

# **APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS: UMA REVISÃO**

NELCIRENE XIMENES TEODORO<sup>1</sup>  
ÁUREA MARCELA DE SOUSA PEREIRA<sup>2</sup>  
KARINA MARIA OLBRICH DOS SANTOS<sup>3</sup>  
FLÁVIA CAROLINA ALONSO BURITI<sup>4</sup>

---

O termo biotecnologia refere-se às aplicações tecnológicas que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou derivados destes, para obter ou modificar produtos e processos para uso específico. O avanço da genética molecular e o seu aporte para a produção e o desenvolvimento dos alimentos funcionais devem ser considerados, uma vez que o consumo destes alimentos pode trazer benefícios para a população. O objetivo da presente revisão é apresentar as aplicações potenciais da biotecnologia na obtenção dos principais alimentos e ingredientes funcionais de interesse comercial. Nos últimos anos, as principais pesquisas nesta área envolveram a modificação genética de espécies vegetais para o aumento da concentração de componentes biologicamente ativos benéficos à saúde, a obtenção de microrganismos probióticos, a obtenção de alimentos e ingredientes a partir de microalgas produtoras de substâncias antioxidantes, entre outros. A aplicação da biotecnologia em ingredientes e alimentos funcionais é de grande interesse para os produtores e as indústrias de alimentos, de forma que as novas possibilidades destas ferramentas serão cada vez mais exploradas, tornando possível colocar os benefícios da biotecnologia de alimentos à disposição da sociedade.

*PALAVRAS CHAVES: ALIMENTOS FUNCIONAIS, BIOPROCESSOS, BIOTECNOLOGIA, INGREDIENTES, PROBIÓTICOS, SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS, TECNOLOGIA GENÉTICA RECOMBINANTE*

---

<sup>1</sup> Bióloga e especialista em Ensino de Biologia pela Universidade Estadual do Vale do Acaraú. Nutricionista pelas Faculdades INTA. [nelcirene@yahoo.com.br](mailto:nelcirene@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Farmacêutica pela Universidade Federal de Campina Grande e mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba. [aurea\\_marcela@hotmail.com](mailto:aurea_marcela@hotmail.com)

<sup>3</sup> Engenheira de Alimentos, mestre e doutora em Ciência da Nutrição pela Universidade Estadual de Campinas, pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria de Alimentos. [karina.dos-santos@embrapa.br](mailto:karina.dos-santos@embrapa.br)

<sup>4</sup> Nutricionista, mestre e doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo, professora do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba. [flavia@ccbs.uepb.edu.br](mailto:flavia@ccbs.uepb.edu.br)

# 1 INTRODUÇÃO

A alimentação apresenta uma contribuição direta sobre a saúde e prevenção de doenças e é cada vez maior o interesse mundial pelos alimentos que contêm componentes que influenciam as atividades fisiológicas ou metabólicas, ou que sejam enriquecidos com substâncias isoladas de alimentos com estas propriedades, e pelo papel que estes alimentos desempenham sobre a saúde. Nesse contexto, os alimentos com propriedades funcionais comprovadas vêm conquistando o mercado há várias décadas (MORAES; COLLA, 2006; FREITAS et al., 2012; BIRCH; BONWICK, 2019).

De acordo com a definição elaborada pelo Consenso Europeu sobre Alimentos Funcionais em 1999, podem ser denominados “funcionais” os alimentos que, além de apresentarem características nutricionais adequadas, exerçam efeitos sobre uma ou mais funções alvo do organismo que sejam relevantes para a melhoria do estado de saúde e bem-estar e/ou para a redução do risco de doenças. Ainda segundo esta definição, os efeitos exercidos pelos alimentos funcionais devem ser comprovados cientificamente e observados quando ingeridos em quantidades (porções) comumente consumidas pela população como parte de um padrão alimentar normal (DIPLOCK et al., 1999). Estima-se que o mercado global de alimentos funcionais irá atingir 192 bilhões de dólares americanos em 2020 (BIRCH; BONWICK, 2019). De maneira semelhante ao verificado para os alimentos funcionais, o mercado global relacionado aos compostos nutracêuticos dos alimentos tem crescido internacionalmente, tendo atingido aproximadamente 67 bilhões de dólares americanos no ano de 2016 (KAUR et al., 2019). Os nutracêuticos são produtos químicos bioativos isolados ou purificados obtidos a partir de alimentos e vendidos em formas farmacêuticas normalmente não associadas a alimentos (suplementos) que resultam em benefícios à saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças gastrointestinais, cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica, degeneração macular, entre outras, sendo, entretanto, consumidos em concentrações muito superiores que aquelas fornecidas pela alimentação (HAYES, HUGHES; GREENE, 2012; BROWN, POU DYAL; PANCHAL, 2015; HU; HU; MANSON, 2019). Os benefícios dos nutracêuticos para a saúde são normalmente obtidos após um longo período de consumo (KAUR et al., 2019). A importância de se ressaltar que as designações “alimento funcional” e “nutracêutico” têm significados diferentes, mesmo que eles estejam fortemente relacionados, é reforçada por pesquisadores da área há vários anos (MORAES; COLLA, 2006). Os alimentos funcionais apresentam aspecto de alimentos comuns e os nutracêuticos são normalmente incluídos no segmento de suplementos; porém, ainda não existem definições universalmente aceitas para as duas classes de produtos, tornando difícil a sua clara distinção, trazendo significados que podem sobrepor-se dependendo da região geográfica (BOCCIA; PUNZO, 2020).

Em 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) havia realizado uma atualização da lista de alimentos que poderiam receber alegações de propriedade funcional no Brasil. Tais produtos deveriam apresentar em sua composição pelo menos um destes constituintes específicos: óleos de peixes, óleo de krill ou óleo da microalga *Schizochytrium* sp., suplementos dos ácidos graxos da série ômega 3 (ou n-3) eicosapentaenoico (EPA) e/ou docosahexaenoico (DHA); carotenoides licopeno, zeaxantina ou luteína com atividade antioxidante; fibras alimentares, dextrina resistente, goma guar parcialmente hidrolisada, polidextrose ou outros carboidratos, como a lactulose, que contribuem para o funcionamento do intestino; beta glicana em farelo, flocos e farinha de aveia, psyllium (ou psyllium) como fibra alimentar e quitosana, carboidratos, que contribuem para o metabolismo e/ou reduzem a absorção de lipídeos; prebióticos frutooligosacarídeos ou inulina; fitoesteróis; polióis manitol, sorbitol e xilitol em gomas de mascar que reduzem a produção de ácidos que danificam os dentes; probióticos; e proteína de soja (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). Até o término da presente revisão, contudo, a lista encontra-se novamente em atualização, com conteúdo ainda indisponível (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020).

Ressalta-se que, em alguma das etapas da cadeia de processamento de parte dos ingredientes funcionais disponíveis para a indústria de alimentos e, conseqüentemente, dos seus produtos derivados, a biotecnologia é utilizada no sentido de melhorar e otimizar as propriedades de seus constituintes que são relevantes para a saúde humana (SHETTY; SARKAR, 2020). As pesquisas visando à utilização da biotecnologia como uma ferramenta para a obtenção de alimentos e ingredientes funcionais são crescentes e estão focadas em uma grande variedade de produtos (SHETTY; SARKAR, 2019).

Nesse sentido, o artigo 2 da Convenção sobre Diversidade Biológica define “biotecnologia” como qualquer aplicação tecnológica que use sistemas biológicos, organismos vivos ou derivados destes, para obter ou modificar produtos e processos para uso específico (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992), sendo esta a definição oficial reconhecida pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e pela Organização Mundial da Saúde (FERRO, 2010).

Alguns exemplos de uso da biotecnologia para a obtenção de alimentos e ingredientes funcionais são: aumento da viabilidade de microrganismos probióticos em alimentos (AHMED, 2003; STANTON et al., 2005; DOUILLARD; de VOS, 2019); produção prebióticos e outros oligossacarídeos e polissacarídeos funcionais a partir de organismos selecionados e/ou geneticamente modificados (WEYENS et al., 2004; MANO et al., 2018), desenvolvimento de espécies vegetais modificadas geneticamente para o aumento da produção de fitoesteróis (LIAO et al., 2018; NEELAKANDAN et al., 2012); modificação genética de microalgas para a produção de substâncias antioxidantes e ácidos graxos EPA e DHA (FERNÁNDEZ-SEVILLA, ACIÉN FERNANDES; MOLINA GRIMA, 2010; ADARME-VEGA et al., 2012; SAINI et al., 2020; HAMIDI et al., 2020); obtenção de carotenoides para a indústria alimentícia, tanto a partir de algas (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN et al., 2018), bem como de leveduras cultivadas em substratos específicos (AVALOS et al., 2017); entre vários outros.

Dessa forma, verifica-se que é de grande importância a divulgação do conhecimento sobre a aplicação da biotecnologia para a produção desses e outros alimentos e ingredientes funcionais em função dos vários benefícios que estes podem trazer à saúde da população.

A presente revisão tem por objetivo apresentar as aplicações potenciais da biotecnologia na obtenção dos principais alimentos e ingredientes funcionais de interesse comercial. São comentadas as técnicas já utilizadas na agricultura e na indústria para a obtenção desses produtos por meio de processos biotecnológicos, bem como os avanços nas pesquisas para o desenvolvimento de alimentos funcionais com o emprego da biotecnologia.

## **2 PRINCIPAIS TÉCNICAS EM BIOTECNOLOGIA**

Os processos biotecnológicos aplicáveis para a melhoria de culturas de microrganismos para uso no processamento de alimentos fazem parte da “biotecnologia tradicional” e incluem os métodos clássicos de melhoramento genético, como a mutagenese e a conjugação. Os bioprocessos fermentativos destacam-se como a principal aplicação biotecnológica no processamento de alimentos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011; NISSAR et al., 2017).

Por sua vez, a “biotecnologia moderna” compreende a tecnologia genética recombinante para a modificação de organismos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011; CHARLEBOIS et al., 2019). O DNA recombinante é um fragmento de DNA incorporado artificialmente à molécula de DNA de um vetor de clonagem que pode ser amplificado em um organismo diversas vezes. Desta forma, grande quantidade do DNA em questão pode ser obtida. O DNA inserido no vetor de clonagem usualmente contém o gene de interesse. Quando necessário, o fragmento de DNA de interesse pode ser libertado do vetor por meio de enzimas de restrição. Uma vez isolado o gene de interesse, estes fragmentos de DNA são incorporados no genoma do organismo alvo, resultando em um organismo geneticamente modificado, cuja

característica adquirida passa a ser hereditária. A clonagem do DNA envolve a separação de um gene específico, sua ligação a uma molécula de DNA transportadora e a replicação deste DNA modificado em que o resultado deste processo é uma amplificação seletiva de um gene particular. A bactéria *Escherichia coli* foi o primeiro organismo usado para as pesquisas com DNA recombinante e é ainda a célula hospedeira mais comum (ALVES, 2004; LOPES et al., 2012). No caso específico de produtos comercializados no Brasil, a legislação brasileira estabelece que os consumidores devem ser informados pelos produtores e indústrias da natureza transgênica dos alimentos e ingredientes alimentares produzidos a partir de organismos geneticamente modificados quando a presença do componente transgênico for superior a um por cento do produto (BRASIL, 2003a,b).

Çakar et al. (2005) ressaltam que, em contraste com a tecnologia de DNA recombinante, o uso de técnicas evolutivas na engenharia de bioprocessos aplicados à produção de alimentos apresenta uma vantagem pela alta probabilidade de aceitação pública como um procedimento mais natural. A “engenharia evolutiva” ou “evolução adaptativa” define um conjunto de mutações provocada pela multiplicação contínua de uma cultura de microrganismo não recombinante submetida a estresses seletivos, isto é, combinações simultâneas ou sequenciais de diferentes condições de cultivo em que o organismo não é otimamente adaptado, levando à sua evolução através da obtenção de características fenotípicas e/ou fisiológicas de interesse (PÉREZ-TORRADO; QUEROL; GUILLAMÓN, 2015; WANG et al., 2019). Passadas algumas centenas de gerações do microrganismo, mutantes haploides, mostrando vários rearranjos cromossômicos, podem ser isolados e avaliados quanto ao seu metabolismo (SANTOS; GELINSKI, 2008). Dentre as características fenotípicas que podem ser desejáveis destacam-se a maior capacidade e eficiência de fermentação dos substratos e geração de produtos, bem como a tolerância a múltiplos estresses, como alta e baixa temperatura (termotolerância), congelamento-descongelamento, osmolaridade, alto teor de produtos intermediários e finais do metabolismo (ácidos orgânicos, etanol, acetoina, peróxido de hidrogênio), estresse oxidativo, entre outros. O processo industrial pode selecionar variantes genéticas para tolerâncias múltiplas (ÇAKAR et al., 2005; PÉREZ-TORRADO; QUEROL; GUILLAMÓN, 2015; WANG et al., 2019). São frequentemente utilizados agentes mutagênicos de natureza química (etil-metano-sulfonato, metil-nitroso-guanidina) ou física (radiação ultravioleta) para a geração de variabilidade em culturas de microrganismos (WANG et al., 2019). Ainda, a engenharia evolutiva pode ser utilizada em conjunto com a engenharia genética para a obtenção dos microrganismos com as características de interesse (GUIMARÃES et al., 2008).

É importante destacar que mecanismos têm sido criados para avaliar a segurança dos alimentos obtidos por técnica genética recombinante antes de sua entrada no mercado consumidor, como testes de equivalência da composição do alimento modificado em relação ao seu antecedente natural, avaliação toxicológica, de potencial alergênico, de avaliação de potenciais efeitos colaterais, além de acompanhamento epidemiológico das populações após a introdução do produto no mercado (AHMED, 2003; DADGARNEJAD; KOUSER; MOSLEMI, 2017; CHARLEBOIS et al., 2019).

### 3 PROBIÓTICOS

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam benéficamente a saúde do hospedeiro. O consumo de tais microrganismos está associado a efeitos benéficos tanto em seres humanos como em animais (HILL et al., 2014). Os benefícios para a saúde humana com o consumo dos alimentos contendo probióticos são amplos, incluindo a prevenção de condições tais como infecções e distúrbios gastrointestinais, processos alérgicos, carcinogênese e crescimento tumoral (MORENO DE LE BLANC; LE BLANC, 2014; MARTINEZ, BEDANI; SAAD, 2015). Estudos também apontaram efeitos dos probióticos sobre a prevenção de infecções urogenitais, respiratórias e da pele (BUSTAMANTE et al., 2020), bem como para o controle glicêmico e redução dos fatores de risco para a síndrome metabólica (BORDALO TONUCCI et al., 2017a,b; XAVIER-SANTOS et al., 2020). Os microrganismos probióticos

disponíveis comercialmente são, na maioria, bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo estes os mais frequentemente empregados para a produção de alimentos, os quais apresentam um amplo histórico de segurança de uso entre a população saudável (SAAD et al., 2011; BURITI; SAAD, 2014; XAVIER-SANTOS et al., 2020).

A resistência às condições gástricas e entéricas e uma boa adesão à mucosa do intestino são importantes características para as bactérias probióticas, uma vez que a maioria dos seus efeitos benéficos ocorre no ambiente intestinal (DOS SANTOS et al., 2015). A sobrevivência das bactérias probióticas no produto é fundamental, necessitando alcançar populações elevadas, em geral, a partir de quantidades superiores a 6 log unidades formadoras de colônias (UFC)/ ml ou g, para exercer efeitos benéficos no intestino, até  $10^8$ - $10^{10}$  UFC/dia ou mesmo  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/dose para obtenção de outros benefícios sistêmicos (MARTINEZ, BEDANI; SAAD, 2015; PEREIRA et al., 2019; XAVIER-SANTOS et al., 2020). No entanto, além de ser um grande desafio para a indústria de alimentos garantir todas essas condições no produto probiótico (KOMATSU, BURITI; SAAD, 2008), a dose suficiente de microrganismo para levar aos efeitos benéficos pode variar dependendo da cepa utilizada e do produto, não sendo possível estabelecer uma dose geral para todos os produtos (MARTINEZ, BEDANI; SAAD, 2015; XAVIER-SANTOS et al., 2020).

Devido a esses desafios, um dos principais objetivos da biotecnologia aplicada aos probióticos é melhorar as características tecnológicas desses microrganismos, como, por exemplo, melhorar a utilização dos nutrientes disponíveis no alimento, aprimorar a produção de metabólitos de interesse para as características do produto, aumentar a sobrevivência e viabilidade do probiótico no produto, entre outras características. Ao mesmo tempo, modificações nas características dos microrganismos para permitir uma melhor relação com o hospedeiro têm sido buscadas. Uma das estratégias para a obtenção de culturas probióticas geneticamente modificadas é através da introdução de plasmídeos, de modo a permitir que tais microrganismos consigam permanecer por mais tempo no hospedeiro, adquiram novos fenótipos como, por exemplo, a melhor utilização de carboidratos para a sua multiplicação, assim como obter um melhor restabelecimento da sua função celular frente a condições ambientais adversas. Outro modo de obtenção de culturas de interesse para a indústria de alimentos e para a saúde humana é através da engenharia de cepas utilizando-se genes de outras espécies de bactérias lácticas, genes de outros grupos de bactérias, ou até mesmo o silenciamento de genes (AHMED, 2003; CLAES et al., 2010; DOUILLARD; DE VOS, 2019).

Outras técnicas de manipulação genética de microrganismos estão disponíveis para melhorar as características tecnológicas de um probiótico. Com o objetivo de melhorar o desempenho dos microrganismos probióticos durante o processamento dos alimentos, muitos pesquisadores têm se dedicado a compreender os mecanismos de resposta ao estresse em lactobacilos e em bifidobactérias. Esses mecanismos de resposta podem ser conseguidos por exposição dos microrganismos probióticos a condições subletais de estresse, tais como oxigênio, ácido ou calor, o que irá desencadear a resposta adaptativa de suas células ao estresse aplicado e aumentar a sobrevivência quando forem expostas novamente a outras condições letais encontradas no processamento industrial e/ou no trânsito gástrico. Sabe-se que estresses subletais induzem a expressão de vários genes que podem resultar em um nível considerável de proteção contra os estresses ambiental e gastrointestinal (TERPOU et al., 2019). Por exemplo, a pré-adaptação de lactobacilos em condições adversas de sal e calor resultou no aumento da termotolerância e no aumento de sua sobrevivência durante a secagem por pulverização (*spray-drying*) em comparação a culturas não adaptadas (STANTON et al., 2005). No estudo conduzido por Buriti et al. (2010), verificou-se que o estresse provocado pelo armazenamento congelado de sobremesas aeradas aumentou a resistência do probiótico *Lactobacillus acidophilus* (cepa LA-5) às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* (variações de pH na faixa de 1,4 a 7,5), além da presença de enzimas digestórias e bile em temperatura de 37 °C. Outros dados semelhantes demonstram o elevado potencial para a indústria deste procedimento biotecnológico ao induzir maior resistência às

condições de processamento em microrganismos probióticos, o que aumentará a sua sobrevivência no alimento e as suas chances de colonizar o intestino (STANTON et al., 2005; TERPOU et al., 2019).

#### 4 PREBIÓTICOS

Diferentemente dos probióticos, que são microrganismos vivos ingeridos pelo consumidor, conforme descrito com mais detalhes na seção anterior, os prebióticos, conforme define Gibson et al. (2017), são substratos seletivamente fermentados utilizados pelos microrganismos do hospedeiro conferindo um benefício à saúde. Os prebióticos desempenham funções fisiológicas comprovadas no organismo, como alteração benéfica da microbiota do intestino, melhoria das funções intestinais (regularidade, massa e consistência das fezes), prevenção da diarreia ou da constipação intestinal, aumento da absorção mineral, modulação da síntese de peptídios gastrintestinais relacionados ao metabolismo energético e saciedade, melhoria das funções intestinais de barreira, decréscimo da produção de metabólitos tóxicos no intestino, redução dos níveis de colesterol circulantes, redução do risco de doenças degenerativas (obesidade, diabetes tipo 2, câncer), entre outros (FRANCK; BOSSCHER, 2009; GIBSON et al., 2017).

Grande parte dos dados da literatura científica sobre os efeitos dos prebióticos estão relacionados aos frutooligossacarídeos e inulina, membros do grupo dos frutanos, e aos galactooligossacarídeos, membro do grupo dos galactanos (VANDEPUTE et al., 2017; BROSSEAU et al., 2019). Frutanos são carboidratos de reserva de vegetais encontrados naturalmente em alimentos como cebola, alho, alho-poró e outros (ROBERFROID, 2005; SAAD et al., 2011; BROSSEAU et al., 2019). Já os galactooligossacarídeos (também denominados de trans-galactooligossacarídeos) são produzidos a partir da lactose, assim como outra molécula que também apresenta efeitos benéficos semelhantes, a lactulose (KOLIDA; GIBSON, 2008; MARTINS; BURKERT, 2009; BROSSEAU et al., 2019; TERPOU et al., 2019). O estímulo da multiplicação dos microrganismos benéficos do intestino, especialmente bifidobactérias no cólon, tem sido observado com consumo diário a partir de 4 a 5 g até 20 g de prebióticos por um período de, pelo menos, duas semanas (KOLIDA; GIBSON, 2008; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015; VANDEPUTE et al., 2017).

A inulina comercializada como ingrediente prebiótico pode ser extraída da raiz de vegetais como a chicória e a alcachofra-de-Jerusalém, enquanto que os frutooligossacarídeos são obtidos a partir da hidrólise controlada da inulina (utilizando endoinulinases) ou sintetizados a partir da sacarose (utilizando enzimas que apresentam atividade fructosil-transferase, como as obtidas a partir de *Aspergillus niger* ou de *Aspergillus ficuum*) (FRANCK; BOSSCHER, 2009; ROBERFROID, 2005; SARUP SINGH; PAL SINGH; KENNEDY, 2016). No entanto, a síntese enzimática de frutooligossacarídeos ainda apresenta empecilhos industriais, como elevado custo e baixa disponibilidade no mercado de enzimas que apresentam um nível de atividade eficiente e necessária para a produção industrial de frutooligossacarídeos (SARUP SINGH; PAL SINGH e KENNEDY, 2016; VEGA-PAULINO e ZÚNIGA-HANSEN, 2012; OLIVEIRA et al., 2020). Para suprir essa demanda, estudos com fructosil-transferases recombinantes têm sido realizados. Alguns dos microrganismos utilizados como doadores de genes foram *Gluconacetobacter diazotrophicus* (TRUJILLO et al., 2001), *Lactobacillus reuteri* (VAN HIJUM et al., 2002), *Bacillus subtilis* (SEIBEL et al., 2006) e *Aspergillus niger* (ZUCCARO et al., 2007; YANG et al., 2016; MAO et al., 2019) enquanto que os organismos receptores para expressão de fructosiltransferase em larga escala foram *Escherichia coli* (VAN HIJUM et al., 2002; SIEBEL et al., 2006) e *Pichia pastoris* (TRUJILLO et al., 2001; YANG et al., 2016; MAO et al., 2019).

Para a produção de galactooligossacarídeos utilizam-se as enzimas  $\beta$ -D-galactosidases com atividade de transgalactosilação que hidrolisam a lactose em glicose e galactose e transferem a galactose liberada para o monômero galactosil de uma lactose intacta (BOTVYNKO et al., 2019; VERA et al., 2020). Enzimas  $\beta$ -D-galactosidases com atividade de transgalactosilação são distribuídas entre vários microrganismos, incluindo bactérias, arqueas, leveduras e bolores

(MARTINS; BURKERT, 2009; PARK e OH, 2010). Os microrganismos utilizados para a obtenção comercial de  $\beta$ - D-galactosidases são principalmente leveduras das espécies *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, bolores das espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, além de bactérias do gênero *Bacillus* sp (OLIVEIRA et al., 2011). A levedura *Kluyveromyces lactis* tem sido o microrganismo mais estudado para a produção desse tipo de enzima; entretanto, a enzima obtida a partir dessa espécie apresenta baixa atividade de transgalactosilação e estabilidade térmica reduzida. Por outro lado, também tem sido estudada a produção de galactooligossacarídeos a partir de  $\beta$ -galactosidases recombinantes termoestáveis obtidas de microrganismos como *Geobacillus stearothermophilus*, *Pyrococcus furiosus*, *S. solfataricus*, *T. marítima* e *Thermus* sp. (PARK; OH, 2010), bem como de *Bifidobacterium longum* expressa em *E. coli*, também com considerável estabilidade térmica acima de 100°C (OH et al., 2017). As enzimas recombinantes termoestáveis apresentam várias vantagens sobre as enzimas nativas, incluindo facilidade de purificação, produção em larga escala, melhoria em sua atividade, além de poderem ser usadas durante o processamento térmico dos produtos, como a pasteurização (PARK; OH, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Oligossacarídeos do leite humano (HMOs) são conhecidos por contribuir para a saúde dos lactentes desempenhando importante papel na redução da susceptibilidade destas crianças a doenças, melhorando a função da barreira intestinal que regula as imunidades local e sistêmica (BYCH et al., 2019). Vários HMOs têm sido descritos como capazes de atuarem como prebióticos, dentre eles lacto-N-neotetraose, 2'-fucosilactose, 3-fucosilactose, promovendo o desenvolvimento da microbiota inicial que coloniza o intestino infantil, especialmente de bifidobactérias, aumentando a resistência a patógenos e modulando a resposta imune (ELISON et al., 2016; YU et al., 2018; HOLLANDS et al., 2019; PITT et al., 2019). A espécie *E. coli* é conhecida por apresentar a capacidade de produzir oligossacarídeos comuns no leite humano com atividade prebiótica usando lactose como substrato, por exemplo, para a aplicação em fórmulas infantis e outras aplicações nutricionais, a partir do silenciamento ou alteração do gene *lacZ*, o gene codificador para a enzima que hidrolisa a lactose, a  $\beta$ -galactosidase (BYCH et al., 2019). Outros microrganismos geneticamente modificados têm sido estudados para a produção destes oligossacarídeos como, por exemplo, *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* e *Corynebacterium glutamicum* (YU et al., 2018; BYCH et al., 2019; HOLLANDS et al., 2019).

Outros estudos têm visado à modificação genética de vegetais para a produção de componentes com atividade prebiótica. Sévenier et al. (1998) obtiveram uma variedade de beterraba geneticamente modificada que apresentou elevada produção de FOS a partir da introdução do gene *1-SST* codificador da enzima 1-sacarose:sacarose fructosil transferase isolado da alcachofra-de-Jerusalém (*Helianthus tuberosus*). Segundos os autores, esta variedade de beterraba apresentou potencial como fonte alternativa de baixo custo para a obtenção de FOS quando comparada à produção industrial a partir do uso da enzima de *A. niger* para a obtenção destes oligossacarídeos utilizando sacarose como substrato. Weyens et al. (2004) também obtiveram sucesso na obtenção de uma variedade transgênica de beterraba produtora de FOS a partir da incorporação do gene *1-SST* obtido de cebola. Kawakami, Sato e Yoshida (2008) relatam que a modificação genética de arroz objetivando a síntese de frutanos nos grãos ainda aumentou a capacidade de resistência ao frio destas novas variedades. Por sua vez, o gene *1-STT* isolado da alcachofra-de-Jerusalém foi expresso em batata (*Solanum tuberosum*), via transformação mediada por *Agrobacterium* no estudo de Moom et al. (2019), gerando níveis do frutano 1-cestose superiores a 3 mg/g nas batatas transgênicas, mais elevados que os encontrados no vegetal doador do gene. Os mesmos autores também verificaram que a incorporação simultânea dos genes *1-SST* e *1-FFT* isolados da alcachofra-de-Jerusalém, este último que codifica para a enzima frutano:frutano 1-frutosiltransferase, permitiu que as batatas também produzissem frutanos com grau de polimerização igual a 5 ou superior, mas neste caso, em concentrações inferiores às encontradas no vegetal doador do gene.

## 5 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 EPA E DHA

Ômega 3 (n-3) constitui uma família específica dentro do grupo dos ácidos graxos poli-insaturados, estando vários ácidos dessa série relacionados metabolicamente uns aos outros. Os ácidos graxos n-3 são denominados dessa forma por serem caracterizados por possuírem duplas ligações a partir do carbono de número 3 mais próximo da posição metila terminal da cadeia (acil) hidrocarbônica; neste caso o carbono metila é contado como o número 1 (INNES; CALDER, 2020). Uma vez que estão relacionados entre si, os ácidos graxos n-3 apresentam como precursor o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, C18:3 n-3 *cis*- $\Delta$ -9,12,15) (MUGGLI, 2006; MEESAPYODSUK; QIU, 2012). Há várias décadas, os ácidos graxos n-3 presentes em organismos marinhos, especialmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3 *cis*- $\Delta$ -5,8,11,14,17) e docosaenoico (DHA, 22:6 n-3 *cis*- $\Delta$ -4,7,10,13,16,19), têm recebido enorme atenção devido ao seu consumo estar associado com a redução do risco de aterosclerose e vários outros benefícios, como a proteção contra diabetes e desordens inflamatórias, além de desempenharem um papel importante no desempenho e manutenção das funções e ocular e cerebral (JACOBSEN et al., 2006; MEESAPYODSUK; QIU, 2012). Estudos recentes têm mostrado que o EPA e o DHA podem atuar de modo diferente no nosso organismo. Por exemplo, o EPA tem sido mais efetivo na redução da morbidade e mortalidade cardiovascular e no tratamento de desordens depressivas do humor, enquanto que, o DHA estaria mais associado à redução do risco de todas as causas de demência (VORS; COUTURE; LAMARCHE, 2020). Ainda, embora demonstre ser capaz de resultar em maior redução nos níveis séricos de triacilgliceróis e aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade associada ao colesterol (HDL-c), também resulta em maior aumento nos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade associada ao colesterol (LDL-c), bem como exerce maior influência no tamanho dessa lipoproteína (DECKELBAUM; CALDER, 2020). Estas diferenças poderiam estar relacionadas ao fato de que o aumento da redução sérica dos níveis de triacilgliceróis desempenhada pelo DHA estaria associado ao aumento da atividade da lipoproteína lipase (LPL) sem alterações na lipogênese; por sua vez, o efeito nulo do EPA nos níveis séricos de triacilgliceróis é resultado de concomitante aumento tanto na lipogênese como na atividade da LPL (KLINGEL et al., 2019; VORS; COUTURE; LAMARCHE, 2020).

De todo modo, a captação de EPA e DHA a partir da dieta é fortemente influenciada pelo consumo de peixe, sendo as fontes típicas desses ácidos graxos os peixes marinhos de águas geladas, como salmão, atum, sardinha, bagre, cavalinha e arenque (YENDAPALLY, 2010; INNES; CALDER, 2020). Visando à promoção da saúde cardiovascular, tem sido recomendado um consumo diário de EPA/DHA entre 250 mg e 300 mg para adultos, dos quais pelo menos 200 mg deveria corresponder ao DHA para gestantes e lactantes (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010; ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA; FUNDACIÓN IBEROAMERICANA DE NUTRICIÓN, 2012). A estratégia para se aumentar a ingestão de EPA e DHA seria aumentar a ingestão de peixes marinhos; entretanto, o consumo desse alimento pelas populações ocidentais é considerado muito baixo. A produção de suplementos alimentares e o desenvolvimento de alimentos enriquecidos com EPA/DHA têm sido alternativas para aumentar o consumo de EPA/DHA pela população (MUGGLI, 2006; INNES; CALDER, 2020).

No entanto, as fontes de EPA e DHA disponíveis para a produção de suplementos e fortificação de alimentos ainda são bastante restritas; a produção de suplementos desses ácidos graxos a partir de óleos de peixes marinhos já foi excessivamente explorada, o que têm resultado em reduções drásticas das populações de peixes no oceano (MEESAPYODSUK; QIU, 2012; LAKRA et al., 2019; PUDNEY et al., 2019). Além disso, a possível contaminação do óleo de peixe com metais pesados e toxinas é cada vez mais uma preocupação (MEESAPYODSUK; QIU, 2012). Por isso, a comunidade científica e entidades comunitárias e comerciais estão atualmente exercendo intensa pressão para a exploração de novas alternativas para estes ácidos graxos (LAKRA et al., 2019; NAPIER et al., 2019a; PUDNEY et al., 2019).



Uma das possibilidades que emergiu para a produção de óleos ricos em EPA e DHA foi o cultivo de cepas de microalgas produtoras de elevadas concentrações de ácido graxo (WARD; SINGH, 2005; MUGGLI, 2006; CHARLES et al., 2019). Cepas dos gêneros *Phaeodactylum*, *Nannochloropsis*, *Thraustochytrium* e *Schizochytrium* apresentaram elevadas concentrações de EPA e/ou DHA (ADARME-VEGA et al., 2012). Outros gêneros propostos para a produção de EPA incluem *Asterionella*, *Pavlova*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Porphyridium* e *Tetraselmis*, e para a produção de DHA *Aurantiochytrium*, *Cryptheconidium*, *Isocrysis*, e *Thraustochytriidae* (WARD; SINGH, 2005; BELLOU et al., 2016). As microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Nannochloropsis* sp. apresentaram um conteúdo de EPA de até 39% do total de ácidos graxos, enquanto as cepas de *Thraustochytrium* e *Schizochytrium limacinum* tiveram uma percentagem de DHA entre 30-40% do total de ácidos graxos quando cultivadas em condições heterotróficas. Alta biomassa e produtividade de EPA e DHA comercialmente aceitável são alcançadas com microalgas cultivadas em meios com concentrações otimizadas de carbono e nitrogênio e condições controladas de pH e temperatura. Uma elevada produção de óleo, incluindo DHA de *Schizochytrium* (50% m/m), pode ser obtida através de elevada taxa de multiplicação por meio do controle de nutrientes tais como glicose, nitrogênio, sódio, e de fatores ambientais, como a concentração de oxigênio, temperatura e pH, alcançando o aumento da densidade celular e a alta produtividade de DHA (ADARME-VEGA et al., 2012).

Em microalgas, a engenharia genética tem provido a oportunidade de explorar o genoma destes organismos sem a através de sua modificação, deletando ou inserindo sequências genéticas específicas (RANDHIR et al., 2020). Ao associarem rendimento da produção de ômega 3 de microalgas com a tecnologia recombinante, Hamilton et al. (2014) conseguiram um aumento de 8 vezes da produção de DHA em *Phaeodactylum tricornutum* pela sua modificação genética a partir da introdução de uma  $\Delta 5$ -elongase originária da picoalga *Ostreococcus tauri*. Concentração ainda maior de DHA foi verificada pelos autores quando a microalga co-expressou a  $\Delta 5$ -elongase com uma  $\Delta 6$ -desaturase dependente de acil-CoA, também originária de *Ostreococcus tauri*.

Por sua vez, a biossíntese de ácidos graxos em plantas ocorre nos plastídios pelo complexo enzimático ácido graxo sintase (WARD; SINGH, 2005). Segundo Napier et al. (2019a), o interesse em plantas modificadas geneticamente capazes de acumular ácidos graxos n-3 iniciou no final dos anos 1990. De acordo com os autores, do ponto de vista econômico, o preço *commodity* do óleo de peixe é duas vezes maior que o de óleos vegetais, tornando mais atrativo introduzir os ácidos graxos n-3 de cadeia longa em plantas. Apesar dos óleos de vegetais serem ricos em ácidos graxos de 18 carbonos, são desprovidos de ácidos com 20 ou mais carbonos, como o EPA e DHA. De modo a permitir que vegetais produzam EPA e DHA, é necessária a introdução de novas enzimas com atividade elongase e desaturase (WARD; SINGH, 2005; NAPIER et al., 2019a). A conversão do ácido graxo  $\alpha$ -linolênico em EPA em um organismo vegetal requer um mínimo de três reações enzimáticas naturalmente ausentes, sendo duas desaturações e uma elongação (VENEGAS-CALERÓN et al., 2010). Apesar de já demonstrada a introdução de rotas biossintéticas para a produção de ácidos graxos com 20 ou mais carbonos em culturas de sementes oleaginosas, o alcance de níveis economicamente viáveis de EPA e DHA nesses vegetais modificados geneticamente tem sido considerado um desafio (RUIZ-LÓPEZ et al., 2012; NAPIER et al., 2019a,b). Para o óleo de canola (*Brassica napus*), por exemplo, níveis modestos de DHA (<4%) foram obtidos a partir da introdução na planta de genes de uma via policetídeo sintase (PKS) anaeróbica obtida a partir da microalga *Schizochytrium*. Já para a canola LBFLFK, seu desenvolvimento foi a partir da variedade de canola *Kamily*, recebendo genes de diferentes microrganismos, por exemplo codificadores de  $\Delta$ -elongases tanto de *Physcomitrella patens* como de *Thalassiosira pseudonana*, cópias da  $\Delta 5$ -desaturase, vinda de *Ostreococcus tauri*, além de cópias da  $\omega 3$ -desaturase, totalizando 24 transgenes para a biossíntese de EPA (em níveis de aproximadamente 7% no óleo) e DHA (aproximadamente 1%) (NAPIER et al., 2019b).

## 6 FITOESTERÓIS

Os fitoesteróis, também conhecidos como esteróis vegetais, são esteróis contendo uma substituição alquila na posição C-24 (C-24 alquil esteróis) e constituem uma família de produtos naturais que ocorrem em plantas superiores em todas as fases de desenvolvimento (NEELAKANDAN et al., 2012). Os esteróis são componentes de membrana e atuam na regulação da fluidez e permeabilidade de membrana (HASE et al., 2005). Estes esteróis são compostos presentes nos óleos de vegetais (MARTINS et al., 2004) e apresentam grande similaridade estrutural com o colesterol (HANNA et al., 2020).

De modo geral, os esteróis são estruturas que apresentam esqueleto baseado em quatro anéis fundidos, cujas diferenças na conjugação, posição e tipo de grupos funcionais polares geram um amplo espectro de polaridades nesta família de lipídios (ALDANA; ROMERO-OTERO; CALA, 2020). O núcleo esterol, 1,2-ciclopentanoperidropenantreno, que compreende esses quatro anéis fundidos (A, B, C, D), se liga a um grupo  $\beta$ -hidroxil (3-OH) no carbono 3 e uma longa cadeia lateral ao carbono 17. O grupo hidrofílico 3-OH geralmente contribui para a realização de pontes de hidrogênio com outros grupos lipofílicos, enquanto que a conformação e o comprimento da cadeia lateral, bem como a estereoquímica do grupo alquila na posição C-24, são a chave para as interações moleculares (HANNAN et al., 2020). A diferença entre as estruturas químicas do colesterol e dos fitoesteróis e fitoestanóis (esteróis saturados) são devidas justamente ao fato de que cada esterol vegetal possui uma cadeia alquila lateral adicional na posição C-24: o  $\beta$ -sitosterol contém um grupo etila extra; o campesterol contém um grupo etila extra; o estigmasterol contém um grupo etila na posição C-24 e também uma dupla ligação na posição C-22 (CEDÓ et al., 2019). Assim, a cadeia lateral dos fitoesteróis contém geralmente 9 ou 10 átomos de carbono, em oposição ao colesterol que possui 8 carbonos (HANNAN et al., 2020).

Os fitoesteróis podem ocorrer na forma livre cristalina, esterificada a ácidos graxos livres ou com ácidos fenólicos como o ácido ferúlico, ou ainda glicosilados com hexoses no carbono 3 (CEDÓ et al., 2019). Dentre os alimentos ricos em fitoesteróis e fitoestanóis, destacam-se a soja, os frutos oleaginosos e os óleos de vegetais em geral, principalmente os de canola, arroz e girassol. Os ésteres de esterol e estanóis vegetais são reconhecidos como componentes funcionais dos alimentos por apresentarem propriedades hipocolesterolêmicas (MARTINS et al., 2004). Duzentos tipos de fitoesteróis já foram identificados, existindo uma grande variedade de fitoesteróis presente nos alimentos, porém o  $\beta$ -sitosterol e o campesterol representam mais de 80% dos fitoesteróis presentes nos extratos vegetais (CEDÓ et al., 2019). Outros fitoesteróis também abundantes nos produtos *in natura* são o estigmasterol, brassicasterol e avenasterol (CEDÓ et al., 2019; GYLLING et al., 2019).

Para a redução da colesterolemia, os fitoesteróis podem ser utilizados de forma isolada ou combinada a outros agentes hipocolesterolemiantes, de acordo com os níveis circulantes de colesterol no paciente (LAW, 2000). Em adição ao efeito da redução do colesterol total e colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), os fitoesteróis também possuem outras propriedades promissoras, como a ação anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antiaterogênica e antipirética (LAW, 2000; BRUFAU, CANELA e RAFECAS, 2008; CEDÓ et al., 2019; JIANG et al., 2019).

Há muito interesse em se aumentar o teor de fitoesteróis naturais em óleos de sementes por engenharia genética da rota metabólica de produção destes compostos. O sitosterol e outros fitoesteróis são moléculas derivadas da via do mevalonato da biossíntese de isoprenoides. A formação dessas moléculas é controlada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR). A superexpressão transgênica do domínio catalítico do gene *HGMR1*, que codifica essa enzima, mostrou ser eficiente para promover o acúmulo de fitoesteróis. Vegetais que receberam genes *HMGR* exógenos mostraram um aumento dos níveis de fitoesterol de 2-10 vezes, dependendo da planta testada. Na soja, duas isoformas da enzima esterol C24-metiltransferase (SMT), SMT1

e SMT2, também estão envolvidas na biossíntese de fitoesteróis. A modificação genética de variedades de soja através da manipulação dos genes *HMGR1*, *SMT1* e *SMT2* promoveu um aumento de, aproximadamente, 35% no acúmulo total de esteróis nas sementes em comparação com as sementes comuns (NEELAKANDAN et al., 2012).

No estudo de Chen et al. (2007), foi relatada a presença de um gene *AtSAT1* (At3g51970) que codifica para uma promissora enzima esterol O-aciltransferase na espécie vegetal *Arabidopsis thaliana*. Quando esta enzima foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae*, verificou-se a produção de ésteres de esterol ricos em lanosterol. Esta esterol O-aciltransferase de *Arabidopsis* é estruturalmente relacionada à acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT) em sistemas animais e media uma rota alternativa para a biossíntese de ésteres de fitoesteróis em vegetais. Segundo os autores, o gene *AtSAT1* também apresenta potencial para ser utilizado na engenharia genética de sementes para a obtenção de concentrações de fitoesteróis comercialmente desejáveis.

No estudo de Liao et al. (2018), foi possível aumentar simultaneamente a produção de vitamina E, carotenoides, esqualeno e fitoesteróis em tomate geneticamente modificado através da introdução, via transformação mediada por plasmídeos de *Agrobacterium*, do gene *BjHMGS1* de *Brassica juncea* (mostarda marrom), que codifica para a enzima 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA sintase (HMGS).

Ainda, segundo Randhir et al. (2020), as microalgas são também promissoras para a produção comercial de fitoesteróis em larga escala, uma vez que numerosos esteróis têm sido reportados nesses organismos e a tecnologia para a sua modificação genética é disponível, seja por evolução adaptativa em situações de estresse ou por técnica de DNA recombinante. No entanto, segundo os autores, ainda são necessários mais estudos de modo a viabilizar tal produção de modo ambientalmente e economicamente sustentável, particularmente, com mais enfoque nas vias metabólicas envolvidas na biossíntese de esteróis por esses organismos.

## 7 CAROTENOIDES

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre em razão da ação dos radicais livres no organismo. Elas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas originam-se de processos biológicos que ocorrem no organismo a partir da atividade de enzimas oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases, além dos sistemas de transporte elétrons e da presença intracelular de metais de transição, enquanto que as fontes exógenas incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações, sendo todos estes processos geradores de radicais livres (MORAES; COLLA, 2006; LI et al., 2020). Os antioxidantes colaboram na redução de radicais livres agindo em diferentes níveis da sequência oxidativa, interceptando os radicais para formar compostos menos reativos (GÜZEL e ELMASTAŞ, 2020). Determinadas substâncias fitoquímicas, carboidratos, proteínas, peptídeos, vitaminas e minerais podem atuar atrasando ou inibindo a propagação das reações de oxidação em cadeia, as quais levam tanto ao dano nas células, bem como ao prejuízo sensorial e nutricional dos alimentos (CARVALHO et al., 2006; HU et al., 2016; MORENO-VÁSQUEZ et al., 2017; SOHAIB et al., 2017). No organismo, os danos oxidativos são causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas como resultado dos processos metabólicos. As ROS possuem grupos radicais livres altamente reativos que podem ser neutralizados por moléculas antioxidantes como, por exemplo, os carotenoides, que apresentam efeitos bastante conhecidos (ÇOLAK et al., 2020).

Os carotenoides são substâncias químicas altamente saturadas derivadas do isopreno dentro de um grupo de substâncias tetraterpênicas, compostas de uma cadeia contendo 40 unidades de carbono e um grande sistema de duplas ligações conjugadas (FERNÁNDEZ-SEVILLA et al., 2010; SHARMA; GHOSHAL, 2020). São pigmentos lipossolúveis amplamente difundidos na natureza, além de serem caracterizados por apresentar moléculas oxidáveis e isomerizáveis (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017). Trata-se de um grupo de compostos relevantes devido ao seu

papel na fotossíntese e fotoproteção, à sua vasta aplicabilidade como corante alimentar e a suas funções fisiológicas nos tecidos humanos como antioxidantes e como filtros da luz azul (KRINSKY et al., 2003; FERNÁNDEZ-SEVILLA et al., 2010). Dessa forma, os carotenoides são utilizados comercialmente como corantes alimentícios e nutracêuticos, bem como também são empregados para fins cosméticos e farmacêuticos (LEE; SCHMIDT-DANNERT, 2002; SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017).

Existem duas classes principais de carotenoides que ocorrem naturalmente: os carotenos, que são hidrocarbonetos lineares ou cíclicos em uma (monocíclicos) ou ambas (dicíclicos) as extremidades da molécula (tais como  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno); e as xantofilas, que são derivados oxigenados dos carotenos (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017). Carotenoides contendo pelo menos um anel  $\beta$ -ionona não substituído ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) são chamados pró-vitamina A porque eles podem ser convertidos em retinal por humanos e animais. O licopeno, apesar de não possuir atividade pró-vitamina A, é um potente antioxidante em função de sua natureza insaturada, sendo capaz de reduzir o risco de doenças coronarianas e certos tipos de câncer (JASWIR et al., 2011; BERMAN et al., 2015). Enquanto isso, as xantofilas contêm grupos hidroxila ou carbonila adicionais, os quais contribuem para aumentar a sua solubilidade e, portanto, a sua distribuição nos tecidos animais. A luteína ((3R,3'R,6'R)- $\beta$ , $\epsilon$ -caroteno-3,3'-diol) é uma xantofila que, em conjunto com zeaxantina, tem recebido elevada atenção devido aos estudos que demonstraram o quanto uma ingestão adequada deste produto pode ajudar na prevenção ou redução do efeitos de doenças degenerativas em humanos, tais como as relacionadas com degeneração macular pela idade ou catarata, e também na contribuição da saúde da pele. A luteína, juntamente com a zeaxantina em menor proporção, é o único carotenoide que é absorvido na corrente sanguínea após ingestão e acumulado na retina humana, sendo assumido que este composto atua como um antioxidante ativo através do efeito protetor que exerce devido à sua capacidade de filtrar a luz azul, seu potencial para inativar oxigênio singlete, uma das espécies reativas de oxigênio, e para eliminar outros radicais livres (ROBERTS et al., 2009; ARNAL et al., 2009; FERNÁNDEZ-SEVILLA et al., 2010). Todas as xantofilas produzidas pelas plantas superiores (por exemplo, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina e luteína), são também sintetizadas por algas verdes. No entanto, em contraste com as plantas terrestres, algas verdes específicas possuem xantofilas adicionais, tais como lodoxantina, astaxantina e cantaxantina. Ainda, existem as formas diatinoxantina, diadinoxantina e fucoxantina que são produzidas em algas marrons ou em diatomáceas (LOHR e WILHELM, 2001; EONSEON et al., 2003).

Até o início dos anos 2010 eram ainda poucos os carotenoides (ex. licopeno,  $\beta$ -caroteno, astaxantina, cantaxantina, capsantina, luteína, anato,  $\beta$ -apo-8-carotenal, éster- $\beta$ -apo-8-carotenal) com relatos de produção comercial através de isolamento de fontes naturais ricas nestes compostos, porém limitadas, ou por síntese química, ou fermentação (JASWIR et al., 2011). Dada a importância destes compostos no mercado de alimentos, nutracêuticos, ração animal e produtos farmacêuticos, houve um aumento de sua demanda, desencadeando uma concentração de esforços em pesquisa com o objetivo de se produzir estas e outras moléculas de carotenoides (KIM et al., 2010; JASWIR et al., 2011; BERMAN et al., 2015). Alguns estudos envolvendo o uso da biotecnologia para a melhoria da concentração desses componentes nos alimentos serão comentados a seguir.

Com relação à obtenção comercial de carotenoides por fermentação, destacam-se os cultivos do bolor *Blakelea trispora* e da microalga *Dunaliella salina* para produção de  $\beta$ -caroteno, bem como da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anteriormente denominada *Phaffia rhodozyma*) e da microalga *Haematococcus pluvialis* para a produção de astaxantina (BERMAN et al., 2015; HARVEY, 2017). São também tidas como produtoras potenciais de carotenoides para uso industrial as microalgas *Chlorella ellipsoidea* e *Porphyridium* spp. para a obtenção de zeaxantina, assim como *Chromochloris zofingiensis* (anteriormente pertencente ao gênero *Chlorella*) para a produção de astaxantina e cantaxantina (VARELA et al., 2015; CEZARE-GOMES et al., 2019). Tal produção tem

sido possível principalmente em função da transformação desses organismos, seja por condições de estresses abióticos ou através de engenharia genética (BERMAN et al., 2015; VARELA et al., 2015).

Varela et al. (2015) fornecem pistas de como situações de estresse desencadeiam a carotenogênese em *Dunaliella salina*. Segundo os autores, depressão de nutrientes, ambiente salino e elevada luminosidade são indicativos de que o habitat irá se modificar. A concentração salina do ambiente aumenta por evaporação da água, ao mesmo tempo em que há aumento da luminosidade (azul e UV) em função da redução da profundidade da água que resulta em baixa atenuação da luz e aumento da densidade de fluxo de fóton. Com isso, ocorre a resposta da microalga pelo aumento da carotenogênese. As gotículas de carotenoides produzidas na periferia de seus cloroplastos ou corpo celulares atuam como fotoprotetores, permitindo que a microalga consiga sobreviver nessas condições adversas.

Segundo Pick et al. (2019), situações de elevada incidência de luz resulta em mutação do gene *psy* que codifica para a fitoeno sintase (PSY), o que aumenta a transcrição dessa enzima em *Dunaliella*, causando a desintegração e amplificação dos plastogóbulos, onde o  $\beta$ -caroteno se acumula (hipercarotenogênese). Ainda segundo os autores, o aumento da luminosidade resulta em mutação semelhante no gene *psy* em *Haematococcus pluvialis*, fazendo com que esta microalga adquira um transportador de carotenoides nas membranas envelope dos cloroplastos e insira as enzimas  $\beta$ -caroteno cetolase,  $\beta$ -caroteno cetolase hidroxilase e astaxantina aciltransferase nas gotículas lipídicas do citoplasma, com conseqüente formação de astaxantina nessas gotículas.

Uma vez que a enzima PSY é essencial para a carotenogênese, essa enzima tem sido alvo de várias abordagens envolvendo engenharia genética para aumentar a concentração de carotenoides em diferentes organismos pela superexpressão ou inclusão do correspondente gene (VARELA et al., 2015; SAINI et al., 2020; WATKINS; POGSON, 2020). Nesse sentido, a engenharia genética tem sido utilizada para aumentar a concentração de carotenoides em vegetais, não somente naqueles capazes de sintetizar naturalmente concentrações relevantes do ponto de vista nutricional, mas também impulsionar a produção em vegetais que, em condições normais, são obtidos níveis escassos dessas moléculas. Por exemplo, o *Golden Rice*, geneticamente modificado pela inclusão da PSY e de uma fitoeno dessaturase/isomerase bacteriana (CRTI) foi capaz de acumular até 31,0  $\mu\text{g/g}$  (base seca) de  $\beta$ -caroteno no endosperma (PAINE et al., 2005; BERMAN et al., 2015). Outro exemplo é o cruzamento de uma linhagem de milho não híbrida com outra expressando as enzimas licopeno  $\beta$ -ciclase (LYCB obtida de genciana), PSY e CRTI, o qual resultou em um acúmulo de até 56,5  $\mu\text{g/g}$  (base seca) de zeaxantina, concentração 40% superior à encontrada em suplementos comerciais (NAQVI et al., 2011; BERMAN et al., 2015). Por outro lado, outras enzimas podem resultar no aumento da produção de carotenoides em vegetais, como no caso do tomate que acumulou até 10 vezes esses compostos através da superexpressão da proteína de choque térmico 21 (HSP21), resultando em um amadurecimento de 7 a 10 dias mais rápido. Reforça-se que a supressão da HSP21 não inibe a síntese de licopeno por este fruto (WATKINS; POGSON, 2020).

Com relação aos microrganismos não carotenogênicos, há décadas que estudos envolvendo a produção recombinante de carotenoides têm mostrado a viabilidade de obtenção de rotas não convencionais para a produção de diversas estruturas (LEE e SCHIMIDT-DANNERT, 2002; KIM et al., 2010). Um exemplo é a combinação dos genes de *Arabidopsis thaliana* para  $\beta$ - e  $\epsilon$ -ciclase com genes específicos para a síntese dos carotenoides licopeno e neurosporeno que possibilitou a síntese de  $\beta$ - e  $\epsilon,\psi$ -caroteno, bem como  $\alpha$ - e  $\beta$ -zeacaroteno em *Escherichia coli*. A co-expressão de ambas as ciclases em células de *E. coli* produtoras de licopeno também resultou na síntese de  $\alpha$ -caroteno (CUNNINGHAM et al., 1996; LEE; SCHIMIDT-DANNERT, 2002).

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A indústria de alimentos é a mais antiga e a mais usuária de processos e produtos biotecnológicos, uma vez que, há mais de 8.000 anos o homem já tirava proveito do uso tradicional

desses processos como, por exemplo, na fermentação de grãos de cereais para a fabricação de bebidas alcoólicas. Com o passar do tempo, a biotecnologia foi se desenvolvendo e se modernizando cada vez mais.

Hoje, a biotecnologia possui papel fundamental na obtenção de ingredientes e alimentos funcionais disponíveis para a indústria de alimentos, e envolve principalmente as técnicas evolutivas na engenharia de bioprocessos (“engenharia evolutiva” ou “evolução adaptativa”). Os métodos biotecnológicos atuais permitem o desenvolvimento de produtos contendo microrganismos probióticos provenientes do uso de técnicas específicas, microrganismos selecionados ou geneticamente modificados produtores de oligossacarídeos prebióticos, alimentos obtidos a partir de espécies vegetais modificadas geneticamente para seu enriquecimento em frutanos prebióticos, fitoesteróis, carotenoides e antioxidantes, alimentos obtidos a partir de microalgas produtoras de substâncias antioxidantes e ácidos graxos ômega 3, entre vários outros. No caso específico do desenvolvimento de novos alimentos e ingredientes funcionais, destaca-se o papel do consumo destes produtos na prevenção e auxílio ao tratamento de doenças crônico-degenerativas como as cardiovasculares, o diabetes tipo 2, a degeneração macular, entre várias outras. Dessa forma, a biotecnologia vem trazendo cada vez mais benefícios para população.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo auxílio financeiro. Aos professores Alexandre Sales Barros, Fábio Solon Tajra e Jorge Luís Pereira Cavalcante pelas suas valiosas sugestões.

## **ABSTRACT**

### **PRODUCTION AND DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOODS THROUGH BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS: A REVIEW**

Biotechnology is referred to as technological applications involving biological systems and live organisms, or their derived parts, for the development and modifications of both products and processes focusing on a specific utilization. The advance of molecular biology and its contribution to production and development of functional foods deserve to be considered, since the consumption of these foods can bring benefits to the population's health. The aim of this review is to show the potential applications of biotechnology in the production of the main functional food products and ingredients of commercial interest. In the recent years, important studies in this field involved the genetic modification of plant species to improve the concentration of health-beneficial biologically active compounds, the improvement of probiotic microorganisms, the production of foods and ingredients using antioxidant producers' microalgae, among others. The production of functional foods and ingredients through biotechnological applications is of valuable interest either for agricultural producers or for the food industry, since the novel possibilities of using these approaches will be even more explored, making possible to put the benefits of biotechnology in the service of the society.

**KEY WORDS:** *BIOPROCESS, BIOTECHNOLOGY, FUNCTIONAL FOODS, INGREDIENTS, PROBIOTICS, BIOACTIVE COMPOUNDS, RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY*

## REFERÊNCIAS

- 1 ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. H. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 96, July 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-11-96>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- 2 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. [Brasília, DF]: ANVISA, 22 dez. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 02 jun. 2017.
- 3 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alegações de propriedade funcional ou de saúde: em atualização**. [Brasília, DF]: ANVISA, 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 4 AHMED, F. E. Genetically modified probiotics in foods. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 491-497, 2003.
- 5 ALDANA, J.; ROMERO-OTERO, A.; CALA, M. P. Exploring the lipidome: current lipid extraction techniques for mass spectrometry analysis. **Metabolites**, v. 10, n. 6, p. 231, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo10060231>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/6/231/htm>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- 6 ALVES, G. S. A biotecnologia dos transgênicos: precaução é a palavra de ordem, **HOLOS**, ano 20, n. 2, p. 1-10, out. 2004.
- 7 ARNAL, E.; MIRANDA, M.; ALMANSA, I.; MURIACH, M.; BARCIA, J. M.; ROMERO, F. J.; DIAZ-LLOPIS, M.; BOSCH-MORELL, F. Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 247, n. 1, p. 115-120, 2009.
- 8 AVALOS J.; NORDZIEKE S.; PARRA O.; PARDO-MEDINA J.; CARMEN LIMÓN M. Carotenoid production by filamentous fungi and yeasts. In: SIBIRNY A. (ed.) **Biotechnology of yeasts and filamentous fungi**. Cham: Springer, 2017. 412 p.
- 9 BELLOU, S.; TRIANTAPHYLLOIDOU, I. E.; AGGELI, D.; ELAZZAZY, A. M.; BAESHEN, M. N.; AGGELIS, G. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 24-35, 2016.
- 10 BERMAN, J.; ZORRILLA-LÓPEZ, U.; FARRÉ, G.; ZHU, C.; SANDMANN, G.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Nutritionally important carotenoids as consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 5, p. 727-743, 2015.
- 11 BIRCH, C. S.; BONWICK, G. A. Ensuring the future of functional foods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1467-1485, 2019.
- 12 BROWN, L.; POU DYAL, H.; PANCHAL, S. K. Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 11, p. 914-941, 2015.
- 13 BOCCIA, F.; PUNZO, G. Nutraceuticals: some remarks by a choice experiment on food, health and new technologies. **Food Research International**, v. 130, p. 108888, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108888>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919307744>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 14 BORDALO TONUCCI, L.; DOS SANTOS, K. M. O.; FERREIRA, C. L. L. F. F.; RIBEIRO, S. M. R.; OLIVEIRA, L. L.; MARTINO, H. S. D. Gut microbiota and probiotics: focus on diabetes mellitus. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2296-2309, 2017a.
- 15 BORDALO TONUCCI, L.; DOS SANTOS, K. M. O.; OLIVEIRA, L. L.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 85-92, 2017b.
- 16 BOTVYNKO, A.; BEDNÁŘOVÁ, A.; HENKE, S.; SHAKHNO, N.; ČURDA, L. Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial  $\beta$ -galactosidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 517, n. 4, p. 762-766, 2019.
- 17 BRASIL. Presidência da República. Decreto 4680 de 24 de abril de 2003. Direito à informação quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 185, n. 79, p. 2, 25 abr. 2003.
- 18 BRASIL. Ministério da Justiça. Portaria No. 2658 de 22 de dezembro de 2003. Regulamento para o emprego do símbolo transgênico. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 140, n. 251 p. 13-14, 26 dez. 2003.
- 19 BROSSEAU, C.; SELLE, A.; PALMER, D. J.; PRESCOTT, S. L.; BARBAROT, S.; BODINIER, M. Prebiotics: mechanisms and preventive effects in allergy. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1841, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu11081841>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1841>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- 20 BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, n. 4, p. 217-225, 2008.

- 21 BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.
- 22 BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Chilled milk-based desserts as emerging probiotic and prebiotic products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 139-150, 2014.
- 23 BUSTAMANTE, M.; OOMAH, B. D.; OLIVEIRA, W. P.; BURGOS-DÍAZ, C.; RUBILLAR, M.; SHENE, C. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. **Folia Microbiológica**, v. 65, n. 2, p. 245-264, Apr. 2020.
- 24 BYCH K.; MIKŠ, M. H.; JOHANSON, T.; HEDEROS, M. J.; VIGSNÆS, L. K.; BECKER, P. Production of HMOs using microbial hosts: from cell engineering to large scale production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 130-137, Apr. 2019.
- 25 ÇAKAR, Z. P.; SEKER, U. O. S.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 6-7, p. 569-578, Apr. 2005.
- 26 CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortalças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 397-404, 2006.
- 27 CEDÓ, L.; FARRÀS, M.; LEE-RUECKERT, M.; ESCOLÀ-GIL, J. C. Molecular insights into the mechanisms underlying the cholesterol-lowering effects of phytosterols. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 37, p. 6704-6723, 2019.
- 28 CEZARE-GOMES, E. A.; MEJIA-DA-SILVA, L. C.; PÉREZ-MORA, L. S.; MATSUDO, M. C.; FERREIRA-CAMARGO, L. S.; SINGH, A. K.; CARVALHO, J. C. M. Potential of microalgae carotenoids for industrial application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 3, p. 602-634, 2019.
- 29 CHARLEBOIS, S.; SOMOGYI, S.; MUSIC, J.; CUNNINGHAM, C. Biotechnology in food: Canadian attitudes towards genetic engineering in both plant- and animal-based foods. **British Food Journal**, v. 121, n. 12, p. 3181-3192, 2019.
- 30 CHARLES, C. N.; MSAGATI, T.; SWAI, H.; CHACHA, M. Microalgae: an alternative natural source of bioavailable omega-3 DHA for promotion of mental health in East Africa. **Scientific African**, v. 6, p. e00187, Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00187>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227619307483>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- 31 CHEN, Q.; STEINHAUER, L.; HAMMERLINDL, J.; KELLER, W.; ZOU, J. Biosynthesis of phytosterol esters: identification of a sterol O-acyltransferase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 974-984, 2007.
- 32 CLAES, I. J. J.; LEBEER, S.; SHEN, C.; VERHOEVEN, T. I. A.; DILISSEN, E.; DE HERTOOGH; BULLENS, D. M. A.; CEUPPENS, J. L.; VAN ASSCHE, G.; VERMEIRE, S.; RUTGEERTS, P.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental colitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 162, n. 2, p. 306-314, 2010.
- 33 ÇOLAK, N. G.; EKEN, N. T.; ÜLGER, M.; FRARY, A.; DOĞANLAR, S. Mapping of quantitative trait loci for antioxidant molecules in tomato fruit: carotenoids, vitamins C and E, glutathione and phenolic acids. **Plant Science**, v. 292, p. 110393, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110393>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168945219315663>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 34 CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992. Rio de Janeiro. [Agreement]. [S.l.]: United Nations, 1992. Disponível em: [https://treaties.un.org/doc/Treaties/1992/06/19920605%2008-44%20PM/Ch\\_XXVII\\_08p.pdf](https://treaties.un.org/doc/Treaties/1992/06/19920605%2008-44%20PM/Ch_XXVII_08p.pdf). Acesso em: 12 jun. 2020.
- 35 CUNNINGHAM, F. X.; POGSON, B.; SUN, Z.; MCDONALD, K. A.; DELLAPENNA, D.; GANTT, E. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. **Plant Cell**, v. 8, n. 9, p.1613-1626, 1996.
- 36 DADGARNEJAD, M.; KOUSER, S.; MOSLEMI, M. Genetically modified foods: promises, challenges and safety assessments. **Applied Food Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 193-202, 2017.
- 37 DECKELBAUM, R. J.; CALDER, P. C. Is it time to separate EPA from DHA when using omega-3 fatty acids to protect heart and brain? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 23, n. 2, p. 65-67, 2020.
- 38 DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. S1-S27, 1999. Suppl. 1.
- 39 DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; ALONSO BURITI, F. C.; NASCIMENTO, J. C. F.; MELO, M. E. S.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F.; ROCHA, C. R. C.; LOPES, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV, S. D. Artisanal coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science and Technology**, v. 95, n. 2, p. 209-230, 2015.



- 40 DOUILLARD, F. P.; DE VOS, W. M. Biotechnology of health-promoting bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107369, 1 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975019300448?via%3Dihub>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 41 ELISON, E.; VIGSNAES, L. K.; KROGSGAARD, L. R.; RASMUSSEN, J.; SØRENSEN, N.; MCCONNELL, B.; HENNET, T.; SOMMER, M. O. A.; BYTZER, P. Oral supplementation of healthy adults with 2'-O-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose is well tolerated and shifts the intestinal microbiota. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 8, p. 1356-1368, 2016.
- 42 EONSEON, J.; POLLE, J. E. W.; LEE, H. K.; HYUN, S. M.; CHANG, M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 165-174, 2003.
- 43 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on EPA/DHA/DPA related health claims. **EFSA Journal**, v. 8, n. 10, p. 1796, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1796>. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2010.1796>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 44 FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G. A.; MOLINA GRIMA, M. E. Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 27-40, 2010.
- 45 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Biotechnology for agricultural development**: proceedings of the FAO International Technical Conference on "agricultural biotechnologies in developing countries: options and opportunities in crops, forestry, livestock, fisheries and agro-industry to face the challenges of food insecurity and climate change" (ABCD-10). Rome: FAO, 2011. 569 p.
- 46 FERRO, E. S. Biotechnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 109-121, 2010.
- 47 FRANCK, A.; BOSSCHER, D. Inulin. In: CHO, S.S.; SAMUEL, P. (Ed.). **Fiber ingredients: food applications and health benefits**. Boca Raton: CRC, 2009. p. 41-60.
- 48 FREITAS, A. C.; RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; GOMES, A. M. P.; DUARTE, A. C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1505-1515, 2012.
- 49 GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews in Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.
- 50 GUIMARÃES, P. M. R.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Adaptive evolution of a lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1748-1756, 2008.
- 51 GYLLING, H.; SIMONEN, P.; KAIPIAINEN, L.; WESTER, I. Methodological aspects of phytosterol measurements in biological samples. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 37, p. 6776-6785, 2019.
- 52 GÜZEL, A.; ELMASTAŞ, M. Antioxidant activity, isolation and identification of some chemical constituents of *Sphaerophysa kotschyana*. **KSU Journal of Agriculture and Nature**, v. 23, n. 2, p. 289-296, 2020.
- 53 HAMIDI, M.; KOZANI, P. S.; KOZANI, P. S.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; DELATTRE, C. Marine bacteria versus microalgae: who is the best for biotechnological production of bioactive compounds with antioxidant properties and other biological applications? **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 28, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md18010028>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31905716/>. Acesso em 10 mar. 2020.
- 54 HAMILTON, M. L.; HASLAM, R. P.; NAPIER, J. A.; SAYANOVA, O. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain poly unsaturated fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 22, p. 3-9, Mar. 2014.
- 55 HANNAN, M. A.; SOHAG, A. A. M.; DASH, R.; HAQUE, M. N.; MOHIBBULLAH, M.; OKTAVIANI, D. F.; HOSSAIN, M. T.; CHOI, H. J.; MOON, I. S. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. **Phytomedicine**, v. 69, p. 153201, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153201>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711320300349>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- 56 HARVEY, P. J. **The microalgae biorefinery: project final report**. [London]: University of Greenwich, 2017. Disponível em: <https://cordis.europa.eu/project/id/613870/reporting>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- 57 HASE, Y.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S.; SUN, G.; UMEDA, M.; TANAKA, A. Ectopic endoreduplication caused by sterol alteration results in serrated petals in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 414, p. 1263-268, Apr. 2005.
- 58 HAYES, M. M.; HUGHES, T. A.; GREENE, A. K. Bacterial diversity in dried colostrum and whey sold as nutraceutical products. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. M359-M363, 2012.
- 59 HOLLANDS, K.; BARON, C. M.; GIBSON, K. J.; KELLY, K. J.; KRASLEY, E. A.; LAFFEND, L. A.; LAUHLI, R. M.; MAGGIO-HALL, L. A.; NELSON, M. J.; PRASAD, J. C.; REN, Y.; RICE, B. A.; RICE, G. H.; ROTHMAN, S. C. Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 232-242, Mar. 2019.

- 60 HU, Y.; HU, F. B.; MANSON, J. E. Marine omega-3 supplementation and cardiovascular disease: an updated meta-analysis of 13 randomized controlled trials involving 127 477 participants. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 19, 1 Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013543>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.119.013543>. Acesso em: 13 jun. 2020.
- 61 HU, S.; YIN, J.; NIE, S.; WANG, J.; PHILLIPS, G. O.; XIE, M.; CUI, S. W. In vitro evaluation of the antioxidant activities of carbohydrates. **Bioactive Carbohydrate and Dietary Fiber**, v. 7, n. 2, p. 19-27, Apr. 2016.
- 62 INNES, J. K.; CALDER, P. C. Marine omega-3 (n-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1362, 18 Feb. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21041362>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1362>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 63 JACOBSEN, C.; TIMM-HEINRICH, M.; NIELSEN, N. S. Application of functional lipids in foods. In: SHAHIDI, F. **Nutraceutical and specialty lipids and their co-products**. Boca Raton: CRC, 2006. p. 341-363.
- 64 JASWIR, I.; NOVIENDRI, D.; HASRINI, R. F.; OCTAVIANI, F. Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 33, p. 7119-7131, 2011.
- 65 JIANG, L.; ZHAO, X.; XU, J.; LI, C.; YU, Y.; WANG, W.; ZHU, L. The protective effect of dietary phytosterols on cancer risk: a systematic meta-analysis. **Journal of Oncology**, v. 2019, p. 7479518, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7479518>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jo/2019/7479518/>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 66 KAUR, S.; KUMAR, M.; PANDIT, K.; KUMAR, A.; KAUR, S. Potential health benefits of nutraceuticals for human health. In: SHARMA, A.; KUMAR, M.; KAUR, S.; NAGPAL, A. K. **Evaluation of environmental contaminants and natural products: a human health perspective**. Singapore: Bentham Science Publishers, 2019. p. 193-209.
- 67 KAWAKAMI, A.; SATO, Y.; YOSHIDA, M. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 4, p. 793-802, 2008.
- 68 KIM, S. H.; PARK, Y. H.; SCHMIDT-DANNERT, C.; LEE, P. C. Redesign, reconstruction, and directed extension of the *Brevibacterium linens* C40 carotenoid pathway in *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5199-5206, Aug. 2010.
- 69 KLINGEL, S. L.; METHEREL, A. H.; IRFAN, M.; RAJNA, A.; CHABOWSKI, A.; BAZINET, R. P.; MUTCH, D. M. EPA and DHA have divergent effects on serum triglycerides and lipogenesis, but similar effects on lipoprotein lipase activity: a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 6, p. 1502-1509, 1 Dec. 2019.
- 70 KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. The prebiotic effect: review of experimental and human data. In: GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008. p. 69-92.
- 71 KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.
- 72 KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 171-203, July 2003.
- 73 LAKRA, N.; MAHMOOD, S.; MARWAL, A.; SUDHEEP, N. M.; ANWAR, K. Bioengineered plants can be an alternative source of omega-3 fatty acids for human health. In: OZTURK, M.; HAKEEM, K. (ed.). **Plant and human health**. Cham: Springer, 2019. v. 2. Chap. 1.
- 74 LAW, W. R. Plant sterol and stanol margarines and health. **British Medical Journal**, v. 320, n. 7238, p. 861-864, 2000.
- 75 LEE, P. C.; Schmidt-Dannert, C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 1-11, 2002.
- 76 LI, S.; LI, H.; XU, X.; SAW, P. E.; ZHANG, L. Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1262-1280, 2020.
- 77 LIAO, P.; CHEN, X.; WANG, M.; BACH, T. J.; CHYE, M. L. Improved fruit a-tocopherol, carotenoid, squalene and phytosterol contents through manipulation of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coa synthase1 in transgenic tomato. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 3, p. 784-796, 2018.
- 78 LOHR, M.; WILHELM, C. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantifications of putative intermediate and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derive form a model. **Planta**, v. 212, n. 3, p. 382-391, 2001.
- 79 LOPES, D. S. A.; PESSOA, M. H. N.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 234-245, 2012.
- 80 MAO, S.; LIU, Y.; YANG, J.; MA, X.; ZENG, F.; ZHANG, Z.; WANG, S.; HAN, H.; QIN, H.; LU, F. Cloning, expression and characterization of a novel fructosyltransferase from *Aspergillus niger* and its application in the synthesis of fructooligosaccharides. **RSC Advances**, v. 9, n. 41, p. 23866, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c9ra02520k>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/RA/C9RA02520K>. Acesso em: 11 mar. 2020.

- 81 MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 144, n. 12, p. 1993-2015, 2015.
- 82 MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, jul./set. 2009. Disponível em: <http://bjft.ital.sp.gov.br/arquivos/artigos/v12n3385a.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 83 MARTINS, S. L. C.; SILVA, H. F.; NOVAES, M. R. C. G.; ITO, M. K. Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, n. 3, p. 257-263, 2004.
- 84 MEESAPYODSUK, D.; Qiu, X. The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use. **Lipids**, v. 47, n. 3, p. 227-237, 2012.
- 85 MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006. DOI: <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2082>. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/2082>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 86 MORENO DE LEBLANC, A.; LEBLANC, J. G. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 44, p. 16518-16528, 2014.
- 87 MORENO-VÁSQUEZ, M. J.; VALENZUELA-BUITIMEA, E. L.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; ENCINAS-ENCINAS, J. C.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, F.; SÁNCHEZ-VALDES, S.; ROSAS-BURGOS, E. C.; OCAÑO-HIGUERA, V. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z. Functionalization of chitosan by a free radical reaction: characterization, antioxidant and antibacterial potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p.117-127, 2 Jan. 2017.
- 88 MOOM, K. B.; KO, H.; PARK, J.; SOHN, J.; CHO, H.; PARK, Y.; KIM, H.; JEON, J. Expression of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) fructosyltransferases, and high fructan accumulation in potato tubers. **Applied Biological Chemistry**, v. 62, p. 74, 19 Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0481-x>. Disponível em: <https://appliedbiolchem.springeropen.com/articles/10.1186/s13765-019-0481-x>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 89 MUGGLI, R. Fortified foods: a way to correct low intake of EPA and DHA. In: AKOH, C. C. **Handbook of functional lipids**. Boca Raton: CRC, 2006. p. 389-401.
- 90 NAPIER, J. A.; HASLAM, R. P.; TSALAVOUTA, M.; SAYANOVA, O. The challenges of delivering genetically modified crops with nutritional enhancement traits. **Nature Plants**, v. 5, n. 6, p. 563-567, 2019a.
- 91 NAPIER, J. A.; OLSEN, R.; TOCHER, D. R. Update on GM canola crops as novel sources of omega-3 fish oils. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 4, p. 703-705, 2019b.
- 92 NAQVI, S.; ZHU, C.; FARRE, G.; SANDMANN, G.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Synergistic metabolism in hybrid corn indicates bottlenecks in the carotenoid pathway and leads to the accumulation of extraordinary levels of the nutritionally important carotenoid zeaxanthin. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 384-393, 2011.
- 93 NEELAKANDAN, A. K.; CHAMALA, S.; VALLIYODAN, B.; NES, W. D.; NGUYEN, H. T. Metabolic engineering of soybean affords improved phytosterol seed traits. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 12-19, 2012.
- 94 NISSAR, J.; AHAD, T.; NAZIR, F.; SALIM, R. Applications of biotechnology in food technology. **International Journal of Engineering Technology Science**, v. 4, n. 2, p. 300-306, 2017.
- 95 OH, S. Y.; YOUN, S. Y.; PARK, M. S.; KIM, H.; BAEK, N.; LI, Z.; JI, G. E. Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharide using bifidobacterial  $\beta$ -galactosidase purified from recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1392-1400, 2017.
- 96 OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved  $\beta$ -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p.600-609, 2011.
- 97 OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F.; SILVA, S. P.; ARAÚJO, A. C. V.; CAVALCANTI, J. V. F. L.; COVERTI, A.; PORTO, T. S. Fructo-oligosaccharides production by an *Aspergillus aculeatus* commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan-magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 922-929, 1 May 2020.
- 98 ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA; FUNDACIÓN IBEROAMERICANA DE NUTRICIÓN. **Grasas y ácidos grasos en la nutrición humana: consulta de expertos**. Granada: FAO; FINUT, 2012. 175 p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i1953s/i1953s.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2020.
- 99 PAINE, J. A.; SHIPTON, C. A.; CHAGGAR, S.; HOWELLS, R. M.; KENNEDY, M. J.; VERNON, G.; WRIGHT, S. Y.; HINCHLIFFE, E.; ADAMS, J. I.; SILVERSTONE, A. I.; DRAKE, R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 482-487, 2005.
- 100 PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: current state and perspectives. **Applied and Environmental Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279-1286, 2010.
- 101 PÉREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J. M. Genetic improvement of non-GMO wine yeasts: strategies, advantages and safety. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-11, 2015.

- 102 PEREIRA, A. M. S.; FARIAS, D. R. B. F.; QUEIROZ, B. B.; NOBRE, M. S. C.; CAVALCANTI, M. T.; SALLES, H. O.; DOS SANTOS, K. M. O.; MEDEIROS, A. C. D.; FLORENTINO, E. R.; ALONSO BURITI, F. C. Influence of a co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis and ace-inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 1, p. 275-282, 2019.
- 103 PITT, J.; CHAN, M.; GIBSON, C.; HASSELWANDER, O.; LIM, A.; MUKERJI, P.; MUKHERJEA, R.; MYHRE, A.; SARELA, P.; TENNING, P.; MIMMELSTEIN, W.M.; ROPER, J.M. Safety assessment of the biotechnologically produced human-identical milk oligosaccharide 3-fucosyllactose (3-FL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110818, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110818>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31533061/>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 104 PUDNEY, A.; GANDINI, C.; ECONOMOU, C. K.; SMITH, R.; GODDARD, P.; NAPIER, J. A.; SPICER, A.; SAYANOVA, O. Multifunctionalizing the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* for sustainable co-production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids and recombinant phytase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.11444, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47875-1>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-47875-1>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- 105 RHANDHIR, A.; LAIRD, D.W.; MAKER, G.; TRENGOVE, R.; MOHEIMANI, N.R. Microalgae: a potential sustainable commercial source of sterols. **Algae Research**, v. 46, p. 101772, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101772>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926419306836>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 106 ROBERFROID, M. Inulin: a fructan. In: ROBERFROID, M. **Inulin-type fructans: functional food ingredients**. Boca Raton: CRC, 2005. p. 39-60.
- 107 ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p.195–201, 2009.
- 108 RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. AVALOS, J.; BONET, M. L.; BORONAT, A.; GOMEZ-GOMEZ, L.; HORNERO-MENDEZ, D.; LIMON, M.C.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; PALOU, A.; RIBOT, J.; RODRIGO, M.J.; ZACARIAS, L.; ZHU, C. A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutritional health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 62-93, Apr. 2018.
- 109 RUIZ-LÓPEZ, N.; SAYANOVA, O. NAPIER, J. A.; HASLAM, R. P. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2397-2410, 2012.
- 110 SAAD, S. M. I.; KOMATSU, T. R.; GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; BURITI, F. C. A. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. p. 23-49.
- 111 SAINI, D. K.; CHAKDAR, H.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Enhancing production of microalgal biopigments through metabolic and genetic engineering. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 391-405, 2020.
- 112 SANTOS, D.; GELINSKI, J. M. L. N. Culturas iniciadoras de fermentação em vinhos, **Evidência**, v. 8, n. 1-2, p. 57-84, 2008.
- 113 SÉVENIER, R.; HALL, R. D.; VAN DER MEER, I. M.; HAKKERT, H. J. C.; VAN TUNEN, A. J.; KOOPS, A. J. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p.843-846, 1998.
- 114 SEIBEL, J.; MORARU, R.; GÖTZE, S.; BUCHHOLZ, K.; NA'AMNIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; HECHT, H. J. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 14, p. 2335-2349, 2006.
- 115 SHARMA, R.; GOSHAL, G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: a statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00407, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00407>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X19306289>. Acesso em 9 mar. 2020.
- 116 SHETTY, K.; SARKAR, D. **Functional foods and biotechnology: biotransformation and analysis of functional foods and ingredients**. Boca Raton: CRC, 2020. 454 p.
- 117 SHETTY, K.; SARKAR, D. **Functional foods and biotechnology: sources of functional foods and ingredients**. Boca Raton: CRC, 2019. 218 p.
- 118 SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural colorants: food colorants from natural sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 261-280, Feb. 2017.
- 119 SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 565-572, Apr. 2016.
- 120 SOHAIB, M.; ANJUM, F. M.; SAHAR, A.; ARSAHAD, M. S.; RAHMAN, U. U.; IRMAN, A.; HUSSAIN, S. Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: a comprehensive review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 11, p. 2581-2593, 2017.

- 121 STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; VAN, S. D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p.198-203, 2005.
- 122 TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I. K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L. A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1591, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu11071591>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1591>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- 123 TRUJILLO, L. E.; ARRIETA, J. G.; DAFHNIS, F.; GARCÍA, J.; VALDÉS, J.; TAMBARA, Y.; PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ, L. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 2-3, p.139-144, 2001.
- 124 VANDEPUTTE, D.; FALONY, G.; VIEIRA-SILVA, S.; WANG, J.; SAILER, M.; THEIS, S.; VERBEKE, K.; RAES, J. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. **Gut**, v. 66, n. 11, p. 1968-1974, 2017.
- 125 VARELA, J. C.; PEREIRA, H.; VILA, M.; LEÓN, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 423-436, 2015.
- 126 VAN HIJUM, S. A. F. T.; VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; RAHAOUI, H.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4390-4398, 2002.
- 127 VEGA-PAULINO, R.J.; ZÚNIGA-HANSEN. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 44-51, 2012.
- 128 VENEGAS-CALERÓN, M.; SAYANOVA, O.; NAPIER, J. A. An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 2, p. 108-109, 2010.
- 129 VERA, C.; GUERRERO, C.; ABURTO, C.; CORDOVA, A.; ILLANES, A. Conventional and non-conventional applications of  $\beta$ -galactosidases. **BBA: Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 1, p. 140271, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963919301578>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- 130 VORS, C.; COUTURE, P.; LAMARCHE, B. Omega-3 fatty acids: new insights into the impact of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lipid and lipoprotein metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 31, n. 1, p. 38-39, 2020.
- 131 WANG, S. HOU, Y.; CHEN, X.; LIU, L. Kick-starting evolution efficiency with an autonomous evolution mutation system. **Metabolic Engineering**, v. 54, p. 127-136, July 2019.
- 132 WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 12, p.3627-3652, Dec. 2005.
- 133 WATKINS, J. L.; POGSON, B. J. Prospects for carotenoid biofortification targeting retention and catabolism. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 5, p. 501-512, 2020.
- 134 WEYENS, G; RITSEMA, T.; VAN DUN, K.; MEYER, D.; LOMMEL, M.; LATHOUWERS, J.; ROSQUIN, I.; DENYS, P.; TOSENS, A.; NIJS, M.; TURK, S.; GERRITS, N.; BINK, S.; WALRAVEN, B.; LEFÈBVRE, M.; SMEEKENS, S. Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, n. 4, p. 321-327, 2004.
- 135 XAVIER-SANTOS, D.; BEDANI, R.; LIMA, E. D.; SAAD, S. M. I. Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103666, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103666>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619305900>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- 136 YANG, H.; WANG, Y.; ZHANG, L.; SHEN, W. Heterologous expression and enzymatic characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 164-170, 2016.
- 137 YENDAPALLY, R. Nutraceuticals with animal origin. In: PATHAK, Y. **Handbook of nutraceuticals: ingredients, formulations and applications**. Boca Raton: CRC, 2010. v. 1, p. 69-98.
- 138 YU, S. LIU, J.; YUN, E. J.; KWAK, S.; KIM, K. H.; JIN, Y. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 101, 27 June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0947-2>. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0947-2>. Acesso em: 9 mar. 2020.
- 139 ZUCCARO, A.; GÖTZE, S.; KNEIP, S.; DERSCH, P.; SEIBEL, J. Tailor-made fructooligosaccharides by a combination of substrate and genetic engineering. **ChemBioChem**, v. 9, n. 1, p. 143-149, 2008.