotenoides, pigmentos naturais sintetizados como resposta ao estresse ambiental e que possuem um papel importante na proteção do microrganismo contra os efeitos da luz (NIERO, 2018).

Carotenoides são moléculas isoprenoides derivadas de uma estrutura de 40 carbonos, que apresentam simetria invertida no centro (FRASER, 2004). Eles podem ser produzidos por microrganismos ou plantas e possuem coloração que varia entre o amarelo e o vermelho, com mais de 600 estruturas já caracterizadas, e são divididos em dois grupos: os carotenos, formados apenas por carbono e hidrogênio, que são apolares, e as xantofilas, que possuem grupos oxigenados, além de uma baixa polaridade (FRASER, 2004; PFANDER, 1992; BRITTON, 1985).

As propriedades dos carotenoides, responsáveis por suas funções e ações, estão relacionadas com a estrutura das moléculas (BRITTON, 2008). Esses compostos podem oferecer diversos benefícios à saúde humana, como alto poder antioxidante e atividade pró-vitamina A, além de poder de fotoproteção para os olhos, na prevenção de doenças crônicas e no fortalecimento do sistema imunológico, os quais os tornam compostos comercialmente desejáveis, seja na área alimentícia, farmacêutica ou cosmética (FRASER, 2004; PACKER, 2004; PANIAGUA-MICHEL, 2012).

Devido às vastas aplicações dos carotenoides e pela crescente busca pela utilização de compostos naturais em detrimento dos de origem sintética, sua produção por via biotecnológica tem se tornado interessante do ponto de vista econômico e ambiental, pois possibilita a utilização de substratos de baixo valor agregado e, diferentemente da produção por extração vegetal, não necessita de grandes áreas para cultivo, além de ser independente de condições climáticas (SILVA, 2004).

Neste contexto, este trabalho foi elaborado com a finalidade de realizar uma revisão de trabalhos já publicados referentes às pesquisas envolvendo a produção biotecnológica de carotenoides, assim como suas utilizações, características, principais microrganismos envolvidos, mercado e tendências.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Apresentar o estado da arte referente à produção biotecnológica de carotenoides.

2.2 Objetivos específicos

- Apresentar o andamento das pesquisas referentes ao tema;
- Descrever os principais microrganismos utilizados na obtenção de carotenoides;
- Apresentar as tendências e potenciais utilizações relativas a estes pigmentos;
- Identificar os fatores que influenciam na produção por via biotecnológica;
- Apresentar o mercado atual de pigmentos naturais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carotenoides

O crescimento mundial da população faz com que ocorra o aumento no consumo de alimentos, medicamentos e cosméticos, o que vem despertando a busca por estratégias para atrair o consumidor, como a melhoria de características do produto como cor, sabor e odor. Os corantes são substâncias que apresentam cor na região do espectro visível e são utilizadas em diversos tipos de produtos para aumentar sua atratividade (VERMA; GUPTA, 2017). Arqueólogos estimam que os corantes passaram a ser utilizados em alimentos por volta de 1500 a.C., sendo obtido através de fontes naturais, como páprica, açafrão, pétalas de flores, extrato de beterraba, entre outros (BURROWS, 2009). Tais corantes podem ser de origem sintética ou natural, sendo o primeiro caso o mais utilizado, assim como mais relacionado a problemas ambientais e de saúde (VERMA; GUPTA, 2017).

Apesar dos corantes sintéticos apresentarem uma legislação muito severa atualmente, com número reduzido de substâncias que podem ser utilizadas devido aos seus efeitos prejudiciais a curto ou longo prazo, como reações alérgicas, piora em casos de hiperatividade, efeito genotóxico e até desenvolvimento de alguns tipos de câncer, ainda são os mais utilizados pela indústria de alimentos, por serem mais baratos e resistentes à exposição à luz e variações de temperatura e pH (KANAREK, 2011; CHUNG, 2016; ZANONI; YAMANAKA, 2016).

Além dos produtos citados, os corantes também são amplamente utilizados na indústria têxtil e na coloração de bens e objetos, sendo os têxteis os que mais impactam no meio-ambiente, que, em sua maioria, pertencem ao grupo azoico, e podem causar problemas de ecotoxicidade em organismos aquáticos, além de relatos de intoxicação laboral, que incluem surgimento de asma, eczema, dermatite de contato, irritação nos olhos, dentre outros problemas. Desta forma, a substituição por corantes não-sintéticos é interessante pela diminuição da quantidade de resíduos tóxicos gerados, os quais podem contaminar o solo e fontes naturais de água, causando sérios problemas ambientais (GHALY *et al.* 2014; MIRJALILI, NAZARPOOR, KARIMI, 2011; CHUNG, 2016).

A busca por novos corantes naturais pode ser explicada pela menor toxicidade em sua produção e descarte em relação aos sintéticos, além de serem considerados mais seguros para uso nas indústrias alimentícia e farmacêuticas (TULI *et al.* 2015). Os corantes naturais também são biodegradáveis, enquanto que os sintéticos, muitas vezes produzidos a partir do petróleo, o que lhes caracterizam, em sua maioria, como xenobióticos. Essa classificação significa que os

microrganismos presentes no meio ambiente não possuem enzimas específicas capazes de degradá-los, gerando acúmulo desses compostos na natureza (ALI, 2010; MIRJALILI, NAZARPOOR, KARIMI, 2011). Dentre os corantes naturais mais conhecidos, encontra-se a família dos carotenoides.

Carotenoides são uma família de pigmentos que podem ser sintetizados por plantas ou microrganismos, cuja coloração varia entre amarelo, alaranjado e vermelho. São a classe mais difundida de pigmentos na natureza, uma vez que possuem cerca de 1100 estruturas caracterizadas (FRASER, 2004; PÉREZ-GÁLVEZ; VIEIRA; ROCA, 2020). Eles podem ser divididos em dois grupos baseados em sua estrutura molecular, sendo eles o dos carotenos e o das xantofilas. Enquanto que os carotenos são hidrocarbonetos, ou seja, compostos apenas por carbono e hidrogênio, as xantofilas possuem funções orgânicas oxigenadas (PFANDER, 1992).

Historicamente, o primeiro caroteno foi isolado em 1831, por Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder. Posteriormente, Berzelius denominou os pigmentos amarelos obtidos das folhas de outono de xantofilas, sendo *xanthos* a palavra grega para a cor amarela e *phyll* para folha. Em 1902, foi publicada uma monografia que listava aproximadamente 800 referências da literatura a respeito de carotenoides, porém uma quantidade muito pequena de pigmentos purificados era conhecida. A primeira separação e purificação de carotenoides pode ser creditada ao botânico russo Tswett, nos anos de 1906 e 1911, respectivamente, que inventou a cromatografia para a separação de pigmentos de folhas. Essa invenção foi seguida do extenso trabalho sobre a química e separação dos carotenoides por Wilstätter, que recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1915 por suas descobertas na área (ISLER, 1971; GOVINDJEE, 1999).

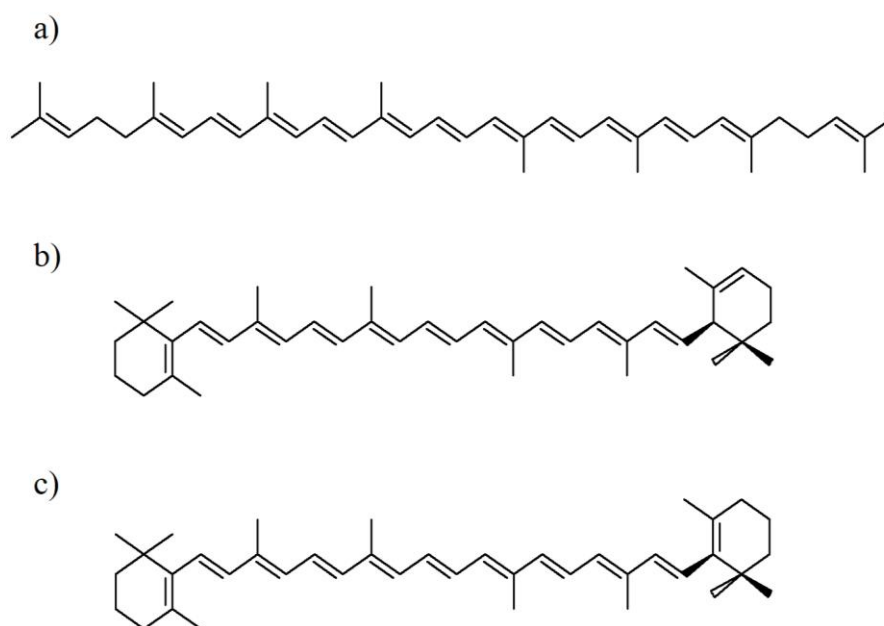
Os carotenoides possuem diversos efeitos benéficos à saúde, com uma ótima capacidade antioxidante, além de atuarem como precursores de vitamina A e terem um importante papel na fotoproteção dos olhos, no aprimoramento das funções imunológicas e na prevenção de doenças crônicas (ARSCOTT, 2013). Por conta desses benefícios, os carotenoides são produtos comerciais desejáveis, sendo utilizados como corantes e suplementos alimentares em indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (PANIAGUA-MICHEL, 2012). Apesar da grande quantidade de carotenoides descritos na literatura, os padrões alimentares do ser humano provêm do acesso regular a cerca de 40 deles, e os principais carotenoides encontrados nos tecidos humanos são α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina (PÉREZ-GÁLVEZ; VIEIRA; ROCA, 2020).

3.1.1 Estrutura, classificação e nomenclatura

Todos os carotenoides podem ser formalmente derivados de uma estrutura acíclica de $C_{40}H_{56}$, tendo uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas (PFANDER, 1992). Também podem ocorrer estruturas com 30 carbonos, denominadas diapocarotenoides, e com 50 carbonos, denominadas homocarotenoides (BRITTON, 1985). Essas estruturas são isoprenoides geralmente constituídas por oito unidades de isoprenos unidas e apresentam simetria invertida no centro. A característica mais evidente nas moléculas dos carotenoides é a longa cadeia de polieno, que pode conter de três a 15 ligações duplas conjugadas (FRASER, 2004). Em algumas moléculas, ocorre ciclização do esqueleto de carbono em uma ou em ambas as extremidades da cadeia. Já as xantofilas derivam dos carotenos pela introdução de funções orgânicas oxigenadas. Modificações envolvendo alongamento ou degradação da cadeia também podem ocorrer (PFANDER, 1992).

Apenas no início da década de 1930 que as três estruturas básicas de carotenoides foram elucidadas, sendo elas o licopeno, o α -caroteno e o β -caroteno (Figura 1). Todos os carotenoides naturais conhecidos são variações dessas três estruturas (GOODWIN, 1993). As diferenças nas estruturas ocorrem por diversos tipos de reação, como hidrogenação, ciclização, oxidação, entre outras, desde que os agrupamentos metil no centro da estrutura sejam mantidos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Figura 1 - Estrutura molecular do (a) licopeno, (b) α -caroteno e (c) β -caroteno.



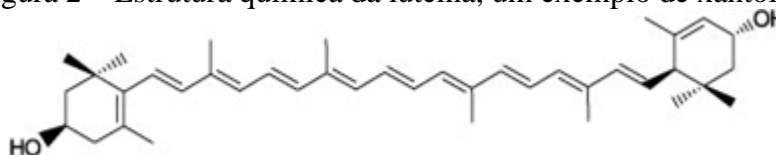
Fonte: A autoria própria, (2021), utilizando-se o *software* AutoCad, baseado em Goodwin (1993).

A nomenclatura mais estabelecida e comumente utilizada é a trivial, relacionada com o local de onde o composto foi primeiramente isolado ou observado. Já a nomenclatura IUPAC é dada pela palavra caroteno unida a duas letras gregas referentes aos dois grupos terminais da molécula como prefixo, enquanto que as denominações das xantofilas são relativas às regras usuais de nomenclatura utilizadas na química orgânica (BRITTON, 1985; PFANDER, 1992).

3.1.2 Propriedades físico-químicas

Os carotenos são típicos hidrocarbonetos apolares, enquanto que as xantofilas apresentam alguma polaridade, ainda que não o suficiente para torná-las solúveis em água (BRITTON, 1985). Por conta disso, os solventes utilizados na extração desses pigmentos devem possuir polaridade adequada, ou seja, apolares e pouco polares, respectivamente (ROMERO, 2012). A Figura 2 mostra um exemplo de xantofila.

Figura 2 – Estrutura química da luteína, um exemplo de xantofila.



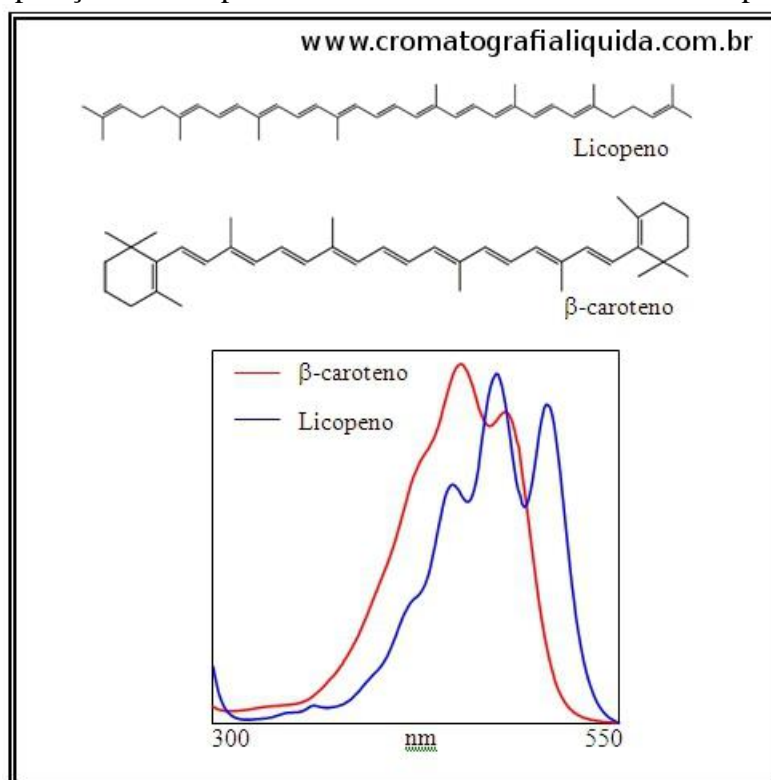
Fonte: PIRES, (2010).

As ligações duplas presentes na molécula determinam sua capacidade de absorção da luz e sua reatividade química (BRITTON, 2008). Esse sistema de duplas ligações é denominado cromóforo e é responsável pela absorção de cor na região do visível (entre 400 e 500 nm), ou seja, está diretamente ligado à coloração dos compostos (ARMSTRONG, 1996). A absorção de luz nessa região faz com que ocorra excitação dos elétrons e, como as duplas ligações conjugadas (DLC) da molécula diminuem a quantidade de energia necessária para promover essa excitação, quanto maior a quantidade de duplas ligações conjugadas, maior o valor do comprimento de onda máximo de absorção (PACHECO, 2009).

Para que seja observada coloração nas moléculas dos carotenoides, são necessárias ao menos 7 DLC, como é o caso do ζ -caroteno, cuja coloração é amarelo-pálido. O fitoeno e o fitoflueno, que respectivamente possuem 3 e 5 DCL, são incolores. A absorção pelas DCL também é influenciada pela presença ou ausência de anéis na molécula, sendo que a presença faz com que a absorção máxima diminua, pois ocorrem tensões no anel devido à estrutura não ser coplanar como o restante da cadeia (PACHECO, 2009).

Um exemplo disso é a Figura 3, em que ambas as estruturas, licopeno e β -caroteno, apresentam 11 duplas ligações conjugadas, entretanto, o β -caroteno apresenta dois anéis terminais com duplas ligações, enquanto que o licopeno é uma estrutura coplanar. Por conta disso, a absorção máxima do licopeno ocorre em 474 nm, enquanto que do β -caroteno ocorre em 454 nm. A presença de anéis sem DCL na molécula representam pouco efeito no cromóforo, e a presença de hidroxilas também não corrobora nenhuma mudança (PACHECO, 2009).

Figura 3 – Comparação entre espectros de UV/Vis das moléculas de licopeno e β -caroteno.



Fonte: PACHECO, (2009).

3.1.3 Mercado

Para fins comerciais, a produção se iniciou em 1954, pela companhia farmacêutica suíça Hoffmann-La Roche, com a síntese química do β -caroteno. Atualmente, a Europa e os Estados Unidos são os principais produtores mundiais de carotenoides (MESQUITA, 2017). Motivada pela recente demanda por produtos naturais e com benefícios à saúde, estima-se que o mercado global de carotenoides poderá alcançar US\$ 1,7 bilhão em 2022, segundo o *Global Industry Analysts*. Dentre os carotenoides existentes, o β -caroteno é o mais utilizado no mercado. Sua receita global alcançou US\$432,2 milhões em 2015, dentre os quais 35% foi por produção a partir de algas (HU, 2019).

Em relação ao mercado brasileiro, existem poucos dados na literatura. Todas as empresas de que se tem registro utilizam o urucum como base para produção de carotenoides, ou seja, fazem extração vegetal. No período de 2010 a 2015, o Brasil importou 861.908 kg de carotenoides e exportou 11.109 kg durante o mesmo período. O significativo número de importações indica que a produção brasileira não é suficiente para suprir a demanda nacional (MESQUITA, 2017).

Conduzida pelo crescimento da significância nutricional dos carotenoides como antioxidantes, assim como o aumento da demanda para aplicação em alimentação animal, alimentação e suplementação alimentar humana e fármacos, o mercado de carotenoides tem se mostrado promissor (*Global Industry Analysts*, 2019). Os investimentos para a produção de carotenoides por via biotecnológica no Brasil ainda são muito baixos, diferentemente do que ocorre em outros países. Entretanto, se fossem maiores, a dependência estrangeira por esse produto poderia diminuir, além de aumentar as possibilidades de exportação (MESQUITA, 2017).

3.1.4 Síntese química

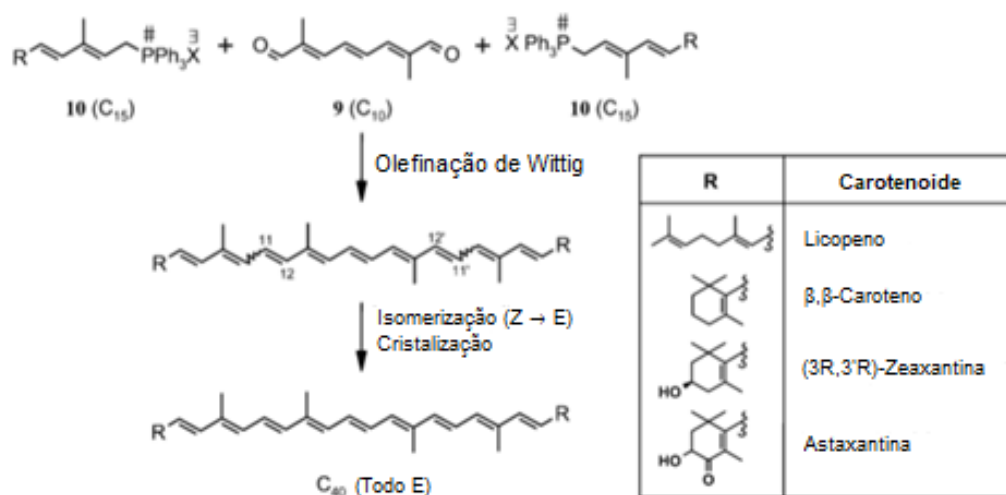
Existem diversas vantagens na produção de carotenoides por síntese química, como um custo relativamente baixo, além de apresentar alta pureza e constância com relação ao produto obtido. No entanto, a síntese de alguns carotenoides por esta via pode ser muito complexa. O conhecimento e o desenvolvimento de tecnologias para a síntese de um carotenoide poderia ser aplicável na síntese de qualquer outro, mas, frequentemente, a síntese de uma nova estrutura requer o desenvolvimento de uma nova rota química. Além disso, as sínteses químicas produzem misturas de estereoisômeros, alguns dos quais nem mesmo podem ser encontrados na natureza, o que pode gerar problemas, como baixa atividade ou efeitos indesejáveis do ponto de vista farmacológico (AUSICH, 1997).

Os carotenoides C_{40} produzidos industrialmente são estruturas simétricas. Dessa forma, o método mais eficiente para produzi-las é por meio de reações de olefinação de Wittig, com um C_{10} -dialdeído simétrico como ponto central e dois equivalentes de um sal de fosfônio com C_{15} . Nesse processo, além das desejadas moléculas de carotenoides de configuração E, alguns mono e di estereoisômeros Z das novas ligações duplas dissubstituídas nos C_{11} e C_{12} são produzidos (ERNST, 2002). Ainda segundo este autor, essas misturas são isomeradas por tratamento térmico em heptano ou etanol durante diversas horas até formar os desejados

isômeros E. Como o isômero E é pouco solúvel nesses solventes, forma cristais que são mais facilmente removidos da mistura em equilíbrio isométrico.

Como a olefinação de Wittig é um método de alta eficiência, este pode ser utilizado de diversas formas no estágio final da síntese de carotenoides. No entanto, o maior desafio no desenvolvimento da síntese desses compostos é encontrar uma via prática para a utilização do sal de fosfônio que seja técnica e economicamente viável (ERNST, 2002). A Figura 4 apresenta um esquema simplificado da síntese química dos carotenoides e possíveis radicais presentes nos sais de fosfônio.

Figura 4 - Síntese química dos carotenoides e possíveis radicais presentes nos sais de fosfônio.



Fonte: Adaptado de Ernst, (2002).

3.1.5 Produção de carotenoides por plantas

Em conjunto com as clorofilas, os carotenoides encontram-se organizados de maneira densa e rigorosa nas membranas dos cloroplastos, estruturadas de modo a otimizar a absorção de luz e a transferência de energia de excitação eletrônica para os centros de reação da fotossíntese. Neste processo, os carotenoides podem desempenhar duas funções diferentes, sendo elas a absorção da luz nos complexos de captação, atuando como pigmentos acessórios, e desempenhando um papel essencial na fotoproteção do aparato fotoquímico, que se deve à canalização da energia de excitação eletrônica para fora das clorofilas e desativação dos radicais livres (STACCIARINI-SERAPHIN, 2004).

A importância do papel dos carotenoides na estrutura vegetal pode ser evidenciada pela letalidade das mutações que afetam a síntese de carotenoides na planta, que a impedem de sobreviver em ambientes bem iluminados (STACCIARINI-SERAPHIN, 2004). Para tanto, existe inclusive uma classe de herbicidas conhecida como “inibidores da biossíntese de carotenoides”, que se subdivide em três conjuntos de substâncias que diferem entre si em relação ao sítio de atuação no bloqueio dos pigmentos, e resulta na perda de praticamente toda a coloração das folhas das plantas suscetíveis (BARROSO; MURATA, 2021).

Além de seu papel fundamental na fotossíntese, os carotenoides também se acumulam como metabólitos secundários em diversas flores e frutos, de forma a atrair polinizadores e dispersores de sementes. As interações planta-animal também podem ser intensificadas pela possibilidade dos carotenoides se clivarem em compostos de aroma e sabor. Considerando que, nesse tipo de tecido, esses pigmentos não são essenciais, eles diferem drasticamente em composição e concentração entre as espécies ou até mesmo entre variedades de uma mesma espécie (STANLEY; YUAN, 2019).

Os estudos voltados para a regulação do acúmulo de carotenoides em vários níveis (transcricional, pós-transcricional, pós-translacional, armazenamento/degradação e regulação de *feedback* por produtos finais) levou à descoberta de vários mecanismos reguladores de carotenoides, como a regulação pós-tradução da fitoeno sintase, o catabolismo de carotenoides por clivagem de carotenoides e dioxigenases 9-cis-epoxicarotenóides e regulação de *feedback* por moléculas de sinalização derivadas de apocarotenoides (STANLEY; YUAN, 2019).

A síntese dos carotenoides está relacionada ao tecido no qual ele se desenvolve, levando-se em conta que em cada tipo de tecido, como os fotossintéticos, frutas, flores, sementes e raízes, sua função é distinta. Os tomates são considerados o sistema modelo para biossíntese desses pigmentos em frutas e *Arabidopsis thaliana* para folhas. Mesmo se limitar o escopo apenas para regulação por transcrição, é possível encontrar mais de 40 reguladores diferentes de genes da biossíntese de carotenoides (STANLEY; YUAN, 2019).

Como os tecidos em que os pigmentos se encontram são diferentes, os métodos de extração de carotenoides dependem do material biológico que os contenham, ou seja, estão diretamente relacionados com a natureza da amostra, sua afinidade com o solvente, propriedades e quantidade de pigmento a ser extraído (GROSS, 1991).

Apesar da extração com solventes ser o método mais consolidado e utilizado, existem inúmeras desvantagens em relação à sua utilização, como a demanda por produtos livres de solventes, além desse tipo de extração requerer longo tempo de processo, consumir grandes quantidades de solvente, requerer tratamento térmico para sua remoção e ter chances de haver

resíduos do solvente no produto final (SALDAÑA *et al.*, 2010). Devido a isto, novos métodos de extração destes fitoquímicos têm sido investigados, como extração com fluido supercrítico e extração assistida por enzima, as quais têm sido amplamente utilizadas para extração de carotenoides de uma variedade de matrizes vegetais, como cenoura, tomate, melancia, abóbora, assim como resíduos de frutas e vegetais, como cascas de banana, uva e tomate, sementes de uva, romã e abóbora e bagaço de damasco (MIEKUS *et al.*, 2019).

3.1.6 Produção de carotenoides por algas

Assim como nas plantas, a função dos carotenoides nas algas é realizar a fotossíntese. Sendo consideradas organismos produtores de pigmentos, as algas possuem uma variedade de pigmentos que podem ser classificadas em três grupo: Clorofilas, carotenoides e ficobilinas. Dessa forma, diferentes perfis de carotenoides podem ser utilizados como um meio para a classificação de algas. A família das macroalgas pode ser classificada em: algas vermelhas (*Rhodophyta*), marrons (*Ochrophyta*) e verdes (*Chlorophyta*) (PEREIRA *et al.*, 2021).

As algas apresentam um número considerável de carotenoides de interesse mercadológico (β -caroteno, fucoxantina, astaxantina, luteína, zeaxantina e violaxantina), podendo ser considerada uma fonte natural e sustentável destes compostos. O carotenoide marinho encontrado em maior abundância é a fucoxantina, que representa aproximadamente 10% do total, e é encontrado em altas concentrações nos cloroplastos de diversas algas marrons, como *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, em diversas espécies pertencentes ao gênero *Sargassum* e *Fucus* (PEREIRA *et al.*, 2021).

Esteban *et al* (2009) demonstrou que algas vermelhas apresentam um padrão de carotenoide comum de β -caroteno e uma dentre três xantofilas: luteína, zeaxantina e anteraxantina, sendo que *Corallina elongata* e *Jania rubens* são as únicas algas que contém anteraxantina como xantofila principal.

As algas têm caminhos para carotenogênese em comum com as plantas terrestres, como também caminhos específicos para algas que são propostos exclusivamente levando-se em conta as estruturas químicas dos carotenoides produzidos. Alguns genes comuns nesse processo são sugeridos pela homologia de genes conhecidos, mas a maioria dos genes e enzimas responsáveis por essa biossíntese ainda são desconhecidos (TAKAISHI, 2011).

3.2 Produção de carotenoides por microrganismos

A manufatura de carotenoides, atualmente, é principalmente feita a partir de métodos com síntese química ou extração de plantas e algas (VALDUGA, 2009). Visando-se métodos mais sustentáveis para a produção de carotenoides em escala industrial, a utilização de microrganismos tem se mostrado uma alternativa mais viável do que as técnicas comumente utilizadas (BARREDO, 2012). Além disso, a grande preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos despertou o interesse pela obtenção desses compostos por meio de processos biotecnológicos (VALDUGA, 2009).

As vantagens da produção de carotenoides por microrganismos referem-se à possibilidade de utilização de substratos de baixo custo, a não necessidade de um espaço muito amplo para sua produção, como ocorre na extração desse produto a partir de plantas, além de não ser influenciado por fatores ambientais, como composição do solo, clima e estações do ano (SILVA, 2004). Ainda segundo este autor, existe a possibilidade de monitorar as condições de cultivo, sendo possível maior controle da produção. Já em comparação com a síntese química, também existem vantagens distintas, como a ampla gama de possibilidades de estruturas a serem obtidas, considerando que, naturalmente, é possível produzir mais de 600 tipos diferentes de carotenoides, dentre os quais estão apenas os estereoisômeros desejáveis (AUSICH, 1997).

Outro fator relevante na produção biotecnológica de carotenoides são os avanços recentes na engenharia genética e metabólica de microrganismos, que tornam cada vez mais possível modificar, projetar e otimizar microrganismos hospedeiros para se tornarem fábricas avançadas (LI; SWOFFORD; SINSKEY, 2020).

Comunidades microbianas podem ser encontradas em diversas condições ambientais, mesmo em locais com extremos de temperatura, pH, salinidade, pouca quantidade ou ausência de nutrientes, entre outros fatores. A fim de se adaptar a diferentes situações, os microrganismos que vivem nesses meios acabam produzindo moléculas que facilitam sua sobrevivência (NIERO, 2018). Um exemplo é a produção de carotenoides como resposta a vários tipos de estresse ambiental, pois esses pigmentos desempenham um papel importante na proteção à luz, funcionando como supressores (BHOSALE, 2004).

Essa produção pode ser influenciada por fatores como luminosidade, temperatura, oxigênio, composição do meio de cultivo, entre outros, podendo ocorrer influências positivas ou negativas relacionadas com cada uma delas. Com o objetivo de estimular a produção de carotenoides pelos microrganismos, estimulantes podem ser adicionados ao meio de cultivo e as condições de cultivo podem ser ajustadas de acordo com as necessidades (BHOSALE, 2004).

A produção de carotenoides tem sido reportada em diversos tipos de microrganismos, como algas, fungos, leveduras e bactérias (BHOSALE, 2004). Alguns poucos foram explorados comercialmente, sendo desenvolvidos procedimentos com as algas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, com o fungo *Blakeslea trispora* e com a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (BARREDO, 2012), e bactérias como a *Kocuria rhizophila* (REDDY, 2003) e as bactérias do gênero *Micrococcus* (STACKEBRANDT, 1995). Além desses, as *Archaea* também podem ser uma alternativa interessante, pois esses microrganismos extremófilos sintetizam carotenoides como um mecanismo que os ajuda a tolerar tais condições extremas (VÁZQUEZ-MADRIGAL *et al.*, 2021).

3.2.1 *Dunaliella salina*

A microalga *Dunaliella salina* é uma das mais ricas fontes naturais de carotenoides, capaz de acumular um teor de até 10% da biomassa seca sob condições sub-ótimas para o crescimento, como temperaturas abaixo do ideal, limitação de nutrientes, alta intensidade de luz e elevadas concentrações de sal (XU, HARVEY, 2019). Na Austrália, o lago Hillier possui uma alta concentração de sal, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos adaptados a ambientes hipersalinos, como é o caso da *D. salina*. Além deste lago, outros três são encontrados na região, sendo um deles o Laguna Hutt, que abriga a maior instalação do mundo para a produção comercial desta microalga, conforme ilustra a Figura 5 (FIOCRUZ, 2016).

A *D. salina* é uma alga verde com células eucarióticas fotossintetizantes entre 9 a 11 μm , cujo carotenoide presente em maior quantidade é o β -caroteno, o qual é armazenado em glóbulos de lipídios e prolina nos espaços inter-tilacoides do cloroplasto (XU, HARVEY, 2019).

Sua resistência a ambientes hipersalinos, além da capacidade antioxidante concedida pelos carotenoides, torna essa espécie de microalgas uma das poucas aptas para cultivo em sistemas abertos, pois isso evita a proliferação de seres vivos contaminantes no meio (MENDOZA *et al.*, 2008).

Contudo, é importante frisar que, apesar de ser considerada uma rica fonte de corante natural, é necessário avaliar outras características, como o meio de cultivo ser considerado de alto custo, o que pode representar um fator limitante. Grande parte dos países que cultivam essa microalga de forma comercial adota o sistema de cultivo aberto, com lagos e tanques, que permitem a produção em larga escala com custo mais baixo do que fotobiorreatores fechados, que requerem custos instrumentais, como instalação e manuseio. Porém, os sistemas abertos

também podem gerar problemas, como alta possibilidade de contaminações, dificuldade de captação eficiente de luz e gás carbônico, controle das condições de cultivo, alto custo de colheita e dificuldade de *scale-up* (DA FRÉ, 2016).

Campos (2019), em sua pesquisa sobre o cultivo de *D. salina* em efluentes de tanque de criação de camarões, empregou diferentes proporções deste como meio de cultivo para a microalga, sendo que as proporções avaliadas foram de 25% (v/v) e 50% (v/v) do efluente, resultou que o meio com 50% apresentou melhores resultados na produção algal e produção de pigmentos dentre os dois tratamentos. Após essa conclusão, testou-se a cepa com 50% do efluente integral e 50% do efluente enriquecido com vitaminas e metais traço, ocasionou em maior densidade celular máxima que se comparado ao cultivo em meio controle de Guillard F/2, sendo a densidade celular de $5,37 \times 10^9$ cél/L para o efluente enriquecido e $5,19 \times 10^9$ cél/L para o meio controle. Nesse estudo, também foi avaliada a capacidade de biorremediação das microalgas, resultando em redução nos níveis de nitrato no efluente. Porém com aumento nos valores de nitrito e amônia durante os experimentos, o que resultou em um teor de amônia mais alto que os níveis de segurança para cultivo de crustáceos, o que impossibilita, assim, o reaproveitamento da água na produção aquícola. Contudo, os valores de nutrientes nitrogenados inorgânicos se encontravam abaixo dos valores máximos padrões para lançamento de efluentes previsto pelo CONAMA, sendo possível seu descarte em corpos hídricos.

Figura 5 – Laguna Hutt, em Mid Western, Austrália, lago de água salgada utilizado para produção comercial de *D. salina*.



Fonte: Fiocruz, (2016).

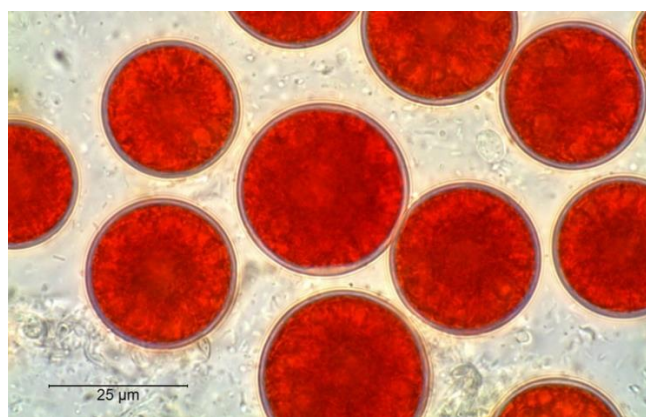
3.2.2 *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis é uma microalga verde que pode ser encontrada em todo o mundo, principalmente em águas continentais e costeiras, com um ciclo de vida complexo, que necessita de condições ótimas para crescimento. Essa microalga é capaz de produzir o carotenoide astaxantina quando as condições de cultivo se tornam desfavoráveis ou estressantes, parando seu crescimento e iniciando o processo de encistamento, no qual elas acumulam altas quantidades de astaxantina e sua coloração muda de verde para vermelho, conforme ilustra a Figura 6 (NUNES, 2011). Sua capacidade de acumular astaxantina é alta em comparação com outras fontes naturais, sendo capaz de acumular até 4% (m/m) de seu peso seco (BECKER, 2004).

No entanto, essa microalga apresenta algumas características desfavoráveis em relação a outras microalgas, como a *D. salina*, por exemplo, quando cultivadas em escala industrial. A maior dificuldade está relacionada com a sua lenta capacidade de crescimento, parâmetro diretamente relacionado com a baixa densidade celular obtida nos cultivos comerciais (NUNES, 2011).

Considerando-se o mecanismo de produção da *H. pluvialis*, vários estudos de cinética têm sido feitos visando-se obter as melhores condições de cultivo, a fim de produzir a maior quantidade possível de biomassa, para então induzir a produção de astaxantina por meio de privação de nutrientes, como nitrogênio ou fósforo, adição de cloreto de sódio, estresse oxidativo obtido através da adição de ferro e espécies reativas de oxigênio, aumento da relação C:N disponível para a célula ou ainda aumento substancial da intensidade luminosa (NUNES, 2011).

Figura 6 – Presença de astaxantina em células de *Haematococcus pluvialis*.

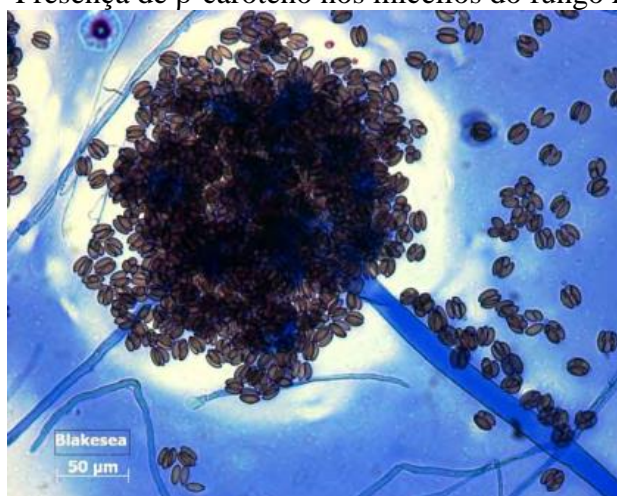


Fonte: AlgaeBase, (2012).

3.2.3 *Blakeslea trispora*

Diversos fungos da ordem dos *Mucorales* são capazes de sintetizar β -caroteno, dentre eles, se encontram as espécies *Phycomyces blakesleeanus*, *Choaneophora curcubitarum* e *Blakeslea trispora*. A produção industrial se focou no *B. trispora* por conta de sua produção consideravelmente mais alta do carotenoide e pela sua capacidade de crescer bem em fermentações com meio líquido. A produção industrial a partir de *B. trispora* envolve a cultura separada de cepas de acasalamento (+) e (-), seguida por fermentação conjunta de duas cepas em meio rico em hidrocarbonetos (principalmente querosene), carboidratos, óleos vegetais e aditivos químicos. Neste fungo, o β -caroteno é acumulado no micélio (Figura 7), e sua síntese é estimulada por ácidos trispóricos, como β -ionona, por um controle de feedback positivo. Este processo resulta em um rendimento de 0,3% do peso seco de β -caroteno ou cerca de 3 g/L. O processo foi significativamente melhorado ao longo do tempo, com teores de carotenoides de até 20% do peso seco relatado (BOROWITZKA, 2010).

Figura 7 – Presença de β -caroteno nos micélios do fungo *B. trispora*.



Fonte: ARS (NRRL) Culture Collection, [20--].

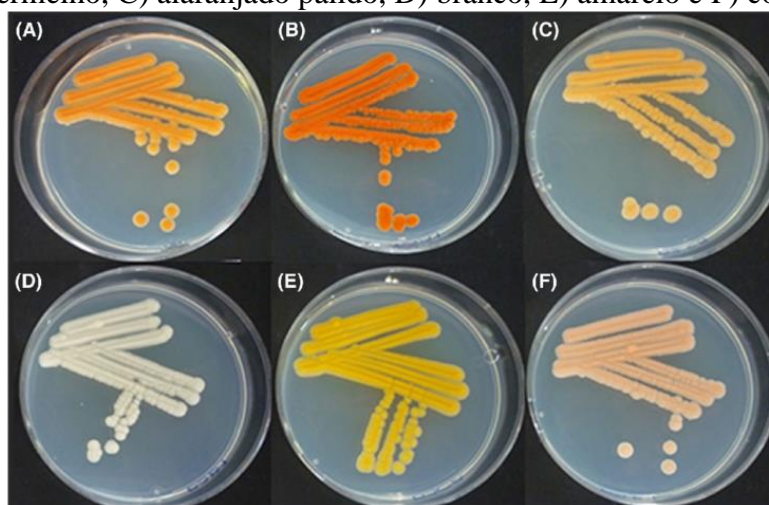
3.2.4 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, também conhecida como *Phaffia rhodozyma*, é produtora de astaxantina, um carotenoide amplamente empregado na aquicultura para alimentação de peixes e crustáceos, visando sua pigmentação. Esta levedura é capaz de fermentar sacarose, glicose e xilose, além de materiais lignocelulósicos e resíduos agroindustriais (CHOCIAI *et al.*, 2002). Fontana *et al.* (1996) relataram os primeiros resultados

da utilização dessa levedura para produção de astaxantina utilizando caldo de cana como fonte de carbono em concentração de 20 g/L. Segundo estes autores, não é possível aumentar esta concentração, tendo em vista que a levedura sofre o chamado “efeito Cabtree”, diminuindo drasticamente a produção do carotenoide, pois o crescimento celular fica comprometido pelo aumento da concentração de açúcar. Neste caso, os autores reportam que o ideal é a utilização de um processo de fermentação descontínuo alimentado, pois permite melhor controle na concentração dos nutrientes.

A fim de compreender melhor a síntese de astaxantina pela levedura, Barbachano-Torres *et al.* (2014) estudaram a possibilidade de mutações com a levedura *X. dendrorhous*, através do tratamento das células com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), as quais foram posteriormente submetidas a avaliação visual, como pode ser observado na Figura 8, demonstrando a formação de diferentes pigmentos intermediários.

Figura 8 – Mutantes de *X. dendrorhous* obtidas após tratamento com NTG: A) espécie selvagem, B) vermelho, C) alaranjado pálido, D) branco, E) amarelo e F) cor-de rosa pálido.



Fonte: Salgado, (2014).

3.2.5 *Micrococcus* sp.

O gênero *Micrococcus* foi primeiramente descrito mais de 100 anos atrás e, desde então, essa descrição tem sido revisada diversas vezes. Atualmente, está claro que esse gênero pertence fenotipicamente aos *coccus* gram-positivos e catalase-positivos, e fitogeneticamente pertence ao grupo dos actinomicetos (STACKEBRANDT, 1995). Essas bactérias constituem um dos grupos mais importantes no ambiente de áreas limpas e de contaminações acidentais de ensaio de esterilidade em produtos farmacêuticos (VIDAL *et al.*, 2013).

Dentre essas espécies, a maioria é produtora de carotenoides. *Micrococcus luteus* (Figura 9) produz um pigmento denominado sarcixantina, que possui características estruturais diferenciadas, com pouca elucidação a respeito de sua utilização como corante natural ou de suas propriedades biológicas, mas sabe-se que o carotenoide produzido apresenta maior número de átomos de carbono, de ligações duplas conjugadas e de grupos hidroxila, características que conferem ao pigmento uma maior atividade antioxidante (SCHMIDT, 2016). Essa espécie é capaz de sobreviver sob condições de estresse como pouca quantidade de nutrientes e extremos de temperatura (UMADEVI; KRISHNAVENI, 2013).

Figura 9 – Placa de Petri contendo colônias de *Micrococcus luteus*.



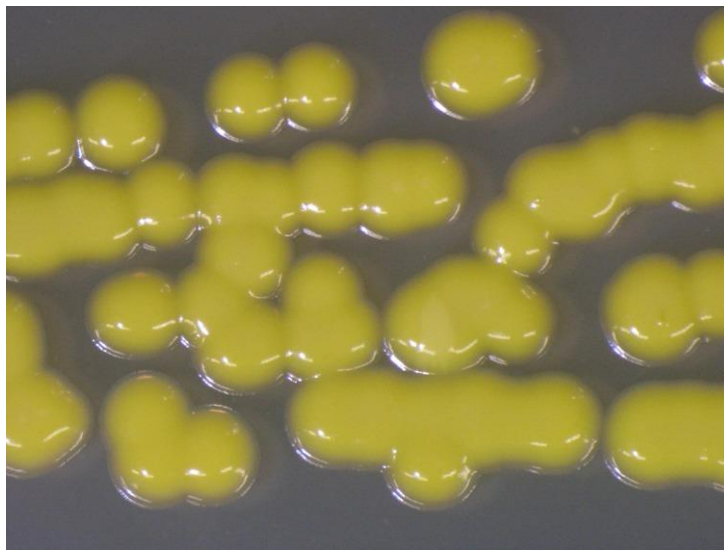
Fonte: Maestrovirtuale, (2014)

3.2.6 *Kocuria rhizophila*

O nome *Kocuria* foi dado em homenagem ao microbiologista eslovaco Miroslav Kocur. As bactérias pertencentes a esse gênero possuem células em formato de *coccus*, são Gram-positivas, não-encapsuladas, sem endósporos, quimiorganotróficas, aeróbias, catalase positivas e mesofílicas (STACKEBRANDT, 1995). Esse gênero foi criado a partir do gênero *Micrococcus* e, até o ano de 2003, continha cinco espécies, sendo elas *Kocuria rosea*, *Kocuria varians*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria palustris* e *Kocuria rhizophila*. Posteriormente, foi isolada uma nova espécie que foi denominada *Kocuria polaris*. Todas as espécies do gênero são pigmentadas (REDDY, 2003).

Úbeda (2004), durante seus estudos sobre produção de biossurfactantes pela bactéria *Kocuria rhizophila*, percebeu que o microrganismo apresentava colônias amareladas e a cor se mantinha no meio fermentativo, demonstrando sua síntese de pigmentos. A Figura 10 apresenta a coloração observada neste microrganismo durante cultivo em placa de Petri, o que confirma a característica reportada por Úbeda (2004).

Figura 10 – Colônias de *Kocuria rhizophila*, mostrando sua pigmentação amarela.



Fonte: TAMURA; ISHIDA [20--].

3.2.7 Archaea

As *Archaea*, ou arqueobactérias, são um domínio de microrganismos que incluem procariotos que não apresentam peptidoglicanos em suas paredes celulares e são geralmente encontrados em ambientes extremos, realizando processos metabólicos incomuns. Este grupo pode ser dividido em três classes principais: Os metanógenos, que produzem metano a partir de dióxido de carbono e hidrogênio; os halófitos, que necessitam de altas concentrações salinas para sua sobrevivência; e os hipertermófilos, que crescem em ambientes com temperaturas extremamente altas (TORTORA, 2017).

Dentre essas classes, as arqueobactérias halofílicas foram descritas como uma fonte natural promissora de carotenoides, cujo principal pigmento encontrado é a bacterioruberina, uma estrutura com 50 carbonos e 13 duplas ligações, envolvida na proteção contra o estresse oxidativo, radiação solar e influência na fluidez da membrana celular. Esse carotenoide possui um grande potencial industrial, devido à sua alta capacidade antioxidante, além de ter

demonstrado melhora na viabilidade de espermatozoides ovinos (VÁZQUEZ-MADRIGAL, 2021).

Algumas fontes de carbono, como carboidratos e aminoácidos, podem estimular o crescimento microbiano, contudo, há poucas informações a respeito de como os nutrientes afetam a produção de carotenoides, que dependem principalmente do perfil metabólico do microrganismo, que varia muito de acordo com a espécie, e da complexidade do substrato. O metabolismo da síntese de carotenoides por estes microrganismos ainda é desconhecido, mas sabe-se que os genes das vias bacterianas foram adquiridos por meio de transferência horizontal de genes (VÁZQUEZ-MADRIGAL, 2021).

A Tabela 1 apresenta os diferentes tipos de carotenoides produzidos por cada tipo de microrganismo.

Tabela 1 – Microrganismos e carotenoides produzidos.

| | Microrganismo | Carotenoide produzido | Referência |
|--------------------|---|-----------------------|---|
| Microalga | <i>Dunaliella salina</i> | β -caroteno | XU, HARVEY, 2019 |
| | <i>Haematococcus pluvialis</i> | Astaxantina | NUNES, 2011 |
| Fungo filamentosos | <i>Blakeslea trispora</i> | β -caroteno | BOROWITZKA, 2010 |
| Levedura | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | Astaxantina | CHOCIAI <i>et al.</i> , 2002; BARBACHANO-TORRES <i>et al.</i> , 2014 |
| | | | |
| Bactérias | <i>Micrococcus luteus</i> | Sarcixantina | SCHMIDT, 2016 |
| | <i>Kocuria rhizophila</i> | Sarcinaxantina. | ÚBEDA, 2004 |
| Arqueobactérias | <i>Haloarcula</i> , <i>Halolamina</i> e <i>Halorubrum</i> | Bacterioruberina | VÁZQUEZ-MADRIGAL, 2021 |

Fonte: Autoria própria, (2021)

3.2.8 Engenharia metabólica de microrganismos

De acordo com Li, Swofford e Sinskey (2020), a combinação de diferentes estratégias e ferramentas da engenharia metabólica permitirá que a produção microbiana de carotenoides atinja altos rendimentos e seja capaz de atender à crescente demanda por este biocomposto. Ajikumar *et al.*, (2010) que desenvolveram uma abordagem sistemática para projetar o metabolismo secundário, descrito como “Engenharia Metabólica Modular Multivariada”, a qual

foi baseada em quatro módulos distintos, os quais são responsáveis por aumentar e equilibrar o fluxo visando o aumento do rendimento de carotenoides. Esses quatro módulos são: 1) metabolismo de carbono central, 2) metabolismo de cofator, 3) metabolismo de suplemento de isopreno e 4) biossíntese de carotenoide. O princípio básico da engenharia metabólica é maximizar o fluxo de carbono dos substratos para o composto alvo, minimizando o fluxo para subprodutos desnecessários.

O módulo de biossíntese de carotenoides está diretamente ligado ao rendimento de carotenoides, em que uma biossíntese ineficiente leva a um acúmulo celular de Isopentenil-pirofosfato/Dimetilalil-pirofosfato (IPP/DMAPP), compostos formados na via do mevalonato, que pode ser tóxico para as células, resultando em menor rendimento do produto desejado. Muitas estratégias têm sido empregadas para melhorar o módulo de biossíntese de carotenoides, incluindo a seleção de novas enzimas, engenharia de enzimas-chave, otimização da expressão gênica e aumento do armazenamento de carotenoides nas células produtoras (LI; SWOFFORD; SINSKEY, 2020).

3.2.9 Engenharia genética de microrganismos

A engenharia genética caracteriza um conjunto de processos que permitem a manipulação do genoma de organismos vivos, como microrganismos, alterando as capacidades da espécie a fim de se obter o resultado pretendido (CANDEIAS, 1991). Tecnologias de DNA recombinante são utilizadas com o objetivo de produzir produtos desejáveis com rendimento e produtividade superiores. É comum que os microrganismos capazes de sintetizar o produto de interesse naturalmente sejam utilizados, mas o uso de microrganismos modificados com capacidade para produzir os precursores pode acarretar em rendimentos superiores e altos níveis de produtividade (SHIMADA *et al.*, 1998).

A levedura *Candida utilis* não possui nenhuma via bioquímica endógena para produção de carotenoides. Shimada *et al.* (1998), mostraram a possibilidade de introdução dos genes de síntese de carotenoides exógenos *crtE*, *crtB* e *crtI*, a qual foi a primeira aplicação de engenharia genética para produção de carotenoides bem-sucedida, em que foi possível a formação de licopeno, β -caroteno e astaxantina pela levedura modificada.

Xu *et al.* (2018) identificaram a síntese de licopeno na bactéria extremófila *Deinococcus wulumuqiensis* R12 e, após identificar e analisar os genes relacionados a essa produção, integrou-os a um plasmídeo policistrônico para que os genes fossem expressos em

Escherichia coli, que poderia ser uma alternativa econômica, simples e competitiva para a produção de licopeno.

Outra utilização para a engenharia genética é a produção de moléculas de carotenoides não naturais, como estruturas com 60 carbonos, cuja coloração desvia-se para o vermelho com espectros de absorvância em até 58 nm em comparação com a contraparte natural. Essas moléculas apresentam estruturas raras de anel γ , cujas funções ainda são desconhecidas. Como essas estruturas são obtidas a partir de C_5 -elongases em cadeias de 50 carbonos, normalmente encontradas em microrganismos halofílicos, as cadeias de C_{60} podem ser interessantes para a caracterização funcional em extremófilos e podem ajudar a compreender as funções dos carotenoides de cadeia longa na natureza (LI *et al.*, 2019).

3.2.10 Nutrição microbiana e meios de cultivo alternativos para produção de carotenoides

Os microrganismos, assim como todos os seres vivos, necessitam de energia e nutrientes para sua sobrevivência, seja para o funcionamento de seus processos metabólicos ou para a construção de membranas e estruturas celulares. Esses microrganismos exigem, principalmente, fontes de carbono e nitrogênio, além de outros compostos que podem estar presentes em menores quantidades (ALTIDOR, 2018).

A produção agropecuária está entre as principais atividades socioeconômicas mundiais, pois resulta em alimentos, fibras e bioenergia. O constante avanço científico-tecnológico possibilitou a utilização daquilo que outrora se chamava de resíduos agroindustriais como matéria-prima para produção de novos bioprodutos e bioinsumos. Dados recentes estimam que a produção agrícola mundial seja da ordem de $7,26 \times 10^9$ toneladas, e que os resíduos secos de biomassa vegetal atinjam 140×10^9 t, uma grande quantidade que, se não houver destinação correta e reaproveitamento, pode se tornar um grave problema ambiental (ALVES, 2020).

O Brasil é um país com uma biodiversidade muito abrangente e, por conta de uma economia altamente baseada na agroindústria, gera uma alta gama de resíduos lignocelulósicos e subprodutos a partir do processamento dos diferentes materiais (RAMOS, 2000). Tais materiais possuem alta carga de matéria orgânica e podem servir como fonte de carbono, nitrogênio e diversos outros nutrientes para processos biotecnológicos, além de disponibilizar proteínas, enzimas e óleos essenciais, que podem ser recuperados através de processos específicos (COELHO, 2001).

A bioeconomia, que refere-se a um conjunto de atividades econômicas relacionadas à invenção, desenvolvimento, produção e uso de processos biológicos, representa uma alta

aplicabilidade na agricultura e agroindústria, promovendo cadeias de valor sustentáveis baseadas em recursos renováveis (VAZ JÚNIOR, 2020). Seguindo essa lógica, as pesquisas para produção de carotenoides a partir do uso de resíduos agroindustriais como substrato torna-se interessante do ponto de vista econômico e ambiental, possibilitando a utilização de substratos com menor custo para produção da biomassa e retirando os resíduos potencialmente prejudiciais do meio ambiente. Nos próximos subitens alguns potenciais subprodutos e resíduos da agroindústria serão descritos como possíveis fontes alternativas visando a obtenção de carotenoides.

3.2.10.1 Melaço de cana

O melaço de cana-de-açúcar é o licor resultante da cristalização do açúcar, composto por água, glicose, frutose, sacarose, aminoácidos, proteínas, vitaminas, magnésio, cálcio, sódio e potássio. Por ser um subproduto da indústria açucareira, relativamente barato e presente em grandes quantidades, e apresentar altos teores em açúcares (em média 62%), o melaço tem se mostrado promissor para utilização em processos fermentativos de interesse econômico (RAMBLA *et al.*, 1999).

Barbato (2014) testou 3 meios a partir do melaço de cana em concentrações de 25%, 50% e 75% (v/v) hidrolisados, em duplicata. O processo de hidrólise foi feito após diluição em água destilada por meio da acidificação com HCl até o pH se igualar a 2,0, mantidos em banho com água fervente por 40 minutos. As soluções foram então resfriadas em banho com gelo por 5 minutos e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH. Após esse processo, as soluções foram centrifugadas e apenas os sobrenadantes foram utilizados nos experimentos.

De acordo com os resultados desta pesquisa, os meios de cultivo que estavam nas menores concentrações de melaço foram propícios para o desenvolvimento celular de *Rhodotorula glutinis*, assim como para a produção de carotenoides, concluindo-se que, em altas concentrações de açúcar, o desenvolvimento da levedura é menor, devido ao “Efeito Cabtree”. Após extração com acetona e éter de petróleo, a concentração de carotenoides encontrada foi de 1,04 µg/mL para o meio com 25% de melaço de cana, 1,03 µg/mL para o meio com 50% e 0,82 µg/mL para o meio com 75%, em comparação com 4,06 µg/mL obtidos utilizando meio de cultivo sintético. As baixas quantidades obtidas sugerem aprimoramento do método de cultivo e de extração (BARBATO, 2014).

Anjos (2013) investigou a produção de astaxantina pelo fungo *Mucor circinelloides* utilizando melaço de cana como substrato alternativo em concentrações de 4%, 7% e 10% (v/v)

a 25°C, 120 rpm e pH 6,5 durante 96 h. O meio padrão utilizado como referência foi *Synthetic Medium for Mucorales*, para o qual se obteve 142,0 µg/g de astaxantina em cultivo sem influência de luz e 340,1 µg/g utilizando-se luz azul. Em relação aos cultivos com melão de cana, o maior rendimento ocorreu na concentração de 4%, com 32,7 µg/g de astaxantina sem luz e 134,4 µg/g com luz azul. A partir desse resultado, a autora realizou um planejamento fatorial completo 2³ para identificar variáveis que pudessem apresentar impacto significativo, o qual indicou que a melhor condição seria temperatura de 30°C, pH 7,5 e agitação de 100 rpm, resultando em 469,0 µg/g em ausência de fonte luminosa e 667,6 µg/g na presença de luz azul. Concluiu-se que a utilização de luz azul de forma contínua pode aumentar significativamente o teor de astaxantina produzida pelo microrganismo utilizado, embora essa indução cause supressão do crescimento celular.

3.2.10.2 Resíduos de arroz

Resíduo muito gerado no Brasil, a água de parboilização do arroz é um efluente gerado em média de 0,83 L por quilo de arroz em casca. Seu potencial para utilização como substrato em processos fermentativos se deve às suas grandes quantidades de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo (FARIA *et al.*, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2016). Urnau (2018) realizou experimentos com esse substrato utilizando a levedura *Phaffia rhodozyma* Y-17268 visando a obtenção de carotenoides. Como o efluente não possuía materiais em suspensão ou resíduos adicionais que pudessem interferir no processo, não foi necessária a realização de um pré-tratamento. De acordo com este autor, a água de parboilização do arroz não apresentou efeito significativo para a produção de carotenoides em testes estatísticos, entretanto, mostrou-se como uma ótima fonte de nitrogênio, nutriente muito consumido pelo microrganismo. Desta forma, os autores sugerem que o mesmo pode ser utilizado no meio de cultivo, mas recomenda-se utilizar combinado a outros resíduos agroindustriais para complementar a carga nutricional necessária.

3.2.10.3 Outros resíduos

Sharma e Ghoshal (2020), visando elucidar o potencial da utilização de resíduos agroindustriais na produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizou cascas de cebola e batata como fontes de carbono juntamente com cascas de feijão mungo e vagens de ervilha como fonte de nitrogênio. Neste estudo, todas as matérias-primas, com exceção da casca

de feijão, foram lavadas e secas a 65°C durante 48 horas, seguido de trituração e peneiramento a fim de se obter tamanho de partícula uniforme. Diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio foram utilizadas (casca de cebola + casca de feijão, casca de cebola + vagem de ervilha, casca de batata + casca de feijão e casca de batata + vagem de ervilha), seguindo uma proporção de 1:1 (m/m), preparados por extração aquosa e hidrólise ácida.

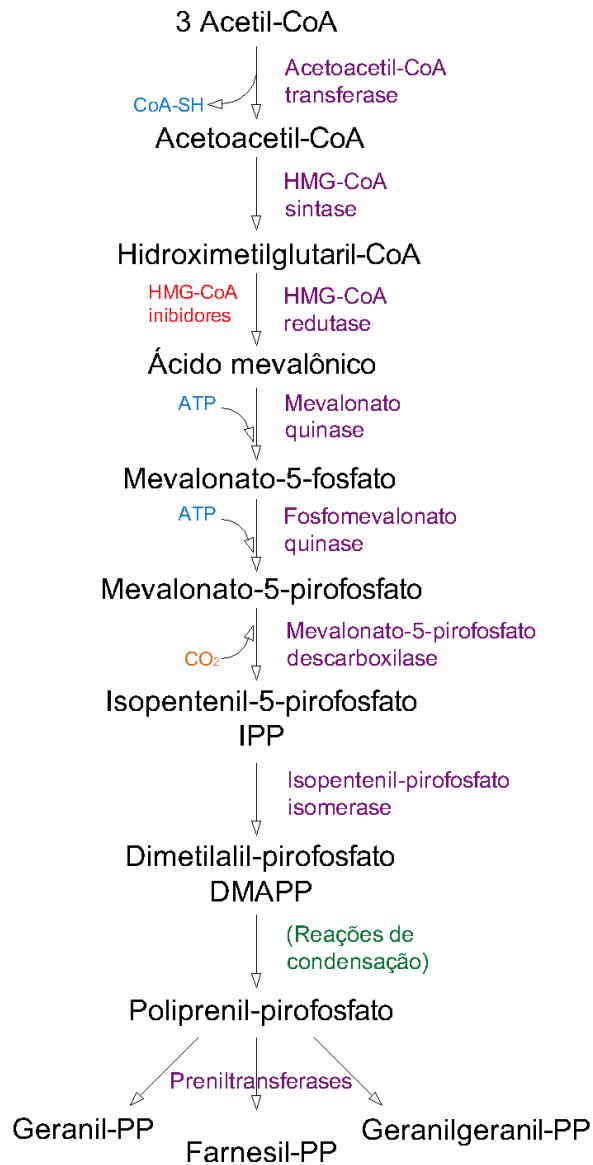
A partir de análises, determinou-se que a maior quantidade de açúcar dentre os substratos utilizados estava presente na casca de cebola, com 851,33 mg/g, seguido pela casca de batata, insignificamente diferente, com 845,10 mg/g, enquanto que a maior quantidade de proteína se encontrava na casca de feijão mungo, com 262,23 mg/g, seguido pela casca de cebola, com 165,10 mg/g (SHARMA; GHOSHAL, 2020). Ainda segundo os mesmos autores, as cascas de cebola e de feijão mungo são potenciais substratos baratos para a produção de carotenoides utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, as condições ótimas para obtenção máxima de carotenoides a partir de fontes de resíduos agroindustriais foram encontradas com pH de 6,1 a uma temperatura de incubação de 25,8 °C com agitação de 119,6 rpm por 84 horas, nas quais foram produzidos 717,35 µg/g de β-caroteno e 7,33 g/L de massa celular.

3.2.11 Biossíntese de carotenoides

A biossíntese dos carotenoides pode ocorrer por duas vias metabólicas distintas: a via do mevalonato e a via do 2-C-metil-D-eritrol (MEP), a qual ocorre em cianobactérias, microalgas e bactérias fotossintéticas. A via do mevalonato está presente no citosol de bactérias, fungos e animais. Essa via inicia pela síntese de acetoacetil-CoA a partir de três moléculas de acetil-CoA, formando posteriormente hidroximetilglutaril-CoA. O mevalonato é produzido por duas etapas de reação com enzimas quinase seguidas de descarboxilação (PANIAGUA-MICHEL, 2012).

A síntese dos carotenoides em microrganismos é feita pelo precursor isopentenil-pirofosfato (IPP) que, como se pode observar mais claramente na Figura 11, é produzido a partir do ácido mevalônico. Após a síntese de IPP, a cadeia alongada é obtida por reações de condensação em dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) para uma cadeia de poliprenil-pirofosfato. A isomerização do IPP para o DMAPP é catalisada pela enzima isopentenil-pirofosfato isomerase. A síntese de geranyl-PP, farnesil-PP ou geranylgeranyl-PP, precursores de mono, di e tri terpenos e carotenoides, a partir da cadeia alongada de poliprenil-pirofosfato é catalisada por preniltransferases (PANIAGUA-MICHEL, 2012).

Figura 11 - Via do mevalonato



Fonte: Autoria própria, (2021), baseado em Paniagua-Michel, (2012).

O primeiro caroteno a ser formado é um composto incolor denominado fitoeno, produto da condensação cauda-cauda de duas moléculas de geranilgeranil-PP, com rejeição de dois grupos difosfato. Os carotenoides coloridos são sintetizados por reações de dessaturação do fitoeno, criando ligações duplas conjugadas (PANIAGUA-MICHEL, 2012).

3.2.12 Processos de extração e purificação

Os carotenoides são compostos intracelulares lipofílicos ligados às membranas celulares. Como os carotenoides podem estar presentes em diversos tipos de tecidos, as técnicas de extração devem ser adaptadas de forma a gerar melhores resultados no tecido a ser pesquisado (BRITTON, 1985). A forma mais comum de extração envolve duas etapas principais: rompimento das células seguido por extração com solventes orgânicos. O rompimento pode ser feito por métodos físicos, químicos ou biológicos, sendo os químicos os mais eficazes, por sua simplicidade, rapidez e baixo custo, além da baixa possibilidade de degradação dos compostos de interesse. Entretanto, deve-se evitar a utilização de solventes alcalinos quando se trabalha com astaxantina, pois a alcalinidade pode induzir uma conversão irreversível deste composto em astaceno (ASKER, 2012).

A segunda etapa consiste em extrações sucessivas utilizando solventes orgânicos. Como a maioria dos tecidos em que os carotenoides podem estar presentes contém muita água, e os carotenoides são compostos hidrofóbicos, os solventes utilizados devem ser solúveis em água, sendo os mais comumente utilizados o metanol, etanol e acetona (BRITTON, 1985). Enquanto que a utilização de um único solvente é o método mais comum, o uso de uma mistura de solventes pode ser vantajoso para melhorar o rendimento na recuperação do produto (ASKER, 2012).

Efetuar a triagem de carotenoides específicos pode ser difícil, devido à presença de uma mistura complexa de moléculas com estruturas ligeiramente diferentes e instabilidade destes compostos à luz, oxigênio e calor. Cromatografia de camada delgada ou cromatografia em coluna clássica podem ser utilizadas para separação e identificação por cor dos carotenoides, pois permitem monitoramento visual. Entretanto, esses métodos possuem diversas desvantagens, como baixa resolução, consumo de tempo, necessidade de volumes grandes de amostra e baixa taxa de recuperação, inviabilizando análises por espectroscopia e por massa molecular (ASKER, 2012).

Dessa forma, e devido à impossibilidade de utilização de cromatografia gasosa por conta da baixa volatilidade dos carotenoides, uma alternativa muito utilizada é o HPLC, pois esse método possui alta sensibilidade e reprodutibilidade, gerando dados confiáveis. Além disso, por ser um método mais rápido, minimiza as chances de degradação ou isomerização dos compostos de interesse (ASKER, 2012). Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) exige mão de obra qualificada para sua utilização, além de ser um equipamento de alto custo e necessitar de detectores específicos (FREITAS, 2017).

3.2.13 Ampliação de escala

O desenvolvimento natural de um processo fermentativo, no geral, parte do princípio do aumento de escala, ou seja, de uma escala pequena para uma maior, conhecido como *scale-up*. Existe uma grande quantidade de microrganismos com capacidade de produzir carotenoides em escala laboratorial, entretanto, não são todos que se mostram interessantes do ponto de vista industrial.

Visando avaliar a influência do volume no cultivo, Castelo Branco (2010) conduziu um estudo utilizando 50 mL, 100 mL e 150 mL de meio de cultura em Erlenmeyers de 500 mL, inoculando 0,1 g/L de massa seca de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 e incubando a 30°C sob agitação de 150 rpm durante 60 h, etapa na qual o cultivo em 50 mL apresentou maior concentração de carotenoides, equivalente a 13,2 g/L. O aumento do volume resultou em uma diminuição da formação de biomassa e consumo da fonte de carbono, o que pode ser explicado pela concentração de oxigênio dissolvido ser um fator importante na síntese de carotenoides, cuja diminuição ocorreu devido à diminuição da área superficial do meio de cultivo dentro do Erlenmeyer ao passo que o volume aumentava (CASTELO BRANCO, 2010).

Após essa etapa, passou-se para cultivo em Erlenmeyers de 2 L com 500 mL de meio, o qual foi adicionado na etapa final, na qual foi utilizado o biorreator New Brunswinck Scientific Co., modelo BioFlo 3000 com capacidade nominal de 14L e volume máximo de trabalho de 10L, com duas turbinas de 6 pás planas, chamadas de “Rushton”, com 9,3 cm de distância entre elas, calculada através da altura do líquido no fermentador, a fim de otimizar a agitação no meio reacional. Nessa etapa, a concentração máxima de biomassa foi de $11,85 \pm 1,10 \text{ g.L}^{-1}$, após 120 horas de processo fermentativo. O estudo também indicou que, apesar de não ter ocorrido aumento significativo da biomassa após 48 horas de fermentação, foi possível observar que houve maior acúmulo de carotenoides durante a fase estacionária (CASTELO BRANCO, 2010).

Outros trabalhos demonstram a utilização de biorreator para a bioprodução de carotenoides. Dentre eles, o cultivo de *Dunaliella salina* em fotobiorreator tubular fechado de 55 L, com sistema de air-lift para recirculação de células, que demonstrou um aumento na produção de β -caroteno e luteína devido à influência da luminosidade. Hu *et al.* (2006) conseguiram alcançar uma concentração máxima de astaxantina de 27 mg/L em fermentador agitado mecanicamente sob pH controlado, utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, com volume de trabalho de 20 L e 3 impelidores de 6 pás cada, enquanto que

Urnau *et al.* (2019) obtiveram um resultado máximo de 697,24 µg/g de astaxantina utilizando a mesma espécie de levedura.

3.3 Funções e Aplicações dos carotenoides

Os carotenoides possuem propriedades especiais que nenhuma outra espécie de moléculas possui, que são determinadas por suas características estruturais e são responsáveis pelas funções e ações delas. A geometria molecular é essencial para se conhecer o mecanismo pelo qual o carotenoide atua nas células (BRITTON, 2008).

Em organismos fotossintéticos, os carotenoides funcionam como pigmentos acessórios na captura de luz, absorvendo a luz e transferindo-a para a clorofila para conduzir a fotossíntese ou na dissipação de altas quantidades de luz (DELLAPENNA, 1999). Além disso, atua protegendo as células contra radicais livres, tanto em organismos fotossintéticos quanto não-fotossintéticos (ASKER, 2012).

Os carotenoides são potentes antioxidantes e seu consumo pode evitar diversos problemas de saúde, pois essas moléculas podem se acumular em quantidades relativamente grandes nos tecidos e no plasma sanguíneo, realizando uma série de atividades biológicas (AMENGUAL, 2019). Por exemplo, a luteína e a zeaxantina se acumulam na região macular do olho humano, prevenindo danos causados pela luz azul. Alguns estudos também reportam os benefícios dessas moléculas na prevenção de doenças cardiovasculares, além de atuarem na regulação do sistema imune (PACKER, 2004; O'BYRNE, 2004). Diversos estudos têm sido realizados em relação a essa classe de substância, como será apresentado nos subitens a seguir.

3.3.1 Atividade pró-vitáminica

A função mais conhecida e estabelecida dos carotenoides é a atividade pró-vitamina A, a qual é restrita apenas a 50 compostos com grupos de anéis terminais β , como o β -caroteno, pois sua clivagem central pela enzima recombinante do organismo humano BCO é uma reação do tipo mono-oxigenase, que ocorre naturalmente no fígado (FRASER, 2004). A vitamina A é de extrema importância para o organismo, estando relacionada à visão, ao crescimento ósseo, à produção de hemácias, ao metabolismo do ferro e à diferenciação de tecidos, assim como à adequada resposta orgânica ao controle de infecções e à reprodução saudável (EL BEITUNE *et al.*, CAMPOS *et al.*, 2006; SWAMY *et al.*, 2021).

A cegueira noturna, afecção causada pela deficiência de vitamina A, foi primeiramente descrita no Egito em cerca de 1500 a.C., ainda que não tenham sido feitas associações dietéticas. A descoberta da vitamina A ocorreu em 1913 por dois grupos de pesquisadores quase simultaneamente: McCollum & Davis, na Universidade de Wisconsin, e Osborne & Mendel, na Universidade de Yale, e, em 1919, Steenbock observou que a quantidade de vitamina A contida nos vegetais variava de acordo com o grau de coloração. Anos depois, Moore (1929) e Euler (1930) confirmaram que o pigmento das plantas estava relacionado à atividade pró-vitamina A (EL BEITUNE *et al.*, 2003).

A hipovitaminose A tem sido um grande problema de saúde mundial por sua significativa prevalência em países em desenvolvimento, a qual pode acarretar em disfunções visuais ou oculares, como cegueira noturna e xerofthalmia, doença caracterizada pela deficiência na produção de lágrimas causada por uma disfunção nas glândulas lacrimais, também podendo reduzir a capacidade de resposta imunológica, resultando em um aumento da incidência ou gravidade de infecções (TANG *et al.*, 2009). A deficiência subclínica dessa vitamina também aumenta a morbidade e mortalidade infantil, problemas na gestação em mulheres grávidas, como desenvolvimento embriogênico anormal e aborto espontâneo, entre outros problemas (EL BEITUNE *et al.*, 2003).

É estimado que 190 milhões de crianças e 19 milhões de mulheres grávidas apresentam deficiência de vitamina A, e quase um milhão de crianças perde a visão anualmente por esse motivo. Considerando-se que o arroz é a principal fonte de energia e nutrição para mais da metade da população mundial, os pesquisadores suíços, Dr. Ingo Potrykus e Dr. Peter Burkhardt, e o pesquisador alemão, Dr. Peter Beyer, do Instituto Tecnológico Federal da Suíça em colaboração com cientistas da Universidade de Freiburg, e com patrocínio da Fundação Rockefeller, desenvolveram um produto chamado *golden rice* (arroz dourado, em português), uma variedade de arroz geneticamente modificada capaz de acumular β -caroteno em seu endosperma, visando diminuir as estatísticas da hipovitaminose A (SWAMY *et al.*, 2021).

O *golden rice* foi obtido utilizando abordagens da engenharia genética, cuja modificação foi feita a partir da adição de dois genes: fitoeno sintase (*Zmpsy1*) de *Zea mays* (milho) e o gene caroteno desaturase (*crtl*) de uma bactéria comum do solo, *Pantoea ananatis*, em uma variedade de arroz denominada Kaybonnet, dos EUA, completando a via dos carotenoides no grão, resultando no acúmulo de β -caroteno no endosperma. De acordo com a pesquisa, é necessário agora que essa tecnologia seja transferida para outras variedades de arroz adaptada nos locais em que se deseja implantar tal tecnologia para que seu lançamento e a adoção sejam bem-sucedidos (SWAMY *et al.*, 2021).

3.3.2 Atividade antioxidante

O termo “antioxidante” possui diversas definições, que têm sido objeto para avanços em pesquisa e contínua evolução. A definição química original de um antioxidante era qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparado a um substrato oxidável, reduz significativamente ou inibe a oxidação daquele substrato. Essa definição foi substituída pela perspectiva biológica de que substâncias naturais ou sintéticas podem prevenir ou impedir danos oxidativos em células causados por oxidantes fisiológicos, tendo potenciais reduções positivas e cobrindo espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e radicais livres. Um dos principais motivos dessa mudança são as evidências que suportam o envolvimento de estresse oxidativo no desenvolvimento de várias doenças como diabetes *mellitus*, câncer, Alzheimer e outras (PÉREZ-GÁLVEZ; VIEIRA; ROCA, 2020).

Carotenoides foram investigados em relação à sua capacidade de diminuir a oxidação de outras moléculas utilizando-se diversos protocolos. Pérez-Gálvez, Vieira e Roca (2020) avaliaram os métodos comumente empregados a pigmentos lipofílicos, primeiramente se o protocolo considerava antioxidantes primários ou secundários. O termo "primário" refere-se a antioxidantes de quebra de cadeia, avaliados por meio de três ensaios a saber: primeiro, baseado em transferência de átomo de hidrogênio (HAT), segundo baseado em transferência de elétron único (SET), terceiro baseado nas atividades de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), quelação de metal ou prevenção da peroxidação de lipídios. Já o termo “secundário” diz respeito aos antioxidantes preventivos que atuam por meio de uma reação de neutralização.

Os carotenoides são reconhecidos como supressores potentes de oxigênio singleto e do estado tripleto das estruturas de porfirinas, a qual foi a base para a busca de modos adicionais de ação em relação a outros radicais livres de oxigênio, como radical ânion superóxido e radicais hidroxila e peroxila, mensurando sua capacidade antioxidante e investigando seu possível efeito na progressão de doenças envolvendo espécies radicais (PÉREZ-GÁLVEZ; VIEIRA; ROCA, 2020).

O principal caroteno do tomate, chamado de licopeno, previne a oxidação do colesterol LDL, reduzindo assim as chances de doenças coronárias. Além disso, alguns estudos apontam que o consumo de licopeno pode reduzir o risco de alguns tipos de câncer, como pulmão, próstata, pele e bexiga. O β -caroteno também é apontado como capaz de inibir doenças mediadas por radicais livres (UENOJO, 2007).

3.3.3 Atividade anti-obesidade

Segundo Mounien, Tourniaire e Landrier (2019), estudos *in vitro* e pré-clínicos indicaram claros benefícios do consumo de carotenoides na obesidade e distúrbios fisiopatológicos associados, como inflamação metabólica, resistência à insulina e esteatose hepática, em que o tecido adiposo aparece como um dos principais alvos desses bioativos. Os carotenoides, ou compostos derivados deles, podem atuar a nível central, prevenindo a neuroinflamação e comorbidades associadas à obesidade.

A atividade de redução de adiposidade foi demonstrada para carotenoides com ação pró-vitamina A, assim como para aqueles sem ação pró-vitamina A em estudos com animais. O β -caroteno apresentou atividade anti-obesidade em roedores por conta da ação pró-vitáminica, no entanto, apocarotenoides não retinoides e outros produtos de conversão de carotenoides também podem ter atividades biológicas interessantes no controle de gordura corporal e saúde metabólica (BONET, 2020).

O tecido adiposo é um local importante para o acúmulo de vitamina A e carotenoides. Há evidências de que o transportador de membrana CD36, proteína ativadora da metástase, está envolvido na captação de licopeno e luteína por adipócitos e explantes de tecido adiposo branco (TAB) e que a atividade da retinil éster hidrolase da lipoproteína lipase contribui para a captação de retinol pelos adipócitos e TAB *in vivo*. Os carotenoides são encontrados nos adipócitos, principalmente com o triacilglicerol na gotícula lipídica, e também no plasma e membranas nucleares. Os ésteres retinílicos também podem se acumular nas gotículas e membranas lipídicas intracelulares. Os carotenoides no tecido adiposo podem ter funções específicas nos adipócitos, como moléculas intactas ou seguindo seu metabolismo (BONET, 2020).

Em humanos, as concentrações de carotenoides nos depósitos de gordura abdominal mostram uma associação direta com a ingestão desses compostos na dieta e com as concentrações de carotenoides no plasma. A atividade antiadiposidade foi relatada para carotenoides pró-vitamina A, em particular β -caroteno e β -criptoxantina, e certos carotenoides não pró-vitamina A, como: zeaxantina, licopeno, o verde algal carotenoide sifonaxantina, os carotenoides marinhos fucoxantina e astaxantina e os carotenoides do açafrão crocetina e crocina (BONET, 2020).

Yao *et al.* (2021) perceberam que o baixo nível sérico de carotenoides é um fator de risco para obesidade, e que a população com sobrepeso e obesa expostos à intervenção com carotenoides teve uma diminuição expressiva em suas medidas antropométricas em comparação com a população controle. Calder *et al.* (2011) propuseram que a obesidade está

altamente correlacionada com uma inflamação de baixo grau, na qual o tecido adiposo libera muitos mediadores inflamatórios. Quando os carotenoides são consumidos em quantidades suficientes, as concentrações dos marcadores inflamatórios diminuem, melhorando o estado de obesidade.

Além disso, existe uma relação muito forte entre obesidade e estresse oxidativo, o qual pode desencadear a doença por diversos mecanismos, seja estimulando a deposição de TAB, aumentando a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos ou ainda aumentando o tamanho dos adipócitos maduros, o que pode ser melhorado com o uso de carotenoides, devido ao seu papel de regulação no metabolismo oxidativo (YAO *et al.*, 2021).

3.3.4 Carotenoides no combate ao câncer

Considerando todas as funções farmacológicas já comprovadas dos carotenoides, como seu poder antioxidante, não é surpresa que eles tenham ganhado espaço nas pesquisas em relação ao combate ao câncer, sendo os mais pesquisados a fenretidina e o bexaroteno. Vários efeitos anti-câncer foram observados utilizando tratamentos com carotenoides, como efeitos anti-metastáticos, parada do ciclo celular relacionada à apoptose, anti-invasivos, antiangiogênicos, antiproliferativos, inibição do crescimento tumoral e redução do risco de câncer. Além disso, diversos estudos pré-clínicos demonstraram potencial pró-apoptótico dos carotenoides por meio do direcionamento de várias vias de sinalização envolvidas nas vias extrínsecas e intrínsecas, processos apoptóticos metabólicos e modulação epigenética (KOKLESOVA, 2020).

O uso farmacológico de compostos carotenoides é frequentemente limitado por sua baixa biodisponibilidade e solubilidade, visto que são compostos principalmente lipofílicos, mas essa deficiência pode ser melhorada ao utilizar abordagens nanotecnológicas, dispersões sólidas, microemulsões e biofortificação que aumentam significativamente as ações dos carotenoides no organismo (KOKLESOVA, 2020; ZARE *et al.*, 2020).

As células cancerígenas apresentam níveis inatamente altos de ROS, o que pode gerar uma ação pró-oxidante dos carotenoides e desencadear apoptose mediada por ROS. Além disso, quando administrados juntamente a drogas citotóxicas indutoras de ROS, podem minimizar os efeitos adversos do medicamento em células normais agindo como antioxidantes sem interferir em seus efeitos citotóxicos em células cancerosas, otimizando o estresse oxidativo em células saudáveis e aumentando o estresse oxidativo em células cancerosas (SHIN *et al.*, 2020).

Apesar do fato de a fenretinida exercer ação anticâncer em modelos pré-clínicos, os resultados de estudos clínicos mais recentes ainda não são claros. As combinações de bexaroteno com drogas quimioterápicas foram consideradas seguras e bem toleradas e a tretionina de ácidos trans-retinóicos revelou um impacto eficaz e seguro sobre cancerização de campo. No entanto, não há evidências de efeitos pró-apoptóticos dos carotenoides em prática clínica. Acima de tudo, a evidência pré-clínica de carotenoide associado a moléculas apoptóticas e vias de sinalização representa a base para pesquisas futuras e uso futuro potencial de carotenoides para melhorar o gerenciamento do câncer em termos de direcionamento específico e terapia de câncer personalizada (KOKLESOVA, 2020).

3.3.5 Carotenoides na saúde embrionária e neonatal

A primeira exposição dos seres humanos aos carotenoides parece ocorrer no início do desenvolvimento embrionário, pois esses tecidos já apresentam enzimas de clivagem dessas moléculas e transportadores que permitem que os compostos cheguem ao embrião (AMENGUAL, 2019). Bernstein e Arunkumar (2021) demonstraram que há muitas correlações estatisticamente significativas entre os níveis de carotenoides da mãe e do filho. Ainda segundo estes autores, também se verificou que os níveis séricos e cutâneos de carotenoides maternos estavam baixos em relação ao banco de dados normativo, sugerindo que as mães poderiam ter se tornado depletadas do nutriente durante a gravidez, sendo indicada reposição através de suplementação.

Após o nascimento, o aleitamento materno é responsável por suprir os carotenoides necessários para o desenvolvimento dos bebês. O leite materno contém macro e micronutrientes essenciais para atender as necessidades nutricionais do lactente, assim como propriedades imunológicas e fatores de crescimento. Esses constituintes do leite derivam do sangue materno e são enriquecidos pela dieta da mulher, como os carotenoides, que só podem ser obtidos de fontes exógenas. O leite provê carotenoides com atividade pró-vitamina A, além disso exercem importantes funções na imunidade, têm ação antioxidante e estão relacionadas à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (XAVIER *et al*, 2018).

Xavier *et al* (2018) analisaram se o nascimento prematuro influencia na composição de carotenoides do leite materno e de acordo com os resultados observou-se que o nível do composto é mais baixo no colostro, com exceção da luteína. Vishwanathan *et al*. (2014) demonstraram que a luteína é o carotenoide predominante no cérebro infantil, um ponto de partida para sustentar a importância dessa substância no neurodesenvolvimento precoce. Esses

resultados levam à conclusão de que o nascimento prematuro afeta a composição quantitativa de carotenoides no colostro, mas não prejudica o conteúdo do principal responsável pelo desenvolvimento da retina e do cérebro infantil, sendo necessárias novas pesquisas para entender a dinâmica existente no conteúdo de carotenoides do leite materno (XAVIER *et al.*, 2018).

3.3.6 Produção de compostos de aroma a partir de carotenoides

A atual demanda por produtos naturais e saudáveis envolve não apenas os corantes, como também abre caminho para a síntese microbiana de compostos de aroma. Visto isso, compostos de aroma derivados de carotenoides já foram detectados em produtos folhosos, como chá, erva mate e tabaco, frutas, como uva, maracujá, carambola, maçã, entre outros, vegetais, condimentos como açafrão e pimenta, e outras fontes, como vinho, café e mel. Esses compostos são chamados de noroisoprenoides e apresentam grande significância e alta ocorrência na natureza (UENOJO, 2007).

Alguns desses compostos de aroma podem ser observados na tabela a seguir:

Tabela 2 – Noroisoprenoides e sua ocorrência em plantas e microrganismos.

| (continua) | | | |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Nome do noroisoprenoide | Ocorrência | Microrganismos produtores | Referência |
| β-ionona | Chá preto, | <i>Geotrichum sp</i> | GRIVEL <i>et al.</i> (1999) |
| | framboesa, maracujá, | <i>Aspergillus niger</i> IFO | SÀNCHEZ- |
| | cenoura, tabaco, | 8541 <i>Ischnoderma</i> | CONTRERAS |
| | damasco, carambola, | <i>benzoinum Marasmius</i> | <i>et al.</i> (2000) |
| cereja, manga | <i>scorodonius Trametes</i> | ZORN <i>et al.</i> | (2003) |
| | | <i>versicolor</i> | |

Tabela 2 – Noroisoprenoídeos e sua ocorrência em plantas e microrganismos.

| (continua) | | | |
|-----------------------------|---|--|--|
| Nome do noroisoprenoídeo | Ocorrência | Microrganismos produtores | Referência |
| 4-oxo- β -ionona | Chá preto, tabaco, flores, <i>Boronia megastigma</i> , <i>Osmanthus</i> | <i>Aspergillus niger</i> IFO 8541 | GRIVEL <i>et al.</i> (1999) |
| | | <i>Ganoderma applanatum</i> <i>Hypomyces odoratus</i> <i>Kuehneromyces mutabilis</i> | |
| diidroactinodiolida | Chá preto, tomate, canela, tabaco | <i>Trametes suaveolens</i> <i>Ischnoderma benzoinum</i> <i>Marasmius scorodoni</i> <i>Trametes versicolor</i> | ZORN <i>et al.</i> (2003) |
| | | <i>Ischnoderma benzoinum</i> <i>Marasmius scorodoni</i> <i>Trametes versicolor</i> | |
| β -ciclocitral | Mate torrado, rum, chá, tomate, melão, paprica, pera, damasco, brocolis | <i>Ischnoderma benzoinum</i> <i>Marasmius scorodoni</i> <i>Trametes versicolor</i> | ZORN <i>et al.</i> (2003) |
| | | <i>Ischnoderma benzoinum</i> <i>Marasmius scorodoni</i> <i>Trametes versicolor</i> | |
| 2-hidroxi- β -ionona | | Oxidaao da luteına <i>Aspergillus niger</i> IFO 8541 | GRIVEL <i>et al.</i> (1999) ZORN <i>et al.</i> (2003) NORNIER <i>et al.</i> (2004) |

Tabela 2 – Noroisoprenoides e sua ocorrência em plantas e microrganismos.

| (conclusão) | | | |
|----------------------------|------------|---|----------------------------------|
| Nome do noroisoprenoide | Ocorrência | Microrganismos produtores | Referência |
| | | <i>Aspergillus niger</i> IFO 8541 | NORNIER <i>et al.</i> (2004) |
| 4-hidróxi- β -ionona | Osmanthus | <i>Bacillus megaterium</i> P450 BM-3 | URLACHER <i>et al.</i> (2006) |
| 2-oxo- β -ionona | | <i>Aspergillus niger</i> IFO 8541 | NORNIER <i>et al.</i> (2004) |

Fonte: Autoria própria (2021), baseado em Uenojo (2007).

Destaca-se que os compostos de aromas derivados de carotenoides têm atraído químicos e perfumistas há algum tempo, resultando na elucidação e isolamento de estruturas noroisoprenoides obtidos através de plantas, como β -ionona, α -ionona, diidroactinidiolida, damascenol e β -ciclocitral, que, nos vegetais, exercem função fungicida, repelem herbívoros e atraem polinizadores (UENOJO, 2007).

Os métodos biotecnológicos para produção de aromas incluem um tipo de síntese que implica na utilização de todo o arsenal metabólico do microrganismo e normalmente implica em uma mistura de compostos que caracterizam o *bouquet* do produto, obtida através da fermentação e biotransformação por catálise de precursores de aroma. As transformações microbianas de moléculas terpenoides têm se mostrado promissoras no desenvolvimento de novos compostos de aromas, no entanto, apresentam alguns desafios e limitações que precisam ser superados, como instabilidade química, baixa solubilidade em água, alta volatilidade e toxicidade de substrato e produto. Além disso, o rendimento obtido na maioria dos processos ainda é insuficiente para aplicação em escala industrial (PIMENTEL, 2012).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse trabalho, foi possível perceber que os carotenoides têm grande potencial mercadológico, não apenas para pigmentação, mas também para fins farmacêuticos e nutricionais, podendo se tornar um aliado na prevenção e tratamento de diversas doenças, como hipovitaminose A, obesidade, câncer e diversas doenças causadas por estresse oxidativo. Pode-se considerar que os carotenoides têm sido alvo de diversas pesquisas na área da saúde, com resultados prósperos, e que a demanda por essas substâncias pode aumentar gradativamente, uma vez que a expansão do mercado poderá se tornar necessária.

A produção a nível industrial ainda se baseia na via química e extração por plantas. No entanto, são diversas as opções de microrganismos capazes de sintetizá-los, sendo o fator limitante da sua produção a nível industrial por esta via a contaminação, o difícil controle das condições de cultivo como o clima e a sazonalidade do processo, principalmente no caso das microalgas, as quais são cultivadas em lagoas ou tanques abertos. Além disso, reportam-se outros impasses encontrados para a produção dos pigmentos por via biotecnológica, que estão correlacionados principalmente a fatores econômicos, pois ainda há muito o que melhorar em relação ao custo-benefício dos processos. Neste sentido, a produção a partir da utilização de substratos agroindustriais tem se mostrado uma alternativa promissora do ponto de vista econômico e ambiental, uma vez que é uma opção ambientalmente sustentável, além de agregar valor a materiais que em muitos processos são subutilizados ou necessitam ser tratados para posterior descarte, adequando-se aos padrões legislativos.

Com este estudo, foi possível constatar a importância dos carotenoides e sua crescente demanda. A produção biotecnológica destes pigmentos é interessante, entretanto ainda necessita de mais pesquisas para se tornar comercialmente viável, além de que a utilização de substratos agroindustriais pode contribuir para este processo.

REFERÊNCIAS

- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 213, n. 1–4, 2010.
- ALTIDOR, M. Nutritional types of bacteria. **Sciencing**, 2018. Disponível em: <<https://sciencing.com/types-heterotrophic-bacteria-6884639.html>> Acesso em 23 de outubro de 2019.
- ALVES, A. A. Apresentação. In: VAZ JÚNIOR, S. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Uma abordagem sustentável**. Brasília, Distrito Federal. Embrapa Agroenergia, 2020.
- AMENGUAL, J. Bioactive properties of carotenoids in human health. **Nutrients**, v.11, n.10, 2019.
- ANJOS, M. N. V. **Produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* utilizando melão de cana-de-açúcar como substrato alternativo sob a influência de luz azul**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- ARSCOTT, S. A. Food sources of carotenoids. In: TANUMIHARDJO, S. A. **Carotenoids and Human Health**. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 3-19.
- ASKER, D. *et al.* Isolation, characterization, and diversity of novel radiotolerant carotenoid-producing bacteria. In: BARREDO, J. L. **Microbial carotenoids from bacteria and microalgae: Methods and Protocols**. León, Spain: Humana Press, 2012.
- AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Appl. Chem.**, v. 69, n. 10, 1997.
- BARBACHANO-TORRES, A. *et al.* Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Archives of Microbiology**, v. 196, 2014.
- BARBATO, J. **Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula sp* em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.
- BARREDO, J. L. **Microbial carotenoids from bacteria and microalgae: Methods and Protocols**. León, Spain: Humana Press, 2012.
- BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. **Matologia: Estudos sobre plantas daninhas**. 1º edição. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 2021.
- BECKER, W. Microalgae for aquaculture – The nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, 2004.

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

BOROWITZKA, M. A. **Single Cells Oils: Microbial and algal oils**, 2ª edição, Academic Press, 2010.

BRITTON, G. General carotenoids methods. **Methods in Enzymology**, v. 111, p. 113-149, 1985.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Natural Functions. **Carotenoids**. Basel: Birkhäuser Verlag, v. 4, 2008.

CALDER, P.C. *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity, **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 3, 2011.

CAMPOS, F. M. *et al.* Pró-vitaminas A em hortaliças comercializadas no mercado formal e informal de Viçosa (MG), em três estações do ano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v. 26, n. 1, p. 33-40, 2006.

CAMPOS, M. V. P. B. **Cultivo da microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116) em efluente de tanques de carcinicultura que empregam o Sistema de Bioflocos BFT**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental), Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2019.

CANDEIAS, J. A. N. A engenharia genética. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, 1991.

CAROTENOIDS – MARKET ANALYSIS, TRENDS AND FORECASTS. **Global Industry Analysts, Inc:** Influencer Driven AI Powered Real-Time Market Intelligence, 2019. Disponível em: <<https://www.strategyr.com/market-report-carotenoids-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>> Acesso em 09 de outubro de 2019.

CASTELO BRANCO, L. S. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenoides**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CHOCIAI, M. B. *et al.* Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, 2002.

CHUNG, K, T. Azo dyes and human health: a review. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 34, n. 4, 2016.

COELHO, M. A. Z. *et al.* Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. In: **Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos**, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

DA FRÉ, N. C. **Influência das condições de cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e lipídios**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química).

Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

DELLAPENNA, D. Carotenoid synthesis and function in plants: insights from mutant studies in *Arabidopsis thaliana*. In: FRANK, H. A. et al. **The Photochemistry of Carotenoids**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. (Advances in Photosynthesis and Respiration, v. 8).

ERNST, H. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 1369-1382, 2002.

ESTEBAN, R. *et al.* Carotenoid composition in *Rhodophyta*: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongate*. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 2, 2009.

EULER, M. H. V. Carotene and vitamin A. **Bulletin de la société de chimie biologique**, v. 14, p. 838-660, 1932.

FARIA, A. F. *et al.* Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 196–203, 2009.

FONTANA, J. D. *et al.* Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, 1996.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, n. 43, p. 228-265, 2004.

FREITAS, R. B. **Introdução à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): análise de extratos vegetais**. 2017. 47 slides.

GHALY, A. E.; ANANTHASHANKAR, R.; ALHATTAB, M.; RAMAKRISHNAN, V. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 05, n. 01, p. 1–18, 2014.

GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 214, 1993.

GOVINDJEE. Carotenoids in photosynthesis: An historical perspective. In: FRANK, H. A. et al. **The Photochemistry of Carotenoids**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. (Advances in Photosynthesis and Respiration, v. 8).

GRIVEL, F.; LARROCHE, C.; GROS, J. B.; **Biotechnology Progress**, v. 15, 1999.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

HU, I-C. Production of potential coproducts from microalgae. In: PANDEY, A. *et al.* **Biofuels from Algae**. 2. ed. Amsterdã: Elsevier, 2019. Cap. 14. p. 345 -358.

ISLER, O. Introduction. In: ISLER, O. **Carotenoids**. Basle: Springer Basel, 1971.

KANAREK, R. B. Artificial food dyes and attention deficit hyperactivity disorder. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 7, p. 385–391, 2011.

KOKLESOVA, L. *et al.* Carotenoids in cancer apoptosis—The road from bench to bedside and back. **Cancers**, v. 12, n. 2425, 2020.

Lagos de chiclete, **FIOCRUZ**, 2016. Disponível em: <
<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1445&sid=9&tpl=printerview>> Acesso em 25 de julho de 2021.

LI, C.; SWOFFORD, C. A.; SINSKEY, A. J. Modular engineering for microbial production of carotenoids. **Metabolic Engineering Communications**, v. 10, 2020.

LI, L. *et al.* Genetically engineered biosynthetic pathways for nonnatural C₆₀ carotenoids using C₅-elongases and C₅₀-cyclases in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 2982, 2019.

MCCOLLUM, E.V., DAVIS, M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 15, n. 167, 1913.

MENDOZA, H. *et al.* Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2008.

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

MIEKUS, N. *et al.* Green chemistry extractions of carotenoids from *Daucus carota L.*—Supercritical carbon dioxide and enzyme-assisted methods. **Molecules**, v. 24, 2019.

MIRJALILI, M.; NAZARPOOR, K.; KARIMI, L. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 9–10, p. 1045–1051, 2011.

MOORE, T. Vitamin A and Carotene. **The Biochemical Journal**, v. 24, p.692-702, 1930.

MOUNIEN, L.; TOURNIAIRE, F.; LANDRIER, J. F. Anti-obesity effect of carotenoids: direct impact on adipose tissue and adipose tissue-driven indirect effects. **Nutrients**, v. 11, 2019.

MUKHERJEE, C. *et al.* Parboiled rice effluent: A wastewater niche for microalgae and cyanobacteria with growth coupled to comprehensive remediation and phosphorus biofertilization. **Algal Research**, v. 19, p. 225-236, 2016.

NIERO, H. **Bioconversão de substratos de baixo custo em carotenoides por *Erythrobacter citreus* LAMA 915**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2018.

NORNIER, M. F. *et al.* **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, 2004.

NUNES, M. **Cultivo de *Haematococcus pluvialis* sob condições de estresse e em consórcio microbiano visando obter maior rendimento de astaxantina**. 2011. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2011.

O'BYRNE, S, M.; BLANER, W. S. Introduction to Retinoids. In: PACKER, L. et al. **Carotenoids and Retinoids: Molecular Aspects and Health Issues**. Champaign: AOCS Press, 2004, p. 1-22.

OSBORNE, T.B., MENDEL, L.B. Relation on growth to diet. **Journal of Biological Chemistry**, v.16, n.423, 1913.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2009.

PACKER, L. *et al.* **Carotenoids and Retinoids: Molecular Aspects and Health Issues**. Champaign: AOCS Press, 2004.

PANIAGUA-MICHEL, J.; OLMOS-SOTO, J.; RUIZ, M. A. Pathways of Carotenoid Biosynthesis in Bacteria and Microalgae. In: BARREDO, J. L. **Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and Protocols**. Léon, Spain: Humana Press, 2012.

PEREIRA, A. G. *et al.* Xanthophylls from the sea: Algae as source of bioactive carotenoids. **Marine drugs**, v. 19, 2021.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. **Antioxidants**, v. 9, n. 505, 2020.

PFANDER, H. Carotenoids: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 3-13, 1992.

PIMENTEL, M. R. **Produção de compostos de aroma a partir da biotransformação de monoterpenos por *Pseudomonas***. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PIRES, J. Luteína. **Infoescola**, 2010. Disponível em: <
<https://www.infoescola.com/bioquimica/luteina/>> Acesso em 18 de agosto de 2021.

RAMBLA, M. A O.; PRADA, A R.; COOPAT, T. S.; CARRACEDO, G. B. **Méis. Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-açúcar. Cap. 2.4, p. 49-55. 1999.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. In: **Seminário Nacional Sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais**, Cetesb, 2000.

REDDY, G. S. N. *et al.* *Kocuria polaris* sp. nov., an orange-pigmented psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 183-187, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington, D.C.: International Life Science Institute Prece, p. 2-14, 1999.

ROMERO, F. *et al.* Selection and taxonomic identification of carotenoid-producing marine *Actinomycetes*. In: BARREDO, J. L. **Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and Protocols**. León, Spain: Humana Press, 2012.

SALDAÑA, M. D. A. *et al.* Apparent solubility of lycopene and b-carotene in supercritical CO₂, CO₂⁺ ethanol and CO₂⁺ canola oil using dynamic extraction of tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 99, 2010.

SÀNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMENEZ, M.; SANCHES, S.; **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, 2000.

SCHMIDT, K. C. **Avaliação da produção de corantes naturais em bactérias isoladas do semiárido brasileiro**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SHIMADA, H. *et al.* Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, 1998.

SHIN, J. *et al.* Pro-oxidant actions of carotenoids in triggering apoptosis of cancer cells: A review of emerging evidence. **Antioxidants**, v. 9, n. 532, 2020.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

STACCIARINI-SERAPHIN, E. Ácido abscísico: Síntese dos Carotenoides. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

STACKEBRANDT, E. *et al.* Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 682-692, 1995.

STANLEY, L.; YUAN, Y. W. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: So many regulators, so little consensus. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

STEENBOCK, H. Review of certain researches relating to occurrence and chemical nature. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 4, n.563-78, 1932.

SWAMY, B. P. M. *et al.* Development and characterization of GR2E golden rice introgression lines. **Scientific Reports**, v. 11, n. 2496, 2021.

TAKAISHI, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. **Marine drugs**, v. 9, 2011.

TAMURA, T.; ISHIDA, Y. *Kocuria rhizophila* NBRC 12708. **The Society for Actinomycetes Japan**. Disponível em: <
<http://www.actino.jp/DigitalAtlas/subwin.cgi?target=4-5>> Acesso em 20 de julho de 2021.

TANG, G. *et al.* Golden Rice is an effective source of vitamin A. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 1776–1783, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da Produção de Carotenoides pela Bactéria *Kocuria rhizophila***. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ÚBEDA, B. T. **Produção de Biossurfactante pela Bactéria *Kocuria rhizophila***. 2004. 99 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

UMADEVI, K.; KRISHNAVENI, M. Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, n. 4, p. 149-152, 2013.

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

VÁZQUEZ-MADRIGAL, A. S. *et al.* Effect of carbon sources in carotenoid production from *Haloarcula* sp. M1, *Halolamina* sp. M3 and *Halorubrum* sp. M5, Halophilic *Archaea* isolated from Sonora Saltern, Mexico. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, 2021.

VAZ JÚNIOR, S. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Uma abordagem sustentável**. Brasília, Distrito Federal. Embrapa Agroenergia, 2020.

VERMA, S.; GUPTA, G. Natural dyes and its applications: a brief review. **International Journal of Research and Analytical Reviews**, v. 4, n. 4, p. 57–60, 2017.

VIDAL, L. M. R. **Caracterização de cocos gram positivos provenientes de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos estéreis realizadas no INCQS/FIOCRUZ**. 2013. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

VISHWANATHAN, R. *et al.* Lutein and preterm infants with decreased concentration of brain carotenoids. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, p. 659–665, 2014.

XAVIER, A. A. O. *et al.* Carotenoid content in human colostrum is associated to preterm/full-term birth condition. **Nutrients**, v. 10, n. 1654, 2018.

XU, X. *et al.* Analysis and expression of the carotenoid biosynthesis genes from *Deinococcus wulumuqiensis* R12 in engineered *Escherichia coli*. **AMB Express**, v. 8, n. 94, 2018.

XU, Y.; HARVEY, P. J. Carotenoid production by *Dunaliella salina* under red light. **Antioxidants**, v. 8, n. 123, 2019.

YAO, N. *et al.* The association between carotenoids and subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis. **Food & Function**, v. 12, p. 4768–4782, 2021.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

ZARE, M. *et al.* Improving the cancer prevention/treatment role of carotenoids through various nano-delivery systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 3, p. 522–534, 2021.

ZORN, H.; LANGHOFF, S.; SCHEIBNER, M.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G.; **Journal of Biological Chemistry**, v. 384, 2003.