

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Álisson Santos de Oliveira

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CAROTENOÍDES MICROALGAL
EM CULTIVO HETEROTRÓFICO**

**Santa Maria, RS
2019**

Álisson Santos de Oliveira

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CAROTENOÍDES MICROALGAL
EM CULTIVO HETEROTRÓFICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^a. Dra. Leila Queiroz Zepka

Santa Maria, RS
2019

Álisson Santos de Oliveira

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CAROTENOÍDES MICROALGAL
EM CULTIVO HETEROTRÓFICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 11 de março de 2019:



Leila Queiroz Zepka, Prof. Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Juliano Smanioto Barin, Prof. Dr. (UFSM)



Maria Isabel Queiroz, Prof. Dra. (FURG)

Santa Maria, RS
2019

A minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar-me sempre em qualquer trajetória, e me abençoar com tantas conquistas até hoje.

Àqueles que considero pais de academia, Prof. Dra. Leila Queiroz Zepka e Prof. Dr. Eduardo Jacob Lopes, pela orientação, generosidade, paciência, disponibilidade, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos demais professores, por todo conhecimento adquirido ao longo dessa trajetória, seja em disciplinas, palestras ou até mesmo dúvidas e conversas pelo corredor. Grato pelo aprendizado.

Aos professores Roger Wagner e Cristiano Ragagnin, pelo empréstimo de equipamentos, tornando parte de minha pesquisa possível.

À minha família, pelo amor incondicional, confiança e apoio contínuo.

À minha querida irmã Andressa, por mesmo longe sempre me apoiar, me confortar quando preciso, pelo carinho, pela amizade, te amo.

À meus pais Elaine e Ney, por todo amor, educação, apoio, por sempre acreditarem em minha capacidade e incentivar apoiar minhas decisões, amo vocês.

Ao Rafael pelo apoio, amor, carinho, amizade, pelas injeções diárias de ânimo, pela paciência e por nunca me permitir retroceder.

À minha filha canina “Bella”, por sempre distribuir amor e carinho, independente do dia e da retribuição.

À todas as amigas do “Rolê sem Limites” por tornarem esta etapa final e os dias mais leve, pela amizade, pelo carinho e pela compreensão.

Às minhas amigas e colegas da sala de estudos e da pós-graduação, Andrine, Rafaela, Mariana, Stefania, Jéssica, Juciane, Renata, Raquel, Aline, Bruna, Marianne pela amizade, incentivo todos os dias, pelo abraço diário, por nunca me deixarem perder a fé, por tornarem meus “dias de laboratório” mais prazerosos.

À minha “IC” Patrícia Caetano, por nunca deixar a peteca cair, por estar sempre comigo, inclusive feriados e finais de semana, sempre com sorriso no rosto e disposição para trabalhar, muitas vezes dando injeções de incentivo, aprendendo e ensinado, foi uma troca que serei grato eternamente, inclusive pelas refeições realizados nos pesados dias de extrações.

Às amigas e colegas Andressa, Tatiele, Pricila e Karem, pela companhia diária, pela troca de conhecimento, amizade, palavras de conforto, parceria nos longos dias de labuta, e por sempre me fazer acreditar no meu trabalho.

Aos meus amigos de fora da bolha, Camila, Thaís, Tássia, Rafael, Liciane, Isadora, Pâmela, Gabriela, Marilice, Dandara, por sempre me apoiarem e estarem presente nos momentos bons e ruins dessa trajetória, pela amizade, pelo amor e alegria distribuídos sempre que é possível estarmos juntos.

Aos colegas dos laboratórios 111 e 104, pelo companheirismo e ajuda sempre que necessário.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida. E demais órgãos, fomentadores.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela formação proporcionada.

Muito obrigado!

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.

(O Pequeno Príncipe)

RESUMO

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CAROTENOIDES MICROALGAL EM CULTIVO HETEROTRÓFICO

AUTOR: Álisson Santos de Oliveira
ORIENTADORA: Leila Queiroz Zepka

Carotenoides são importantes compostos conhecidos por suas atividades bioativas, e são amplamente utilizados na indústria de alimentos, química e farmacêutica. Entre os carotenoides mais conhecidos o β -caroteno é o mais utilizado comercialmente, no entanto a luteína vem crescendo positivamente no mercado, principalmente por ser o único carotenoide a acumular-se em local específico no corpo humano e funcionar como parte do sistema, junto com seus derivados oxidados acumulando-se na mácula ocular. As microalgas são reconhecidas como uma fonte natural de carotenoides comumente produzidos por cultivos fotoautotróficos, por outro lado, o metabolismo heterotrófico para a produção de pigmentos naturais tem atraído muita atenção para aplicações comerciais, por superar dificuldades associadas ao fornecimento de CO₂ e luz, além de evitar os problemas de contaminação. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de carotenoides em função da curva de crescimento na biomassa de *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo heterotrófico, utilizando glicose como fonte de carbono exógeno. Os resultados demonstraram um perfil de 7 compostos sem mudanças qualitativas em toda a cinética de crescimento, alcançando uma biomassa celular máxima de 2200mg.L⁻¹ e produtividade de 12.15mg.L.h⁻¹. O teor de carotenoides total foi de 381. 69 μ g.g⁻¹, expressando que a melhor condição para biossíntese ocorreu em 96h, sendo os carotenoides majoritários all-*trans*-luteína (131, 35 μ g.g⁻¹) e all-*trans*- β -caroteno (80. 99 μ g.g⁻¹), porém considerando o crescente mercado da luteína e o fato de microalgas produzirem quantidades mais elevadas de luteína livre comparado as fontes tradicionais de obtenção, sugere-se o tempo de 72h como melhor tempo para produção de luteína, onde o quantitativo apresentado foi de (143. 53 μ g.g⁻¹). Através dos resultados encontrados, os carotenoides demonstraram ser sintetizados no escuro e o cultivo heterotrófico ser uma opção interessante para a produção comercial de luteína, uma vez que possuem vantagens com alto conteúdo de luteína livre e uma maior taxa e crescimento.

Palavras-Chave: carotenoides, microalgas, cultivo heterotrófico, cinética, compostos bioativos.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE PROFILE OF MICROALGAL CAROTENOIDS IN HETEROTROPHIC CULTURE

AUTHOR: Álisson Santos de Oliveira
ADVISOR: Leila Queiroz Zepka

Carotenoids are important compounds known for their bioactive activities, and are widely used in the food, chemical and pharmaceutical industries. Among the most well-known carotenoids, β-carotene is the most used commercially; however, lutein has been growing positively on the market, mainly because it is the only carotenoid to accumulate at a specific site in the human body and function as part of the system, along with its oxidized derivatives that accumulate in the macula. Microalgae are recognized as a natural source of carotenoids commonly produced by photoautotrophic cultures; on the other hand, heterotrophic metabolism for the production of natural pigments has attracted much attention for commercial applications, for overcoming difficulties associated with CO₂ and light avoid contamination problems. In this sense, the aim of this work was to evaluate the carotenoid profile as a function of the growth curve in *Chlorella vulgaris* biomass, from the heterotrophic culture, using glucose as an exogenous carbon source. The results showed a profile of 7 compounds with no qualitative changes in the whole growth kinetics, reaching a maximum cell biomass of 2200mg.L⁻¹ and productivity of 12. 15mg.L.h⁻¹. The total carotenoid content was 381. 69μg.g⁻¹, expressing that the best condition for biosynthesis occurred in 96h, with the major carotenoids all-trans-lutein (131, 35μg.g⁻¹) and all-trans-β-carotene (80. 99μg.g⁻¹). However, considering the growing market for lutein and the fact that microalgae produce higher amounts of free lutein compared to current sources, the 72h time is suggested as the best time for production of lutein, where the amount presented was (143. 53μg.g⁻¹). Through the results found, carotenoids have been shown to be synthesized in the dark and heterotrophic cultivation seems to be an interesting option for the commercial production mainly of lutein, since they have advantages with high content of free lutein and a higher rate and growth.

Keywords: carotenoids, microalgae, heterotrophic culture, kinetics, bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1- Carotenoides e xantofilas encontrados em microalgas.....27

CAPITULO 2

Figura 1- Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of carotenoid extract from *Chlorella vulgaris*. See text for chromatographic conditions, times 0h (A), 24h (B), 72h (C) and 96h (D). The identification and characterization of the peak are given in Table 2. The chromatogram was processed at 451 nm.....43

Figura 2- Growth kinetics and carotenoid production of *Chlorella vulgaris*.....45

Figura 3- Diagram of the carotenoid biosynthesis pathway, in heterotrophic culture.....47

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1 - Principais espécies de microalgas produtoras de carotenoides.....	18
Tabela 2 - Benefícios a saúde dos 5 principais carotenoides produzidos por microalgas.....	29

CAPITULO 2

Tabela 1- Kinetics parameters of microalgae <i>Chlorella vulgaris</i>	38
Tabela 2- Chromatographic, UV-vis spectrum and mass characteristics, obtained by HPLC–PDA–MS/MS of <i>Chlorella vulgaris</i> carotenoids.....	41
Tabela 3- Quantitative characterization of carotenoids in microalgal extracts of <i>Chlorella vulgaris</i> ($\mu\text{g/g}$ dry weight).....	44

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
CAPÍTULO 1	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Microalgas	17
3.1.1 <i>Chlorella</i>	19
3.1.2 Cultivo heterotrófico	20
3.1.3 Cinética de produção de carotenoides	22
3.2 Biocompostos microalgais	24
3.2.1 Carotenoides em microalgas	25
CAPITULO 2	31
5 CONCLUSÃO GERAL	56
6 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

Existe um interesse global na exploração dos processos e produtos baseados em microalgas, fundamentalmente apoiados na composição química da biomassa (proteínas, lipídios e pigmentos) além dos compostos extracelulares (carboidratos, lipídios e orgânicos voláteis) excretados pelas culturas. Assim, sua composição confere às microalgas amplo potencial de aplicação nas indústrias de energia renovável, biofarmacêutica e nutracêutica. As microalgas são fontes renováveis, sustentáveis e econômicas de biocombustíveis, produtos medicinais bioativos e ingredientes alimentícios.

As microalgas apresentam altas taxas de crescimento, determinando vantagens tecnológicas e comerciais quando comparadas às matrizes convencionais na produção de bioproductos. Principalmente os que possuem atividades bioativas, dispondo vantagens em relação aos produzidos de forma sintética, especialmente pelo fato de os obtidos de forma sintética serem menos eficazes que as fontes naturais quando aplicados em alimentos (JACOB-LOPES et al., 2019; CHEW et al., 2017).

Na produção de biocompostos, os pigmentos naturais compreendem um dos componentes mais interessantes gerados em sistemas baseados em microalgas. Em termos de pigmentos, as microalgas podem sintetizar até três classes destes compostos (clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas). Os carotenóides são os mais explorados, tendo como principal aplicação o uso como corante alimentar, especialmente β -caroteno e astaxantina. Além disso, devido às atividades antioxidantes e anti-inflamatórias de alguns destes compostos, há novas aplicações sendo desenvolvidas, especialmente nos setores cosmético e farmacêutico (RODRIGUES et al., 2015; CHEW et al., 2017; KHAN et al., 2018).

Para atender à crescente demanda do mercado de carotenóides naturais, microalgas biomassas adequadas para a produção em massa de pigmentos naturais, por possuírem sua classificação genética relativamente simples e o ciclo celular curto. A microalga *Chlorella vulgaris*, possui alta capacidade fotossintética, e quase todas as espécies de *Chlorella* já relatadas são capazes de crescer de forma robusta sob condições heterotróficas com a adição de fontes de carbono orgânico, especialmente açúcares. Essas fontes de carbono orgânico servem como energia para apoiar o crescimento. A competitividade da produção heterotrófica de *Chlorella* sobre a produção fotoautotrófica está em grande parte em função da densidade celular, eliminação da demanda de luz, facilidade de controle para monoculturas e rendimento

de biomassa a baixo custo. Embora a produção de *Chlorella* cultivada de forma heterotrófica esteja ganhando cada vez mais a atenção da indústria, ela é considerada economicamente favorável apenas para produtos de alto valor, servindo como uma ótima alternativa para a produção de carotenoides (CHEN, 1996; CHEN & WALKER, 2012; LIU & CHEN, 2014).

As microalgas são capazes de sintetizar uma ampla variedade estrutural de carotenoides, os principais carotenoides presentes nas microalgas são β-caroteno, zeaxantina, echinenona, luteína, cantaxantina, antheraxantina, violaxantina, astaxantina. O teor de carotenoides em microalgas é extremamente superior aos obtidos por fontes convencionais, sendo as xantofilas encontradas em maior proporção (GOIRIS et al., 2012). A astaxantina e o β-caroteno são os dois carotenoides mais reconhecidos no mercado global e compõem quase a metade do mercado de carotenoides (BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY, 2015). Dois outros produtos biológicos, a luteína e a zeaxantina, também estão se tornando cada vez mais importantes no mercado nutracêutico, uma vez que desempenham um papel significativo na saúde macular (MANAYI et al., 2015).

A produtividade de um bioprocesso depende das condições e da cinética de crescimento de microrganismos, que afetam diretamente a quantidade de células produzidas, bem como a produção de pigmentos intracelulares e a extração destes a partir do cultivo. Da mesma forma que há a necessidade de pesquisas visando o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos sistemas de produção, também se faz necessária à identificação e quantificação dos produtos de interesse a ser extraídos das microalgas durante todo o processo, para que seja possível avaliar até que ponto é necessário ir para obter o produto de interesse.

Em face do exposto, o trabalho teve como objetivo determinar o perfil de carotenoides da biomassa de *Chlorella vulgaris* em função da curva de crescimento em cultivo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono exógeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de carotenoides na biomassa de *Chlorella vulgaris* em função da curva de crescimento, em cultivo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono exógeno.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a curva de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo heterotrófico;
2. Calcular parâmetros cinéticos de crescimento celular;
3. Obter os extratos de carotenoides da biomassa de todos os pontos da curva cinética da microalga;
4. Identificar e quantificar os extratos de carotenoides da biomassa em cultivo heterotrófico de todos os pontos da curva de crescimento do microrganismo por HPLC-PDA-MS/MS;
5. Verificar a relação entre cinética de crescimento e a produção de carotenoides.

**CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

3.1. Microalgas

Microalgas são organismos fotossintéticos microscópicos com taxonomia complexa encontrados em diversos habitats aquáticos, geralmente são mais eficientes na conversão de energia solar em biomassa, principalmente devido à sua estrutura celular simples (CHACON-LEE; GONZALEZ-MARINO, 2010; LOURENÇO, 2006). Compreende um grupo diversificado de microrganismos com cerca de 72.500 espécies catalogadas de forma consistente, estes constituem um grupo polifilético e altamente diversificado de organismos procarióticos e eucarióticos. A classificação é baseada em várias propriedades, tais como pigmentação, natureza química do produto de armazenamento fotossintético, organização de membranas fotossintéticas e outras características morfológicas. (BOROWITZKA et al., 2018; RIZWAN, et al., 2018).

Os padrões taxonômicos atuais incluem 16 classes desses organismos. Entre essas classes, as mais abundantes são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as algas verdes (*Chlorophyceae*) e as algas douradas (*Chrysophyceae*). Por outro lado, algas verdes, cianobactérias (*Cyanophyceae*) e diatomáceas são as mais significativas em termos de exploração e uso biotecnológico, conforme exposto na Tabela1. (BOROWITZKA et al., 2018). Microalgas verdes (clorofíceas), compartilham o mesmo mecanismo fotossintético que as plantas superiores, apresentam grande variedade nos níveis de organização, desde unicelulares, microalgas flageladas ou não, até talos morfologicamente complexos.

Essa divisão reúne a classe mais diversificada de microalgas e estão entre as linhagens que vêm sendo utilizada na produção de biomassa e compostos celulares, devido ao interesse global na exploração dos processos e produtos baseados em microalgas, fundamentalmente apoiados na composição química da biomassa de microalgas (proteínas, lipídios e pigmentos) além dos compostos extracelulares (carboidratos, lipídios e compostos orgânicos voláteis) excretados pelas culturas (JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2008; ZEPKA et al., 2008; JACOB-LOPES et al., 2009; JACOB-LOPES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; RODRIGUES et al. 2015; SANTOS et al., 2016; MARONEZE et al, 2016; PATIAS et al., 2017).

Tabela 1. Principais espécies de microalgas produtoras de carotenoides.

Espécies	Carotenoides	Referências
<i>Spirulina platensis</i> ; <i>Phormidium sp.</i> ; <i>Anabaena</i> ; <i>Synechococcus sp.</i>	β-caroteno; Equinenona; Cantaxantina	Valderrama et al., 2003; Wang et al., 2007; Loreto et al., 2003; Ibáñez et al., 2008; Li et al., 2007; Rodrigues et al, 2015;
<i>Dunaliella salina</i> ; <i>Chlorella zofingiensis</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chlorella salina</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> ; <i>Coelastrella sp</i> ; <i>Desmodesmus sp</i> ; <i>Scenedesmus sp.</i> ; <i>Chlamydomonas nivalis</i>	β-caroteno; Luteína; Astaxantina; Violaxantina; Anteraxantina; Cantaxantina; Equinenona; Neoxantina;	Rodriguez-Garcia and Guil-Guerrero, 2008; García-González et al., 2005; Ip & Chen, 2005; Grudzinski et al., 2016; Han & Hu, 2013; Gayathri et al., 2016; Abrahamsson et al., 2012; Panis & Carreon, 2016
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Cyclotella meneghiniana</i>	Fucoxantina; β-caroteno.	Sánchez et al., 2002; Gildenhoff et al., 2010; Kosakowska et al., 2004.
<i>Pelagococcus subviridis</i>	Fucoxantina; Diadinoxantina; β-caroteno	BjØrnland et al., 1989.

Devido à sua versatilidade em se adaptar a uma ampla gama de condições de crescimento, climas e pH variado, as microalgas exibem uma clara vantagem sobre as plantas superiores para produção de pigmentos naturais. Os carotenoides com atividade bioativa comumente presentes em microalgas são astaxantina, β-caroteno, luteína, licopeno e cantaxantina. Apesar das vantagens percebidas, a fabricação em larga escala e econômica dos carotenoides por microalgas é atualmente bastante desafiadora tanto em termos de produção quanto de extração e purificação (GONG & BASSI, 2016).

Dentre as diversas microalgas na linhagem das clorofíceas, a *Chlorella vulgaris* é uma espécie de alga de água doce, amplamente cultivada, com produtividade elevada de biomassa (LIU & CHEN, 2014; KIM, 2016). Estudos relataram que a *Chlorella vulgaris* é estabelecida como uma boa fonte de proteínas e pigmentos naturais como os carotenoides (SAFI et al., 2014). O conteúdo proteico pode chegar a 58% do peso seco de biomassa, e o perfil de aminoácidos essenciais das proteínas extraídas se compara bem aos padrões recomendados pela OMS/FAO (ZAGHDOUDI et al., 2015; KULKARNI & NIKOLOV, 2018). O conteúdo de luteína em *Chlorella sp.* pode atingir concentrações altas de até 7 mg/g de peso seco de biomassa (SAFAFAR et al., 2016). Quase todas as espécies de *Chlorella* já relatadas são capazes de crescer de forma robusta sob condições heterotróficas com a adição de fontes de carbono orgânico, este tipo de cultivo é recomendado para a obtenção de produtos de alto valor, como os carotenoides.

3.1.1 *Chlorella*

Chlorella é um grupo de microalgas verdes eucarióticas com alta capacidade de fotossíntese. Através da fotossíntese eficiente, a *Chlorella* é capaz de se reproduzir dentro de algumas horas, exigindo apenas luz solar, dióxido de carbono, água e uma pequena quantidade de nutrientes. Quase todas as espécies de *Chlorella* relatadas são capazes de crescer de forma robusta sob condições heterotróficas com a adição de fontes de carbono orgânico, especialmente mono e dissacarídeos. É fácil de cultivar, tem um ciclo de vida simples e vias metabólicas semelhantes às plantas superiores e, portanto, tem sido empregada como um organismo modelo para investigar os mecanismos de biossíntese para produção de metabólitos de alto valor (GERKEN et al., 2013; LIU & CHEN et al., 2014).

Comumente, as células de *Chlorella* são esféricas ou elipsoidais e o tamanho das células pode variar de 2 a 15 µm de diâmetro. São amplamente distribuídos em diversos habitats, como água doce, água marinha, solo. Se reproduz através da produção assexuada, quando crescido,

os autospores são liberados simultaneamente através da ruptura da parede celular (GERKEN et al., 2013). *Chlorella* possui a parede celular espessa e rígida, mas a estrutura da parede celular pode diferir muito entre as espécies. Quando transferida para condições de estresse (por exemplo, escuro, privação de nitrogênio, adição de fonte de carbono exógeno), a parede celular engrossa e o cloroplasto começa a regredir ao estágio de proplastídio com uma redução gradual no número de tilacaróides, acompanhado pelo acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma (YAMADA & SAKAGUCHI, 1982; LIU & CHEN et al., 2014)

O crescimento requer nutrientes, incluindo carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e metais. O carbono é o elemento predominante no crescimento da *Chlorella*, independe do cultivo, seja foto, mixo ou heterotrófico (SHI et al., 2000). O ar atmosférico contém apenas 0,04% de CO₂, não é suficiente para manter o rápido crescimento de *Chlorella* para alta densidade celular. Portanto, um suprimento deve ser normalmente fornecido às culturas, porém níveis muito elevados de carbono, podem causar uma diminuição no pH do meio e, assim, inibir ou até bloquear o crescimento de algas (ONG et al., 2010; CHIU et al., 2008).

A competitividade da produção heterotrófica de *Chlorella* sobre a produção fotoautotrófica está em grande parte com alta densidade celular e grande produtividade de biomassa, e economia de luz. A alta densidade celular e a produtividade de biomassa da *Chlorella* heterotrófica podem ser alcançadas empregando-se estratégias de cultura com lotes alimentados, contínuos e reciclados (CHEN, 1996; CHEN & WALKER, 2012).

Carotenóides comumente encontrados em *Chlorella* incluem α e β-carotenos, luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina. Os carotenoides têm importantes aplicações nas indústrias alimentícia, nutracêutica e farmacêutica devido à sua forte capacidade de coloração, e capacidade bioativa apresentando efeitos benéficos à saúde humana (FRASER & BRAMLEY, 2004). Usando *Chlorella* como produtores de luteína e astaxantina foi proposto. Shi & Chen (1999), em estudos relatam espécies de *Chlorella* como uma ótima produtora de luteína em cultivo heterotrófico e mixotrófico, o foco nesses organismos e o emprego de estratégias de cultivo sugerem explorar o cultivo heterotrófico como fonte de carotenoides.

3.1.2 Cultivo heterotrófico

A produção de microalgas em grande escala tem se tornado o foco de muitas pesquisas. Porém, a tecnologia de cultivo é um dos principais fatores que restringem a produção de bioproductos microalgaicais. Diversas pesquisas têm sido realizadas com foco nos tipos de cultivos para aumentar a produtividade de biomassa. Os mais abordados, tem sido o fotoautotrófico,

heterotrófico e o mixotrófico (MARONEZE et al., 2016; QUEIROZ et al., 2011; ZHAN, RONG & WANG, 2016; HU et al., 2018).

As vias metabólicas estão relacionadas à disponibilidade e aos tipos de nutrientes, nos meios em que microalgas estão sendo cultivadas. O carbono é de especial importância, o tipo de carbono disponível determina a via metabólica pela qual as microalgas assimilam o carbono (GULDHE et al., 2017).

Em geral, existem duas vias principais de fixação de carbono em microalgas. O cultivo fotoautotrófico corresponde ao crescimento fotossintético, é o procedimento mais comum empregado no cultivo de microalgas. Por serem microrganismos fotossintetizantes, as microalgas produzem energia através da luz e fixação de CO₂ atmosférico como fonte de carbono inorgânico através do ciclo de Calvin-Bensen (CHEN, 2006; WU et al., 2017). No entanto, o cultivo de microalgas usando o modo fotoautotrófico tem algumas limitações, como crescimento lento, maior custo com energia e baixa produtividade de biomassa (WU et al., 2017).

Uma alternativa viável para culturas fototróficas, mas restrita a poucas espécies de microalgas, é o uso de cultivos heterotróficos (CHEN, 2006). O metabolismo heterotrófico apresenta como características a ausência total de luminosidade e o emprego de uma fonte de carbono orgânica exógena utilizada na obtenção de energia. Este tipo de cultivo permite o crescimento de microalgas em meios suplementados com fontes de carbono como: glicose, frutose, sacarose, acetato e glicerol, além da utilização direta de águas residuais (FRANCISCO et al., 2014; SANTOS et al., 2016; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A glicose é a fonte de carbono exógena mais utilizada para as culturas heterotróficas microalgais, devido às elevadas taxas de crescimento e respiração obtidas com esse substrato. Em geral, quando se utilizam outros substratos, as microalgas requerem um período de adaptação, representadas pela extensa fase *lag*, necessária para a síntese das enzimas e dos sistemas de transporte específicos para a assimilação e o consumo das moléculas (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

O glicogênio é o principal carboidrato de reserva, podendo, assim como a glicose exógena, ser convertido em glicose-6-fosfato e ser metabolizada pela via respiratória. Algumas enzimas do Ciclo de Krebs são detectadas com atividades extremamente baixas e o metabolismo no escuro está ligado à presença de oxigênio, sendo que a principal rota é a via da

pentose-fosfato (FAY, 1983). A glicose-6-fosfato é oxidada e descarboxilada em ribulose-5-fosfato. As reações são catalisadas pela glicose 6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gluconato-desidrogenase, respectivamente. Ambas as enzimas estão presentes em altas concentrações nas cianobactérias e duas moléculas de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto) são geradas, com subsequente oxidação na cadeia respiratória, rendendo 2 ATPs (adenosina trifosfato) (FAY, 1983; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Análises dos extratos celulares revelaram que a ribulose-1,5-difosfato inibe a glicose-6-fosfato-desidrogenase, a primeira enzima da via oxidativa (HU et al., 2018). A transferência das culturas para cultivo no escuro está ligada ao imediato desaparecimento deste metabólito, com ativação da via metabólica oxidativa (PELROY; BASSHAM, 1972).

Este tipo de cultivo tem a vantagem de acelerar a taxa de crescimento celular, aumentar o acúmulo de biomassa em comparação com a cultura autotrófica e até mesmo pode utilizar substratos de baixo custo como resíduos agroindustriais, reduzindo o custo global do processo (FRANCISCO et al., 2014). O custo associado à aquisição da fonte de carbono e operação de equipamentos de cultivo heterotrófico pode ser compensado pelo quantidade e qualidade dos bioproductos gerados para aplicação industrial (HU et al., 2018).

Portanto, o cultivo heterotrófico serve como uma alternativa, para a obtenção de compostos naturais de interesse, que são principalmente de origem intracelular, e dependentes da curva de crescimento da microalga. (CÓRDOVA et al., 2018).

3.1.3 Cinética de produção de carotenoides

O crescimento celular pode ser entendido como o aumento ordenado de todos os componentes químicos celulares incluindo os carotenoides. Durante o crescimento equilibrado, a duplicação da biomassa é acompanhada da duplicação de todas as outras propriedades mensuráveis (proteína, pigmentos entre outras moléculas orgânicas). De forma mais rápida e com menores custos, o crescimento é, normalmente, quantificado em termos de massa ou número de células (RUSSO, 2011).

A cinética, é uma ciência que estuda a velocidade de uma reação, e estabelece relações por meio de equações que permitem definir a ordem cinética da reação podendo ser de zero, primeira ou segunda ordem. A microalga apresenta cinética de crescimento definida por quatro

fases: I) fase lag, na qual o crescimento é retardado devido à presença de células não viáveis ou ajustes fisiológicos para se adaptar às novas condições do meio; II) fase log , onde as células crescem e se dividem como uma função exponencial do tempo, com intensidade luminosa ou não, e/ou nutrientes não limitantes; III) fase estacionária, onde há limitação de nutrientes , determinando quando o crescimento cessa, e IV) fase de declínio (morte celular), onde a concentração de microalgas diminui rapidamente devido a um esgotamento de nutrientes e distúrbios de pH. Em todas as fases, existem mudanças na composição intracelular do microrganismo (LEE et al., 2015; CÓRDOVA et al., 2018).

A produção de pigmentos naturais em escala industrial está em expansão, levando a um crescente interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos para a sua produção. A produtividade de um bioprocesso depende das condições de crescimento de microrganismos, que afetam a quantidade de células produzidas, bem como a produção de pigmentos intracelulares e a extração destes a partir do cultivo (LIU e WU, 2007).

Segundo Jacob-Lopes e Zepka (2017), a abordagem mais comum para prever as alterações de produção, envolve um sistema modelo, selecionando alguma condição, expondo a amostra a esta condição e monitorando a concentração do composto a ser avaliado ao longo do tempo. Alternativamente, outra abordagem é utilizar o desenho elaborado com base em princípios de cinética química e determinar as alterações dos compostos. A produção pode ser representada pela quantidade inicial de pigmento, ou pela formação de novos compostos.

Alternativamente, é possível supor uma ordem de reação, em função da resposta linear do gráfico dos dados da concentração/tempo. Este método é usado com maior frequência quando a ordem de reação é conhecida e é desejado avaliar as constantes de velocidade de reação específicas. A maioria dos dados para alterações dos compostos em reações químicas características, segue cinética de primeira ordem (KEBEBE et al., 2015).

A produção comercial em escala industrial de carotenoides, a partir de microrganismos, concorre principalmente com a síntese química, apesar de haver uma crescente demanda por carotenoides de fontes naturais, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos. Assim, a produção biotecnológica é uma alternativa relevante para esse mercado (ALBUQUERQUE, 2015).

3.2 Biocompostos microalgais

Existe um interesse global na exploração dos processos e produtos baseados em microalgas, a biodiversidade, o estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, e a consequente variabilidade na composição química da biomassa de microalgas além dos compostos extracelulares excretados pelas células, vêm permitindo sejam utilizadas em diversas aplicações (BOROWITZKA, 2013; BOROWITZKA, 2018). A produtividade das microalgas pode superar o de qualquer outra matéria-prima terrestre utilizada em processos de biorrefinaria, pois, além de possuir um cultivo mais rápido, tanto no processamento quanto na obtenção da biomassa, também podem ser cultivadas em águas residuais (RODRIGUES et al., 2014; GERARDO et al., 2015).

Microalgas eucarióticas possuem um elevado crescimento celular, e em paralelo, a biomassa produzida é uma excelente fonte diversificada de moléculas como lipídios, proteínas, polissacarídeos, antioxidantes, esteróis insaponificáveis, agentes antimicrobianos e minerais. Adicionalmente, esses microrganismos são uma fonte potencial de triacilglicerídeos que podem conter quantidades elevadas de ácidos graxos de cadeia longa poli insaturados, tais como o ômega 3, ácido docosa-exaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA) (HERRERO et al., 2015; RIZWAN et al., 2018).

Estes microrganismos contêm altos níveis de óleos, carboidratos e proteínas que os tornam matérias-primas versáteis para a produção de combustíveis e biogás em paralelo com produtos químicos valiosos para a alimentação humana e animal (SILVA et al., 2015; BRASIL et al., 2017; CÓRDOVA et al., 2018). A combinação da produção de biocombustíveis de microalgas com as aplicações convencionais é excelente para prosperar a indústria de biorrefinaria microalgal de forma sustentável (QUEIROZ et al., 2013; MA, et al., 2015). Observa-se também que, além das frações de metabolitos não voláteis, o rendimento da microalga não satisfaz completamente o balanço de carbono total do sistema, sugerindo que parte deste balanço está direcionado para a produção de compostos orgânicos voláteis (JACOB-LOPES et al., 2010).

Microalgas e seus extratos representam uma fonte vasta e inexplorada de compostos com atividade biológica. As conversões de biomassa de microalgas, para produtos e compostos de alto valor agregado estão globalmente ganhando um destaque significativo (HERRERO & IBÁÑEZ, 2018). Embora centenas desses metabólitos tenham sido identificados em culturas de microrganismos, a indução de síntese é na maioria dos casos, desconhecida, a separação e

recuperação dos compostos precisam ser otimizadas e, assim, a inserção em produtos comerciais depende ainda de pesquisa e desenvolvimento (RAMÍREZ-MÉRIDA et al., 2017).

Em relação aos pigmentos que possuem propriedades bioativas, inclui-se três classes: carotenoides e clorofilas e ficobiliproteínas, pigmentos naturalmente presentes na biomassa microalgal que recebem cada vez mais atenção (RODRIGUES et al., 2015; D'ALESSANDRO & FILHO, 2016). Estes, já são aplicados na indústria de corantes, e pelo fato de apresentar diversas atividades biológicas, como: atividade antioxidante, efeitos anti-inflamatórios, redução da degeneração macular, atividades neuroprotetoras, de alguns desses compostos, novos estudos e aplicações estão surgindo, principalmente nos setores cosmético e farmacêutico (ZHANG et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

Os carotenoides têm altos valores comerciais, especialmente por sua alta demanda como compostos bioativos. Assim, são atualmente os produtos mais comercializados a partir de microalgas, renovando o interesse em aumentar a pesquisa e o desenvolvimento desses compostos na biomassa de microalgas (POOJARY et al., 2016). O mercado global de carotenóides foi de US\$ 1,24 bilhões em 2016 e projeta-se aumentar para US\$ 1,53 bilhões até 2021, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 3,78% de 2016 a 2021(HU et al., 2018; JACOB-LOPES et al., 2019). As maiores participações de mercado são β-caroteno e astaxantina, com preço médio próximo a US\$ 2.500/kg (SUGANYA, VARMAN, MASJUKI, & RENGANATHAN, 2016).

3.2.1 Carotenoides em microalgas

Os carotenoides representam um grupo de pigmentos, sintetizados naturalmente por organismos fotossintéticos (GONG & BASSI, 2016). Quimicamente, são compostos isoprenóides lipofílicos, suas características colorem na faixa do amarelo ao vermelho, classificados de acordo com o número de carbonos que constituem sua estrutura. A maioria dos carotenoides compartilha a estrutura C40 comum das unidades de isopreno, sendo encontrada na natureza mais abundantemente. Além disso, suas estruturas químicas são constituídas por diversos grupos terminais (BRITTON et al., 2008; RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

Considerando a estrutura dos carotenoides, eles podem ser classificados em carotenos e xantofilas. Os carotenos são compostos que contêm apenas hidrocarbonetos em sua estrutura (por exemplo, β-caroteno e licopeno). Por outro lado, as xantofilas são carotenoides

oxigenados, que contêm diferentes grupos funcionais, como grupos funcionais epoxídos, hidroxila, ceto e metoxi. Por sua vez, as xantofilas estão entre os principais carotenoides nos tecidos fotossintéticos. (GONG & BASSI et al., 2016).

De acordo com essas modificações, esses grupos funcionais contendo oxigênio afetam as funções biológicas e a solubilidade dos carotenoides, tornando as xantofilas mais polares que os carotenos, permitindo sua separação por meio de vários tipos de cromatógrafos (BRITTON et al, 2008). O conjunto de duplas ligações conjugadas (*c.d.b*), é responsável pela cor e características como capacidade antioxidant e suas propriedades. Portanto a capacidade bioativa dos carotenoides das microalgas está diretamente ligada ao aumento da intensidade de absorção, chamado efeito batocrômico (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Algumas estruturas podem ser visualizadas na Figura1.

Em microalgas os carotenoides têm funções primárias e secundárias. A primária atua sobre o sistema fotossintético celular, a secundária protege a clorofila do fotodano. Por essa razão, sob condições de estresse, os carotenoides secundários são sintetizados em grandes quantidades. Além disso, os carotenoides apresentam propriedades antioxidantes que protegem as microalgas de ataques dos radicais livres. (GUEDES et al., 2011; GONG & BASSI, 2016).

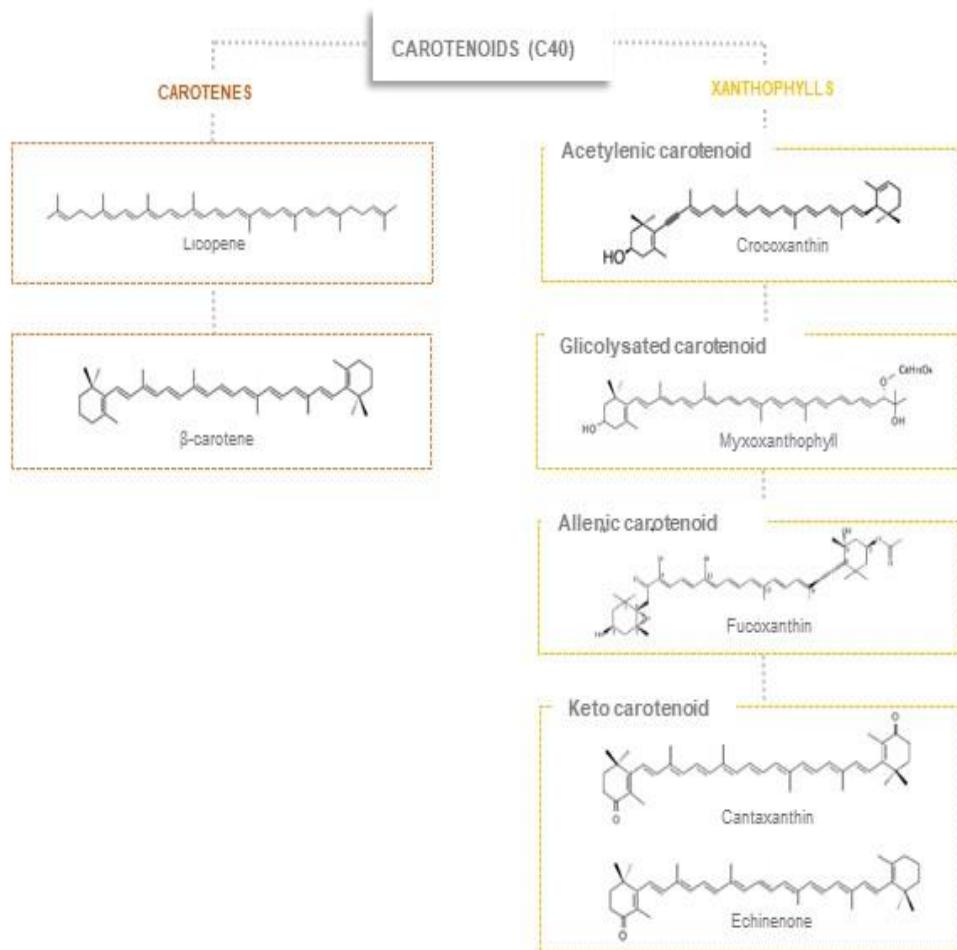


Figura 1. Carotenoides e xantofilas encontrados em microalg

Segundo Rodrigues et al. 2015, várias espécies de algas demonstram a capacidade de sintetizar carotenoides específicos. Entre os principais carotenoides produzidos por esses microrganismos se destacam o β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina, astaxantina, equinenona, cantaxantina e a neoxantina. Espécies específicas de algas verdes possuem xantofilas adicionais, como a loroxantina (BRITTON et al, 2004; TAKAISHI et al 2011; GOIRIS et al, 2012; RODRIGUES et al, 2015; CHEN et al., 2016).

A produção industrial de carotenoides naturais usando microalgas envolve, principalmente, duas espécies, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, que produzem β -caroteno e astaxantina, respectivamente (PŘIBYL et al., 2016). Porém, existem deficiências inerentes a essas cepas, como crescimento lento, rendimento insuficiente, assim sendo estudos vem sendo realizados na busca por cultivos de microalgas alternativas que possam suplementar a produção de carotenoides. A microalga *Chlorella vulgaris*, cresce rapidamente, possuem conteúdo substancial de carotenoides e realizam-se de forma robusta em biorreatores (KIM, 2016).

A produção destes compostos à base de microalgas em escala industrial surgiu como uma oportunidade comercial visando ganhar participação de mercado no segmento de moléculas com atividades biológicas, inicialmente dominado por moléculas sintéticas e de origem animal e vegetal (BOROWITZKA et al., 2018). Em face disso, o uso de corantes naturais tem aumentado constantemente principalmente devido a mudanças na preferência do consumidor em relação a produtos mais naturais conhecidos por exibir propriedades funcionais específicas (SINGH et al, 2015).

Os principais carotenoides de interesse comercial das microalgas são o β -caroteno, luteína, cantaxantina, fucoxantina e a astaxantina, apresentados na Tabela 2. A astaxantina e o β -caroteno são os dois carotenoides mais reconhecidos no mercado global, a astaxantina apresenta o maior potencial antioxidante em função do tamanho do cromóforo. β -caroteno, é responsável pela ação pró-vitamínica A (DUFOSSÉ et al., 2005). A luteína tem papel importante no mercado nutracêutico, uma vez que a ação sobre a saúde macular já foi comprovada, auxiliando no tratamento e prevenção de catarata e degeneração macular (CHEN et al., 2016).

Tabela 2. Benefícios a saúde dos 5 principais carotenoides produzidos por microalgas.

Carotenoides	Benefícios a saúde	Microalgas	Referências
β-Caroteno	Reduz o risco de doença cardiovascular; Reduz a ocorrência de câncer de células epiteliais; Propriedade antioxidante.	<i>Dunaliella salina</i> ; <i>Phormidium sp.</i> ; <i>Chlorella protothecoides</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chlorella salina</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> .	Eroglu, Harrison, 2013; Niranjana et al., 2015; Cook et al., 2000; Rodrigues et al., 2015; García-González et al., 2005; Grudzinski et al., 2016; Gayathri et al., 2016; Jaime et al., 2010.
Astaxantina	Atividade antioxidante; Efeitos anti-inflamatórios; Atividade anti-apoptótica.	<i>Chlorella zofingiensis</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> . <i>Chlamydocapsa spp.</i>	Bennedsen et al., 2000; Wu et al., 2015; Fakhri et al., 2018; Ip & Chen, 2005; Jaime et al., 2010; Leya et al., 2009.
Luteína	Pode inibir a peroxidação lipídica nas membranas; Diminui a progressão da degeneração macular; Propriedade antioxidante; Previne doenças cardiovasculares.	<i>Dunaliella salina</i> ; <i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Chlorella protothecoides</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Coelastrella sp.</i> ; <i>Desmodesmus sp.</i> ; <i>Chlorella salina</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> . <i>Chlamydocapsa spp.</i>	Juturu et al, 2016; Kamoshita et al, 2016; García-González et al., 2005; Cha et al., 2008; Chen, et al., 2016; Grudzinski et al., 2016; Chiu, Soong & Chen, 2016; Gayathri et al., 2016; Jaime et al., 2010; Leya et al., 2009.
Canthaxantina	Propriedade antioxidante	<i>Phormidium sp.</i> ; <i>Scenedesmus sp.</i> <i>Chlamydocapsa spp.</i>	Rodrigues et al, 2015; Zhang et al., 2014 Abrahamsson, Rodriguez-Meizoso & Turner, 2012; Leya et al., 2009.
Fucoxantina	Neuroproteção em modelos de lesão cerebral traumática; Efeitos antitumorais; Efeitos anti-inflamatórios; Promove efeitos apoptóticos; Atividade de limpeza radical.	<i>Isochrysis galbana</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i> .	Zhang et al, 2017; Wang et al, 2012; Yu et al, 2011; Heo et al, 2012; Takashima et al, 2012; Foo et al, 2015; Wu et al, 2015; Di Lena et al, 2018;

O mercado global de luteína foi estimado em US\$ 135 milhões em 2015 e continuará a crescer até 2024, com uma taxa de crescimento de 5,3% (Global Market Insights Lutein Market Report, 2016). O atual suprimento comercial de luteína é dependente apenas de pétalas de flores de calêndula, no entanto o rendimento é depende da variação sazonal (HU et al., 2018). Kamoshita et al., (2016) comprovou que a luteína retarda a progressão da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), uma das principais causas de cegueira em pessoas mais velhas.

Essa xantofila que se acumulam na região macular da retina estão principalmente na forma all-*trans*-luteína, a biodisponibilidade da atual fonte produtora é em grande maioria ésteres de luteína. Portanto, a produção comercial de luteína está preocupada com o teor de luteína all-*trans*, e não com o teor total de luteína, mostrando que cepas de microalgas são ótimas fontes exploratórias para obtenção deste composto (LIN et al., 2015)

Finalmente, os compostos bioativos sintetizados por microalgas são de grande importância para o mercado industrial. Nesse sentido, a extensão em que a biossíntese dessas estruturas de microalgas é elucidada será útil nas indústrias. As microalgas apresentaram um perfil rico e interessante de carotenoides, caracterizado pela prevalência de xantofilas sobre carotenos, essas microalgas podem ser vistas como fontes sustentáveis de carotenoides na perspectiva de uma abordagem de biorrefinaria, onde vários componentes de biomassa são valorizados (DI LENA et al., 2018).

CAPITULO 2

INFLUENCE OF HETEROTROPHIC CULTURE ON CAROTENOID PRODUCTION IN *CHLORELLA VULGARIS*

Influence of heterotrophic culture on carotenoid production in *Chlorella vulgaris*

**Álisson Santos de Oliveira^a, Patricia Acosta Caetano^a, Tatiele Casagrande Nascimento^a,
Pricila Nass Pinheiro^a, Andressa da Silva Fernandes^a, Eduardo Jacob-Lopes, Leila
Queiroz Zepka^a**

^a Department of Food Technology and Science, Federal University of Santa Maria (UFSM),
P.O. Box 5021, Santa Maria 97105-900, Brazil

*Corresponding author: e-mail: zepkaleila@yahoo.com.br; Phone/Fax: +55-55-32208254

ABSTRACT: Carotenoid profile in Chlorella vulgaris biomass growth were evaluated from heterotrophic culture using glucose as exogenous carbon source. The results showed a profile of 7 compounds with no qualitative changes in the whole growth kinetics, reaching a maximum cell biomass of 2200mg.L^{-1} and productivity of 12.15mg.L.h^{-1} . The total carotenoid content was $381.69\mu\text{g.g}^{-1}$, expressing that the best condition for biosynthesis occurred in 96h, with the major carotenoids all-*trans*-lutein ($131.35\mu\text{g.g}^{-1}$) and all-*trans*- β -carotene ($80.99\mu\text{g.g}^{-1}$). However, considering the growing market for lutein and the fact that microalgae produce higher amounts of free lutein compared to current sources, the 72h time is suggested as the best time for production of lutein, where the amount presented was ($143.53\mu\text{g.g}^{-1}$). Through the results found, carotenoids have been shown to be synthesized in the dark and heterotrophic cultivation seems to be an interesting option for the commercial production mainly of lutein, since they have advantages with high content of free lutein and a higher rate and growth.

Keywords: carotenoids, microalgae, heterotrophic culture, kinetics, bioactive compounds.

1. Introduction

There is a global interest in the exploration and development of cultivation processes and extractions of bioproducts supported in microalgae. Fundamentally based on the production of intracellular compounds synthesized by these microorganisms, such as carotenoids (Rizwan et al., 2018). Microalgae of the genus *Chlorella vulgaris* are ideal for exploitation because they are extremely resistant to adverse and invasive conditions. In addition, they are marketed as a rich food additive and are considered safe food sources by GRAS status generally recognized as safe, according to the Food and Drug Administration (Chacón-Lee and González-Mariño, 2010; Mócsai et al., 2019).

Due to the significantly positive impact of carotenoids on commercial application, a growing demand for these biologically active compounds has increased the attention and commercial interest both in the supply and in obtaining promising natural carotenoids produced by the synthesis of microorganisms. The world market for carotenoids was estimated at US\$ 1,577 million in 2017 and is expected to reach US\$ 2,098 million by 2025. By 2017, astaxanthin, β -carotene, and lutein were the major contributors to the global carotenoid market in value terms. β -carotene and astaxanthin, with an average price close to US\$ 2,500/kg (Patias et al., 2017; Jacob-Lopes et al., 2019).

Regardless of the intended application of biomass, the kinetic model of microalgae culture is significant to evaluate the proficiency and performance of a reactor, as well as the quantity and quality of the desired product. The growth curve of microalgae cultures shows different phases involving changes in the physical-chemical and biological characteristics of the microalgae (Queiroz et al., 2011; Tijani et al., 2018; Tkáčová et al., 2018).

The heterotrophic culture maintained by sources of exogenous carbon is a potential form of pigment production. The choice of inputs that have a low cost to the culture medium is of great importance for process economics (Wen and Chen, 2003). The efficiency of converting incoming energy into the form of electricity in ATP and NADPH at heterotrophic cultivation is economically more advantageous than photoautotrophic cultivation. Glucose is the preferred source of carbon in *Chlorella* species in heterotrophic cultivation for the production of lutein (Perez-Garcia et al., 2011; Behrens et al., 2005).

The objective of this study was to determine the heterotrophic metabolic potential of the *Chlorella vulgaris* microalgae for production of carotenoids, in different phases of microalgae growth kinetics in batch cultures.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and culture media

The axenic cultures of *Chlorella vulgaris* (CPCC90) was manipulated in the experiments. The culture in was disseminated and maintained in synthetic BG11 medium (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman & Stanier, 1979). The incubation conditions were 25 °C, photon flux density of 15 µmol/m²/s⁻¹ and a photoperiod of 12/12 h light/dark were used.

2.2. Microalgal biomass production

The experiments were developed in a bioreactor operating in the batch system, fed with 2.0L of culture medium. The experimental conditions were as follows: initial inoculum concentration of 100mg/L, a temperature of 25°C, pH adjusted to 7.6, aeration of 1 volume of air per culture volume per minute and absence of light. The culture medium consisted of BG11 supplemented with an exogenous carbon source to obtain a fixed C/N ratio of 20. The source and the concentration of organic carbon used were: D-glucose (12.4 g/L). The glucose was weighed and diluted in synthetic BG11 medium, followed by autoclaving at 121 ° C for 20 min (Francisco et al., 2014).

Cell biomass concentration, pH control and carotenoid production were monitored every 24h during growth kinetics of the microorganism. The experiments were carried out in two aliquots, so the kinetic data refer to the mean value of the replicates. The pH values were determined using a potentiometer (Mettler-Toledo, São Paulo, SP, Brazil). Cell biomass was determined gravimetrically by filtering a known culture volume through a 0.45µm membrane filter (Millex FG®, Billerica, MA, USA), and drying at 60°C for 24h. The biomasses for pigment extraction were separated from the culture medium by centrifugation. It was subsequently lyophilized for 24h at -50°C above -175µm Hg and then stored under refrigeration until analysis.

2.3. Kinetics parameters

Biomass data were used to calculate the biomass productivity [$P_X = (X_i - X_{i-1}) / (t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg.L.h⁻¹], the maximum specific growth rate [$\ln(X_i/X_0) = \mu_{\text{máx}} \cdot t$, h⁻¹], the generation time [tg =

$0.693/\mu_{\text{máx}}, \text{h}^{-1}$]; where X_0 is the initial concentration of biomass, X_i is the concentration of biomass at time t and X_{i-1} is the biomass concentration at time t_{i-1} , t is the residence time, μ_{max} is the maximum specific growth rate (Santos et al., 2017)

2.4. Carotenoid extraction

The carotenoids were exhaustively extracted from the freeze-dried sample ($0.1 \pm 0.02\text{g}$) with ethyl acetate and methanol in a mortar with a pestle followed by centrifugation (Hitachi, Tokyo, Japan) for 7min at 3500rpm (Patias et al., 2017). The extraction procedure was repeated until the supernatant becomes colorless. The homogenized sample suspension was filtered through a $0.22\mu\text{m}$ polyethylene membrane, concentrated in a rotary evaporator ($T < 30^\circ\text{C}$), suspended in a mixture of petroleum ether/diethyl ether [1:1 (v/v)], and saponified overnight (16h) with 10% (w/v) methanolic KOH at room temperature. The alkali was removed by washing with distilled water, and each extract was once again concentrated in a rotary evaporator, flushed with N_2 and kept at -37°C in the dark until chromatographic analysis. All extractions were performed in triplicate.

2.5. HPLC-PDA-MS/MS analysis

The carotenoids were analyzed by high performance liquid chromatography, HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with quaternary pumps (model LC-20AD) and an automatic injector. The equipment was connected in series to a PDA detector model SPD-M20A and a mass spectrometer with a triple quadrupole 8040 analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan) and APCI ionization source (Shimadzu, Kyoto, Japan). UV-visible spectra were obtained between 250 and 600nm, and the chromatograms were processed at 450nm. The mass spectra were obtained with a scanning range of m/z of 300 to 700nm. The HPLC-PDA MS/MS parameters were adapted as described previously by Bukowski et al (2018). The instrument was run in multiple reaction monitoring modes (MRM), with pre-cursor m/z, product m/z and collision energy voltages optimized. The parameters MS and MS/MS were as follows: positive mode; potential interface maintained at 4.0 KV; Temperature DL, 200°C ; dry gas, N_2 , with flow rate of $10 \cdot \text{min}^{-1}$; nebulizer gas, argon with flow rate of $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; interface temperature, 300°C ; Carotenoid separation was performed on an Acclaim™ C30 reverse phase column, $5\mu\text{m}$ ($250 \times 4.6 \text{ mm}$) column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Prior to HPLC-PDA-MS/MS analysis, the carotenoid extract was solubilized in methanol (MeOH): methyl-terbutylether (MTBE) (70:30) and filtered through Millipore membranes (0.22µm). The mobile phase consisted in a mixture of MeOH and MTBE. A linear gradient was applied from 95:5 to 70:30 in 30min, to 50:50 in 20min. The flow rate was 0.9mL/min. The identification was performed according to the following combined information: elution order on C30 HPLC column, co-chromatography with authentic standards, UV-visible spectrum (λ max, spectral fine structure, peak *cis* intensity), and mass spectra characteristics (protonated molecule ([M+H]⁺) and MS/MS fragments), compared with data available in the literature (Rodrigues et al., 2015; Van Breemen, Dong & Pajkovic, 2012; Zepka & Mercadante, 2009; De Rosso & Mercadante, 2007; Britton, 1995; Patias et al., 2017; Huang et al., 2017). Carotenoids were quantified by HPLC-PDA using external calibration curves for all-trans-lutein and all-trans- β -carotene at five concentration levels. Total carotenoid content was calculated as the sum of the content of each individual carotenoid separated in column C30.

2.6. Statistical analysis

Descriptive statistics, one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) were applied to the experimental data. The analyzes were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa-OK, US).

3. Results and discussion

1. Biomass Production

The heterotrophic growth of *C.vulgaris* in the medium containing 24.7g.L⁻¹ glucose, applying a C/N ratio of 20 was achieved and the results are presented in Table1. In the absence of light, the use of suitable carbon source is crucial for attaining high biomass yield in algal culture. The maximum specific growth rate was 0.0248h⁻¹, similar to that obtained with the use of the same monosaccharide by Francisco et al. (2014) which was 0.0320h⁻¹ in the study of different carbohydrates as a carbon source using cyanobacteria, resulting in a generation time of 27.94h⁻¹.

Table 1. Kinetics parameters of microalgae *Chlorella Vulgaris*.

Parameters	Results
$\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})$	0,0248
$\text{tg} (\text{h}^{-1})$	27,94
$X_{\text{máx}} (\text{mg.L}^{-1})$	2200
$P_x (\text{mg.L}^{-1})$	12,15

$\mu_{\text{máx}}$ maximum specific growth rate, tg generation time, $X_{\text{máx}}$ maximum cell biomass, P_x biomass productivity.

In terms of maximum cellular biomass, the microalgae *Chlorella Vulgaris* presented satisfactory performance, when compared to the results obtained in the mixotrophic culture by Molazadeh et al., (2019), this being an average yield of 2200mg.L^{-1} . The higher biomass production is because of the elevated assimilation capacity of glucose with lower energy expenditure via phosphorolytic degradation of the substrate. Biomass yield coefficients generally have lower values than one, but values greater than one, obtained in the experiment are due to the resulting energy savings of phosphorolysis of the substrate. In addition, considering the biomass productivity parameter, productivity was obtained around 12.15mg.L.h^{-1} .

An active hexose/ H^+ inducer system in *Chlorella* cells is found and some other genes, these are photosynthetically absent, and are activated when autotrophically cultured *Chlorella* cells change for growth heterotrophic in the presence of D-glucose, facilitating the absorption of available glucose as a substrate source (Hilgarth et al., 1991; Perez-Garcia, 2011). This sugar transporter mechanism is inactivated when the pH is below 6.0 (Komor and Tanner, 1976; Komor et al., 1979). Considering that the cell growth kinetics occurred up to 120h with a pH decrease during the experiment, and that in the decline phase the microalga was at pH 5.89, this may be one of the justifications for the cell death of the microorganism.

2. Identification of carotenoids

Naturally, the pigments are produced under photoautotrophic growth conditions, but some cultures are produced and in large amounts under heterotrophic dark conditions. A total of 7 different carotenoids were separated in the extracts of *Chlorella vulgaris* (Table 2). Separate carotenoids were identified based on the combined information obtained from the

chromatographic elution, co-chromatography with the standards, UV/Visible spectrum and mass spectrum quantitative characterization of carotenoids in microalgal extracts of *Chlorella vulgaris* ($\mu\text{g/g}$ dry weight). Characteristics obtained by the instrument performed in multiple MRM reaction monitoring modes (Table 2). A detailed description of the identification and profile of carotenoids in microalgae using heterotrophic culture has not yet been reported, only studies for the production of a specific compound as described by Ip & Chen (2005), Liu et al. (2012), Liu et al., (2013), Wang & Peng (2008).

According to Table 2, 15-*cis*-neoxanthin (peak 1) and all-*trans*-neoxanthin (peak 2) were identified. These two compounds were not found by Patias et al. (2017) using the same algae in photoautotrophic cultivation, in fact, allenic carotenoids are very limited in microalgae (Takaichi, 2011). But all-*trans*-neoxanthin was found in a cyanobacterium *Phormidium autumnale* cultivated and agroindustrial wastewater according to Rodrigues et al. (2014), showed characteristic UV-visible spectra with a hypsochromic shift of 1 nm. The molecular mass of neoxanthin was confirmed by the protonated molecule at m/z 601 and by consecutive losses of two hydroxy groups, m/z 583 [M + H - 18]⁺, 565 [M + H - 18 - 18]⁺ from protonated molecule, found in MS/MS. In addition, other fragments were detected, both from the MS/MS fragmentations, at m/z 509 [M + H-92]⁺, 491 [M + H-92-8]⁺ and 521.

Luteoxanthine, peak 3 was identified, considering the characteristics of the UV-visible spectrum, the protonated molecule a m/z 601, and the fragment a m/z 583 [M + H-18]⁺, 509 [M + H-92]⁺ and 521. However, the m/z 221, which characterizes the epoxy substituent in a hydroxyl grouping, was not detected. all-*trans*-Lutein (peak 4) and 9-*cis*-Lutein (peak 5) showed characteristic UV-visible spectra. The identifications of both were given by their mass spectra with the protonated molecule at m/z 569 and the m/z 551 fragment [M+H-18]⁺ (at source). In addition, MS/MS showed the presence of fragments in m/z 495 [M+H-18-56]⁺ and 325. A characteristic observed with electron impact ionization was the 551 u fragment corresponding to the loss of the hydroxyl group in the ε-ring, with higher intensity than the protonated molecule (569 u) (De Rosso & Mercadante, 2007). Coelution with the all-*trans*-lutein standard confirmed the identity.

Peaks 7 and 8 were identified as 13-*cis*-β-carotene and all-*trans*-β-carotene, considering the characteristics of UV-visible spectra, chromatographic behavior, pattern co-elution and mass spectra. The mass spectra of the isomer of β-carotene showed the protonated molecule a

m/z 537 and two ionic fragments in the MS/MS a m/z 444 [M+H-92]⁺ and 457, corresponding to the loss of the toluene of the polyene chain (Van Breemen et al., 2012).

Table 2. Chromatographic, UV-vis spectrum and mass characteristics, obtained by HPLC-PDA-MS/MS of *Chlorella vulgaris* carotenoids.

Peak ^a	Carotenoid	t _R (min) ^b	UV-Vis characteristics			Fragment ions (positive mode) (<i>m/z</i>)	
			λ _{max} (nm) ^c	III/II (%) ^d	A _B /II (%) ^e	[M+H] ⁺	MS/MS
1	15- <i>cis</i> -neoxanthin	4.4	344,411,435,463	66	nd ^f	601	583 [M+H-18] ⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491 [M+H-92-18] ⁺
2	all- <i>trans</i> -neoxanthin	4.6	414,437,466	77	0	601	583 [M+H-18] ⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491 [M+H-92-18] ⁺ , 521
3	all- <i>trans</i> -luteoxanthin	4.9	399,420,445	66	0	601	583 [M+H-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 521
4	all- <i>trans</i> -lutein	6.1	420,443,471	57	0	569	551 [M+H-18] ⁺ (in-source), 495 [M+H-18-56] ⁺ , 325
5	9- <i>cis</i> -lutein	7.3	329,413,438,465	50	37	569	551 [M+H-18] ⁺ (in-source), 495 [M+H-18-56] ⁺ , 325
6	13- <i>cis</i> -β-carotene	27.8	337,419,443,469	33	nd ^f	537	444 [M+H-92] ⁺ , 457
7	all- <i>trans</i> -β-carotene	28.4	425,450,476	25	0	537	444 [M+H-92] ⁺ , 457, 399

^aNumbered according to the chromatograms shown in Figure 1. ^bt_R: Retention time on the C₃₀ column. ^cLinear gradient Methanol: MTBE. ^dSpectral fine structure: Ratio of the height of the longest wavelength absorption peak (III) and that of the middle absorption peak (II). ^eRatio of the *cis* peak (A_B) and the middle absorption peak (II). ^fNot detecte

3. Influence of cell growth on carotenoid production

The impact of microalgae growth kinetics on carotenoid composition can be seen in Figures 1, 2 and Table 3. In general, at time 0h, where the microalga was in the process of transition to the dark environment, all-*trans* carotenoids decreased with a concomitant increase in the amounts of *cis* isomers, where 9-*cis*-lutein was the majority (330.52µg/g) and the carotenoids total was 1330.30µg/g.

The highest total carotenoid content of *Chlorella vulgaris* grown under heterotrophic conditions was 381.69µg/g in 96h. During all the heterotrophic cell growth the major compounds were all-*trans*-lutein and all-*trans*-β-carotene, in 96h they obtained values of (131.35µg/g) and (80.99µg/g) respectively. Considering the progression in the lutein market and the exploration for new natural sources of the compound, it is suggested that the time of 72h as an ideal to obtain the same, since the apex of its production occurred at this time with 143.53µg/g, representing 43,90% of the total value of carotenoids (326.90µg/g) in 72h.

According to the results presented above, it is noted that time 0h has a higher total carotenoid value than at any other time. On the other hand, it shows the exploratory potential in the biosynthesis of carotenoids using heterotrophic culture, since the production apex is favored in cultures with light due to the occurrence of photosynthesis. Patias et al (2017), using the same strain in photoautotrophic culture, did not obtain all-*trans*-lutein as the primary compound, showing that there is a change in the metabolic route of production of these compounds in the dark.

In a study about the kinetics production of volatile organic compounds in microalgae using heterotrophic cultures and applying the same conditions of this study, Santos et al. (2016) concluded that the cultivation using glucose produced a greater variety of compounds and also obtained better production time 72h, It showed the impact of the metabolic transformation as a function of time in the composition of biocompounds in the heterotrophic bioreactor supplemented with glucose, that between 24 and 72 h of culture, there was a clear change in the quantitative profile.

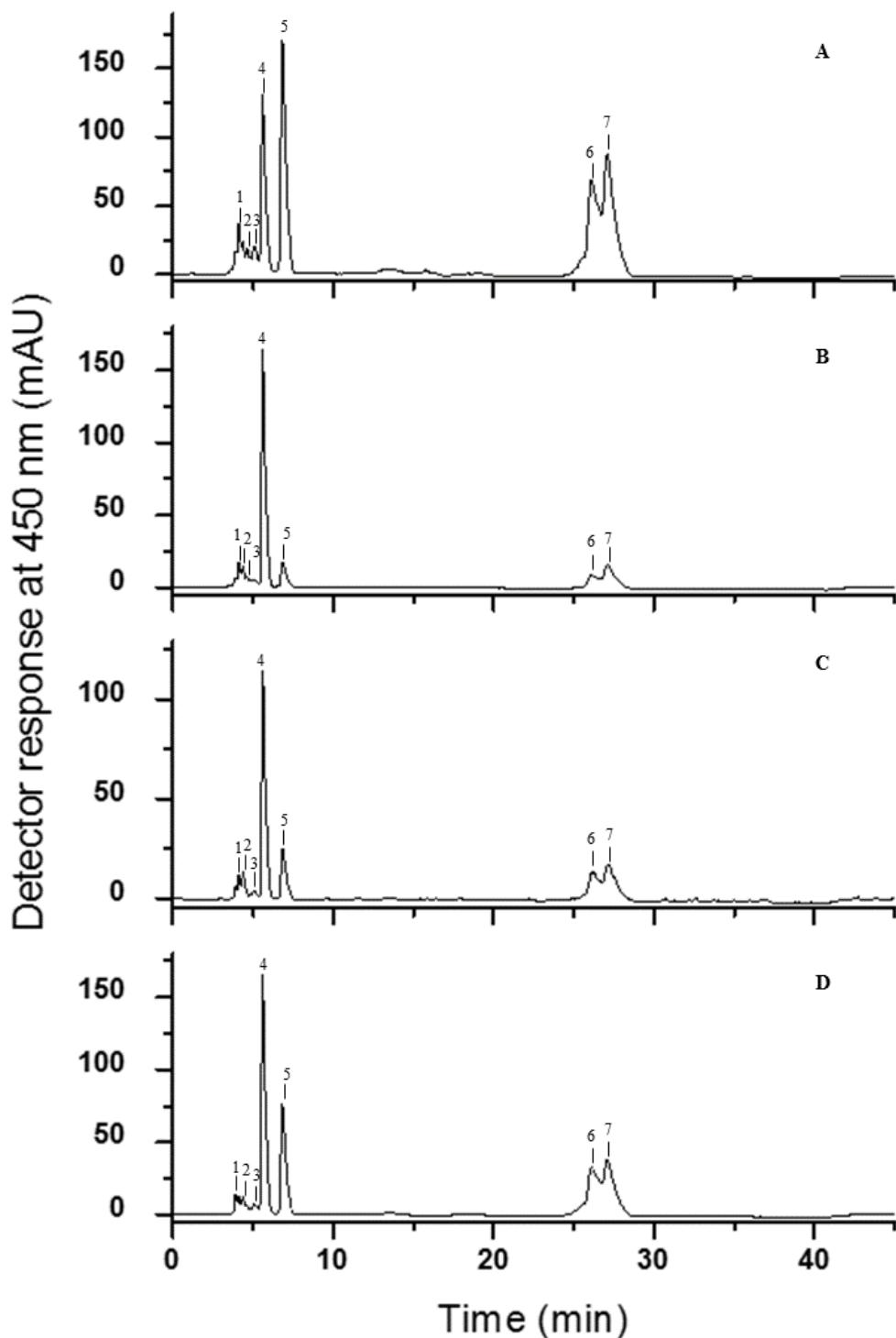


Figure 1. Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of carotenoid extract from *Chlorella vulgaris*. See text for chromatographic conditions, times 0h (A), 24h (B), 72h (C), 96h (D). The identification and characterization of the peak are given in Table 2. The chromatogram was processed at 451 nm

Table 3. Quantitative characterization of carotenoids in microalgal extracts of *Chlorella vulgaris* ($\mu\text{g/g}$ dry weight).

Peak	Carotenoids	0 h	24h	48h	72 h	96h	120h
1	15- <i>cis</i> -neoxanthin	38.44 ^a \pm 0,02	5.58 ^b \pm 0,00	1.76 ^c \pm 0,00	10.12 ^d \pm 0,02	6.24 ^e \pm 0,01	5.05 ^f \pm 0,00
2	all- <i>trans</i> -neoxanthin	29.26 ^a \pm 0,00	4.72 ^b \pm 0,00	3.74 ^c \pm 0,01	14.96 ^d \pm 0,07	7.29 ^e \pm 0,01	6.78 ^f \pm 0,01
3	all- <i>trans</i> -luteoxanthin	21.19 ^a \pm 0,00	2.59 ^b \pm 0,00	1.86 ^c \pm 0,01	7.62 ^d \pm 0,03	2.92 ^e \pm 0,02	3.97 ^f \pm 0,01
4	all- <i>trans</i> -lutein	220.39 ^a \pm 0,07	78.20 ^b \pm 0,01	69.56 ^c \pm 0,13	143.53 ^d \pm 0,69	131.35 ^e \pm 0,24	138.09 ^f \pm 0,10
5	9- <i>cis</i> -lutein	330.52 ^a \pm 0,10	11.64 ^b \pm 0,00	7.52 ^c \pm 0,01	40.88 ^d \pm 0,19	74.42 ^e \pm 0,13	47.32 ^f \pm 0,03
6	13- <i>cis</i> - β -carotene	10.76 ^a \pm 0,00	12.64 ^b \pm 0,00	8.36 ^c \pm 0,02	47.85 ^d \pm 0,22	78.48 ^e \pm 0,21	49.25 ^f \pm 0,04
7	all- <i>trans</i> - β -carotene	672.73 ^a \pm 4,73	22.73 ^b \pm 0,00	17.74 ^c \pm 0,02	61.94 ^d \pm 0,28	80.99 ^e \pm 0,16	70.38 ^f \pm 0,04
Total carotenoids		1330.30 ^a	138.14 ^b	110.54 ^c	326.90 ^d	381.69 ^e	320.84 ^f

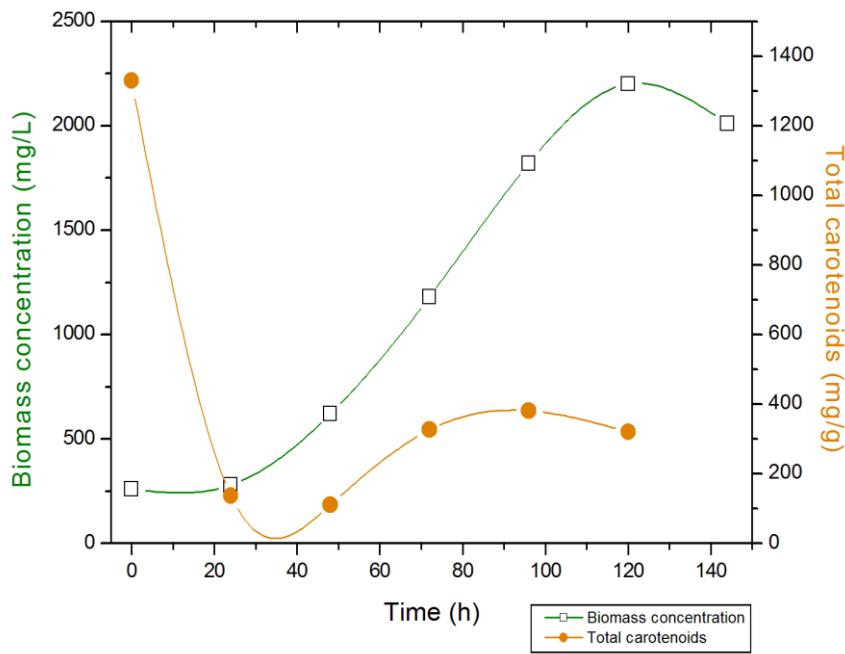


Figure 2: Growth kinetics and carotenoid production of *Chlorella vulgaris*.

The cultivation of microalgae which are mainly photosynthetic under heterotrophic conditions for the production of economically useful metabolites or technological processes is a tempting option, given significant reductions in crop complexity and costs. Mainly because heterotrophic growth consume simple, cheap and available carbon sources (glucose, acetate, fructose) that are commonly used by fermentation industries for other purposes. Microalgae cells cultured in the dark require a latency period (lag phase) to develop the specific transport systems required for uptake of other substrates. The consumption of "less preferred" substrates is aborted because the enzymes that catalyze the uptake of an alternative substrate can not be synthesized in the presence of the "preferred" substrate (Ip & Chen, 2005; Hu et al., 2018).

Unfavorable environmental conditions can be used for adaptive evolution, with the function of increasing the carotenoid content in microalgae, but the responses are different for each type of carotenoids (Hodgson et al., 2016). The investigation of the parameters involved in the process can help to obtain high productivity of carotenoids, according to Hodgson et al. (2016), the astaxanthin pigment content can be raised to more than 50 mg/g under certain stress conditions, while the lutein content is dependent on the rate of growth of the microorganism.

Many variables affect the productivity of lutein, being algal species, temperature, light intensity, photoperiod, pH, nutrient availability and salinity. Fernández-Sevilla et al. (2010) showed that 28°C is the optimal temperature for the production of lutein considering the cell growth rate. Shi et al. (2000) reported a lutein yield of 83.8mg/L can be achieved under heterotrophic conditions using glucose as the carbon source.

Under heterotrophic conditions, glucose is utilized in the cell by means of the pentose phosphate pathway (Figure 3). Glucose is easily introduced into both biosynthetic routes of isoprenoid. These catabolic routes of glucose produce glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate, which are the precursors in the MEP pathway (Eisenreich et al., 2004). The isopentenyl diphosphate (IPP) is isomerized to its allylic isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Geranyl pyrophosphate (GPP) is then produced by the condensation reaction of IPP and DMAPP elongation of GPP by the addition of IPP results in the formation of farnesyl pyrophosphate (FPP) to which is further added another IPP to produce GGPP. In a head-tohead condensation of the two GGPP C20 compounds, the first carotene phytoene (C40) (Fraser et al., 2000; Sun et al., 2015). For the conversion of phytoene into lycopene, microalgae require three enzymes: phytoene desaturase (CrtP), δ -carotene desaturase (CrtQ) and ciscarotene isomerase (CrtH), all carotenoids present in microalgae are derived from lycopene (Takaichi, 2011).

Carotenogenesis pathways in algae are common in terrestrial plants, and also specific algal pathways, which are proposed exclusively based on the chemical structures of carotenoids according to Takaichi 2011. Phytoene (C40) is the first carotenoid synthesized by the enzyme phytoene synthase (PSY) is a limiting enzyme that acts on carotenoid biosynthesis. PSY levels are light regulated and reduced under darkness, thereby limiting the availability of phytoene necessary for cis-carotene biosynthesis. In general, PSY is a central regulatory center, which limits the synthesis of cis-carotene biosynthesis and xanthophyll (Maass et al., 2009; Mapelli-Brahm et al., 2017). According to Alagoz et al. (2018), PSY reduced the action by limiting the availability of the phytoene necessary for the biosynthesis of the formation of the cis compound. In photoautotrophic experiments, performed by Rodrigues et al. (2015) and Patias et al. (2017), most of the compounds are in the all-trans form. Thus, the identification performed in this work, where 4 of the 7 compounds are in the all-trans form, is supposed to be by limiting the action of PSY.

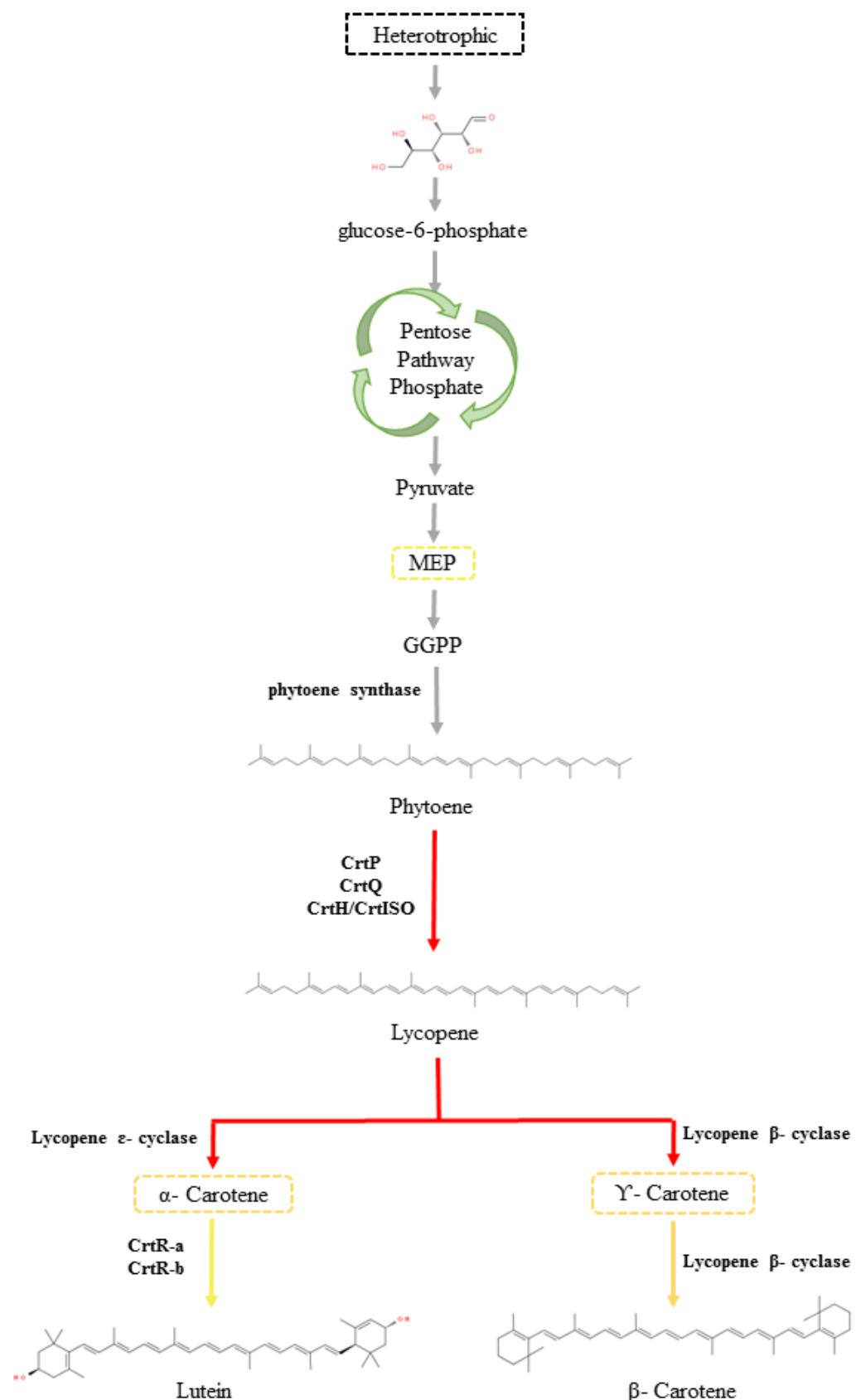


Figure 3. Diagram of the carotenoid biosynthesis pathway, in heterotrophic culture.

Lutein is a primary xanthophyll pigment present in plants and green algae, involved in the collection of light during photosynthesis and in the protection of oxidative photo damage photosystems. It is the only carotenoid to be accumulated at a specific site in the human body and functions as part of the system, it accumulates in the macula of the human eye, protecting the eyes from the oxidative damage caused by blue light, improves visual acuity, and protects against degeneration age-related macular degeneration (Krinsky et al., 2003; Panova et al., 2017).

Genetic engineering studies are applied to improve the production of certain pigments, but for microalgae lutein is still crawling in the market and these strategies have not yet been applied, however, it has been observed that the main bottleneck in lutein synthesis is the low flux for the production of lycopene. Since the production of lycopene is increased, consequently the lutein content can be increased (Wu et al., 2009). Yeh et al. in a study by transcriptome analysis of a strain called *Desmodesmus* sp. JSC3, stated that the increase in the synthesis of lycopene in the initial phase of growth may lead to the flow of α -carotene and lutein in the late exponential phase.

The global lutein market was estimated at US\$ 135 million in 2015 and will continue to rise until 2024 (Global Market Insights Lutein Market Report, 2016; Jacob-Lopes et al., 2019). Thus, the potential of microalgae seems undeniable, important issues will have to be solved, such as the industry inertia and the legal status of the carotenoids from microalgae, therefore heterotrophic cultivation of microalgae is a promising approach in facing the demand for natural lutein in the nutraceutical market.

4. Conclusion

The study by *Chlorella vulgaris* showed no differences in relation to its qualitative profile of carotenoids in the different phases of growth, only in the quantitative profile. A total of 7 carotenoids were identified and the highest total carotenoid production was at 96h with 381.69 μ g/g (dry weight), and all-*trans*-lutein carotenoid majority. However, with the increasing market demand for lutein, it is suggested 72h as the best time to obtain this compound, where lutein accounted for 43% of total carotenoids. From this work, it is safe to recommend that species of the genus *Chlorella* are suitable candidates for the heterotrophic production of lutein and demonstrate that carotenoids are also synthesized in the dark and heterotrophic culture seems to be an interesting option for the commercial production of these compounds. The focus on these organisms and the use of cultivation strategies and genetic engineering of processes can overcome the difficulties encountered in these crops for the production of natural pigments.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to the National Academic Cooperation Program PROCAD/CAPES and National Counsel of Technological and Scientific Development (552440/2011-6 and 405640/2013-7) (CNPq) for the financial support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

6. References

- Aimjongjun, S., Sutheerawattananonda, M., Limpeanchob, N. (2013). Silk lutein extract and its combination with vitamin E reduce UVB-mediated oxidative damage to retinal pigment epithelial cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, B, 124, 34-41.
- Alagoz, Y., Nayak, P., Dhami, N., Cazzonelli, C.I. (2018). cis-carotene biosynthesis, evolution and regulation in plants: The emergence of novel signaling metabolites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 654, 172-184.
- Behrens, P.W. Photobioreactors and fermentors: the light and dark sides of growing algae R.A. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, Oxford (2005), pp. 189-204.
- Britton, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids: Spectroscopy* (pp. 13–62). Badel: Birkhäuser Verlag.
- Bukowski, M. R., Voeller, K., & Jahns, L. (2018). Simple and sensitive dilute-and-shoot analysis of carotenoids in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 1095, 32–38.
- Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D.-G., Lee, D.-U., & Pan, C.-H. (2010). Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 793–797.
- Chacón-Lee, T.L., González-Mariño, G.E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods Possibilities and Challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9, 655-675.
- Chung, R.W.S., Leanderson, P., Lundberg, A.K., Jonasson, L. (2017). Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 262, 87-9.
- De Rosso, V.V., & Mercadante, A.Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5062–5072.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007), pp. 5062-5072.

- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 61: 1401–1426.
- Fernández-Sevilla, J.M.J.M., Acién Fernández, F.G., Molina Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications Applied Microbiology and Biotechnology., 86, 27-40.
- Francisco, É. C., Franco, T. T., Wagner, R., & Jacob-Lopes, E. (2014). Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(8), 1497–1505.
- Fraser, P.D., Schuch, W., Bramley, P.M. (2000). Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts-partial purification and biochemical properties. *Planta* 211, 361–369.
- Global Market Insights Lutein Market Report. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/lutein-market> (2016–2024).
- Hilgarth, C., Sauer, N., Tanner, W. Glucose increases the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Chlorella J. Biol. Chem., 266 (1991), pp. 24044-24047.
- Hodgson, P., Barrow, C., Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-19.
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67.
- Huang, J. J., Lin, S., Xu, W., & Cheung, P. C. K. (2017). Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances*, 35(5), 597–618.
- Ip, P.-F., & Chen, F. (2005). Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, 40(2), 733–738.
- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M.M., Deprá, M.C., Sartori, R.B., Dias, R.R., Zepka, L.Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries, 25, 1-7.

- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., & Hasegawa, T. (2009). Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(5), 657–661.
- Komor, E., Schwab, W.G.W., Tanner, W. The effect of intracellular pH on the role of hexose uptake in *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Acta*, 555 (1979), pp. 524-530.
- Komor, E., Tanner, T. The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*: evidence for electrogenic sugar transport *Eur. J. Biochem.*, 70 (1976), pp. 197-204.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.I., Bone, R.A. (2003). Biological mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition*., 23, 171-201
- Lin, J.H., Lee, D.J., Chang, J.S. (2015). Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*., 184, 421-428.
- Liu, J., Sun, Z., Zhong, Y., Gerken, H., Huang, J., Chen, F. (2013). Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by a *Chlorella zofingiensis* mutante. *Journal of Applied Phycology*., 25, 447-1456.
- Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., Chen, F. (2012). Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*., 107, 393-398.
- Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P., Welsch, R. (2009). Carotenoid Crystal Formation in *Arabidopsis* and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *PLoS ONE* 4(7): e6373.
- Mapelli-Brahm, P., Corte-Real, J., Meléndez-Matinéz, A.J., Bohn, T. (2017). Bioaccessibility of phytoene and phytofluene is superior to other carotenoids from selected fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 229, 304-311.
- Mócsai, R., Figl, R., Troschl, C., Strasser, R., Svehla, E., Windwarder, M., Thader, A., Altmann, F. (2019). N-glycans of the microalga *Chlorella vulgaris* are of the oligomannosidic type but highly methylated. *Nature Scientific Reports*, 9(1).
- Molazadeh, M., Danesh, S., Ahmadzadeh, H., & Pourianfar, H. R. (2019). Influence of CO₂ concentration and N:P ratio on *Chlorella vulgaris*-assisted nutrient bioremediation, CO₂

biofixation and biomass production in a lagoon treatment plant. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. *In press.*

Panova, I.G., Yakovleva, M.A., Tatikolov, A.S., Kononikhin, A.S., Feldman, T.B., Poltavtseva, R.A., Nikolaev, E.N., Sukhikh, G.T., Ostrovsky, M.A. (2017). Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development. Experimental Eye Research., 160, 31-37.

Panova, I.G., Yakovleva, M.A., Tatikolov, A.S., Kononikhin, A.S., Feldman, T.B., Poltavtseva, R.A., Nikolaev, E.N., Sukhikh, G.T., Ostrovsky, M.A. (2017). Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development. Experimental Eye Research., 160, 31-37.

Patias, L.D., Fernandes, A. S., Petry, F.C., Mercadante, A.Z., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. (2017). Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxyl radical scavenger capacity. Food Research International, 100, 260-266.

Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water Res 45:11–36.

Queiroz MI, Hornes MO, Silva-Manetti AG, Jacob-Lopes E (2011) Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothecace microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. Appl Energy 88:3438–3443.

Rippka R, Derueles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol 111:1–61.

Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, Lee K, Rashid N. (2018) Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. Renewable Sustainable Energy Reviews, 92, 394-404.

Rodrigues, D.B., Menezes, C.R., Mercadante, A., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. Food Research International, 77 (2015), pp. 273-279

Rodrigues, D.B., Flores, E.M.M., Barin, J.S., Mercadante, A.Z., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. From waste to natural pigments: Productions of microalgal carotenoids in agroindustrial wastewater Food Research International, 65 (2014), pp. 144-148.

- Santos, A. M., Vieira, K. R., R. B., Santos, A. M., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E. (2017). Heterotrophic Cultivation of Cyanobacteria: Study of Effect of Exogenous Sources of Organic Carbon, Absolute Amount of Nutrients, and Stirring Speed on Biomass and Lipid Productivity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5.
- Sauer, N., Tanner, W. The hexose carrier from Chlorella. cDNA cloning of a eukaryotic H⁺-cotransporter *FEBS Lett.*, 259 (1989), pp. 43-46.
- Shi, X. -M., Zhang, X. -W., Chen, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by Chlorella protothecoides on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 312-318.
- Sun, Z.; Li, T.; Zhou, Z.; Jiang, Y. (2015). *Microalgae Biotechnology*. (2th Ed.), Switzerland.
- Takaichi. S. (2011). Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9 (6), 1101-1118
- Tanner, W. (1969). Light-driven active uptake of 3-O-methylglucose via an inducible hexose uptake system of *Chlorella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36(2), 278–283.
- Tijani, H., Yuzir, A., Dagang, W. R. Z. W., Zamyadi, A., & Abdullah, N. (2018). Multi-parametric modelling and kinetic sensitivity of microalgal cells. *Algal Research*, 32, 259–269.
- Tkáčová, J., Klempová, T., & Čertík, M. (2017). Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in β-carotene producing Rhodotorula glutinis . *Chemical Papers*, 72(5), 1193–1203.
- Van Breemen, R.B., Dong, L., & Pajkovic, N.D. (2012). Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *International Journal of Mass Spectrometry*, 312, 163–172.
- Van Breemen, R.B., Dong, L., Pajkovic, N.D. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *International Journal of Mass Spectrometry*, 312 (2012), pp. 163-172.
- Wang, Y., Peng, J. (2008). Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1915-1922.

- Wen, Z. Y., and Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* 21, 273–294.
- Wu, Z.Y., Qu, C.B., Shi, X.M. (2009). Biochemical system analysis of lutein production by heterotrophic Chlorella pyrenoidosa in a fermentor. Food Technology and Biotechnology, 47, 450-455
- Yang, C., Hua,Q., Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal . 6, 87-102
- Yeh, T.J., Tseng, Y.F., Chen, Y.C., Hsiao, Y., Lee, P.C., Chen, T.J., Chen, C.Y., Kao,C.Y., Chang, J.S., Chen, J.C., Lee, T.M. (2017). Transcriptome and physiological analysis of a lutein-producing alga Desmodesmus sp. reveals the molecular mechanisms for high lutein productivity. Algal Research., 21, 103-119

5 CONCLUSÃO GERAL

A microalga *Chlorella vulgaris* CPCC90, não apresentou diferenças em relação ao seu perfil qualitativo de carotenoides nas diferentes fases de crescimento, apenas no perfil quantitativo. Um total de 7 carotenoides foi identificado e a maior produção heterotrófica total de carotenoides foi em 96h com 381,69 μ g/g (peso seco). O carotenoide majoritário em todo o experimento foi all-trans-luteína. Porém, com a crescente demanda do mercado por luteína, é sugerido 72h como o melhor tempo para obter este composto, onde a luteína foi responsável por 43,90% do total de carotenoides. A partir deste trabalho, é possível recomendar que espécies do gênero *Chlorella* sejam candidatas adequadas para a produção heterotrófica de luteína e demonstrar que os carotenoides também são sintetizados no escuro, tornando a cultura heterotrófica uma opção interessante para a produção comercial desses compostos.

6 REFERÊNCIAS

- ABRAGAMSSON, I.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, C.; TURNER. Supercritical fluid extraction of lipids from linseed with on-line evaporative light scattering detection, **Analytica Chimica Acta**, 853, 320-327, 2015.
- ALBUQUERQUE, C.D. Estudo da cinética de produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* e de técnicas de extração de pigmentos. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC. 177p, 2015.
- BENNEDSEN, M., WANG, X., WILLIÉN, R., WADSTROM, T., ANDERSEN, L.P. (2000). Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. **Immunology letters**, 70, 185-189, 2000.
- BJØRLAND, T., LIAAEN-JENSEN, S., THRONDSEN, J. Carotenoids of the marine chrysophyte *Pelagococcus subviridis*. **Phytochemistry**, 28(12), 3347–3353, 1989.
- BOROWITZKA, M.A. Biology of Microalgae. In: Microalgae in Health and Disease Prevention. Edited by Levine IA, Fleurence J. Academic Press; 23-72, 2018.
- BOROWITZKA, M.A. Chapter 9 - Microalgae in Medicine and Human Health: A Historical Perspective. **Microalgae in Health and Disease Prevention**, 195-210, 2018.
- BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae-their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, 25, 743-756, 2013.
- BRASIL, B.S.A.F., SILVA, F.C.P., SIQUEIRA. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 39, 90-98, 2017.
- BRITTON, G. Chapter 10: functions of intact carotenoids. In: BRITTON, G., PFANDER,H., LIAAEN-JENSEN, S. Carotenoids. Volume 4: natural functions. **Birkhäuser Basel**, 189–212, 2008b.
- BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. Carotenoids: Handbook. 1st ed. Basel, Switzerland:Springer Basel AG; 2004. p. 646p.

BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY. The Global Market for Carotenoids - FOD025E <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html> (2015).acessado 22.02.19.

BUSTAMANTE, A., MASSON, L., VELASCO, J., VALLE, J.M., ROBERT, P. Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. **Food Chemistry** 190, 1013–1021, 2016.

CHA, K., KOO, S., LEE, D. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 10521–10526, 2008.

CHACON-LEE, T. L.; GONZALEZ-MARINO, G. E. Microalgae for “healthy” foods: possibilities and challenges. Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, 9, 655–675, 2010.

CHEN, C.; JESISCA.; HSIEH, C.; LEE, D.; CHANG, C.; CHANG, J. Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. **Bioresource Technology**, 200, 500-505, 2016.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**. 14, 421–426, 1996.

CHEN, G. Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607-616, 2006.

CHEN, Y-H, WALKER, T.H. Fed-batch fermentation and supercritical fluid extraction of heterotrophic microalgal *Chlorella protothecoides* lipids. **Bioresource Technology**, 114, 512–517,2012.

CHEW, K.W., YAP, J.Y., SHOW, P.L., SUAN, N.H., JUAN, J.C., LING, T.C., LEE, D.J., CHANG, J.S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, 229, 53-62, 2017.

CHIU, P.; SOONG, K.; CHEN, C.N. Cultivation of two thermotolerant microalgae under tropical conditions: Influences of carbon sources and light duration on biomass and lutein productivity in four seasons. **Bioresource Technology**, 212, 190-198, 2016.

CHIU, S.Y., KAO, C.Y., CHEN, C.H., KUAN, T.C., ONG, S.C., LIN, C.S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of Chlorella sp in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, 99, 3389–3396, 2008.

CÓRDOVA, O., SANTIS, J., RUIZ-FILLIPI, G., ZUÑIGA, M.E., FERMOSO, F.G., CHAMY, R. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 82, 2806-2813, 2017.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 58, 832-841, 2016.

DI LENA, G., CASINI I., LUCARINI, M., LOMBARDI-BOCCIA, G. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, *In Press*, 2018.

DUFOSSE, L. (2016). Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae). **Woodhead Publishing**, 337-354, 2016.

EROGLU, A., HARRISON, E.H. Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids. **Journal of Lipid Research**, 54, 1719-1730, 2013.

FAKHRI, S., DARGAHI, L., ABBASZADEH, F., JORJANI, M. Astaxanthin attenuates neuroinflammation contributed to the neuropathic pain and motor dysfunction following compression spinal cord injury. **Brain Research Bulletin**, 143, 217, 224, 2018.

FAY, P. *The Blue-Greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)*, 5th Edn. London: Edward Arnold Publishers, 88. Studies in Biology no. 160, 1983.

FRANCISCO, E. C., FRANCO, T. T., WAGNER, R., and JACOB-LOPES, E. (2014). Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 37, 1497–1505.

FRASER, P.D., BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**. 43:228–265, 2004.

- GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MORENO, J.; MANZANO, J.C.; FLORENCIO, F.J.; GUERRERO, M.G. Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis-β-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, 115, 81-90, 2005.
- GAYATHRI, S., RAJASREE, S.R.R., KIRUBAGARAN, R., ARANGANATHAN, L.; SUMAN, T.Y. Spectral characterization of β, e-carotene-3, 3'-diol (lutein) from marine microalgae Chlorella salina. **Renewable Energy**, 98, 78-93, 2016.
- GERARDO, M. L.; VAN DEN HENDE, S.; VERVAEREN, H.; COWARD, T.; SKILL, S. C. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. **Algal Research**, 11, 248-262, 2015.
- GERKEN, H., DONOHOE, B., KNOSHAUG, E. Enzymatic cell wall degradation of Chlorella vulgaris and other microalgae for biofuels production. **Planta**, 237, 239–253, 2013.
- GILDENHOFF, N., AMARIE, S., GUNDERMANN, K., BEER, A., BUCHEL, C., WACHTVEITL, J. Oligomerization and pigmentation dependent excitation energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1797(5), 543–549, 2010.
- GOIRIS, k., MUYLAERT, K., FRAEYE, I., FOUBRT, M., BRABATER, J., COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, 24, 1477-1486, 2012.
- GONG, M., BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, 34, 1396-1412, 2016.
- GRUDZINSKI, W., KRZEMINSKA, I., LUCHOWSKI, R., NOSALEWCZ, A.; GRUSZECKI, W. L. Strong-light-induced yellowing of green microalgae Chlorella: A study on molecular mechanisms of the acclimation response. **Algal Research**, 16, 245-254, 2016.
- GUEDES, A., AMARO, H., MALCATA, F. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine drugs**, 9, 625–644, 2011.
- GULDHE, A., ANSARI, F.A., SINGH, P., BUS, F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, 99, 47-53, 2017.

- HAN, D. X., LI, Y. T., & HU, Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. **Algae research**, 28(2), 131–147, 2013.
- HERRERO, M., IBÁÑEZ, E. Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae. **The Journal of Supercritical Fluids**, 96, 211-216, 2015.
- HU, J., NAGARAJAN, D., ZHANG, Q., CHANG, J.-S., LEE, D.J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, 36(1), 54–67, 2018.
- JACOB-LOPES, E. et al. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothecce microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63–69, 2007.
- JACOB-LOPES, E., MARONEZE, M.M., DEPRÁ, M.C., SARTORI, R.B., DIAS, R.R., ZEPKA, L.Q. Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries. **Current opinion in Food Science**, 25, 1-7, 2019.
- JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothecce microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p. 27–34, 2008.
- JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M. Protein characterisation of the *Aphanothecce Microscopica* Nägeli cyanobacterium cultivated in parboiled rice effluent. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 482–488, 2006.
- JACOB-LOPES, E.; REVAH, S.; SHIRAI, K.; HERNANDEZ, S.; FRANCO, T. T. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 153, p. 120–126, 2009.
- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894–900, 2010.
- JAIME, L., RODRÍGUEZ-MEIOZOSO, I., CIFUENTES, A., SANTOYO, S., SUAREZ, S., IBÁÑEZ, E., SEÑORANS, F.J. (2010). Pressurized liquids as an alternative process to

antioxidante carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT-Food Science and Technology**, 43, 105-112, 2010.

KAMOSHITA, M., TODA, E., OSADA, H., NARIMATSU, T., KOBAYASHI, S., TSUBOTA, K., OZAWA, Y. Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. **Nature Scientific Reports**, 6(1), 2016.

KEBEBE, B.T., GRAUWET, T., MAGPUSAO, J., PALMERS, S., MICHELS, C., HENDRICKX, M., LOEY, A.V. An integrated fingerprinting and kinetic approach to accelerated shelf-life testing of chemical changes in thermally treated carrot puree. **Food Chemistry**, 179, 94-102, 2015.

KHAN, S.A., RASHMI, HUSSAIN, M.Z., PRASAD, S., BANERJEE, U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 13, 2361–2372, 2009.

KIM, K.; JUNG, J.; SHIN, H.; CHOI, S.; KIM. D.; BAI, S. C.; CHANG, Y. K.; HAN, J. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* using dynamic filtration with a perforated disk. **Journal of Membrane Science**, 517, 14-20, 2016.

KOSAKOWSKA, A., LEWANDOWKA, J., STÓN, J., BURKIEWICZ, K. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricornutum* (*Bacillariophyceae*) stressed by iron. **BioMetals**, 17(1), 45–52, 2004.

KULKARNI, S., NIKOLOV, Z. Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**. 35, 185-193, 2018.

LEE, E., JALALIZADEH, M., & ZHANG, Q. Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. **Algal Research**, 12, 497–512, 2015.

LEYA, T.; RAHN, A.; LUTZ, C.; REMIAS, D. Response of arctic snowand permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment compositionand applied aspects for biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, 67, 432-443, 2009.

LI, H.B., CHENG, K.W., WONG, C.C., FAN, K.W., CHEN, F., JIANG, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, 102, 771–776, 2007.

- LIN, J.-H., LEE, D.-J., CHANG J.-S. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. **Bioresource Technology**, 184, 421–428, 2015.
- LIU, J., & CHEN, F. Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 1–35, 2014.
- LIU, Y.S.; WU, J.Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of Xanthophyllomyces dendrorhous through statistical experiment design. **Journal of Biochemical Engineering**, v.36, p. 182–189, 2007.
- LORETO, C., ROSALES, N., BERMÚDEZ, J., MORLAES, E. Producción de pigmentos y protéinas de la cianobacteria *Anabaena PCC 7120* en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. **Gayana Botánica**, 60(2), 83–9, 2003.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa, 606p., 2006.
- MA, N.L.; THE, K.Y.; LAM, S.S.; KABEN, A.M.; CHA, T.S. Optimization of cell disruption methods for efficient recovery of bioactive metabolites via NMR of three freshwater microalgae (chlorophyta). **Bioresource Technology**, v. 190, p. 536-542, 2015.
- MANAYI, A., ABDOLLAHI, M., RAMAN, T., NEBAVI, S.T., HABTEMARIAM, S., DAGLIA, M., NABAVI, A.M. Lutein and cataract: from bench to bedside. **Critical Reviews in Biotechnology**, 8551, 1-11. 2015.
- MARONEZE, M. M. et al. The role of photoperiods on photobioreactors - A potential strategy to reduce costs. **Bioresource Technology**, v.219, p.493–499, 2016.
- MORENO-GARCIA, L., ADJALLÉ, K., BARNABÉ, S., RAGHAVAN, G.S.V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 76,493-506,2017.
- NIRANJANA, R., GAYATHRI, R., NIMISH MOL, S., SUGAWARA, T., HIRATA, T., MIYASHITA, K., GANESAN, P. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells. **Journal of Functional Foods**, 18, 968-985, 2015.
- ONG, S-C., KAO, C-Y., CHIU, S-Y., TSAI, M-T., LIN, C-S. Characterization of the thermotolerant mutants of Chlorella sp. with high growth rate and application in outdoor photobioreactor cultivation. **Bioresource Technology**, 101, 2880–2883, 2010.

- PATIAS, L.D., FERNANDES, A. S., PETRY, F.C., MERCADANTE, A.Z., JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L.Q. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. **Food Research International**, 100, 260-266, 2017.
- PELROY, R.A., BASSHAM J.A., Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue-green algae. **Archives of Microbiology**. 86(1):25-38, 1972.
- PENG, J., YUAN, J.-P., WU, C.-F., WANG, J.-H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. **Marine Drugs**, 9, 1806–1828, 2011.
- PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M. E., DE-BASHAN, L. E., and BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**. 45, 11–36, 2011.
- POOJARY, M.M., BARBA, F.J., FALIAKBARIAN, B., DONSÍ, B., PATARO, G., DIAS, D.A., JULIANO, P. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. **Marine Drugs**. 14 (11), 214, 2016.
- PŘIBYL, P.; PILNÝ, J.; CEPÁK, V.; KAŠTÁNEK, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, 16, 69-75, 2016.
- QUEIROZ, M. I. et al. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanthece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v.88, n.10, p.3438–3443, 2011.
- QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v.98, p.2163–2169, 2007.
- QUEIROZ, M.I. et al. Evaluación Del crecimiento de la *Aphanthece microscopica* Nägeli en las aguas residuales de la parbolización del arroz. **Revista información Tecnológica**, v.1, p.61–65, 2002.
- RAMÍREZ-MÉRIDA, L.G., ZEPA, L.Q., JACOB-LOPES, E. Produção atual de microalgas em escala industrial JCM Pires (Ed.), Recentes Avanços em Energia Renovável , Betham Science Publishers. 242 – 260, 2017.

RIZWAN, M., MUITABA, G., MEMON, S.A., LEE, K, RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, 92, 394-404, 2018.

RODRIGUES, D. B.; FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, 65, 144-148, 2014.

RODRIGUES, D.B.; MENEZES, C. R.; MERCADANTE, A.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, 77, 273-279, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Food Carotenoids: Chemistry, Biology, and Technology. 1st ed. **John Wiley & Sons, Ltd**; p. 306p. ISBN 978-1-118-73330-, 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA. Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. **Food Chemistry and Biochemistry**, v.1, p.56-63, 2015.

RODRIGUEZ-GARCIA, I., GUIL-GUERRERO, J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chemistry**, 108, 1023–26, 2008.

RUSSO, D. A. M. T. Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura. **Dissertação. (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.** 111f, 2011.

SAFAFAR, H., ULDALL NØRREGAARD, P., LIUBIC, A., MØLLER, P., LØVSTAD HOLDT, S., JACOBSEN, C. Enhancement of protein and pigment content in two *Chlorella* species cultivated on industrial process water, **Journal of Marine Science and Engineering**, 4 (4), 84, 2016.

SAFI, C., ZEBIB, B., MERAH, O., PONTALIER, P.-Y., VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 35, 265–278, 2014.

SÁNCHEZ, A., CÉRON, M.C., GARCÍA, F., MOLINA, E., CHISTI, Y. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift

photobioreactors: studies in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, 31,1015–23, 2002.

SANTOS, A. B. et al. Biogeneration of volatile organic compounds produced by *Phormidium autumnale* in heterotrophic bioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v.28, n.2, p.1561–1570, 2016

SHI, X-M., ZHANG, X-W., CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by Chlorella protothecoides on various nitrogen sources. **Enzyme and Microbial Technology**. 27,312–318, 2000.

SILVA, C.M.; FERREIRA, A.F.; DIAS, A.P.; COSTA, A.; A comparison between microalgae virtual biorefinery arrangements for bio-oil production based on lab-scale results. **Journal of Cleaner Production**, In Press, 2015.

SINGH, B.B.; SHAKIL, N. A.; KUMAR, J.; WALIA, S.; KAR, J. Develment of slow release formulations of β-carotene employing amphiphilic polymers and their release kinetics study in water and different pH conditions. **Journal of Food Science and Technology**, 52, 8068–8076, 2015.

SUGANYA, T., VARMAN, M., MASJUKI, H.H., RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 55, 909-941, 2016.

TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. **Marine Drugs**, 9, 1101-1118, 2011.

TAKASHIMA, M., SHICHIKI, M., HAGIHARA, Y., YOSHIDA, Y., NIKI, E. Capacity of fucoxanthin for scavenging peroxy radicals and inhibition of lipid peroxidation in model systems. **Free Radical Research**, 46, 1406–1412, 2012.

VALDERRAMA, J.O., PERRUT, M., MAJEWSKI, W. Extraction of astaxanthine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, 48, 827–30, 2003.

WANG, J., CHEN, S., XU, S., YU, X., MA, D., HU, X., CAO, X. (2012). *In Vivo* Induction of Apoptosis by Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Associated with Down-Regulating

STAT3/EGFR Signaling in Sarcoma 180 (S180) Xenografts-Bearing Mice. **Marine Drugs**, 10, 2055–2068, 2012.

WANG, L., PAN, B., SHENG, J., XU, J., HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, 105, 36–41, 2007.

WU, H., NIU, H., SHAO, A., CHENG., WU, C., DIXON, B.J., ZHANG, J., YANG, S., WANG, Y. Astaxanthin as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases. **Marine Drugs**, 13, 5750-5766, 2015.

WU, W., WANG, P-H., LEE, D-J., CHANG, J-S. Global optimization of microalgae-to-biodiesel chains with integrated cogenetication combined cycle systems based on greenhouse gas emissions reductions. **Applied Energy**, 197, 63-82, 2017.

YAMADA, T., SAKAGUCHI, K. Comparative studies on Chlorella cell walls: induction of protoplast formation. **Archives of Microbiology**. 132, 10–13, 1982.

ZAGHDOUDI, K.; PONTVIANNE, S.; FRAMBOISIER, X.; ACHARD, M.; KUDAIBERGENOVA, R.; AYADI-TRABELSI, M.; GUIAVARC'H, Y. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Food chemistry**, 184, 131-139, 2015.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8505-8517, 2016.

ZHANG, L., WANG, H., FAN, Y., GAO, Y., LI, X., HU, Z., DING, K., WANG, Y., WANG, X. Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. **Nature Scientific Reports**, 7, 46763, 2017.

ZHANG, W., WANG, J., WANG, J., LIU, T. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. **Bioresource Technology**. 158, 329–335, 2014.

ANEXOS

ANEXO A: TABLE: MICROALGAE GROWTH KINETICS.

Time (h)	Cellular concentration (mg/L)	pH
0	260	7,45
24	280	7,45
48	620	7,22
72	1180	7,33
96	1820	6,83
120	2200	6,51
144	2010	5,89