

Artigo

O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações

Tinoco, N. A. B.;* Teixeira, C. M. L. L.; Rezende, C. M.

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (4), 1421-1440. Data de publicação na Web: 21 de fevereiro de 2015<http://www.uff.br/rvq>**The Genus *Dunaliella*: Biotechnology and Applications**

Abstract: Microalgae are sources of distinguished metabolites, among which stands out the carotenoids which are essential for photoprotection, pollination, as antioxidant and also as precursors of volatile substances. Besides chlorophyll *a* and *b*, the genus *Dunaliella* contains carotenoids of great significance, such as α -carotene, β -carotene, violaxanthin, neoxanthin, lutein and zeaxanthin. Microalgae of the genus *Dunaliella* are considered the best natural source of commercial β -carotene. In this review we discuss the importance of these microalgae as a natural source of β -carotene, the biotechnological aspects of cultivation for the production of pigments and some new applications.

Keywords: Microalgae; *Dunaliella*; carotenoids; β -carotene.

Resumo

Microalgas têm sido importante fonte de diferentes metabólitos, entre os quais se destacam os carotenoides, que são essenciais na fotoproteção e na polinização, possuem atividade antioxidante e são precursores de substâncias voláteis. Além das clorofilas *a* e *b*, o gênero *Dunaliella* contém carotenoides de grande importância, tais como α -caroteno, β -caroteno, violaxantina, neoxantina, luteína e zeaxantina. As microalgas do gênero *Dunaliella* são consideradas a melhor fonte natural β -caroteno. Nesta revisão, discutimos a importância destas microalgas como fonte natural de β -caroteno, os aspectos biotecnológicos de cultivo para a produção de pigmentos e algumas novas aplicações.

Palavras-chave: Microalgas; *Dunaliella*; carotenoides; β -caroteno.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Laboratório de Aromas 626A, Cidade Universitária, CEP 21941-909, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ nataliaabtinoco@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20150078](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150078)

O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações

Natália A. B. Tinoco,^{a,*} Cláudia M. L. L. Teixeira,^b Claudia M. Rezende^a

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Laboratório de Aromas 626A, Cidade Universitária, CEP 21941-909, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Instituto Nacional de Tecnologia, Divisão de Energia, Laboratório de Biotecnologia de Microalgas, Avenida Venezuela, 82, Saúde, CEP 20081-310, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* nataliaabtinoco@gmail.com

Recebido em 30 de dezembro de 2014. Aceito para publicação em 12 de dezembro de 2015

1. Introdução
2. Microalgas
3. As microalgas do gênero *Dunaliella*
4. Cultivo de *Dunaliella* para a produção de β -caroteno
5. Carotenoides como precursores de compostos de aroma
6. Considerações Finais

1. Introdução

A crescente conscientização do consumidor sobre os benefícios de alimentos naturais vem favorecendo a indústria que lida com carotenoides, que movimentou em 2010 US\$ 1.2 bilhões e deve alcançar US\$ 1.4 bilhões em 2018. Seus dois principais representantes são o β -caroteno e a luteína, cujo consumo vem apresentando, nos últimos anos, uma taxa de crescimento em torno de 3,5%. Sua produção é controlada por conglomerados internacionais, onde BASF e DSM detêm 55% do mercado.¹

A maior aplicação dos carotenoides no mercado é na alimentação animal, seguida do uso como complemento alimentar devido as suas propriedades antioxidantes, além de

serem precursores de vitamina A no organismo. Também são empregados na indústria de cosméticos, farmacêutica e como corantes naturais, e neste caso a predominância é do β -caroteno.

Os carotenoides são pigmentos naturais da classe dos terpenos (tetraterpenoides com 40 átomos de carbono), que apresentam coloração vermelha, amarela e laranja, amplamente encontrados nas frutas, flores, raízes, algas, invertebrados, peixes, aves, bactérias, fungos e leveduras. Na natureza seu papel está associado à fotossíntese, como pigmentos acessórios à clorofila, à polinização, proteção dos tecidos devido as suas propriedades antioxidantes e produção de substâncias voláteis para a atração de polinizadores e defesa da espécie.²

Os carotenoides também se destacam

pela ação na prevenção e no tratamento do envelhecimento celular, inflamações, obesidade, doenças cardiovasculares, catarata e alguns tipos de câncer, especialmente relacionados à sua ação antioxidante no combate aos radicais livres.^{3,4}

Os carotenoides constituem um dos mais vastos grupos de pigmentos naturais, com mais de 700 moléculas descritas.² Entre as principais fontes de obtenção de carotenoides estão a cenoura, o óleo de palma e as microalgas do gênero *Dunaliella*, tema deste artigo, embora apenas 2% da produção mundial de carotenoides seja de fonte natural. Isto está principalmente relacionado ao alto custo do meio de cultivo e ao reduzido aproveitamento de biomassa. Quanto aos processos sintéticos, usa-se a β -ionona oriunda da indústria petroquímica, voltada especialmente para a produção de vitamina A, advinda da condensação com acetona e butadieno. A substituição da matriz dos combustíveis fósseis é uma necessidade, o que dá destaque ao papel das microalgas.⁵

Nas microalgas, os carotenoides têm ação como pigmentos acessórios, sendo responsáveis pela absorção de energia na região azul do espectro, transferindo-a para a clorofila *a* (pigmento fotossintetizante). Por apresentarem função antioxidante, também podem ser produzidos em resposta ao estresse, onde atuam como foto-protetores, prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio.⁶ Nos últimos anos, as microalgas têm sido importantes fontes de substâncias naturais bioativas, pois diversos metabólitos por elas produzidos já demonstraram atividade biológica diversificada e, em especial, benefícios à saúde.³

Microalgas possuem versatilidade metabólica e capacidade de mitigação de dióxido de carbono, o que tem despertado interesse no desenvolvimento de tecnologias limpas, permitindo a comercialização de créditos de carbono e co-geração de produtos comerciais. Assim sendo, a utilização de meios de cultivo naturais e de composição mais complexa passa a ser uma alternativa interessante no cultivo industrial de microalgas, associando o tratamento de

águas residuais com sua produção.⁷

2. Microalgas

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes procarióticos (Divisões Cyanophyta e Prochlorophyta) ou eucarióticos (Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta), que apresentam estrutura simples, são unicelulares, embora possam apresentar-se em forma multicelular, possuem crescimento rápido e são capazes de viver em condições adversas.⁸ Desta forma, possuem uma extensa diversidade de espécies podendo ser encontradas em diferentes habitats, como por exemplo nos ecossistemas marinhos, dulcícolas e terrestres. Estima-se que existam milhões de espécies de microalgas, e até o momento cerca de 35.000 foram estudadas.^{8,9}

Dentre as características que fazem das microalgas organismos de grande importância, destaca-se a diversidade de metabólitos que produzem e a capacidade de alterarem rapidamente seu metabolismo como resposta às mudanças das condições ambientais. Como consequência, podem se ajustar com facilidade através da aclimação bioquímica e fisiológica, ocasionando a produção de uma variedade de substâncias, muitas de alto valor comercial.⁸ Como exemplo estão os ácidos graxos poliinsaturados, carotenoides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas e esteróis.^{2,10-14} A produção comercial de microalgas abastece a indústria de cosméticos, de suplementos alimentares e movimenta o desenvolvimento de produtos alimentícios naturais, conforme descrito na Tabela 1, sendo considerada uma área emergente e um campo promissor para aplicação industrial.¹⁵

As microalgas apresentam propriedades típicas de plantas superiores (fotossíntese aeróbica eficiente e simplicidade das necessidades nutricionais) e atributos biotecnológicos de células microbianas

(crescimento rápido em meio de cultura e capacidade de acumular ou secretar metabólitos de interesse). A biotecnologia de microalgas tem se destacado nas últimas décadas ganhando uma relevância considerável na produção de biocombustíveis e de carotenoides.¹¹

Tabela 1. Produtos comerciais obtidos a partir de microalgas. TA: tanques abertos; FBRs: fotobiorreatores; F: fototrófico; H: heterotróficas. (Adaptado da ref. 16 com autorização. Copyright©2013)

Microalga	Produto	Cultivo	Tipo de cultivo	Aplicação
<i>Prototheca moriformis</i>	Vitamina C	FBRs	H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Odontella aurita</i>	Ácidos graxos	TA	F	Produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos para bebês
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Vitaminas e ácidos graxos	TA, FBRs	F	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Lyngbya majuscula</i>	Moduladores imunes	TA, FBRs	H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polissacarídeos	FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos, nutricionais e cosméticos
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa e lipídios	TA, FBRs,	F, H	Suplemento alimentar
<i>Euglena gracilis</i>	α -Tocoferol, biotina	FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Chlorella protothecoides</i>	Tocoferóis, biomassa e lipídios	FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	Glicoproteínas, vitaminas, lipídios	TA, FBRs	F	Produtos farmacêuticos, nutricionais e cosméticos
<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos graxos	TA, FBRs	F, H	Nutrição animal
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Ácidos graxos e lipídios	TA, FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Tetraselmis suecica</i>	Lipídios, ácidos graxos poliinsaturados	TA, FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Lipídios	TA, FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos,

				cosméticos e nutricionais
<i>Shizochytrium sp.</i>	Ácido docosa-hexaenóico	FBRs	H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Ácido docosa-hexaenóico	FBRs	H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Nitzschia laevis</i>	Ácido eicosapentaenóico	FBRs	H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Monodus subterraneus</i>	Ácido eicosapentaenóico	TA, FBRs	F	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Chlorella minutissima</i>	Ácido eicosapentaenóico	FBRs	F, H	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Parietochloris incise</i>	Ácido araquidónico	FBRs	F	Produtos farmacêuticos e nutricionais
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianina e biomassa	TA, FBRs	F	Suplemento alimentar e cosméticos
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoides, β -caroteno	TA, FBRs	F,H	Suplemento alimentar
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenoides, astaxantina	TA, FBRs	F,H	Suplemento alimentar e produtos farmacêuticos

Existem aproximadamente 60 tipos diferentes de carotenoides que são encontrados em microalgas, sendo que em cada espécie é possível encontrar entre 5 a 10 tipos. Diversas espécies (Figura 1) podem acumular grandes concentrações de diversos carotenoides, como por exemplo, β -caroteno (*Dunaliella salina*), astaxantina (*Haematococcus pluvialis*) e ficocianina (*Spirulina sp.*)¹⁷

As microalgas têm amplo mercado, principalmente para as indústrias de alimentos e rações e como aditivos, além de serem uma matéria prima importante para as indústrias de cosméticos, conforme visto na Tabela 1. Especificamente quanto aos pigmentos presentes em microalgas, seus aspectos gerais, aplicações e suas fontes de obtenção encontram-se apresentados na Tabela 2.

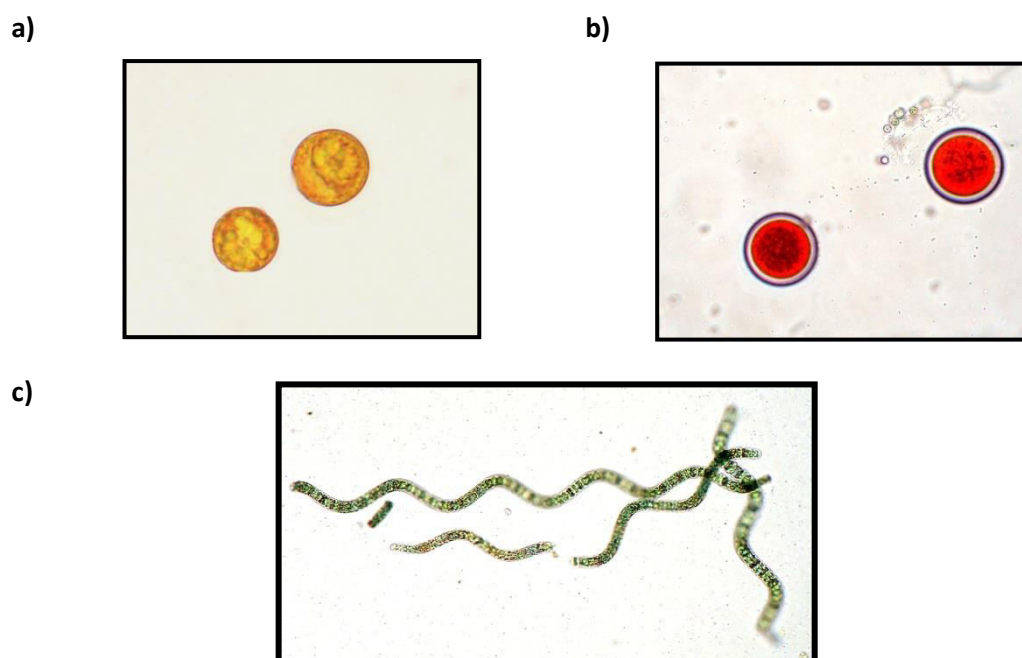


Figura 1. Microalgas capazes de acumular grandes quantidades de carotenoides de interesse: **a)** Células de *Dunaliella bardawil* com aumento de 1000x (produção de β -caroteno); **b)** Células de *Haematococcus pluvialis* com aumento de 400x (produção de astaxantina) e **c)** Células de *Spirulina sp.* com aumento de 400x (produção de ficocianina) (Foto: Natália A. B. Tinoco, Instituto Nacional de Tecnologia- Laboratório de Biotecnologia de Microalgas)

Tabela 2. Pigmentos presentes em microalgas e suas principais áreas de aplicação (Adaptado da ref 18 com autorização. Copyright©2014)

Pigmento	Microalgas de origem	Cor do pigmento	Aplicação
β -Caroteno	<i>Dunaliella salina</i> , <i>D. bardawil</i> , <i>Botryococcus brauni</i>	Amarelo	Pro-vitamina A, antioxidante, aditivo alimentar E160a; coloração de gema de ovo
Bixina	<i>D. salina</i>	Amarelado, cor de pêssego	Aditivo alimentar E160b (corante); cosméticos
Violaxantina	<i>B. braunii</i> , <i>D. tertiolecta</i> , <i>Nannochloropsis sp</i>	Laranja	Aditivo alimentar E161e (aprovado na Austrália e Nova Zelândia); anticâncer
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>B.s braunii</i>	Avermelhado-salmão	Aditivo alimentar E161j; antioxidante; cultivo de salmão e truta (cor e resposta imune)
Fucoxantina	Brown algae	Castanho de oliva	Anti-adiposidade

	(Phaeophyceae)		
Luteína	<i>Chlorella protothecoides</i> , <i>C. zofingiensis</i> , <i>B. braunii</i> , <i>Chlorococcum citrifforme</i> , <i>D. salina</i> , <i>Muriellopsis sp.</i> , <i>Neosporangiococcum gelatinosum</i>	Amarelo-laranja	Aditivo alimentar E161b; coloração amarela da gema de ovo (aditivo), pigmentação de tecidos animais. Farmacêutica: anti-degeneração macular; Cosméticos: coloração
Zeaxantina	<i>B. braunii</i> , <i>D. salina</i> , <i>N. oculata</i> , <i>N. gladiata</i>	Laranja-amarelo	Aditivo alimentar E 161 h, ração animal Farmacêutica: anticâncer do cólon, anti-degeneração macular
Cantaxantina	<i>N. oculata</i> , <i>N.s salina</i> , <i>N. gladiata</i>	Laranja dourado	Aditivo alimentar E 161 g, cultivo de salmonídeos e frango, pílulas para bronzeamento
Ficocianina	<i>Arthrospira</i> , <i>Spirulina (cyanobacteria)</i>	Azul-verde ("ciano")	Corante alimentar (bebidas, sorvetes, doces); cosméticos; Técnicas de imunofluorescência
Ficoeritrina	<i>Cyanobacteria</i> , <i>Porphyridium</i>	Vermelho	Técnicas de imunofluorescência
Clorofila a	Todas as microalgas fototróficas aeróbicas	Verde	Farmacêutica e cosmética (desodorante)

Apesar do enfoque principal sobre a utilização do cultivo de microalgas estar voltado aos produtos bioquímicos produzidos pelas mesmas, a utilização desses microrganismos como fonte de combustível vem sendo foco de crescente pesquisa. Devido à conscientização ambiental, os *slogans* sobre os benefícios da obtenção de biocombustíveis a partir de microalgas vem se tornando usual, especialmente no exterior.¹⁵

Diversos estudos apontam que uma variedade de combustíveis à base de microalgas são tecnicamente viáveis, mas o

custo de produção ainda é muito alto quando comparado com os combustíveis fósseis. O desenvolvimento de fotobiorreatores eficientes, a seleção de cepas que possuem um rápido crescimento e o aprimoramento do cultivo compreendem alguns dos muitos desafios importantes a serem superados.¹⁹

Outra aplicação que tem se destacado nos últimos anos e considerada uma boa opção para o desenvolvimento biotecnológico e comercial é a realização do cultivo de microalgas com águas residuais. O tratamento dessas águas com microalgas é particularmente interessante devido ao baixo

custo e à abundância de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, ao mesmo tempo responsáveis pela eutrofização ambiental. O que se observa é a incorporação desses nutrientes pelas microalgas, removendo-os da água, concomitante à produção de biomassa, que pode ter diversas aplicações comerciais. Espécies como *Dunaliella* e *Chlorella* já são utilizadas para o tratamento de águas residuais e produção de biomassa para uso comercial.²⁰⁻²¹

A produção de bioprodutos de interesse comercial e a conscientização para as questões ambientais e de energia fazem com que as microalgas sejam cada vez mais estudadas, promovendo um avanço

significativo nas tecnologias de cultivo e otimização da produção e aplicação desses microrganismos.

3. As microalgas do gênero *Dunaliella*

Pertencentes ao filo *Chlorophyta*, as espécies do gênero *Dunaliella* são eucarióticas, fotossintéticas, unicelulares, biflageladas e com flagelos do tamanho aproximado ao da célula; são desprovidas de parede celular rígida e possuem um tipo de glicocálix que envolve a célula (Figura 2).²²

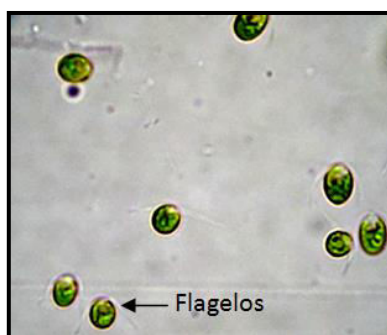


Figura 2. Células de *Dunaliella salina* com aumento de 1000x (Foto: Natália A. B. Tinoco, Instituto Nacional de Tecnologia- Laboratório de Biotecnologia de Microalgas)

Sua reprodução pode ocorrer por divisão longitudinal das células móveis ou por fusão de duas células móveis para formar um zigoto.²² De acordo com os dados da *Algaebase*, disponíveis até novembro de 2014, há 28 espécies de *Dunaliella* identificadas. (Tabela 3).²³

Como são capazes de crescer em meios com ampla faixa de concentração salina, de 0-5% de saturação, os habitats naturais de *Dunaliella* incluem oceanos, lagos de água salgada e salinas.²⁴ Assim, são responsáveis pela maior parte da produção primária (ou formação de substâncias orgânicas ricas em energia a partir de material inorgânico) em ambientes hipersalinos de todo o mundo.²² Elas são capazes de sobreviver também em

condições extremas de temperatura (entre 5° a 40°C).²⁵

O formato da célula de *Dunaliella* varia conforme a salinidade, devido à ausência de parede celular, o que favorece o acúmulo dos metabólitos. Sua sobrevivência aos choques hiperosmóticos é resultante do mecanismo de osmorregulação, onde há produção de glicerol. Em situações de choque hiposmótico, o glicerol presente na célula é eliminado. Desta forma, a quantidade de glicerol intracelular e carotenoides é proporcional à concentração de sal no meio extracelular.²⁶

As espécies mais relatadas deste gênero são aquelas capazes de acumular grande quantidade de β -caroteno nos cloroplastos,

principalmente *D. bardawil* e *D. salina*.⁵ Embora a produção de carotenoides seja a maior aplicação para *Dunaliella*, outros usos têm sido propostos para as espécies deste gênero conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 3. Espécies de microalgas que constituem o gênero *Dunaliella*²³

Espécie	Sinônimo taxonômico
<i>D. acidophila</i> (Kalina) Massyuk	
<i>D. assymetica</i> Massyuk	
<i>D. baasbeckingii</i> Massyuk	
<i>D. bardawil</i> Ben-Amotz & Avron	<i>D. salina</i> (Dunal) Teodoresco
<i>D. bioculata</i> Bucher	
<i>D. carpatica</i> Masyuk	
<i>D. cordata</i> Pascher & Jahoda	<i>Papenfussiomonas cordata</i> (Pascher & Jahoda) Desikachary
<i>D. euchlora</i> Lerche	<i>D. viridis</i> Teodoresco
<i>D. gracilis</i> Massyuk	
<i>D. granulata</i> Massyuk	
<i>D. lateralis</i> Pascher & Jahoda	
<i>D. maritima</i> Massyuk	
<i>D. media</i> Lerche	
<i>D. minuta</i> W. Lerche	
<i>D. parva</i> W. Lerche	
<i>D. peircei</i> Nicolai & Baas-Becking	
<i>D. polymorpha</i> Butcher	
<i>D. primolecta</i> Butcher	
<i>D. pseudosalina</i> Massyuk & Radchenko	
<i>D. quartolecta</i> Butcher	
<i>D. ruineniana</i> Massyuk	
<i>D. salina</i> (Dunal) Teodoresco	
<i>D. terricola</i> Massyuk	
<i>D. tertiolecta</i> Butcher	
<i>D. turcomanica</i> Massyuk	
<i>D. viridis</i> var. <i>palmelloides</i> Massyuk	
<i>D. viridis</i> Teodoresco	
<i>D. viridis</i> f. <i>euchlora</i> (Lerche) Massyuk	<i>D. viridis</i> Teodoresco

Tabela 4. Usos gerais de espécies de *Dunaliella*

Espécie	Aplicação proposta	Referência
<i>D. salina</i>	Produção de biocombustível	27
	Terapia anticâncer	28
	Terapia antioxidante	29
	Produção de ácidos graxos	30
	Tratamento de águas residuais	31
<i>D. salina</i> e <i>D. bardawil</i>	Remoção de metais pesados	32
<i>D. tertiolecta</i> , <i>D. viridis</i> e <i>D. parva</i>	Produção de glicerol	33-35
<i>D. tertiolecta</i>	Indicador ecológico	36
	Fonte de vitaminas	37

4. Cultivo de *Dunaliella* para a produção de β -caroteno

Em condições favoráveis de crescimento, as microalgas *Dunaliella* apresentam

coloração verde, pois possuem apenas os pigmentos necessários para a fotossíntese, em concentração não muito elevada.³⁸ Além das clorofilas *a* e *b*, as microalgas *Dunaliella* contêm valiosos carotenoides tais como α -caroteno, β -caroteno, violaxantina, zeaxantina e luteína (Figura 3).³⁹

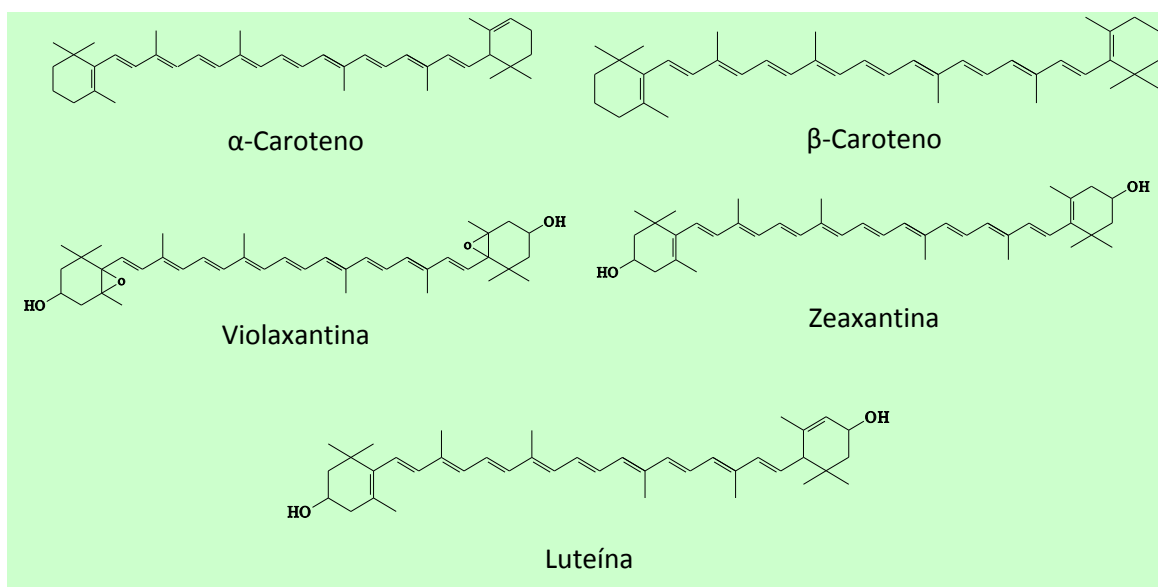


Figura 3. Principais carotenoides encontrados nas espécies do gênero *Dunaliella*

A capacidade de acumulação de β -caroteno em *Dunaliella* é induzida por diversos fatores de estresse no cultivo, tais como alta intensidade de luz, alta concentração salina, baixa temperatura ou cultivo com deficiência de nitrato, conforme demonstrado na Figura 4.⁴ Nestas condições, os cultivos de *D. bardawil* e *D. salina* apresentam predominantemente a coloração

laranja devido à grande quantidade de β -caroteno produzido. Um exemplo prático de carotenogênese pode ser observado na Figura 5, desenvolvido em nosso laboratório do Instituto Nacional de Tecnologia, INT-RJ. Cabe ressaltar que, sob condições de estresse, o número de células por unidade de volume de cultura é reduzido, pois estes fatores afetam a viabilidade celular.^{2,39}

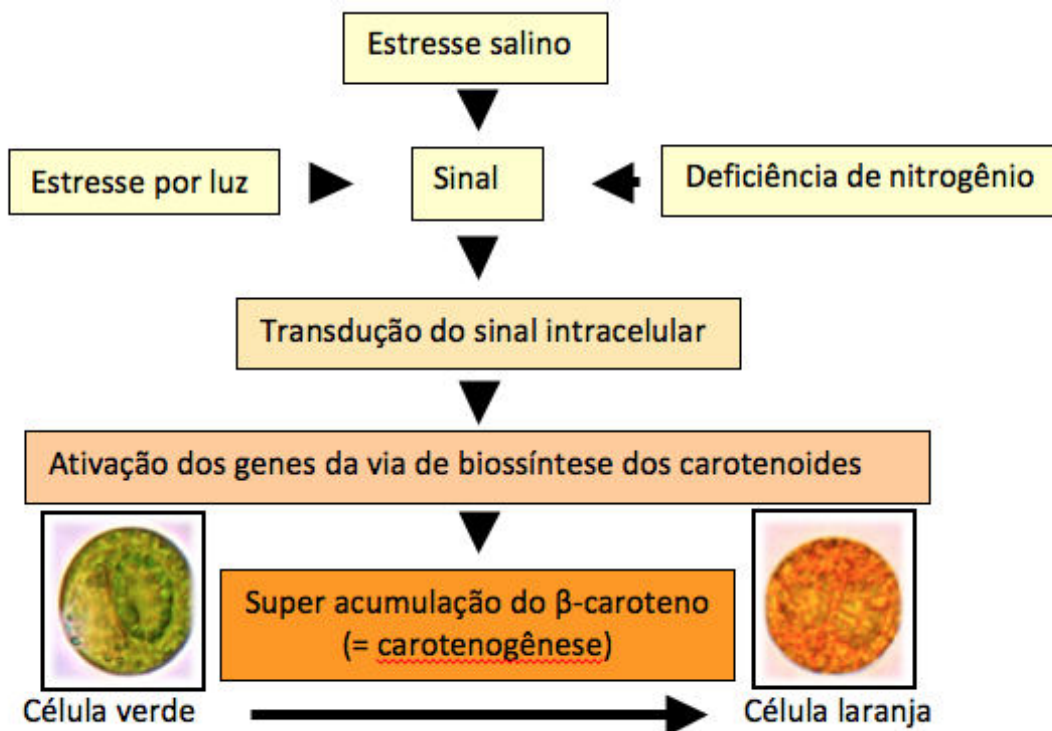


Figura 4. Resumo da carotenogênese em *Dunaliella*. Adaptada da ref 25 com autorização. (Fotos: Natália A. B. Tinoco)

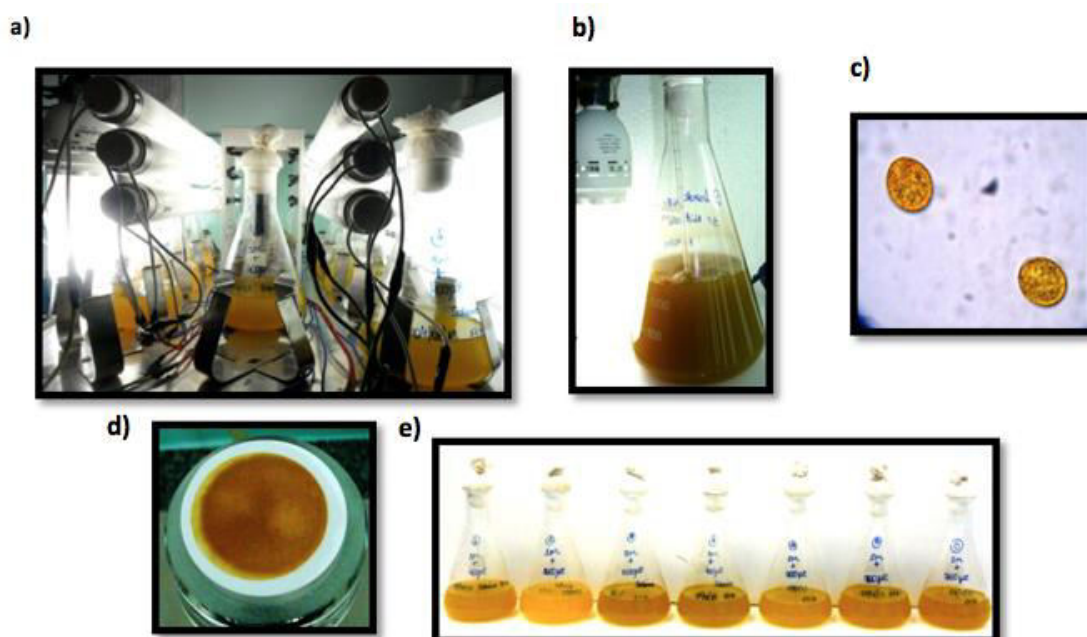


Figura 5. *D. bardawil* cultivada em condições de carotenogênese no Instituto Nacional de Tecnologia (INT). **a)** Cultivo realizado em mesa agitadora com 300 mL de cultivo; **b)** Cultivo realizado em estantes com 1,5 L de cultivo; **c)** Células de *D. bardawil* com aumento de 1000x; **d)** Filtro de fibra de vidro com biomassa de *D. bardawil*; **e)** Culturas de *D. bardawil* sob diferentes intensidades de luz (Fotos: Natália A. B. Tinoco)

Um fluxograma dos aspectos gerais do cultivo comercial de *Dunaliella* para a produção de β -caroteno e outros produtos, realizado em diferentes sistemas, pode ser observado na Figura 6. O cultivo em tanques abertos é o mais comum para a produção de

biomassa de *Dunaliella* (Figura 7).⁴⁰ As instalações para a produção de *Dunaliella* devem estar localizadas em áreas onde a radiação solar é máxima, a nebulosidade é mínima, o clima é quente e haja disponibilidade de água hipersalina.⁴¹

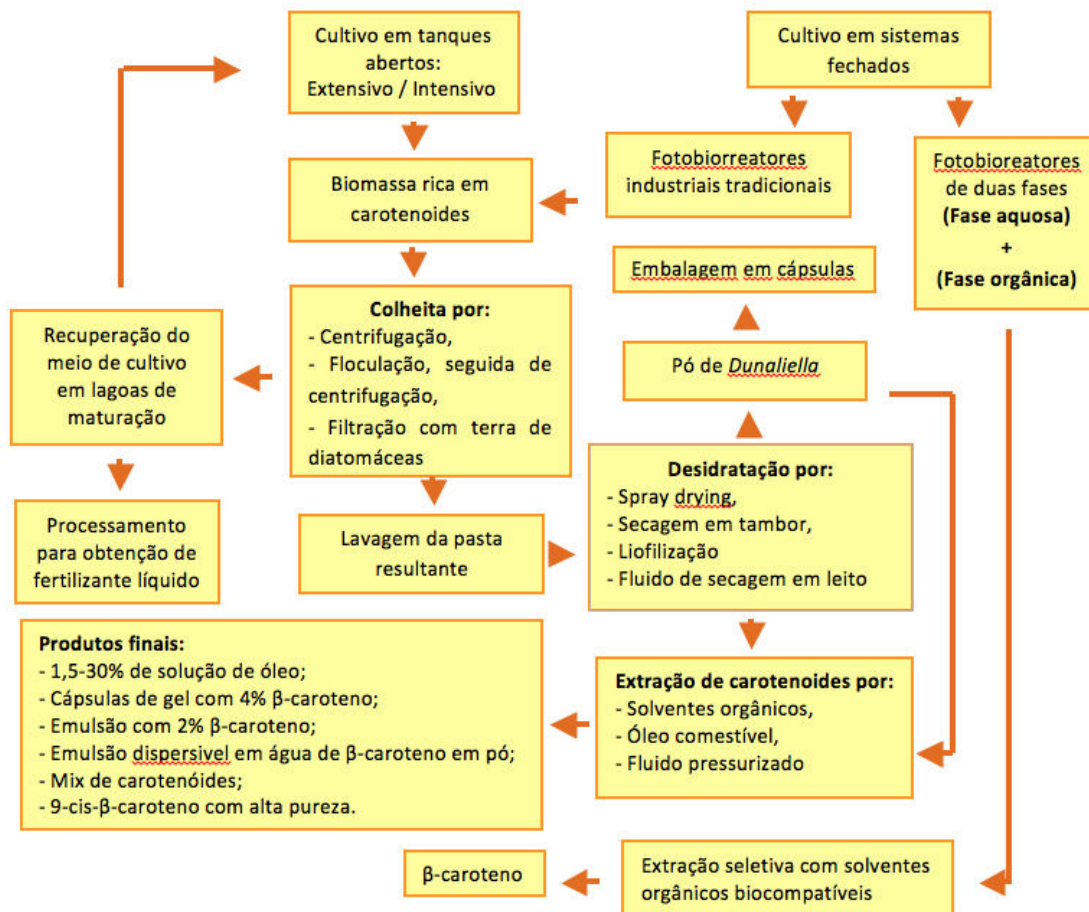


Figura 6. Fluxograma dos processos de cultivo e pós-cultivo de *D. salina* em diferentes sistemas (adaptado da ref 39 com autorização. Copyright © 2014 Copyright Clearance Center, Inc.)



Figura 7: Cultivo de *D. salina* com 250 ha de área, em Eilat, Israel (Cortesia. Ami Ben-Amotz)

Existem dois tipos principais de sistemas em tanques abertos: os que compreendem os sistemas de forma extensiva, onde há controle dos fatores que influenciam o crescimento e a composição celular através do emprego da biotecnologia; e os sistemas de forma intensiva, onde há controle mínimo das condições de cultivo, empregando alta concentração salina no meio de cultivo como forma de evitar predadores naturais da microalga e, como consequência, o crescimento da microalga é mais lento.^{11,39}

As empresas Western Biotechnology e Betateno (hoje conhecida como Cognis Nutrition and Health), localizadas na Austrália, foram as primeiras empresas a iniciar, em 1986, o cultivo de *D. salina* em maior escala visando à produção de β -caroteno, pelo modo extensivo. Isto permitiu que a produção comercial de *D. salina* se tornasse a terceira maior indústria no ramo de produção de biomassa de microalgas.⁴² De acordo com o relatório elaborado pela

BCC Research “FOD025C - O mercado mundial de carotenoides”, publicado em 2011, o β -caroteno é considerado o carotenoide de maior relevância no mercado, estimado em cerca de US\$ 250 milhões em 2007 e US\$ 261 milhões em 2010, com estimativa para alcançar US\$ 334 milhões em 2018 numa taxa de crescimento anual de 3,1%.⁴³ Segundo SPOLAORE (2006), o preço do β -caroteno produzido a partir de *Dunaliella* apresenta variação de US\$ 300 a 3000 por quilo, de acordo com a pureza.⁴²

Conforme pode ser observado na Tabela 5, as espécies de *D. salina* podem produzir até 21 mg g⁻¹ de β -caroteno, enquanto que na cenoura encontra-se apenas 0,058 mg g⁻¹. O β -caroteno produzido por *Dunaliella* tem tido uma demanda crescente, com uma grande variedade de aplicações no mercado, tais como corante nos alimentos industrializados, componente em produtos farmacêuticos e cosméticos e em alimentos da indústria dietética.⁴⁴

Tabela 5. Teor de metabólitos em matrizes fornecedoras de carotenoides⁴⁵

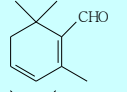
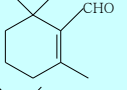
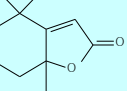
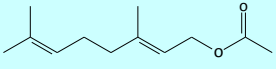
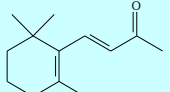
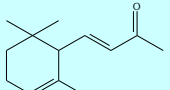
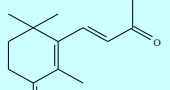
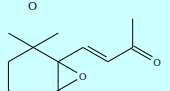
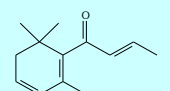
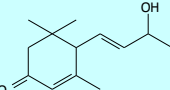
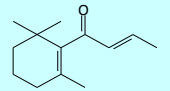
	<i>D. salina</i> (mg g ⁻¹)	<i>Spirulina</i> (mg g ⁻¹)	Cenoura (mg g ⁻¹)
Proteína	74	570	10
Ácidos graxos	70	80	0
Carboidratos	297	240	100
β-Caroteno	11-21	0,00342	0,058
α-Caroteno	0,531	0	0,028
Luteína e zeaxantina	0,543-0,976	0	0,002
Criptoxantina	0,234-0,465	0	0,001
Clorofila	22,1	10	0

5. Carotenoides como precursores de compostos de aroma

Além dos efeitos benéficos dos carotenoides para a saúde e sua utilização

como pigmentos, os carotenoides servem de base para a produção de aromatizantes. Os principais constituintes voláteis produzidos a partir de carotenoides estão representados na Tabela 6, com seu respectivo odor.

Tabela 6. Compostos voláteis originados a partir de carotenoides

Nome	Estrutura	Odor ⁴⁶⁻⁴⁷
Safranal		Doce, erva
β -Ciclocitral		Hortelã
Diidroactinodiolida		Doce, floral, tabaco
Acetato de geranila		Rosa
β -Ionona		Algas marinhas, violeta, flor, framboesa
α -Ionona		Madeira, violeta
4-Oxo- β -ionona		Madeira
5,6-Epoxi- β -ionona		Frutado, doce, Madeira
β -Damascenona		Maçã, rosa, mel
3-Oxo- α -ionol		Especiarias
β -Damascona		Maçã

Por apresentarem duplas ligações altamente conjugadas em sua estrutura, os carotenoides sofrem reações diversas via agentes externos como temperatura, luz, oxigênio e alteração na acidez, ou por via enzimática/microbiana, gerando vários compostos, alguns dos quais possuem aroma intenso que podem ser detectados em

concentrações bastante reduzidas (Tabela 6). Estes produtos de degradação, conhecidos como norisoprenoides, mantêm o grupo terminal do composto de origem, e são preferencialmente compostos carbonilados com 9, 10, 11 e 13 átomos de carbono (norisoprenoide C-9, C-10, C-11 e C-13) (Figura 8).⁴⁸

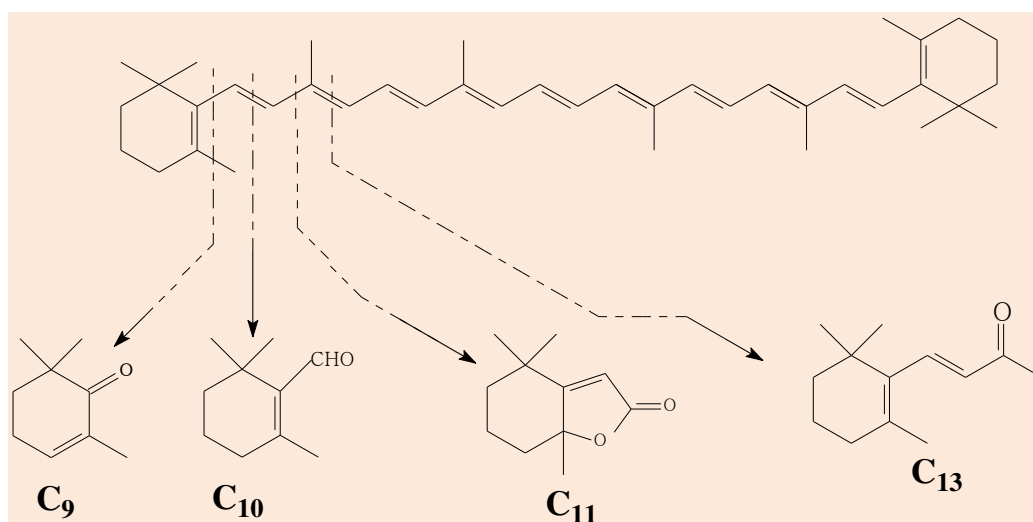


Figura 8. Formação dos norisoprenoides C₉ (p. ex. 2,2,6-trimetil-ciclo-hexanona), C₁₀ (p. ex. β-ciclocitral), C₁₁ (p. ex. diidroactinodiolida) e C₁₃ (p. ex. β-ionona), a partir do β-caroteno

Damasconas e iononas são bastante difundidas na indústria de aromas e fragrâncias.⁴⁹ Por apresentarem baixo limite de percepção (*threshold*), como 0,007 e 0,009 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água para β-ionona e β-damasconona, respectivamente, são compostos de aroma altamente potentes, o que os torna importantes aditivos na indústria alimentícia, contribuindo para os atributos florais e frutados em vinhos, chás, tabacos e uvas.⁵⁰⁻⁵² No ambiente natural, os norisoprenoides parecem ter ação fungicida, afastam herbívoros e atraem agentes polinizadores.⁵³ Mas a obtenção de compostos de aroma através da extração de plantas é um processo de baixo rendimento, e sua principal fonte é sintética.^{54,55}

A degradação dos carotenoides presentes na madeira do carvalho (*Quercus petraea*) utilizada na elaboração de barris para vinho foi investigada, e diferentes fatores de degradação de carotenoides, como luz, temperatura e oxidação promovida pelo cobre, utilizando como matriz apenas o β-caroteno, foram avaliados.⁵⁶ Foram encontrados quatorze compostos de aromas na madeira de *Q. petraea*, como: 7-oxo-diidroteaspirano; megastigmatrienona; diidroactinodiolida; megastigma-4,7,9-trien-3-ona; 4-oxo-β-ionona; 3-hidroxi-β-damasconona; 3-oxo-7,8-diidro-α-ionol; 3-oxo-α-ionol; 4-oxo-β-ionol; diidro-β-ionona;

diidro-3-oxo-β-ionol; 2-hidroxi-β-ionona; blumenol C e blumenol A. A grande maioria dos norisoprenoides encontrados nesse estudo é C₁₃, e contribuem para as diferentes nuances olfativas e de sabor presentes nos vinhos. Após 30 min de exposição à luz ambiente, a concentração do β-caroteno foi reduzida a metade. Sob o efeito da temperatura (temperatura ambiente, 40 e 70 °C), foi observado que à temperatura ambiente e no escuro, a degradação do β-caroteno ocorre lentamente. Ao elevar a temperatura, há um aumento na degradação do β-caroteno. Após 20 minutos a 70 °C foi observada a degradação instantânea do β-caroteno. A oxidação promovida pelo cobre (0 °C e no escuro) se mostrou mais eficiente do que o emprego da luz, uma vez que após 120 minutos de exposição a concentração do β-caroteno encontrou-se próxima de zero.

Uenojo e cols (2010) avaliaram a formação de compostos de aromas através da biotransformação do β-caroteno. A seleção das linhagens foi realizada através do método de placa, e das 300 linhagens investigadas, cerca de 80 apresentaram capacidade de produção de aromas, e sete cepas apresentaram aromas com descritores e intensidade de interesse. A β-ionona foi o principal produto obtido da degradação de β-caroteno, encontrado em maior concentração nas linhagens CS1 (34,0 mg L^{-1})

e CF9 (42,4 mg L⁻¹) em 72 e 24 horas de fermentação; β -damascona e pseudoionona foram encontrados em baixa concentração, e o 1,1,6-trimetil-1,2,3,4-tetraidronaftaleno (TTN) foi apenas identificado e não quantificado.⁵⁷

Bechoff e cols (2010) avaliaram os efeitos da temperatura de armazenamento (10; 20; 30; 40 °C), atividade de água (0,13; 0,30; 0,51; 0,76) e nível de oxigênio (0; 2,5; 10; 21%) na degradação de carotenoides e sua relação com a formação de compostos voláteis durante o armazenamento de batata chips secas. β -ionona, 5,6-epoxi- β -ionona, diidroactinodiolida e β -ciclocitral foram identificados neste estudo. A formação de norisoprenoides durante o armazenamento de batatas fritas secas oriundas da batata doce de polpa alaranjada foi correlacionada com a degradação do β -caroteno, presente nesta matriz. A degradação do β -caroteno mostrou-se diretamente proporcional à formação dos norisoprenoides. A 40 °C e em amostras armazenadas sob ar, menor é a atividade de água e mais rápida ocorre a degradação β -caroteno. A alta atividade de água preservou o β -caroteno e foi registrada a menor concentração de norisoprenoides, de maneira similar ao observado com baixo nível de oxigênio nas amostras.⁵⁸

Ningrum e Schreiner (2014) estudaram a clivagem do β -caroteno e β -apo-8'-carotenal através de enzimas isoladas das folhas de *Pandan wangi* ou pandano, um importante flavorizante da cozinha do sudeste asiático (*Pandanus amryllifolius*). Foi avaliada a dependência da atividade enzimática com a temperatura e o pH. A temperatura ótima para a ação das enzimas foi de 70 °C e pH 6. A β -ionona foi identificada como o principal composto volátil na incubação dos dois substratos avaliados (β -caroteno e β -apo-8'-carotenal). As enzimas utilizadas nesse estudo foram escolhidas devido a sua potencial aplicação na biocatálise, principalmente na indústria de aromas naturais.⁵⁹

Evidências preliminares de que espécies de *Dunaliella* podem ser de utilidade no

processo biotecnológico de produção de aromas foram obtidas por Donadio e cols (2010), ao estudar os compostos voláteis do sal marinho conhecido como "fleur de sel", das salinas solares de Saint-Armel (Bretanha, França), uma especiaria valiosa na culinária internacional. Além da cor deste sal, intimamente correlacionada com a concentração de *Dunaliella* no meio salino, foi sugerido que seu aroma estivesse correlacionado à concentração e ao número de norisoprenoides detectados, derivados de carotenoides.⁶⁰

Herrero e cols (2006), por sua vez, avaliaram a composição química e atividade antimicrobiana do extrato pressurizado de *D. salina*, onde norisoprenoides como α -ionona, β -ionona, β -ciclocitral, neofitadieno e fitol foram observados.⁶¹ A atividade antimicrobiana do extrato foi associada à presença desses compostos, pois é sabido que alguns norisoprenoides, como a β -ionona, inibem a cadeia respiratória impedindo o consumo microbiano de oxigênio.⁶²

6. Considerações Finais

As diferentes espécies do gênero *Dunaliella* têm amplo emprego na biotecnologia, como produção de biocombustíveis, tratamento de águas residuais, remoção de metais pesados, produção de glicerol e ácidos graxos, fonte de vitaminas, indicadores ecológicos, produção de carotenoides e de aromas. Focar sua produtividade em biocombustíveis é apenas uma parcela de seu amplo potencial econômico. Estudos avançados devem ser realizados, especialmente em nosso país, devido à abundância de nossas águas salinas, visando aprimorar seu cultivo e os processos de pós-cultivo em escala comercial, ampliando o emprego da biomassa de microalgas para aplicações mais nobres e de menor impacto ambiental.

Referências Bibliográficas

- ¹ Cosgrove, J. The Carotenoid Market: Beyond Beta-Carotene. Disponível em: <http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view_online-exclusives/2010-12-13/the-carotenoid-market-beyond-beta-carotene>. Acessado em: 12 dezembro 2014.
- ² Lamers, P. P.; Janssen, M.; De Vos, R. C. H.; Bino, R. J.; Wijffels, R. H. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology* **2008**, *26*, 631. [CrossRef]
- ³ Pangestuti, R.; Kim, S. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* **2011**, *3*, 255. [CrossRef]
- ⁴ Ye, Z. W.; Jiang, J. G. & Wu, G. H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances* **2008**, *26*, 352. [CrossRef]
- ⁵ Ribeiro, B. D.; Barreto, D. W.; Coelho, M. A. Z. Technological Aspects of β -Carotene Production. *Food Bioprocess Technology* **2011**, *4*, 693. [CrossRef]
- ⁶ Asua, G. G.; Lang, H. P.; Cogdell, R. J.; Hunter, C. N. Carotenoid diversity: a modular role for the phytoene desaturase step. *Trends in Plant Science* **1998**, *3*, 1360. [CrossRef]
- ⁷ Sydney, E. B.; Da Silva, T. E.; A. Tokarski, A.; Novak, A. C.; De Carvalho, J. C.; Woiciechowski, A. L.; Larroche, C.; Soccol, C. R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy* **2011**, *88*, 3291. [CrossRef]
- ⁸ Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2010**, *14*, 217. [CrossRef]
- ⁹ Pasquet, V.; Cherouvrier, J. R. ; Farhat, F.; Thiery, V.; Piot, J. M.; Berard, J. B.; Kaas, R.; Serive, B.; Patrice, T.; Cadoret, J. P.; Picot, L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, **2011**, *46*, 59. [CrossRef]
- ¹⁰ Arad, S. M.; Varon, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology* **1992**, *3*, 92. [CrossRef]
- ¹¹ Del Campo, J. A.; García-González, M.; Guerrero, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology* **2007**, *74*, 1163. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Gouveia, L.; Nobre, B. P.; Marcelo, F. M.; Mrejen, S.; Cardoso, M. T.; Palavra, A. F.; Mendes, R. L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 717. [CrossRef] [PubMed]
- ¹³ Pilát, Z.; Bernatová, S.; Ježek, J.; Šerý, M.; Samek, O.; Zemánek, P.; Nedbal, L.; Trtílek, M. Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification. *Journal of Applied Phycology* **2012**, *24*, 541. [CrossRef]
- ¹⁴ Qin, S.; Lin, H.; Jiang, P. Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 1602. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Rodrigues, D. B.; Flores, E. 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* **2014**, *65*, 144 [CrossRef]
- ¹⁶ Oncel, S. S. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2013**, *26*, 241. [CrossRef]
- ¹⁷ Derner, R. B. D.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S. M.; Fett, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* **2006**, *36*, 1959. [CrossRef]
- ¹⁸ Koller, M.; Muhr, A.; Braunnegg, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* **2014**, *6*, 52. [CrossRef]
- ¹⁹ Faria, G. R.; Paes, C. R. P. S.; Castro, D. J. F. A.; Tinoco, N. A. B.; Barbarino, E.; Lourenço, S. O. Effects of the availability of CO₂ on growth, nutrient uptake, and chemical composition of the marine microalgae *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata*, two potentially useful strains for biofuel

- production. *International Research Journal of Biotechnology* **2012**, *3*, 65. [Link]
- ²⁰ Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A. A.; Ibraheem, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment *Saudi Journal of Biological Sciences* **2012**, *19*. [CrossRef]
- ²¹ Aravantinou, A. F.; Theodorakopoulos, M. A.; Manariotis, I. D. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. *Bioresource Technology* **2013**, *147*, 130 [CrossRef]
- ²² Oren, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems* **2005**, *1*, 1. [CrossRef]
- ²³ Guiry, M. D.; Guiry, G. M. *AlgaeBase*. Diponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 6 dezembro 2014
- ²⁴ Ben-Amotz, A. The Biotechnology of Cultivating *Dunaliella* for Production of β -Carotene Rich Algae. *Bioresource Technology* **1991**, *38*, 233. [CrossRef]
- ²⁵ Ben-Amotz, A.; Polle, J. E. W.; Subba Rao, D. V. *The alga Dunaliella*. Ed. Science publishers. Enfield, NH. 2009.
- ²⁶ Ben-Amotz, A.; Shaish, A.; Avron, M. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich algae. *Bioresource of Technology* **1991**, *38*, 233. [CrossRef]
- ²⁷ Devi, S. A.; Santhanam, P.; Rekha, V.; Ananth, S.; Prasath, B. B.; Nandakumar, R.; Jeyanthi, S.; Kumar, S. D. Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp. *Journal of Algal Biomass Utilization* **2012**, *3*, 38. [Link]
- ²⁸ Jayappriyan, K. R.; Rajkumar, R.; Venkatakrishnan, V.; Nagaraj, S.; Rengasamy, R. In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition* **2013**, *3*, 99. [CrossRef]
- ²⁹ Murthy, K. N. C.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Swamy, M. M.; Sowmya, P. R.; Ravishanka, G. A. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. *Life Sciences* **2005**, *76*, 1381. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Lamers, P. P.; Janssen, M.; De Vos, R. C. H.; Bino, R. J. & Wijffels, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology* **2012**, *162*, 21. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Santos, C. A.; Vieira, A. M.; Fernandes, H. L.; Empis, J. A.; Novais, J. M. Optimisation of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2001**, *76*, 1147 [CrossRef]
- ³² Akbarzadeh, N.; Shariati, M. Aluminum remediation from medium by *Dunaliella*. *Ecological Engineering* **2014**, *67*, 76. [CrossRef]
- ³³ Ben-Amotz, A.; Avron, M.. The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiology* **1973**, *51*, 875. [Link]
- ³⁴ Borowitzka, L. J.; Kessly, D. S.; Brown, A. D. The salt relations of *Dunaliella*. Further observations on glycerol production and its regulation. *Archives of Microbiology* **1977**, *113*, 131. [CrossRef]
- ³⁵ Chow, Y. Y. S.; Goh, S. J. M.; Su, Z.; Ng, D. H. P.; Lim, C. Y.; Lim, N. Y. N.; Lin, H.; Fang, L.; Lee, Y. K. Continual production of glycerol from carbon dioxide by *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* **2013**, *136*, 550. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Wong, C. K. C.; Cheung, R. Y. H.; Wong, M. H. Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate, *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Pollution* **1999**, *105*, 175. [CrossRef]
- ³⁷ Carballo-Cárdenas, E. C.; Tuan, P. M.; Janssen, M.; Wijffels, R. H. Vitamin E (a-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* **2003**, *20*, 139. [CrossRef]
- ³⁸ Orset, S.; Young, A. J. Low-temperature-induced synthesis of α -carotene in microalga

- Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **1999**, *35*, 520. [CrossRef]
- ³⁹ Tafreshi, A. H.; Shariati, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, **2009**, *107*, 14. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Jin, E.; Melis, A. Microalgal biotechnology: carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2003**, *8*, 331. [CrossRef]
- ⁴¹ Ben-Amotz, "Dunaliella β -carotene: from science to commerce," in *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*, J. Seckbach, Ed., pp. 399–410, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1999.
- ⁴² Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2006**, *101*, 87. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ The Global Market for Carotenoid (FOD025C). Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>>. Acessado em: 5 dezembro 2014;
- ⁴⁴ Francavilla, M.; Trotta, P.; Luque, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 4144. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁵ InterClinical Laboratories. *Dunaliella salina* – Marine Phytoplankton. [Link]
- ⁴⁶ El- Sayed, A. M. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 2 dezembro 2014
- ⁴⁷ Acree, T.; Arn, H. Flavornet. Disponível em: <<http://www.flavornet.org>>. Acesso em: 2 Dezembro 2014
- ⁴⁸ Mendes-Pinto, M. M. Carotenoid breakdown products the - norisoprenoids - in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2009**, *483*, 236. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁹ Gerhäuser, C.; Klimo, K.; Hümmer, W.; Hölzer, J.; Petermann, A.; Garreta-Rufas, A.; Böhmer, F.; Schreier, P. Identification of 3-hydroxy-*b*-damascone and related carotenoid-derived aroma compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated phase 2 response with concomitant anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition & Food Research* **2009**, *53*, 1237. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁰ Winterhalter, P.; Schreier, P. C₁₃-Norisoprenoid glycosides in plant tissues: An overview on their occurrence, composition and role as flavour precursors. *Flavour and Fragrance Journal* **1994**, *9*, 281. [CrossRef]
- ⁵¹ Rodríguez-Bustamante, E.; Sánchez, S. Microbial Production of C₁₃-Norisoprenoids and Other Aroma Compounds via Carotenoid Cleavage. *Critical Reviews in Microbiology* **2007**, *33*, 211. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵² Sánchez-Contreras, A.; Jiménez, M. & Sanchez, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. *Applied Microbiology Biotechnology* **2000**, *54*, 528. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵³ a) Weeks, W. W. Em Biogeneration of Aromas; Parliament, T. H.; Croteau, R., eds.; American Chemical Society: Washington D. C., 1986, cap. 12; b) Apud Uenojo, M.; Junior, M. R. M.; Pastore, G. M. Carotenoides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova* **2007**, *30*, 616. [CrossRef]
- ⁵⁴ Maldonado-Robledo, G.; Rodriguez-Bustamante, E.; Sanchez-Contreras, A.; Rodriguez-Sanoja, R.; Sanchez, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *62*, 484. [CrossRef]
- ⁵⁵ Wang, S.; Jiao, L.; Li, Y.; Fan, M. Degradation of β -carotene to volatile compounds in an aqueous model system to simulate the production of sea buckthorn wine. *International Journal of Food Properties* **2012**, *15*, 1381 [CrossRef]
- ⁵⁶ Nonier, M.; De Gauleja, N. V. ; Vivas, N.; Vitry, C. Characterization of carotenoids and their degradation products in oak wood. Incidence on the flavour of wood. *Comptes Rendus Chimie* **2004**, *7*, 689. [CrossRef]

- ⁵⁷ Uenojo, M.; Pastore, G. M. β -Carotene biotransformation to obtain aroma compounds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2010**, *30*, 822. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁸ Bechoff, A.; Dhuique-Mayer, C.; Dornier, M.; Tomlins, K. I.; Boulanger, R.; Dufour, D.; Westby, A. Relationship between the kinetics of β -carotene degradation and formation of norisoprenoids in the storage of dried sweet potato chips. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 348. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁹ Ningrum, A.; Schreiner, M. Carotenoid-Cleavage Activities of Crude Enzymes from *Pandanous amryllifolius*. *Chemistry & Biodiversity* **2014**, *11*, 1871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Donadio, C.; Bialecki, A.; Valla, A.; Dufossé, L. Carotenoid-derived aroma compounds detected and identified in brines and speciality sea salts (*fleur de sel*) produced in solar salterns from Saint-Armel (France). *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 801. [[CrossRef](#)]
- ⁶¹ Herrero, M.; Ibañez, E.; Cifuentes, A.; Reglero, G.; Santoyo, S. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *Journal of Food Protection* **2006**, *69*, 2471. [[PubMed](#)]
- ⁶² Larroche, C.; Creuly, C.; Gros, J. B. Fed-batch biotransformation of β -ionone by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1995**, *43*, 222. [[CrossRef](#)]