

Clarissa Detomi de Albuquerque

**ESTUDO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES  
DE *SPOROBOLOMYCES RUBERRIMUS* E DE TÉCNICAS DE  
EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow. Coorientadores: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Alves da Costa Cardoso.

Florianópolis - SC  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Detomi de Albuquerque, Clarissa  
Estudo da cinética de produção de carotenoides de  
*Sporobolomyces ruberrimus* e de técnicas de extração de  
pigmentos / Clarissa Detomi de Albuquerque; Orientador, Jorge  
Luiz Ninow / Coorientadores, José Vladimir de Oliveira e Lígia  
Alves da Costa Cardoso, - Florianópolis, SC, 2015.  
177p.

Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
de Alimentos.

Inclui referência

1. Engenharia de Alimentos. 2. *Sporobolomyces ruberrimus*. 3.  
Cinética microbiana 4. Carotenoides 5. Extração. I. Jorge Luiz Ninow.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

Clarissa Detomi de Albuquerque

**ESTUDO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES  
DE *SPOROBOLOMYCES RUBERRIMUS* E DE TÉCNICAS DE  
EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
**Orientador**

---

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira  
**Co-orientador**

---

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
**Coordenador do Curso**

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúgia Alves da Costa Cardoso

---

Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valério

---

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

---

Prof. Dr. Franciolo Vendruscolo



Este trabalho é dedicado a todos que demonstram curiosidade ou buscam aprimorar seus conhecimentos científicos.



## AGRADECIMENTOS

Ao Universo, por me proporcionar forças e me iluminar durante todo o processo.

Aos meus pais Carlos Henrique e Maria Cristina, e toda minha família, que sempre apoiaram as minhas escolhas, me aconselhando, motivando, dando carinho e amor nesses anos de vida.

Ao meu parceiro Francilins, que mesmo à distância, esteve presente neste percurso com amor, atenção, palavras de incentivo em momentos difíceis e pelas comemorações a cada pequena conquista.

À amiga Luciana, que me incentivou a mudar de vida e ir estudar em Florianópolis, pela cumplicidade, convivência e por abrir os caminhos para tornar-me uma “Jorgete”.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow, pela confiança em minha capacidade para a realização deste trabalho, pela amizade e por todos os conselhos e ensinamentos vindos do coração.

À minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ligia Alves da Costa Cardoso, por me receber em sua instituição e fornecer as condições necessárias para a realização de parte deste trabalho. Com paciência e dedicação foi uma companhia preciosa nas noites dormidas no laboratório.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira, pela orientação, atenção e por todo o auxílio prestado no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Willibaldo, pela disposição constante em aprender e ensinar, compartilhando sua sabedoria com humildade.

A todos os colaboradores da Universidade Positivo – Curitiba, pela recepção carinhosa e por fornecerem toda a infra-estrutura para a realização do cultivo microbiano.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio F. Machado e sua pós-doutora Alessandra Valério, por ceder gentilmente seu laboratório e sua equipe de trabalho para a realização de ensaios cromatográficos e pelos conselhos ao decorrer das análises.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, por disponibilizar espaço, equipamento e equipe de trabalho, especialmente o aluno Matheus, para a realização dos ensaios de extração em alta pressão.

À Camila Guindani e Simone Mazzutti pelo acolhimento e acompanhamento nas análises de extração supercrítica, além de proporcionarem dias prazerosos no LATESC.

À equipe dos laboratórios LCME-UFSC e CEBIME-UFSC pelo suporte técnico durante as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de massa, respectivamente.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, pelos importantes ensinamentos à minha formação profissional.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas do ENGEBIO pela convivência, pelas trocas de experiências, pelo auxílio nos experimentos e pelas boas conversas.

Aos meus amigos, em especial, a Will, Gabi, Helmut, Fabiana, Fernanda, Felipe e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalizando com um agradecimento especial a minha mãe, que acompanhou todo o processo de redação e correção deste documento.



A admirável rosa avermelhada,  
*Sporobolomyces ruberrimus*.  
Crescei e multiplicai-vos,  
Em broto de vida.  
Esplendo rubro.

*Aditi* 13/02/15



## RESUMO

Os carotenoides pigmentados podem ser produzidos por ampla variedade de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, plantas e algas. Além de produzirem pigmentos que conferem cor, variando em tons amarelados, laranja e vermelho, os carotenoides são antioxidantes naturais e representam um grupo de moléculas valiosas para aplicações na indústria farmacêutica, química, de alimentos e rações. Os carotenoides sintetizados por *Sporobolomyces ruberrimus* são intracelulares e a rigidez da parede celular da levedura limita a extratibilidade desses compostos, necessitando a aplicação de métodos de extração para recuperação desses pigmentos. Este trabalho teve como objetivo estudar a cinética de produção de carotenoides em cultivo submerso de *Sporobolomyces ruberrimus*, buscando potencializar a biossíntese de torularrodina por meio de estresse oxidativo e investigar metodologias de extração de pigmentos empregando técnicas: mecânica, química e em alta pressão. Três concentrações de oxigênio dissolvido (20, 50, 80 %) foram empregadas no cultivo descontínuo de *Sporobolomyces ruberrimus* em biorreator, durante 72 h. Técnicas de ruptura celular e extração de carotenoides utilizando vórtex, ultrassom e agentes de lise: químico (dimetilsulfóxido) e mecânico (pérola de vidro) foram utilizadas para definir a técnica de quantificação de pigmentos em escala laboratorial. A morfologia celular foi verificada por microscopia eletrônica de varredura, após a aplicação de técnicas de ruptura da parede celular. Após 72 h de fermentação, a biomassa foi concentrada e liofilizada e utilizada como amostra para a extração supercrítica, técnica recentemente aplicada à extração de pigmentos. Os resultados demonstraram que a melhor condição para a biossíntese de torularrodina ( $11,948 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ocorreu no tratamento com concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, com concentração de biomassa de  $13,126 \text{ g.L}^{-1}$ , velocidade específica máxima de crescimento de  $0,123 \text{ h}^{-1}$ , produção de carotenoides totais de  $30,607 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $2,332 \text{ mg.g}^{-1}$  de célula) e produtividade de metabólitos de  $0,417 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A melhor técnica para extrair os pigmentos foi a de abrasão mecânica empregando pérola de vidro com agitação em vórtex. O uso da extração supercrítica utilizando células liofilizadas pré-tratadas por maceração com nitrogênio líquido e o uso de etanol como co-solvente demonstrou ser o melhor tratamento em termos de rendimento (3,11 %) e carotenoides totais extraídos ( $0,029 \text{ mg}$  de carotenoides totais. $\text{g}^{-1}$  de célula seca).

**Palavras-chave:** *Sporobolomyces ruberrimus*. Cinética microbiana. Estresse Oxidativo. Carotenoides. Extração.



## ABSTRACT

The pigmented carotenoids can be produced by a wide variety of bacteria, yeast, filamentous fungi, plants, and algae. In addition to producing pigments which color, ranging from yellow, orange and red tones, the carotenoids are natural antioxidants and represent a group of valuable molecules for applications in the pharmaceutical, chemical, food and feeding industries. Carotenoids are synthesized by *Sporobolomyces ruberrimus* in the intracellular environment and cell wall rigidity limits the extractability of such compounds, making the application of methods for recovery of these pigments necessary. The objective of this study was to study the carotenoid production kinetics in growing *Sporobolomyces ruberrimus*, seeking to enhance torularhodin biosynthesis by oxidative stress and investigate pigment extraction methods employing techniques, such as: mechanical, chemical and high pressure. Three concentrations of dissolved oxygen (20%, 50%, 80%) were used in submerged batch cultivation of *S. ruberrimus*, in bioreactor, at 72 h. Chemical (dimethyl sulfoxide) and mechanical (glass bead) techniques for cell disruption and extraction of carotenoids using a vortex, ultrasound and lysing agents were used to validate a pigment quantification technique at the laboratory scale. The cell morphology was observed by scanning electron microscopy, after applying the cell wall disruption techniques. After 72 h of fermentation, the biomass was concentrated and lyophilized and used as a sample for the supercritical extraction, this technique has been recently applied to the extraction of pigments. Results showed that the best condition for torularhodin biosynthesis ( $11.948 \text{ mg.L}^{-1}$ ) was 50% of dissolved oxygen, with  $X_{\max}$   $13.126 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\mu_{\max}$  of  $0.123 \text{ h}^{-1}$ , maximum production of carotenoids total of  $30.607 \text{ g.L}^{-1}$  ( $2,332 \text{ mg total carotenoids.g}^{-1} \text{ cell}$ ) and productivity of metabolites of  $0,417 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . The best technique to extract the pigment was the mechanical abrasion using glass bead with vortexing. The use of supercritical extraction using lyophilized cells pretreated by soaking with liquid nitrogen and the use of ethanol as co-solvent proved to be the best treatment in terms of yield (3,11%) and extracted carotenoids ( $0,029 \text{ mg total carotenoids.g}^{-1}$  of dry cell).

**Keywords:** *Sporobolomyces ruberrimus*. Microbial Kinetics. Oxidative Stress. Carotenoids. Extraction.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das classes de carotenoides: (a) caroteno e (b) xantofilas. ...39	39
Figura 2. Fluxograma dos cinco estágios de biossíntese dos carotenoides. ....40	40
Figura 3. Primeiro estágio de biossíntese de carotenoides: ácido mevalônico transformando em geranyl-geranyl difosfato.....41	41
Figura 4. - Estágios intermediários de biossíntese dos carotenoides.....42	42
Figura 5. Ciclização dos carotenoides acíclicos insaturados.....43	43
Figura 6. Formação de xantofilas a partir do carotenoide $\alpha$ -caroteno.....43	43
Figura 7. Formação de xantofilas a partir do carotenoide $\beta$ -caroteno.....44	44
Figura 8. Postulado da biossíntese de torularrodina por <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> . ....45	45
Figura 9. Valor do mercado global de carotenoides produzidos em 2007 e previsões para 2015, em milhões de dólares.....47	47
Figura 10. Cultura de <i>S. ruberrimus</i> em meio YM sólido (a) em frascos Erlenmeyer de 500 mL (b).....68	68
Figura 11. Diferentes etapas de pré-cultura para o cultivo em biorreator. ....69	69
Figura 12. Foto do biorreator - 7,5 L (Tecnal – TEC-BIO-T, Brasil). ....70	70
Figura 13. Amostras de células recuperadas a cada 8h de fermentação em biorreator, a 50 % de oxigênio dissolvido, para extração de pigmentos. ....73	73
Figura 14. Amostras de células liofilizadas produzidas em biorreator, com concentração de 20 % de oxigênio dissolvido. ....74	74
Figura 15. Aparato experimental de ESC do LATESC, utilizado na extração dos carotenoides. ....76	76
Figura 16. Correlação entre densidade óptica (DO) a 600 nm e a concentração celular mássica de <i>S. ruberrimus</i> . ....77	77
Figura 17. Correlação entre a concentração da solução de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a densidade óptica (DO) a 540 nm. ....78	78
Figura 18. Perfil do eluente água/ acetona utilizado para a separação dos carotenoides em HPLC. ....80	80
Figura 19. Correlação entre a concentração de $\beta$ -caroteno ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a unidade de absorvância (UA), a 480 nm. Condições cromatográficas citadas no texto. ....81	81
Figura 20. Consumo de substrato (S), crescimento celular (X) e produção de carotenoides totais (P), ao longo de 72 h de fermentação em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido. ....88	88
Figura 21. Cinética de crescimento de <i>S. ruberrimus</i> em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.....89	89
Figura 22. Velocidade específica de crescimento de <i>S. ruberrimus</i> em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h, considerando a fase exponencial de crescimento.....90	90
Figura 23. Produção dos principais carotenoides específicos produzidos por <i>S. ruberrimus</i> no cultivo em biorreator em 72 h, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.....90	90

Figura 24. Composição do extrato de pigmentos extraídos pela técnica de abrasão mecânica em amostragem a cada 8 h de fermentação, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.....	91
Figura 25. Produção de carotenoides totais parcialmente associada ao crescimento de <i>S. ruberrimus</i> , em biorreator, em 72 h de fermentação, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido. ....	92
Figura 26. Consumo de substrato (S), crescimento celular (X) e produção de carotenoides totais (P), em 72 h de fermentação em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido.....	93
Figura 27. Cinética de crescimento de <i>S. ruberrimus</i> em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h. ....	94
Figura 28. Produção dos principais carotenoides específicos produzidos por <i>S. ruberrimus</i> no cultivo em biorreator a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido.....	95
Figura 29. Composição do extrato de pigmentos composto por $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, a cada 8 h de fermentação, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h. ....	95
Figura 30. Produção de carotenoides totais parcialmente associada ao crescimento microbiano em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.....	96
Figura 31. Consumo de substrato (S), obtenção de biomassa (X) e produção de carotenoides totais (P), em 72 h de fermentação em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido. ....	97
Figura 32. Curva de crescimento de <i>S. ruberrimus</i> em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h. ....	98
Figura 33. Produção dos principais carotenoides específicos produzidos por <i>S. ruberrimus</i> no cultivo a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h. ....	99
Figura 34. Composição do extrato de pigmentos composto por $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, a cada 8 h de fermentação, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido.....	100
Figura 35. Produção de carotenoides totais associada ao crescimento microbiano, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.....	100
Figura 36. Obtenção da constante empírica ( $\alpha$ ) da equação de produção de carotenoides totais associado ao crescimento, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido.....	101
Figura 37. Influência da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento e no consumo de substrato de <i>S. ruberrimus</i> , em 72 h de fermentação em biorreator. ....	102
Figura 38. Perfil do crescimento celular e da frequência de agitação versus tempo, nos tratamentos de concentração de: (a) 20 %, (b) 50 % e (c) 80 % de oxigênio dissolvido.....	103
Figura 39. Curvas de frequência de agitação versus tempo, para as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em produção de <i>S. ruberrimus</i> em biorreator, em 72 h de fermentação. ....	105



Figura 40. (a) Cultivo a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido (b) Formação de espuma. ....	106
Figura 41. Perfil das curvas de carotenoides totais, em diferentes condições de concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo de <i>S. ruberrimus</i> , em 72 h de fermentação em biorreator. ....	109
Figura 42. Concentração dos carotenoides específicos identificados no conteúdo extraído ao longo das 72 h de fermentação, em três condições de oxigênio dissolvido (20, 50 e 80 %): (a) $\beta$ -caroteno, (b) toruleno e (c) torularrodina. ....	112
Figura 43. (a) Placa de sílica em gel com os extratos separados de <i>S. ruberrimus</i> . (b) Estrutura molecular dos principais carotenoides supostos produzidos pela <i>S. ruberrimus</i> e separados por TLC. ....	114
Figura 44. Perfil de migração do $\beta$ -caroteno (C), toruleno (B) e torularrodina (A) em placa de sílica em gel. Resultado obtido por: (a) Park <i>et al.</i> (2007), (b) Davoli e Weber (2002) e (c) este estudo. ....	115
Figura 45. Cromatograma das soluções de 0,008 a 0,1 g.L <sup>-1</sup> de $\beta$ -caroteno, a 480 nm. Condições cromatográficas citadas no texto. ....	119
Figura 46. Curva de calibração do padrão comercial de $\beta$ -caroteno para a determinação dos carotenoides específicos identificados por HPLC e quantificados pela equação 20. ....	119
Figura 47. Cromatograma obtido a partir de diferentes técnicas de extração de carotenoides e os tempos de retenção dos três principais compostos identificados: Torularrodina (a), Toruleno (b) e $\beta$ -caroteno (c). Condições cromatográficas citadas no texto. ....	120
Figura 48. (a) células antes da extração, células após técnica de extração com: (b) perola de vidro e vórtex, (c) DMSO e vórtex. ....	122
Figura 49. Composição dos três principais carotenoides específicos encontrados no conteúdo extraído de células de <i>S. ruberrimus</i> , conforme análise em HPLC. ....	123
Figura 50. Microscopia eletrônica de varredura em célula liofilizada (a), após os diferentes métodos de extração: pérola de vidro e vórtex (b), DMSO e vórtex (c), DMSO, pérola de vidro e vórtex (d), DMSO e ultrassom (e) e DMSO, ultrassom, pérola de vidro e vórtex (f). ....	124
Figura 51. Amostras de células liofilizadas e maceradas com nitrogênio líquido (a) antes e (b) após a ESC. ....	129
Figura 52. Extratos obtidos em diferentes ensaios de ESC dissolvidos em éter de petróleo. ....	129
Figura 53. Placa de sílica após a separação dos pigmentos extraídos em diferentes condições de ESC (1, 2 e 3). (A) corresponde a molécula de $\beta$ -caroteno e (B) Torularrodina. ....	130
Figura 54. Espectro UV-visível obtido de extrato bruto dos três ensaios da ESC. ....	131
Figura 55. Espectro UV-visível característico dos principais carotenoides extraído (torularrodina, toruleno e $\beta$ -caroteno) de: (a) <i>Rhodotorula glutinis</i> (b) <i>Sporobolomyces Roseus</i> . ....	133

Figura 56. Células de *Sporobolomyces roseus* analisadas em microscópio (Barra = 10  $\mu\text{m}$ ). (a) Organelas coloridas apresentaram propriedades típicas de gotículas de lipídeos (b) Gotículas de lipídeos identificadas pelo amarelo/ verde fluorescente na presença da tintura vermelha. Os pontos de referência estão marcados por setas, em ambas as imagens. .... 134

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de fusão e espectro de absorção de alguns carotenoides. ....	37
Tabela 2. Composição do meio de cultura YM modificado.....	67
Tabela 3. Parâmetros cinéticos de diferentes condições de concentração de oxigênio dissolvido, em 72 h de fermentação em biorreator de <i>S. ruberrimus</i> . .....	107
Tabela 4. Produtividade dos carotenoides específicos em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, em 72 h de fermentação em biorreator de <i>S. ruberrimus</i> . ....	110
Tabela 5. Concentração de carotenoides totais e rendimento obtido por diferentes métodos de extração. ....	116
Tabela 6. Tempo de retenção dos principais carotenoides específicos extraídos de <i>S. ruberrimus</i> identificados por HPLC. ....	120
Tabela 7. Concentração dos carotenoides específicos obtidos a partir de diferentes métodos de extração, quantificados a partir da curva padrão de $\beta$ -caroteno, equação 20. ....	121
Tabela 8. Resultados obtidos nos ensaios de extração realizados em alta pressão a 35 °C, 300 bar, tempo de extração de 120 min. em modo contínuo, vazão de solvente de 0,5 Kg.h <sup>-1</sup> e 5 % (m/m) de co-solvente. ....	128
Tabela 9. Dados obtidos da análise do UV-visível característico dos extratos da ESC.....	132



## LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Microrganismos e carotenoides produzidos biotecnologicamente...	49
Quadro 2. Revisão de diferentes métodos de ruptura celular e extração de carotenoide em microrganismos. ....	55
Quadro 3. Parâmetros de extração supercrítica de alguns materiais naturais encontrados na literatura. ....	64
Quadro 4. Métodos de extração de carotenoides com agentes de lise mecânico, químico e combinado.....	71
Quadro 5. Tratamento experimental para extração supercrítica.....	75
Quadro 6. Amostras submetidas à análise do MEV.....	82



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APCI-MS	Espectrometria de Massas Sequencial com Ionização Química a Pressão Atmosférica
BBC	Companhia de Comunicações Empresarial Inc.
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	Carotenoides totais
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
DO	Densidade óptica
E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	Coefficiente de extinção
ENGEBIO	Laboratório de Engenharia Bioquímica
ESC	Extração supercrítica
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
kHz	Quilohertz
Kv	Quilovolt
LATESC	Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
Ln	Logaritmo neperiano
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio hepta hidratado
N	Normal
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio di básico
NaOH	Hidróxido de sódio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônia
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
P.A.	Padrão analítico
Rend.	Rendimento
rpm	Rotação por minuto
<i>S. ruberrimus</i>	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>
TLC	Cromatografia em fina camada
UA	Unidade de absorvância

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Radiação ultravioleta
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
W	Watts
YM	Yeast Malt



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Constante empírica de dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular
$\beta$	Constante empírica da não dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular
CL	Célula liofilizada
CL+MN <sub>2</sub>	Célula liofilizada macerada com nitrogênio líquido
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{P}}$	Velocidade específica de formação de produto (mg de produto. $\text{g}^{-1}$ de célula. $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{S}}$	Velocidade específica de consumo de substrato (g de substrato. $\text{g}^{-1}$ de célula. $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{X}}$	Velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
P	Produto: Concentração de carotenoides totais ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
P <sub>0</sub>	Concentração de carotenoides totais inicial ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
P <sub>células</sub>	Produtividade de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
P <sub>produto</sub>	Produtividade de carotenoides totais ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação
S	Substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
S <sub>0</sub>	Substrato inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )
t	Tempo (h)
t <sub>f</sub>	Tempo final de fermentação (h)
X	Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )
X <sub>0</sub>	Biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )
Y <sub>P/S</sub>	Fator de conversão produto/ substrato ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
Y <sub>P/X</sub>	Fator de conversão produto/ biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
Y <sub>X/S</sub>	Fator de conversão biomassa/ substrato ( $\text{g.g}^{-1}$ )



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>31</b>
1.1 Objetivo geral	33
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
1.3 ESTRUTURA DO DOCUMENTO	34
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>35</b>
2.1 PIGMENTOS NATURAIS	35
<b>2.1.1 Propriedades e funções dos carotenoides</b>	<b>35</b>
<b>2.1.2 Estrutura e biossíntese de carotenoides</b>	<b>38</b>
<b>2.1.3 Produção biotecnológica e mercado dos carotenoides</b>	<b>46</b>
2.2 LEVEDURAS VERMELHAS	48
<b>2.2.1 <i>Sporobolomyces ruberrimus</i></b>	<b>51</b>
TÉCNICAS DE RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES	53
<b>2.3.1 Extração mecânica</b>	<b>58</b>
<b>2.3.2 Extração química</b>	<b>58</b>
Combinação de métodos mecânico e químico de extração	59
<b>2.3.4 Extração supercrítica</b>	<b>61</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>67</b>
3.1 MICRORGANISMO	67
3.2 MEIO DE CULTURA	67
3.3 CULTIVO DA LEVEDURA	68
<b>3.3.1 Pré-cultura</b>	<b>68</b>
<b>3.3.2 Condições de cultivo descontínuo em biorreator</b>	<b>69</b>
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES	70
Definição da técnica de extração de pigmentos, em escala laboratorial, para quantificar a produção de metabólitos	71
<b>3.4.2 Extração mecânica de carotenoides para o estudo da cinética de produção de pigmentos</b>	<b>72</b>
<b>3.4.3 Extração supercrítica</b>	<b>73</b>
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	76
<b>3.5.1 Coleta de amostras</b>	<b>76</b>

3.5.2	Determinação da concentração de biomassa	76
3.5.3	Determinação de substrato (açúcar redutor DNS)	78
3.5.4	Determinação de carotenoides totais	78
3.5.5	Determinação de carotenoides específicos	79
3.5.6	Determinação do rendimento global de extração	81
3.5.7	Análise dos carotenoides em cromatografia em fina camada	81
3.5.8	Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	82
3.6	PARÂMETROS CINÉTICOS	82
3.6.1	Velocidade específica máxima de crescimento	83
3.6.2	Velocidades específicas	83
3.6.3	Fatores de conversão	84
3.6.4	Produtividade média	82
3.6.5	Classificação dos processos fermentativos	84
3.7	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	84
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>87</b>
4.1	CINÉTICA MICROBIANA	87
	Estudo da cinética microbiana, em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo	
4.1.1	Estudo da cinética microbiana, em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo	87
4.1.2	Estudo da cinética microbiana, em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo	92
4.1.3	Análise da influência da concentração oxigênio dissolvido no meio de cultivo e da frequência de agitação nos parâmetros cinéticos de <i>S. ruberrimus</i>	96
4.1.4	Análise da concentração de carotenoides totais e específicos, sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultivo	101
4.1.5		108
	DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES PARA OBTENÇÃO DA CURVA DE METABÓLITOS	
4.2		113

<b>4.2.1</b>	<b>Análise dos carotenoides por TLC</b>	<b>113</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Determinação dos carotenoides totais</b>	<b>115</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Identificação e quantificação dos carotenoides específicos</b>	<b>118</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Efeito dos tratamentos de lise na estrutura celular de <i>S. ruberrimus</i></b>	<b>123</b>
<b>4.3</b>	<b>EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EMPREGANDO TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA</b>	<b>127</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>137</b>
<b>5.1</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros</b>	<b>138</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>139</b>
	APÊNDICE A – Dados experimentais e gráficos do tratamento de dados da cinética de fermentação em biorreator com concentração de 20 % de oxigênio dissolvido	149
	APÊNDICE B – Dados experimentais e gráficos do tratamento de dados da cinética de fermentação em biorreator com concentração de 50 % de oxigênio dissolvido	159
	APÊNDICE C – Dados experimentais e gráficos do tratamento de dados da cinética de fermentação em biorreator com concentração de 80 % de oxigênio dissolvido	169



## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos naturais abundantes na natureza, sendo que mais de 700 destas moléculas já foram isoladas e caracterizadas. Devido sua via de biossíntese relativamente simples, os carotenoides são produzidos por uma gama de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, plantas e algas. Os carotenoides pigmentados apresentam propriedade antioxidante, atividade pró-vitamina A, redução do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e catarata (BUZZINI *et al.*, 2005; KAISER *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). A evidência científica crescente que os carotenoides pigmentados podem ter benefícios potenciais a saúde humana e animal aumentou o interesse comercial na busca de fontes naturais de produção de carotenoides (VALDUGA *et al.*, 2009a).

Devido à característica cromóforo dessas moléculas, os carotenoides conferem cor variando em tons amarelados, laranja e vermelho, representando assim, um grupo de moléculas importantes na indústria, como por exemplo, na reposição e uniformização da cor de alimentos processados, na indústria de alimentos e concedendo cor ao tecido animal e aos produtos derivados, na indústria de rações (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; BUZZINI *et al.*, 2005; GOUVEIA *et al.*, 2006).

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

As exigências nutricionais dos consumidores atuais por alimentos saudáveis rejeitam o uso de corantes sintéticos nos alimentos o que vem contribuindo no aumento de investigações de alternativas de colorir naturalmente os alimentos. Apesar da disponibilidade de uma ampla variedade de carotenoides naturais e sintéticos, há atualmente um interesse por fontes microbianas (VALDUGA *et al.*, 2009a).

As leveduras do gênero *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporomolomyces* e *Phaffia* foram descritas pela notável capacidade de produção de carotenoides (IRAZUSTA *et al.*, 2013), como o  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno e torularrodina (BUZZINI *et al.*, 2005).

A torularrodina, carotenoide importante produzido pelas leveduras vermelhas, está presente em concentrações variáveis e sua estrutura química contém um grupo metálico terminal, em C (1'), do grupo acíclico da extremidade, substituído por um grupo carboxílico (SILVA, 2004). Em condições de estresse oxidativo, ambiente rico em radicais livres como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), acredita-se que o metabolismo das leveduras é estimulado a elevar a biossíntese de carotenoides, como a de torularrodina que apresenta uma atividade antioxidante, com o objetivo de prevenir a oxidação (SAKAKI *et al.*, 2000).

As utilizações de carotenoides de fonte microbiana têm limitações devido à resistência da parede celular das leveduras, que constitui uma barreira para a biodisponibilidade desses compostos, o que requer a utilização de técnicas de ruptura celular para liberar os carotenoides intracelulares e serem recuperados através da extração (MICHELON *et al.*, 2012). A escolha de um método adequado para a extração de compostos bioativos intracelulares, incluindo pigmentos, depende de alguns aspectos, tais como a resistência da parede da célula, a localização intracelular, a estabilidade dos compostos e o seu uso final (FARKADE *et al.*, 2005).

Os carotenoides pigmentados estão acumulados em gotículas de lípidios no interior de células de levedura e, portanto, podem ser extraídos por uma ampla variedade de solventes orgânicos. A extração dos carotenoides produzidos requer a destruição eficiente da parede rígida da célula da levedura. Métodos de extração de carotenoides baseados na ruptura da parede celular por técnicas: enzimática, utilizando agentes de lise químico e/ ou mecânico, extrações com dióxido de carbono têm sido relatadas (PARK *et al.*, 2007).

A utilização de dióxido de carbono supercrítico para o rompimento celular constitui-se em um método potencial para a extração de materiais biológicos termossensíveis, devido a uma série de vantagens quando comparada a outras técnicas. O dióxido de carbono atinge o estado supercrítico em condições brandas de temperatura e pressão e, nas proximidades do ponto crítico, suas propriedades podem ser precisamente ajustadas. Neste estado, caracteriza-se pela transferência de massa da ordem do estado gasoso e poder de dissolução equivalente ao exibido no estado líquido, ambos dependentes da temperatura e pressão. Além disso, o solvente pode ser facilmente removido do meio, sem qualquer resíduo, por despressurização simples. O dióxido de carbono apresenta baixo custo, não inflamável e atóxico,



além de ser amplamente disponível em um alto grau de pureza (EGYHÁZI *et al.*, 2004).

Neste contexto e frente às importantes aplicações dos carotenoides, tanto na indústria de alimentos, quanto no seu uso farmacêutico, surge a necessidade do estudo de produção de pigmentos e técnicas de rompimento celular, possibilitando a utilização dos carotenoides de fontes microbianas.

Desta forma, este trabalho dedicou-se a estudar a produção de carotenoides em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e agitação no meio de cultivo, visando aumentar a biossíntese de torularrodina da levedura vermelha *Sporobolomyces ruberrimus*. Além de investigar técnicas de rompimento celular, extração e quantificação de carotenoides, em escala laboratorial, e utilizando a tecnologia supercrítica.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a cinética de produção de carotenoides em cultivo de *Sporobolomyces ruberrimus*, buscando potencializar a biossíntese de torularrodina através de estresse oxidativo e investigar metodologias de extração de pigmentos empregando técnicas: mecânica, química e em alta pressão.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter os parâmetros cinéticos de *Sporobolomyces ruberrimus* no cultivo em biorreator em concentrações de 20, 50 e 80 % de oxigênio dissolvido no meio;
- b) Constatar a influência da frequência de agitação nos parâmetros cinéticos de *Sporobolomyces ruberrimus* nos três tratamentos estudados;
- c) Definir a técnica de ruptura da parede celular e extração de pigmentos, em escala laboratorial, utilizando agentes de lise: químico, mecânico e combinados;
- d) Quantificar e qualificar o conteúdo de carotenoides produzidos nos três tratamentos estudados;
- e) Identificar a morfologia celular após a aplicação de diferentes métodos de ruptura da parede celular e extração de pigmentos;
- f) Aplicar a tecnologia supercrítica como método alternativo de ruptura celular e extração de pigmentos, em células liofilizadas após 72 h de fermentação.

## 1.3 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

## 1. INTRODUÇÃO

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3. MATERIAS E MÉTODOS

## 4. RESULTADOS

Produção e extração de carotenoides ao longo da fermentação de *S. ruberrimus*

Extração de carotenoides, após 72 h de fermentação, em células liofilizadas de *S. ruberrimus*

**Produção de carotenoides:**

- Do estudo da cinética microbiana do cultivo em concentração de 20, 50 e 80 % de oxigênio dissolvido;
- Da influência da frequência de agitação nos tratamentos;
- Da análise da concentração de carotenoides totais e específicos nos tratamentos.

**Extração de carotenoides:**

- Da determinação da técnica de extração de carotenoides;
- Da análise de carotenoides por TLC;
- Da determinação dos carotenoides totais e específicos;
- Da identificação por MEV da morfologia celular após tratamento de ruptura da parede celular.

- Do rendimento e concentração de carotenoides totais utilizando a tecnologia supercrítica como técnica de ruptura celular e extração de pigmentos;
- Da análise do conteúdo extraído por TLC.

## 5. CONCLUSÃO

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão apresentadas informações sobre a bioprodução, e recuperação de carotenoides. Os principais aspectos abordados são: as propriedades e funções dos carotenoides, a estrutura química, a biossíntese, os microrganismos produtores de pigmentos, os fatores que influenciam na produção biotecnológica, os dados mercadológicos, além de revisar diferentes métodos de ruptura celular e de extração destes carotenoides.

### 2.1 PIGMENTOS NATURAIS

Os pigmentos naturais, tal como os ocre e os óxidos de ferro têm sido usados como corantes desde a era pré-histórica. Eles são utilizados pelo homem para colorir o corpo, em produtos de artesanato e para melhorar a aparência dos alimentos, por exemplo. Antes da revolução industrial, a gama de cores disponíveis para utilizações artísticas e decorativas era tecnicamente limitada. Algumas cores eram extremamente caras ou impossíveis de misturar com a maioria dos outros pigmentos disponíveis. O azul e a púrpura ficaram associados à realeza, tal era o seu preço de compra. A grande maioria dos pigmentos era minerais, terras ou de origem biológica extraída de plantas ou de produto de plantas, ou ainda de microrganismos, insetos, moluscos, algas, ciano bactérias e fungos (ABEROUMAND, 2011).

O uso de pigmentos artificiais data do século XIX, uma vez que estes pigmentos são amplamente utilizados na indústria têxtil, química, de alimentos e farmacêutica (CONSTANT *et al.*, 2012).

#### 2.1.1 Propriedades e funções dos carotenoides

O nome carotenoides é derivado do nome científico da cenoura - *Daucus carote*, reconhecido por Wackenroder em 1831, como a primeira fonte de caroteno (GOODWIN, 1952). Existem mais de 700 carotenoides na natureza que foram isolados e caracterizados, classificados como carotenos e xantofilas. Provavelmente, devido à sua via de biossíntese relativamente simples, eles são produzidos por uma ampla variedade de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, plantas e algas (BUZZINI *et al.*, 2005; KAISER *et al.*, 2007; JOMOVA e VALKO, 2013; AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014).

Os carotenoides são pigmentos naturais abundantes na natureza e estão entre os componentes mais importantes nos alimentos, pois eles

são os pigmentos naturais responsáveis em conferirem cores nas tonalidades do amarelo ao vermelho, característica que têm uma influência decisiva sobre a aceitabilidade de muitos alimentos. Nutricionalmente, alguns carotenoides são precursores da vitamina A. Em termos de saúde humana, os carotenoides estão entre os fitoquímicos bioativos creditados na redução do risco de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata, além de fortalecer o sistema imunológico (KRINSKY, 1994; MALDONADO *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

As propriedades dos carotenoides pigmentados conferem seu amplo uso na indústria de alimentos, tendo como objetivo repor a cor dos alimentos perdida durante o processamento e armazenamento, colorirem alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos (FRANCESCHI *et al.*, 2009). Tradicionalmente, os carotenoides são comercializados na forma de pó seco ou extratos de plantas, tais como urucum, páprica e açafrão. Os carotenoides também são utilizados na preparação de emulsões oleosas e aquosas, suspensões coloidais e complexos com proteínas. Essas preparações têm sido encontradas em margarinas, manteigas, sucos de frutas e bebidas, sopas, laticínios, sobremesas e misturas, xaropes e medicamentos, molhos para saladas, carnes, massas, ovos, maioneses, entre outros (GOUVEIA *et al.*, 2006).

Os animais, apesar de não sintetizarem os carotenoides, podem obtê-los a partir do consumo de alimento. Por isso, outra aplicação de tais moléculas que vem crescendo é o uso de carotenoides como aditivo em ração animal, com o propósito de conceder cor adequada ao tecido animal ou aos produtos derivados, como por exemplo, a astaxantina para o salmão, a luteína e a zeaxantina para a gema de ovos e pele de galinhas, o  $\beta$ -caroteno para rebanho bovino, na coloração de nata ou gordura. Além da utilização como suplemento de vitamina A (BRITTON *et al.*, 1995; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Os carotenoides são moléculas lipossolúveis e, portanto, solúveis em solventes orgânicos clássicos como éter de petróleo, metanol, sulfeto de carbono, acetona. São insolúveis na água, exceto quando formando complexos com proteínas (carotenoproteínas). Os carotenoides aparecem dissolvidos nos lipídios e, em alguns casos, formando soluções coloidais (WILEY, 1960; VILLELA, 1976). Além dessas propriedades de solubilidade dos carotenoides, eles também possuem funções importantes, principalmente em vista de suas interações com a luz (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014).

A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo, que nos carotenoides se caracteriza pelo longo sistema de duplas ligações conjugadas, sendo necessário, aproximadamente sete ligações duplas conjugadas para os carotenoides apresentarem coloração (IRAZUSTA *et al.*, 2013; JOMOVA e VALKO, 2013). Por isso, o fitoeno e o fitoflueno, que possuem respectivamente, três e cinco duplas ligações conjugadas, são considerados carotenoides incolores. Nos carotenos, a cor pode variar do incolor até o vermelho. A mudança de cor nos carotenoides ocorre à medida que o número de duplas ligações aumenta, pois há um deslocamento no espectro de absorção da molécula (FRANCIS, 1986). Logo, a capacidade de absorver a luz visível depende da estrutura da molécula do carotenoide (VILLELA, 1976).

Cada carotenoide é caracterizado por um espectro de absorção eletrônica (Tabela 1). Assim, a espectroscopia de absorção é uma importante técnica na análise de carotenoides (GROSS, 1991). Os carotenoides incolores absorvem na região ultravioleta, abaixo de 350 nm a 400 nm (VILLELA, 1976). Já os carotenoides pigmentados, os comprimentos de onda máximos de absorção variam na faixa de 410 nm a 600 nm (FONTANA *et al.*, 2000).

Tabela 1. Pontos de fusão e espectro de absorção de alguns carotenoides.

Carotenoides	Ponto de fusão (°C)	Espectro de absorção máxima (nm)	
		Em dissulfeto de carbono	Em éter e petróleo
$\alpha$ -caroteno	187-188	509, 477	478, 477
$\beta$ -caroteno	184	520, 485	497, 466
$\gamma$ -caroteno	178	533, 496, 463	508, 475
Licopeno	175	547, 507	506, 474
Luteína	193	508, 475, 445	477, 447
Astaxantina	215 - 266	502	-

Fonte: Villela (1976).

Os carotenoides antioxidantes são ricos em elétrons, sendo doadores de elétrons eminentes ou receptores de energia. A antioxição pode ser caracterizada pela transferência de elétrons (o carotenoide oferece um elétron para uma molécula depreciada de elétrons) ou por transferência de energia (o carotenoide combate oxigênio em sua

configuração eletrônica singlete altamente reativo assumindo o excesso de energia do oxigênio). É comumente aceito que quanto mais longa a cadeia polimérica, melhor as propriedades antioxidantes (ZAIDI *et al.*, 2013). Assim, a proteção antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas. Por exemplo, o licopeno é mais eficaz que o  $\beta$ -caroteno, pois o licopeno possui onze duplas ligações conjugadas e cadeia acíclica, enquanto o  $\beta$ -caroteno possui nove duplas ligações conjugadas e cadeia cíclica nas extremidades (MCBRIDE, 1996). Esses carotenoides são capazes de seqüestrar espécies reativas de oxigênio, como o radical peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância. Os carotenoides são, por conseguinte, capazes de retirar do meio, espécies altamente reativas (FOOTE *et al.*, 1970).

O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estas moléculas alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados, principalmente quando submetidos às condições não controladas. Além disso, os carotenoides também são susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas que dependem da estrutura do carotenoide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz. A exposição dos carotenoides a tais agentes ocasiona isomerização das moléculas *trans* (forma mais estável na natureza) para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor, diminuição da atividade pró-vitamínica e quebra da cadeia (JONHSON *et al.*, 1995; OLIVIER e PALOU, 2000).

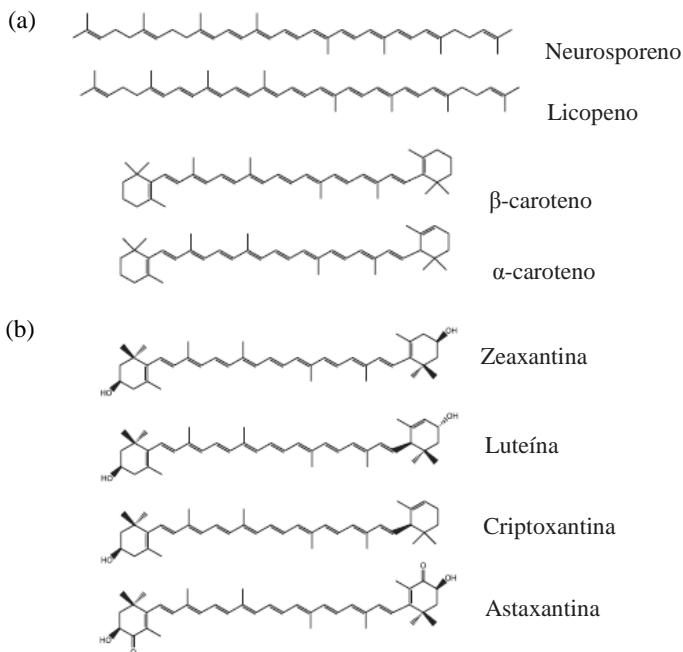
Os carotenoides são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos (pH 3,0 a 7,0) (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). No entanto, alguns carotenoides não são relativamente resistentes a valores extremos de pH (ácidos e álcalis), podendo sofrer isomerização *cis/trans* de certas duplas ligações. Isto ocorre principalmente na manipulação em laboratórios com fins analíticos. Por exemplo, algumas xantofilas são instáveis em meio alcalino e os epóxi-carotenoides são instáveis em meio ácido (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Estrutura e biossíntese de carotenoides

Os carotenoides têm a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos ( $\text{C}_{40}$ ), formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. Duas classes de carotenoides são encontradas na natureza (Figura 1): os carotenos, tais como  $\beta$ -caroteno,

hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula, e os derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, denominados xantofilas. A estrutura básica acíclica  $C_{40}$  pode ser modificada através de reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação (OLIVIER e PALOU, 2000).

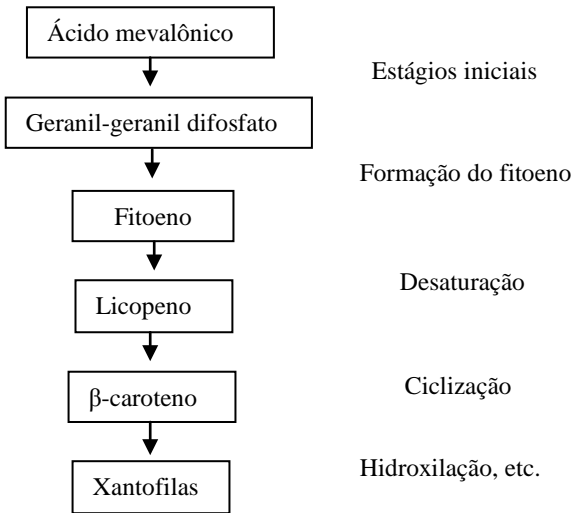
Figura 1. Estrutura das classes de carotenoides: (a) caroteno e (b) xantofilas.



Fonte: Silva (2004).

O caminho de biossíntese de acordo com Silva (2004) pode ser dividido em cinco etapas: estágios iniciais, formação de fiteno, desaturação, ciclização e formação de xantofilas, como descrito na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma dos cinco estágios de biossíntese dos carotenoides.

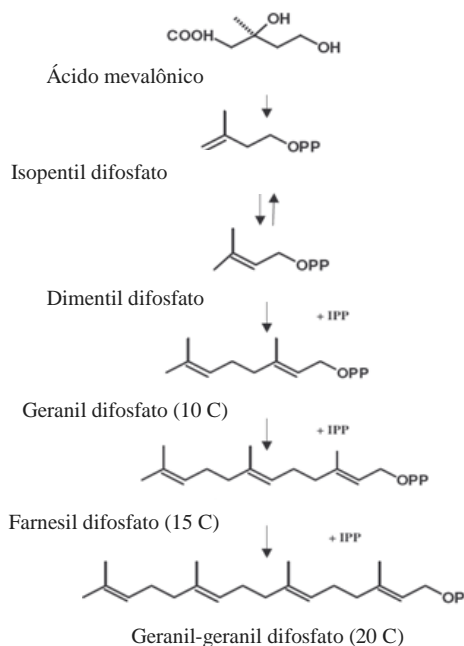


Fonte: Silva (2004).

Os carotenoides são tetraterpenos e sua biossíntese apresenta um padrão para todos os terpenóides resultando na formação de um composto de vinte carbonos, o geranyl-geranyl difosfato. O primeiro precursor específico da biossíntese dos terpenóides é o ácido mevalônico que é convertido em isopentil difosfato, que sofre isomerização para formar o dimetil difosfato que é a base para o alongamento da cadeia. Sucessivas adições de moléculas de isopentil difosfato levam a formação do geranyl difosfato (dez carbonos), farnesil difosfato (quinze carbonos) e geranyl-geranyl difosfato (vinte carbonos), conforme Figura 3 (SILVA, 2004).



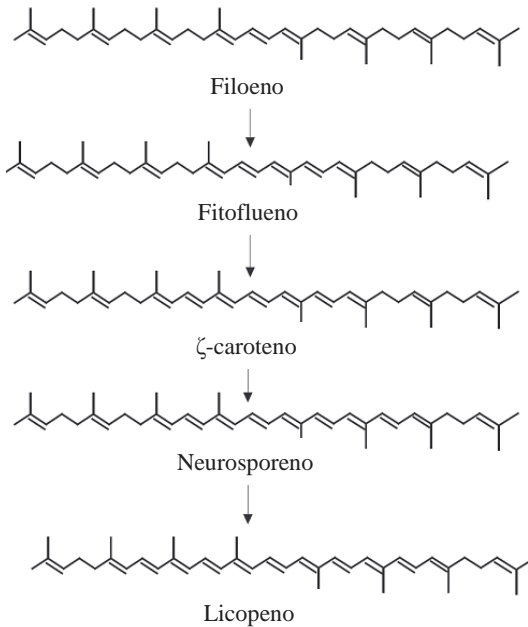
Figura 3. Primeiro estágio de biossíntese de carotenoides: ácido mevalônico transformando em geranyl-geranyl difosfato.



Fonte: Silva (2004).

A reação chave para a carotenogênese é a dimerização de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato para formar o fitoeno, sendo este o primeiro composto de quarenta carbonos, embora ainda sem coloração. Segue uma série de desaturações a partir do fitoeno para formar fitoflueno, zetacaroteno, neurosporeno e, finalmente, o licopeno, Figura 4 (SILVA, 2004).

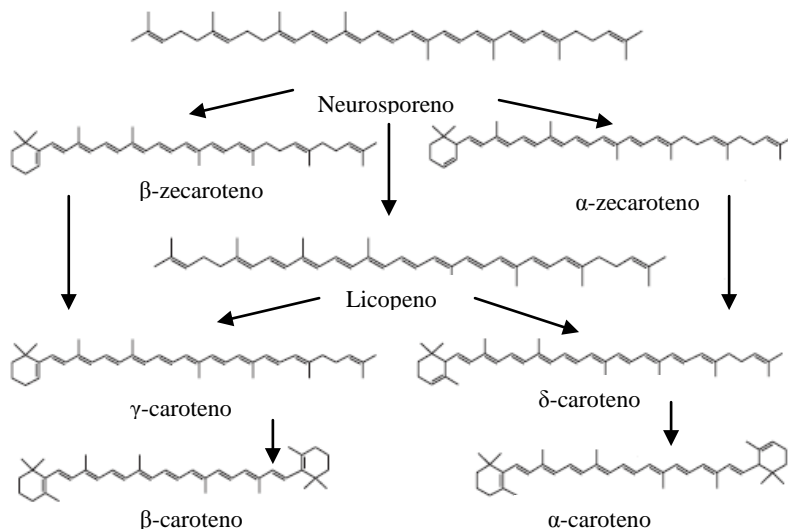
Figura 4. - Estágios intermediários de biossíntese dos carotenoides.



Fonte: Silva (2004).

A ciclização pode acontecer a partir do neurosporeno ou do licopeno (Figura 5). O neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel  $\beta$  do  $\beta$ -zeacaroteno ou o anel  $\epsilon$  de  $\alpha$ -zeacaroteno. Estes dois carotenoides são transformados em  $\gamma$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de duplas ligações conjugadas. O licopeno pode ser também ciclizado em uma das extremidades, gerando  $\gamma$ -caroteno ou  $\delta$ -caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno (bicíclicos), respectivamente (SILVA, 2004).

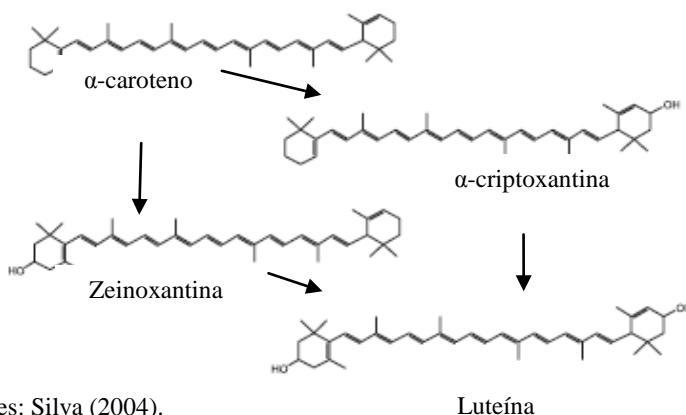
Figura 5. Ciclização dos carotenoides acíclicos insaturados.



Fonte: Silva (2004).

Após a formação dos carotenoides cíclicos, tem-se a introdução de substituintes, como a hidroxila, gerando xantofilas. Nas Figura 6 e Figura 7, têm-se a formação das xantofilas a partir do α-caroteno e β-caroteno, respectivamente.

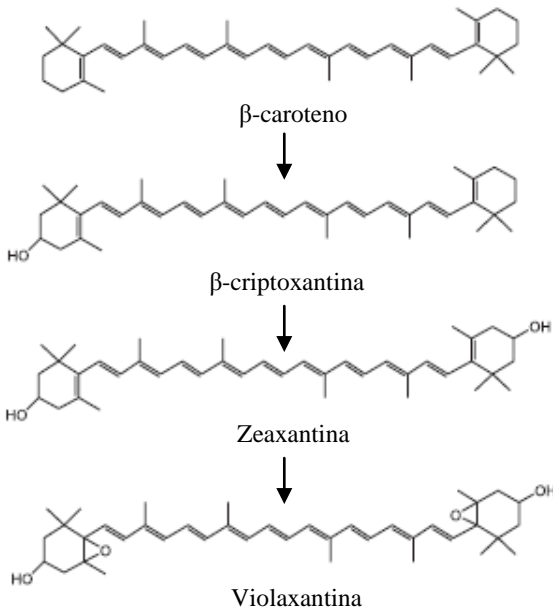
Figura 6. Formação de xantofilas a partir do carotenoide α-caroteno.



Fontes: Silva (2004).

Luteína

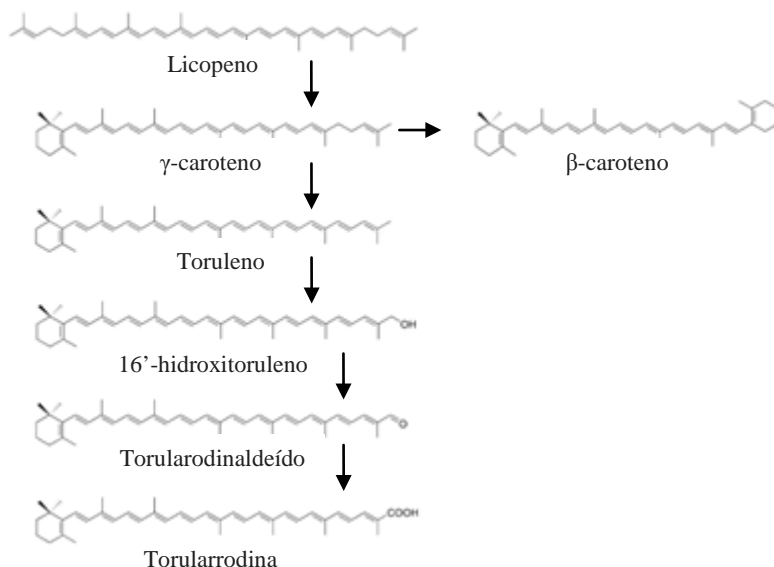
Figura 7. Formação de xantofilas a partir do carotenoide  $\beta$ -caroteno.



Fonte: Silva (2004).

Alguns carotenoides apresentam em suas estruturas substituintes metálicos que são modificados por oxidação, apesar de não serem frequentes, existem alguns exemplos em plantas, algas, fungos e bactérias. A torularrodina, carotenoide importante produzido pelas leveduras vermelhas, está presente em concentrações variáveis e sua estrutura química contém um grupo metálico terminal, em C (1'), do grupo acíclico da extremidade, substituído por um grupo carboxílico. Estudos realizados por Herz *et al.* (2007), sobre intermediários da via oxidativa de turuleno em torularrodina, em leveduras vermelhas, mostrou a via de biossíntese de carotenoides em *Cystofilobasidium infirmominatum*. A torularrodina é sintetizada a partir de hidrocarbonetos, como o  $\gamma$ -caroteno e o toruleno, por intermédio de aldeídos correspondentes, que estão presentes, conforme Figura 8.

Figura 8. Postulado da biossíntese de torularrodina por *Cystofilobasidium infirmominiatum*.



Fonte: Herz *et al.* (2007).

A torularrodina ((3'E) -3', 4'-di-dehidro-β, ácido caroten-ψ-16'-óico) possui um grupo carboxílico terminal no carbono C (1) da cadeia acíclica e um anel β. Sua fórmula química bruta é  $C_{40}H_{52}O_2$  e sua massa molecular corresponde a  $564,6 \text{ g.mol}^{-1}$ . É solúvel em etanol, metanol, hexano, acetona, éter de petróleo e em outros solventes apolares [1].

O β-caroteno (β, β-caroteno) se distingue da classe geral de carotenos por ter anel β em ambas às extremidades da molécula. Sua estrutura foi deduzida por Karrer *et al.* em 1930. Sua fórmula bruta é  $C_{40}H_{56}$  e sua massa molar é de  $536,87 \text{ g.mol}^{-1}$ . Por ser um hidrocarboneto sem grupo funcional, o β-caroteno é uma molécula apolar, solúvel em solventes orgânicos [1].

O γ-caroteno (β, ψ-caroteno) é um intermediário da biossíntese de carotenoides ciclizado em plantas. É formado a partir da ciclização do licopeno, sua fórmula e massa molar são semelhantes ao do β-caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ,  $536,87 \text{ g.mol}^{-1}$ ). O toruleno ((3'E) -3', 4'-di-dehidro-β, ψ-

caroteno) é um caroteno de fórmula molecular  $C_{40}H_{54}$  e massa molar de  $534,86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  [1].

### 2.1.3 Produção biotecnológica e mercado dos carotenoides

A produção comercial em escala industrial de carotenoides, a partir de microrganismos, concorre principalmente com a produção sintética por procedimentos químicos, apesar de haver uma crescente demanda por carotenoides de fontes naturais, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos. Assim, a produção biotecnológica é uma alternativa para esse mercado (JIN *et al.*, 2003; BUZZINI *et al.*, 2005).

Desde o início dos anos 80, várias companhias biotecnológicas têm desenvolvido métodos para produzir pigmentos em culturas bacterianas, de algas e fungos. Para sobreviverem, os materiais produzidos biologicamente devem oferecer vantagens em seu emprego, custo e/ou conformidade com as normas (VALDUGA *et al.*, 2009a).

A produção biotecnológica de carotenoides destaca-se devido a fatores tais como: a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo, pequeno espaço para produção, independência das condições ambientais (clima, estação do ano ou composição do solo), controle das condições de cultivo para garantir a produção de carotenoides de maior interesse, além da denominação de substância natural (VALDUGA *et al.*, 2009a; DAS *et al.*, 2007).

A produção por microrganismos pode tornar-se industrialmente praticável e o custo da produção pode ser minimizado com o uso de substratos industriais baratos como fontes de nutrientes (DAS *et al.*, 2007). As condições do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), temperatura, pH, taxa de aeração e agitação influenciam na variação dos tipos de carotenoides e respectivas quantidades (BUZZINI *et al.*, 2005).

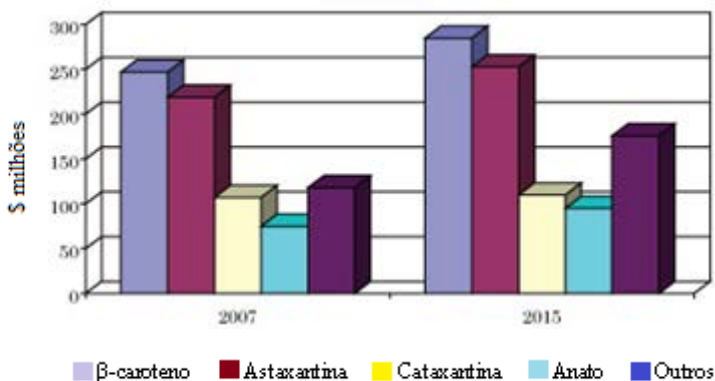
Uma parte dispendiosa, apesar de essencial, do processo industrial é a transformação do composto lipofílico, cristalino e puro em formulações que são apropriadas para a aplicação industrial. A dispersão micro cristalina do carotenoide em uma gordura comestível é usada na produção de margarinas. A micro dispersão de alguns pós, contendo um colóide protetor hidrofílico, são utilizados em meios aquosos, tais como, suco de frutas (BRITTON, 1995).

Desta forma, pesquisas de produção de corantes naturais a partir de microrganismos vêm focando não somente na seleção de linhagens produtoras de uma variedade de carotenoides, mas também, na otimização das metodologias de cultivo para um aumento da produção

de corante, redução de custos com a bioprodução e posterior aplicação em escala industrial. Além do uso da técnica da engenharia genética visando à obtenção de carotenoides de maior interesse e em maiores quantidades. Estes temas que vêm sendo pesquisados buscam tornar a bioprodução competitiva com a síntese química (MORAIS, 2006).

O último relatório divulgado pela Companhia de Comunicações Empresarial Inc. (BCC Research), empresa de pesquisa de mercado relatou a situação do mercado global atual de carotenoides, apresentando as tendências e previsões de crescimento até 2015 (Figura 9). O faturamento do mercado mundial de carotenoides foi de 766.000 mil dólares em 2007. Até 2015 espera-se um aumento com um valor total de faturamento de 919 milhões dólares. Os dados coletados corroboram que a maioria dos carotenoides ainda é produzida por síntese química.

Figura 9. Valor do mercado global de carotenoides produzidos em 2007 e previsões para 2015, em milhões de dólares.



Fonte: BCC Research.

A produção industrial de β-caroteno começou em 1954 e, desde então, a síntese comercial de carotenoides vem sendo desenvolvida. O β-caroteno tem a maior quota de mercado de carotenoides. Avaliada em 247.000 mil dólares em 2007, este segmento deverá valer 285 milhões dólares americanos em 2015, uma taxa de crescimento anual composta por 1,8%, conforme pesquisa realizada pela BCC Research, em 2011.

Em 2010, a BASF assumiu Cognis, a única empresa considerável em produção de β-caroteno a partir de algas e, em 2011, adquiriu DSM Vitatene, um importante produtor de β-caroteno por fermentação. Com a

consolidação das estruturas da indústria de produção e transformação de  $\beta$ -caroteno várias empresas que estavam no mercado durante os meados da década de 2000 desapareceram. Um número muito limitado de companhias domina esse negócio global (BBC Research, 2011). A Índia possui a maior indústria produtora de  $\beta$ -caroteno biossintetizado por micro alga (*Dunaliella*) e seu uso se destina à indústria farmacêutica. Outras grandes produtoras estão localizadas na Austrália, Estados Unidos, China, Mongólia e Japão. Pequenas plantas de produção também são encontradas no México, Chile, Cuba, Irã e Taiwan (DUFOSSE *et al.*, 2005).

O mercado de astaxantina, embora menor que o de licopeno e  $\beta$ -caroteno, têm crescido rapidamente, constando um aumento da sua participação no mercado de 26 % entre 2000 e 2010. O segmento de aditivos de alimentação animal foi o mais lucrativo em 2010, seguido pelo de suplementos e alimentos fortificados. O preço de mercado, por grama, é em torno de R\$ 57,00 para o  $\beta$ -caroteno, e R\$ 633,00 para a astaxantina, já um miligrama de zeastaxantina chega a custar R\$ 1.690,71 (BBC Research, 2011).

## 2.2 LEVEDURAS VERMELHAS

Leveduras vermelhas são assim chamadas por causa de seu alto teor de carotenoides. Estes possuem o papel fisiológico em leveduras vermelhas associado à característica antioxidante dessas moléculas que atuam em condições de elevado estresse oxidativo - definido como condição de desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares causados pelos radicais livres. Uma classe de substâncias particularmente sensíveis aos radicais de oxigênio ( $^1O_2$ ) são os ácidos graxos polinsaturados, e é interessante neste contexto, que os carotenoides são acumulados em gotículas lipídicas em leveduras e outros fungos. Além disso, sob condições de estresse oxidativo a composição de carotenoide nas leveduras vermelhas tendem a aumentar e os pigmentos que possuem a propriedade antioxidante elevada são sintetizados em maior quantidade, como a torularrodina (DAVOLI e WEBER, 2002, SAKAKI *et al.*, 2000 ).

A maioria das leveduras vermelhas já descritas pertence ao filo *Basidiomycota* e estas apresentam interesse especial para os investigadores de carotenoides porque seu crescimento é facilmente manipulado em laboratório. Fell *et al.* (2002) estimam que apenas 1% de todas as leveduras basidiomicetos (compreendendo espécies pigmentadas e não pigmentadas) foram descobertas e descritas, como



ainda, indicando uma vasta biodiversidade inexplorada de produtores de novos carotenoides. Além disso, as observações mostraram que mesmas espécies de leveduras intimamente relacionadas entre si podem abrigar perfis de carotenoides diferentes.

Leveduras vermelhas do gênero *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporomolomyces* e *Phaffia* foram descritas pela notável capacidade de produção de diferentes carotenoides naturais importantes comercialmente, tais como,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno e torularrodina, levando a considerar estes microrganismos como fontes potenciais de produção de pigmentos. Comparando com as algas, a produção em larga escala em fermentadores das leveduras é mais conveniente devido à sua natureza unicelular e alta taxa de crescimento (BUZZINI *et al.*, 2005; FRENGOVA *et al.*, 2009; IRAZUSTA *et al.*, 2013).

A acumulação de carotenoides pigmentados na maioria das leveduras vermelhas inicia-se após a fase logarítmica e continua na fase estacionária. A presença de uma fonte de carbono adequada é importante para a biossíntese de carotenoides durante a fase de não crescimento (FRENGOVA *et al.*, 2009).

A torularrodina é produzida apenas por algumas leveduras cultivadas em meio rico em peptona e extrato de levedura com fonte de nitrogênio e carbono específicos, Quadro 1 (SAKAKI *et al.*, 2000).

Quadro 1 - Microrganismos e carotenoides produzidos biotecnologicamente.

Fungos e leveduras	Principais carotenoides produzidos
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -caroteno e licopeno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina
<i>Rhodotorula sp.</i>	Toruleno e $\beta$ -caroteno
<i>Rhodospiridium sp.</i>	Toruleno e $\beta$ -caroteno
<i>Rhodotorula graminis</i>	Toruleno
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno e torularrodina
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	Toruleno, torularrodina e $\beta$ -caroteno
<i>Rhodotorula rubra</i>	$\beta$ -caroteno
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Toruleno, torularrodina e $\beta$ -caroteno
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Toruleno, torularrodina e $\beta$ -caroteno
<i>Sporidiobolus sp.</i>	Toruleno, torularrodina e $\beta$ -caroteno

Fonte: Valduga *et al.* (2009a).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas como produtoras de carotenoides com coloração avermelhada, com concentrações variando de 10 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de biomassa seca (HARI *et al.*, 1992; DE MIGUEL *et al.*, 1997). Frengova *et al.* (1995) estudaram a co-fermentação por *Rhodotorula glutinis* 22P e *Lactobacillus helveticus* 12A obtendo rendimento em carotenoides na ordem de 8,4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os carotenoides principais identificados por HPLC foram  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina.

Davoli e Weber (2002) investigaram os carotenoides pigmentados da levedura vermelha *Sporobolomyces roseus*. A cor rosa avermelhada da levedura foi encontrada devido a três pigmentos principais identificados por UV e espectro de massa: o  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina. Através de análises microscópicas os pigmentos foram visualizados no interior das células, localizados em numerosas gotas de lipídeos. Em 2004, esses autores investigaram a influência da aeração e o conteúdo de carotenoides da levedura *Sporobolomyces roseus*. Concluíram que o aumento da aeração proporcionou o incremento na concentração de carotenoides de 109  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula seca para 412  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula seca. Tinoi *et al.* (2005) na bioprodução da mesma levedura em frascos agitados, verificaram que baixa frequência de agitação (100 a 150 rpm) apresentam menor crescimento celular devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes na superfície das células. Ao contrário, em altas frequências de agitação (>250 rpm), ocorreu ruptura celular evidenciada pelo o aparecimento de uma fina camada oleosa.

A produção de carotenoides pela *Rhodotorula glutinis*, levedura vermelha isolada a partir do solo, foi investigada por Aksu e Eren (2007) quanto ao pH inicial, temperatura, vazão de aeração, substrato inicial (glicose, caldo de cana e lactose). O pH 6 e a temperatura de 30 °C foram determinados como ótimos para a produção de carotenoides totais. A concentração de carotenoides totais e o rendimento de produção de carotenoides aumentaram significativamente com a elevação da vazão de aeração de até 2,4 vvm. A concentração mais elevada de carotenoides (125,0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi obtida quando 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de caldo de cana foi usado como fonte de carbono. Enquanto que o maior rendimento de produto (35,5  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula seca) foi obtido com 13,2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de soro de leite utilizado como fonte de carbono.

Maldonade *et al.* (2008) estudaram a composição de carotenoides em leveduras pigmentadas isoladas no Brasil. As leveduras foram cultivadas em meio de cultura *Yeast Malt*, a 200 rpm, 25 °C, durante 5 dias, sem iluminação. Técnicas de cromatografia em camada fina e cromatografia líquida de alta eficiência foram usadas para a separação,

identificação e quantificação dos carotenoides. Os principais pigmentos encontrados nestas leveduras foram  $\beta$ -caroteno, toruleno, torularrodina e  $\gamma$ -caroteno. Em termos de célula seca, os valores de carotenoides produzidos foram: *Rhodotorula glutinis* ( $132 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), *Rhodotorula mucilaginosa*-135 ( $76 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), *Sporobolomyces roseus* ( $72 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), *Rhodotorula mucilaginosa*-12 ( $72 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), *Rhodotorula graminis* -125 ( $70 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 ( $69 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), *Rhodotorula mucilaginosa*-108 ( $68 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e *Rhodotorula minuta* ( $33 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).

Petrik *et al.* (2013) realizaram um estudo focando na comparação do crescimento e produção de carotenoides de sete linhagens vermelhas de leveduras do gênero *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Cystofilobasidium* cultivadas em glicerol. Todas as estirpes testadas foram capazes de utilizar glicerol como única fonte de carbono. As maiores produções de pigmentos totais foram alcançadas por *Sporobolomyces roseus* ( $3,60 \text{ mg.g}^{-1}$  de célula seca), *Sporobolomyces salmonicolor* ( $2,85 \text{ mg.g}^{-1}$  de célula seca) e *Rhodotorula glutinis* ( $2,80 \text{ mg.g}^{-1}$  de célula seca).

No estudo da produção de carotenoides por uma espécie recém isolada *Sporidiobolus pararoseus* utilizando substratos agroindustriais Valduga *et al.* (2013) obtiveram uma concentração máxima de carotenoides totais de  $843 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo  $396 \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno, em um meio de cultura contendo  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol,  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de água de milho macerado e  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de água de arroz parcialmente cozido, a  $25^\circ\text{C}$ , pH inicial 4,0 e agitação de 180 rpm. A avaliação cinética mostrou que a concentração máxima de carotenoides totais foi alcançada após 96 h de fermentação e que a produção de carotenoides foi associada ao crescimento celular.

### 2.2.1 *Sporobolomyces ruberrimus*

O gênero *Sporobolomyces* compreende mais de 20 espécies isoladas (Kurtzman *et al.*, 2011). A espécie *Sporobolomyces ruberrimus* foi descoberta por Yamasakie e Fujii (1950). A cepa dessa levedura foi isolada no ar do Japão e apresenta duas variedades, *Sp. ruberrimus* variedade *ruberrimus*, e *Sp. ruberrimus* variedade *albus*, um mutante espontâneo incolor.

*Sporobolomyces ruberrimus* se multiplica por brotamento ou gemulação, um processo de reprodução assexuada, no qual ocorre a formação de uma dilatação denominada gema formada por mitoses na superfície externa do organismo progenitor, podendo separar-se e dar origem a um novo indivíduo. As colônias podem ser incolores ou

apresentam uma coloração que pode variar de rosa salmão, vermelho alaranjado, vermelho vivo, creme ou amarelo marrom, dependendo das condições de cultivo (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Em um estudo Biswas *et al.* (2001) demonstraram a composição da parede celular de leveduras *basidiomicética*, que inclui o gênero *Sporobolomyces*. A parede celular é constituída apenas de um simples septo poroso e não contém xilose. Lopandic *et al.* (1996) em uma investigação da composição celular de algumas cepas de leveduras *basidiomicética* concluiu que a parede celular da cepa *Sporobolomyces holsaticus* contém 77 % de manose, 22 % de glicose e 1 % de galactose.

A espécie de levedura abordada neste trabalho apresenta um número restrito de trabalhos publicados. A cepa selvagem da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* H110 foi isolada no *Laboratoire des Sciences Du Genie Chimique*, Nancy, França, em 2001 (RAZAVI e MARC, 2006).

Na pesquisa do efeito da temperatura e pH sobre o crescimento celular e produção de carotenoides da levedura *S. ruberrimus* H110, Razavi e Marc (2006) utilizaram o meio de cultura composto por: 20 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 g.L<sup>-1</sup> de peptona; 1 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 2 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O e 4 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para cultura em biorreator descontínuo. Os parâmetros constantes foram o tempo de fermentação (72 h), as concentrações das fontes de carbono (32 g.L<sup>-1</sup>) e concentração de 50 % de oxigênio dissolvido. A frequência de agitação oscilou entre 300 a 900 rpm. A temperatura variou de 19 °C a 31 °C e o pH inicial foi ajustado nos valores entre 3,5 a 8,2. O conteúdo mínimo de carotenoides (2,02 mg.g<sup>-1</sup> de célula seca) e de células (6,81 g.L<sup>-1</sup>) foi observado em cultivo a pH 3,5. O pH 6 foi selecionado como ótimo para o crescimento celular (11,30 g.L<sup>-1</sup>) e para a formação de pigmentos (3,43 mg.g<sup>-1</sup> de célula seca). Já quanto ao parâmetro temperatura ótima de crescimento os valores elegidos foram entre 19 e 27 °C. No entanto, em temperaturas superiores a 27 °C ocorreu o crescimento celular, porém as células não apresentaram coloração. A produção dos carotenoides foi acentuada durante a fase exponencial na maioria das temperaturas, com exceção de 31 °C.

Em outra investigação, Razavi (2006) dedicou a estudar os métodos de separação e identificação de carotenoides produzidos pela levedura *Sporobolomyces ruberrimus* H110. Os resultados indicaram que essa levedura produz essencialmente os carotenoides torularrodina e uma pequena quantidade de β-caroteno.

Seguindo os estudos encabeçados por Razavi (2006), Cardoso (2008) obteve um conjunto de informações quantitativas e qualitativas

do comportamento metabólico da *Sporobolomyces ruberrimus* H110, especificamente, sobre o crescimento celular e a produção de torularrodina. Assim, a melhor condição de cultivo em biorreator descontínuo encontrada foi a de pH 6, temperatura de 23 °C e concentração de fonte de carbono de 33,5 g.L<sup>-1</sup> (glicerol enriquecido com 2 g.L<sup>-1</sup> de ácido oléico). Para uma concentração de 10 % de oxigênio dissolvido, o valor máximo de biomassa obtido foi de 18,5 g.L<sup>-1</sup>, com  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,058 h<sup>-1</sup> e torularrodina de 4x10<sup>5</sup> unidade de absorbância (UA). Já com uma concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, houve um aumento de biomassa (20 g.L<sup>-1</sup>) e da velocidade máxima específica de crescimento (0,068 h<sup>-1</sup>), porém, a quantidade de torularrodina produzida manteve-se constante. Elevando a concentração de oxigênio dissolvido para 80 %, notou-se um aumento significativo de torularrodina (7x10<sup>5</sup> UA).

### 2.3 TÉCNICAS DE RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

Apesar da elevada produção de carotenoides a partir de microrganismos, uma das dificuldades encontrada na recuperação desses compostos está relacionada ao fato que eles são normalmente produzidos no interior das células. Assim, a sua utilização tem limitações devido à resistência e rigidez da parede celular, que constitui uma barreira para a biodisponibilidade desses compostos de interesse. No entanto, uma grande quantidade de produtos podem ser isolados e purificados com o auxílio de técnicas de lise celular (SQUINA e MERCADANTE, 2003; MICHELON *et al.*, 2012; MONK *et al.*, 2013).

A parede celular de leveduras é responsável por diversas funções como: proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva. A parede celular de leveduras é formada por uma camada de nano proteínas que sobrepõe à camada de glucana, o que explica a resistência das células vivas de leveduras ao ataque das misturas enzimáticas elaboradas por alguns microrganismos (ASENJO *et al.*, 1985).

Após o rompimento celular, os carotenoides podem ser extraídos das células microbianas pela dissolução em solventes orgânicos, como acetona, éter de petróleo, hexano, clorofórmio, etanol e metanol. A utilização de acetato de etilo, ciclo-hexano ou clorofórmio pode causar artefatos e perdas nos compostos bioativos, pois estes solventes podem produzir ácidos, gerar radicais ou promover certos produtos de condensação como acetonitrila. Uma vez que os carotenoides podem

apresentar grupos reativos como aldeídos ou epóxios (KAISER *et al.*, 2007).

A recuperação de biocompostos de matrizes biológica pode ser realizada por meio de diferentes métodos de extração aplicados sozinhos ou combinados. A seleção da técnica de extração é de importância decisiva para a qualidade do produto extraído. Existem vários processos convencionais para a extração de carotenoides a partir de uma matéria prima natural utilizando solventes orgânicos, tais como: maceração com nitrogênio líquido, *Soxhlet*, ultrassom, abrasão com pérola de vidro ou areia em agitador vórtex e uso de DMSO (Quadro 2).

Quadro 2. Revisão de diferentes métodos de ruptura celular e extração de carotenoide em microrganismos.

Microrganismo	Metodologia de lise celular e extração de carotenoides	Resultados (carotenoides totais)	Referência
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> H110	Agente de lise: (1) pérola de vidro + vórtex, (2) pedras + vórtex e (3) DMSO + vórtex Solventes: Éter de petróleo: acetona (7:3, v/v)	Concentração de carotenoides totais por grama de célula obtido em cada ensaio: (1) 1,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; (2) 1,31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e (3) 0,33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .	(Pennacchi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Agente de lise: maceração + nitrogênio líquido + DMSO + Vórtex Solventes: Metanol: acetona (7:3, v/v)	Máxima concentração de carotenoides totais encontrados 843 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .	(Valduga <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> e <i>Cystofilobasidium capitatum</i>	Agente de lise: incubação com DMSO Solventes: acetona e éter de petróleo	Identificou os pigmentos extraídos em HPLC e espectro de massa. Não quantificou.	(Herz <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rhodotorula glutinis dairenensis</i> , <i>Diozegia takashimae</i> , <i>Sporobolomyces coprosmae</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> e <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Agente de lise: incubação com DMSO por 12 horas + Vórtex Solvente: Acetona e éter de petróleo	Identificou os pigmentos extraídos em HPLC e espectro de massa. Não quantificou.	(Weber <i>et al.</i> , 2007)
	Solvente: DMSO, acetona, clorofórmio, éter de petróleo, hexano, testados	Determinado por espectrofotômetro e expresso	

<i>Rhodotorula glutinis</i>	separadamente.  Mistura de DMSO, éter de petróleo, acetona e solução de NaCl.	em carotenoides totais por célula seca. Éter de petróleo: 237,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DMSO: 226,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Acetona: 208,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Clorofórmio: 192,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Hexano: 190,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Mistura: 266,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	(Park <i>et al.</i> , 2007)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Agente de lise: pérola de vidro Solvente: metanol + ciclohexano Moinho + vórtex  Agente de lise: 7 dias as células submersas em água destilada para induzir a autólise + areia + vórtex Solvente: Acetato de etila	Identificou os pigmentos extraídos ( $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina) em HPLC. Não quantificou.	(Davoli e Weber, 2002)
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i> - 135, <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> - 137, <i>Rhodotorula graminis</i> , <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> - 108, <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> - 12, <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Sporobolomyces</i> .	Agente de lise: maceração com Hyflo supercel Solventes: Acetona + éter de petróleo.	Resultados de carotenoides totais determinados por espectrofotômetro para <i>Sporobolomyces</i> : 237 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou 72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de célula seca.	(Maldonado <i>et al.</i> , 2007)



Microrganismo	Metodologia de lise celular e extração de carotenóides	Resultados dos carotenoides totais	Referência
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<p>Método 1: Agente de lise: Ultrassom Solvente: Acetona</p> <p>Método 2: Agente de lise: moagem com areia de sílica Solvente: Acetona</p> <p>Método 3: Agente de lise: HCl Solvente: Acetona</p>	<p>Determinação por espectrofotômetro, valores expressos em carotenoides totais por célula seca.</p> <p>Ultrassom: 664 <math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> Moagem: 1.615 <math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> HCl: 4.650 <math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math></p>	(Gu <i>et al.</i> , 2008)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	<p>Método 1: Agente de lise: Ultrassom + Bicarbonato de sódio Solvente: Acetona: metanol (7:3, v/v)</p> <p>Método 2: Agente de lise: Ultrassom Solvente: Acetona: metanol (7:3, v/v)</p> <p>Método 3: Agente de lise: Bicarbonato de sódio Solvente: Acetona: metanol (7:3, v/v)</p> <p>Método 4: Agente de lise: Ácido clorídrico + acético + Lático Solvente: Acetona: metanol (7:3, v/v)</p>	<p>Determinação por espectrofotômetro expresso em carotenoides totais por litro de meio de cultivo.</p> <p>Ultrassom: 60,7 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math> Ultrassom + bicarbonato de sódio: 113,9 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math> Bicarbonato de sódio: 155,3 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math> Ácido láctico: 86,7 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math> Ácido acético: 69,0 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math> Ácido clorídrico: 94,3 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></p>	(Monks <i>et al.</i> , 2013)

Cada método apresenta vantagens e desvantagens, a eficácia de cada método depende da aplicação do produto e da qualidade exigida. As limitações dos processos convencionais são: altos custos de energia, elevado uso de solventes, longo tempo de extração, altas temperaturas afetando as substâncias termo instáveis, baixa seletividade e retenção de vestígios de solventes no soluto (MEZZOMO *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Extração mecânica

Os métodos mecânicos são os mais difundidos na indústria, no entanto, procedimentos enzimáticos e químicos são considerados de grande interesse (FONTANA *et al.*, 1996).

Medeiros *et al.* (2008) compararam a tradicional técnica de abrasão usada para ruptura celular em agitador tipo vórtex com o processo de ruptura celular conjugando ondas ultrassônicas e pérolas de vidro para extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081. Concluíram que o uso de ultrassom por um período de 40 minutos pode ser aplicado eficientemente para extração, substituindo assim, o tradicional método de ruptura por abrasão.

Ungureanu *et al.* (2013) pesquisaram um novo método para a recuperação de carotenoides (incluindo a torularrodina) direto do meio de cultura de *Rhodotorula rubra*. Os carotenoides foram extraídos por centrifuga de partição (extração sólido-líquido-líquido). Uma recuperação de 91 % de torularrodina foi obtida em poucos minutos e atingiu um valor de  $74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de biomassa. Os resultados mostraram o potencial desta técnica para a extração de carotenoides. O meio de cultura aquoso foi utilizado como a fase de transporte, com o consumo de solvente de extração moderado e tempo de extração curto.

### 2.3.2 Extração química

A extração com solventes é um possível substituto para ruptura mecânica devido à sua simplicidade, o processamento em curto espaço de tempo e o custo relativamente baixo (FONTANA *et al.*, 1996).

Um dos métodos utilizados para promover a ruptura celular de biocompostos intracelulares é a permeabilização celular que modifica a estrutura da membrana citoplasmática. Os agentes permeabilizantes podem diminuir o conteúdo das estruturas da membrana celular permitindo a passagem de solutos de baixo peso molecular para dentro e fora das células. Na literatura, diferentes solventes têm sido descritos

para a permeabilização de células, como o etanol, isopropanol, butanol e acetona (MONK *et al.* 2013).

Um dos principais objetivos da pesquisa realizada por Park *et al.* (2007) foi investigar o efeito de vários solventes na recuperação de carotenoides a partir de *Rhodotorula glutinis*. Os três principais solventes, nomeadamente, éter de petróleo, DMSO e acetona foram selecionados para posterior avaliação. O rendimento de extração variou entre o valor máximo de 237,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula para o éter de petróleo e o mínimo de 190,9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de biomassa para o hexano, o que representou uma diferença de 25 %. As diferenças nos resultados de extração poderiam ser atribuídas às diferenças na capacidade de um dado solvente em permeabilizar a parede da célula da levedura e /ou a solubilidade dos carotenoides num dado solvente. O melhor tratamento foi da combinação de DMSO, éter de petróleo e acetona obtendo 258,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula de *Rhodotorula glutinis*. Os pigmentos principais do extrato foram identificados como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina.

Um método simples para a extração de carotenoides pigmentados a partir de células frescas de leveduras vermelhas (Basidiomycota) foi proposto por Weber *et al.* (2007). A extração foi realizada por sucessivas incubações de células com DMSO e os solventes utilizados para a recuperação do extrato foi éter de petróleo e acetona. A análise em HPLC usando uma coluna C18 com um sistema de solventes: água/acetona foi descrito para a separação de  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, astaxantina e torularrodina. A identidade dos pigmentos foi confirmada através da espectrometria de massa.

Ungureanu *et al.* (2011) apresentaram um trabalho explicitando a técnica de extração de torularrodina de *Rhodotorula rubra* pelo procedimento clássico utilizando solventes. Este método compreendia na extração utilizando acetona, seguida por n-hexano a fim de separar o conteúdo total de carotenoides. O isolamento de torularrodina foi realizado utilizando metanol alcalino. Os carotenoides totais e as concentrações de torularrodina nos extratos foram determinados por espectrofotômetro.

### **2.3.3 Combinação de métodos mecânico e químico de extração**

A escolha de um método adequado para a extração de compostos bioativos intracelulares, incluindo pigmentos, é dependente de alguns aspectos, tais como, a resistência da parede celular, a localização intracelular, a estabilidade e a utilização final do composto. Métodos

mecânico, químico, enzimático, em alta pressão ou uma combinação destes métodos podem ser aplicados (FARCADE *et al.*, 2005).

Valduga *et al.* (2009b) testaram 11 métodos diferentes de recuperação de carotenoides. Constataram que ao utilizar a combinação de maceração das células com nitrogênio líquido e o uso de DMSO para ruptura celular, seguido pela extração com a mistura de solvente acetona: metanol (7:3, v/v) obtiveram a maior recuperação de carotenoides da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*.

Kaiser *et al.* (2007) investigaram a viabilidade, a produção e validação de um novo método de extração em pequena escala de carotenoides de *Micrococcus luteus* e *Rhodotorula glutinis*. Para a desintegração celular combinaram técnicas enzimática, mecânica (ciclos de ultrassom e congelamento) e química (DMSO). Para a extração foi utilizada uma mistura de metanol-clorofórmio estabilizada com hidroxitolueno butilado e alfa-tocoferol. A separação dos compostos foi realizada por HPLC. O método proporcionou uma análise sensível para a determinação de carotenoides a partir de bactérias e leveduras, e também para as pequenas mudanças no tipo de carotenoide de uma única espécie.

Fonseca *et al.* (2011) avaliaram o uso de abrasão com celite, pérolas de vidro em agitador vórtex, ultrassom, carbonato de sódio e dimetilsulfóxido (DMSO) como método de rompimento de células para recuperar astaxantina a partir de *Phaffia rhodozyma*. O método com carbonato de sódio não foi eficiente, entretanto, o agitador com pérolas de vidro, abrasão com celite e o choque de ultrassom foram considerados promissores para futuros estudos.

Monk *et al.* (2013) focou seus estudos na ruptura celular de *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) para libertar os carotenoides, por meio de tratamentos com ultrassom, enzimas e agentes químicos (bicarbonato de sódio, ácido clorídrico, acético e láctico). A quantidade máxima de carotenoides recuperados foi 572,70  $\mu\text{g.L}^{-1}$  obtidos por hidrólise enzimática. Os métodos químicos e de ultrassom para rompimento celular recuperaram apenas 26 % do montante recuperado utilizando hidrólise enzimática. Concluíram que o rompimento celular por ultrassom, sem combinação com outros agentes de lise, apresentou desempenho inferior.

Gu *et al.* (2008) comparou três métodos de extração de carotenoides (ultrassom, moagem com areia em agitador vórtex e HCl) de *Rhodobacter sphaeroides*. A extração com HCl foi a mais eficiente. As condições ideais para extração com HCl foram: temperatura de 30

°C, 40 ml de solvente por grama de célula seca e tempo de extração de 40 minutos.

Pennacchi *et al.* (2015) estudaram diferentes métodos de lise celular da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* H110, com o objetivo de otimizar a recuperação de pigmentos intracelulares. Foram utilizados três métodos de extração: vórtex (com pérolas de vidro ou pedras de quartzo), moinho planetário (com pérolas de vidro ou pedras de quartzo) e DMSO. Para cada um dos agentes de lise estudados foi desenvolvido um planejamento fatorial. Os resultados indicaram que o melhor método de extração de carotenoides totais ( $1,74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de células) foi utilizando o moinho planetário com 135 mg de pérolas de vidro e com frequência de agitação de 200 rpm. As análises indicaram que os métodos mecânicos estudados mostraram-se eficientes, no que diz respeito à laceração celular.

### 2.3.4 Extração supercrítica

Quando uma substância está sujeita a temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico, um gás altamente comprimido, conhecido como fluido supercrítico se forma. Os tratamentos com fluidos supercríticos são muito rápidos, pois apresentam boa transferência de massa em função da baixa viscosidade e alta difusividade do fluido supercrítico (TAYLOR, 1996).

O princípio do tratamento com fluido supercrítico é aproveitar as propriedades físicas dos líquidos e dos gases, no estado supercrítico. A densidade de um fluido supercrítico é de 100 a 1.000 vezes maior que a de um gás comparável a de um líquido. Assim, as interações moleculares podem ser fortes, permitindo diminuir suas distâncias intermoleculares e oferecendo maior capacidade de solvatação para várias substâncias químicas. Por conta da semelhança entre a viscosidade dos fluidos supercríticos e a dos gases, e por seu coeficiente de difusão ser maior que o dos líquidos, a extração das substâncias mediante a este processo é muito facilitada (KNOWLES *et al.*, 1988).

A temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando o quanto se eleve a pressão aplicada. Por outro lado, sua pressão crítica é definida como a pressão acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando o quanto se diminua a temperatura. É um estado intermediário da substância, isto é, entre o líquido e o gasoso. Nessas condições a substância é relativamente densa se comparada a um gás

convencional e suas forças de solubilização são mais intensas (TAYLOR, 1996).

Segundo Recansens *et al.* (1999) a extração com fluidos supercríticos sofre influência da temperatura, pressão, tamanho da partícula, velocidade superficial do fluido, densidade e natureza do solvente. Sendo que a taxa de extração é maior, quanto maior a solubilidade do soluto no solvente.

Existe uma ampla variedade de compostos que podem ser usados como fluido supercrítico. Dentre os gases mais utilizados podemos citar o propano e o dióxido de carbono. O CO<sub>2</sub> apresenta pressão crítica moderada de 72,85 bar e baixa temperatura crítica 31 °C, ideal para muitos compostos termossensíveis. Já o propano apresenta pressão de 41,85 bar e temperatura crítica de 97 °C. As vantagens do uso do CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico é que ele é atóxico, não inflamável, alta pureza e disponível a baixo custo. Considerando estas características, o CO<sub>2</sub> é um solvente ideal para alimentos, corantes, produtos farmacêuticos e indústrias de cosméticos (MONK *et al.*, 2012; MACHMUDAH *et al.*, 2008).

A extração com fluido supercrítico apresenta numerosas vantagens sobre as técnicas convencionais, tais como, o uso de baixas temperaturas, menor consumo de energia, eficiência na utilização de solventes reutilizáveis, prevenção de reações de oxidação e de alta qualidade do produto, pois, não contém traços de solvente após a extração. É um processo flexível, devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solubilidade e da seletividade do solvente, através da escolha de parâmetros de processamento. É também considerada uma tecnologia limpa, sem poluir o meio ambiente. Apesar das vantagens conhecidas do processo, o uso da tecnologia supercrítica tem uma restrição econômica devido ao elevado custo de investimento inicial inerente às instalações do processo (MACHMUDAH *et al.*, 2008; MEZZOMO *et al.*, 2013).

Na literatura não há muitos relatos da utilização de fluidos pressurizados na ruptura celular e \ou extração de carotenoides intracelulares produzidos por levedura. Montero *et al.* (2005) avaliaram a ruptura e extração de carotenoides a partir de microalgas: *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina pacifica* e *Gaditana nannochloropsis* empregando CO<sub>2</sub> supercrítico. Também há relatos da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico na extração de carotenos da cenoura (VEGA *et al.*, 1996), de carotenoides de frutos de pitanga (FILHO *et al.*, 2008), de licopeno de culturas *Blakeslea trispora* NRRL 2895 e 2896 (CHOUDHARI e SINGHAL, 2008), de astaxantina de leveduras

vermelhas *Phaffia rhodozyma* (LIM *et al.*, 2002), de extração com fluido supercrítico de fração de carotenoides de resíduo de camarão-rosa (MEZZOMO *et al.*, 2013) e do uso de fluido comprimido na ruptura celular e extração de carotenoides da levedura vermelha *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 (MONK *et al.*, 2012).

Podem ser encontrados na literatura alguns estudos sobre a extração supercrítica de carotenoides utilizando CO<sub>2</sub> em diferentes matrizes naturais, no entanto, há relativamente pouco conhecimento acerca da seletividade deste solvente para os diferentes carotenoides, Quadro 3.

Quadro 3. Parâmetros de extração supercrítica de alguns materiais naturais encontrados na literatura.

Materiais	Nome botânico	Compostos analisados	T (°C)	P (bar)	T (min.)
Algas marinhas	<i>Nannochloropsis Gaditana</i>	Carotenoides, clorofila <i>a</i>	40-50-60	100 e 500	180
Microalga marinha	<i>Spirulina Pacifica</i>	Zeaxantina, criptoxantina, $\beta$ -caroteno	40-60-80	150-250-350	40-70-100
Microalga	<i>Chlorella vulgaris</i>	Astaxantina, cantaxantina	40-55	200-350	-
Abóbora	<i>Curcubita moschata</i>	$\alpha$ - $\beta$ -caroteno, criptoxantina, <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno	40-80	310-350-500	40
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	Lipídios, carotenoides	40-55	200-300	95-210
Resíduos de tomate	-	$\beta$ -caroteno, licopeno	35-45-55-65	200-250-300	60 e 180
Tomate	-	Licopeno	32 e 86	137,8 e 482,6	-
Tomate	Tipo de Pêra	Licopeno	40	77-280	30
Pimentas e pimentões	Var. <i>Byedige</i>	Carotenoides, outros pigmentos	40-80	100-400	330-1182
Cenoura	-	$\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno	30-40-50	300-400-500	60
Tecido de batata doce	-	$\beta$ -caroteno	38 e 48	138-414	-
Fibra de óleo de palma prensada	<i>Elaes guineensis</i>	$\beta$ -caroteno, lípidos	45-55	250-300	-

Fonte: Filho *et al.* (2008).



Macías-Sánchez *et al.* (2009) avaliaram os efeitos de pressão, temperatura e adição de um co-solvente ao dióxido de carbono supercrítico para a recuperação de carotenoides em três microalgas. Os resultados obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico indicam que as condições ótimas de extração, para *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*, foram de 400 bar e 60 °C, enquanto que para *Synechococcus sp.* os melhores resultados foram obtidos a 300 bar e 50 °C. A adição de etanol (5 % m/m) ao dióxido de carbono supercrítico como co-solvente aumentou o rendimento de extração de carotenoides.

Monk *et al.* (2012) investigaram diferentes estratégias de extração de carotenoides pigmentados da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). A ruptura celular foi realizada utilizando o DMSO e dois fluidos puros comprimidos (dióxido de carbono e propano) e também a combinação de fluido pressurizado e tratamento com DMSO. Diclorometano, etanol, acetato de etila e acetona foram testados como solvente para a extração dos carotenoides. Os resultados obtidos mostraram que o uso de múltiplos solventes apresenta um efeito sinérgico no conteúdo de carotenoides extraídos. A concentração máxima de carotenoides totais (2,875 µg.L<sup>-1</sup>) foi obtida no tratamento aplicando CO<sub>2</sub> supercrítico (300 bar / 120 min.) seguido pela ruptura celular com DMSO. A extração foi realizada utilizando acetona/metanol (7:3, v/v) como solvente.

A extração com dióxido de carbono supercrítico foi pesquisada por Lim *et al.* (2002) para a extração de astaxantina de células de leveduras vermelhas *Phaffia rhodozyma* liofilizadas. Os efeitos de pressão (102 – 500 bar), temperatura (40, 60 e 80 °C), vazão de CO<sub>2</sub> (velocidades superficial de 0,27 e 0,54 cm.min.<sup>-1</sup>) e o uso de álcool etílico como co-solvente (1,5; 10; 15 % do volume de solvente) foram determinados para a eficiência da extração. O rendimento mais elevado de astaxantina (84 %) e de carotenoides (90 %) foi obtido utilizando 50 g de CO<sub>2</sub>, em 40 °C e 500 bar.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC e no Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Departamento de Biotecnologia Industrial – Universidade Positivo, Curitiba, com apoio financeiro do CNPq.

#### 3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* H110, cepa selvagem isolada no *Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés*, Nancy, França, em 2001 (RAZAVI e MARC, 2006). A levedura foi cultivada a 27 °C, em meio de cultura *Yeast Malt* (YM) e conservada a -20 °C. Repiques semestrais da cepa foram realizados com o intuito de manter o bom estado fisiológico.

#### 3.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura adotado foi de acordo com Cardoso (2008). O *Yeast Malt* é um meio rico em fontes de nitrogênio e carbono, sua composição, com adição de sais, está determinada na Tabela 2. A forma sólida do meio foi obtida acrescentando 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar ao meio líquido. O substrato utilizado foi glicose em concentração de 33 g.L<sup>-1</sup>.

Tabela 2. Composição do meio de cultura YM modificado.

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	33,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,5
Extrato de levedura	1,0
Peptona	0,5
Água destilada	Até completar 1L

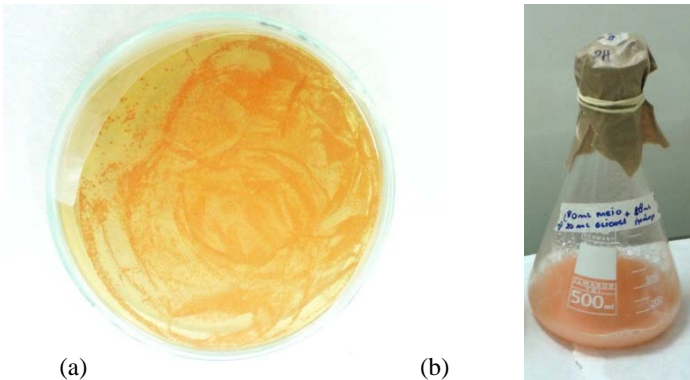
Fonte: Cardoso (2008).

### 3.3 CULTIVO DA LEVEDURA

#### 3.3.1 Pré-cultura

A metodologia praticada foi adaptada de Cardoso (2008). A primeira etapa consistiu na preparação do inóculo I (Figura 11). Frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 150 mL de meio líquido de YM, foram inoculados com a cultura de *Sporobolomyces ruberrimus* conservada em meio YM sólido (Figura 10), utilizando alça de platina. Os frascos foram autoclavados durante 20 min, a 120 °C e incubados em agitador orbital horizontal (Incubadora TE-420, Tecnal - Brasil) a 27 °C, 210 rpm, com duração de 64 horas.

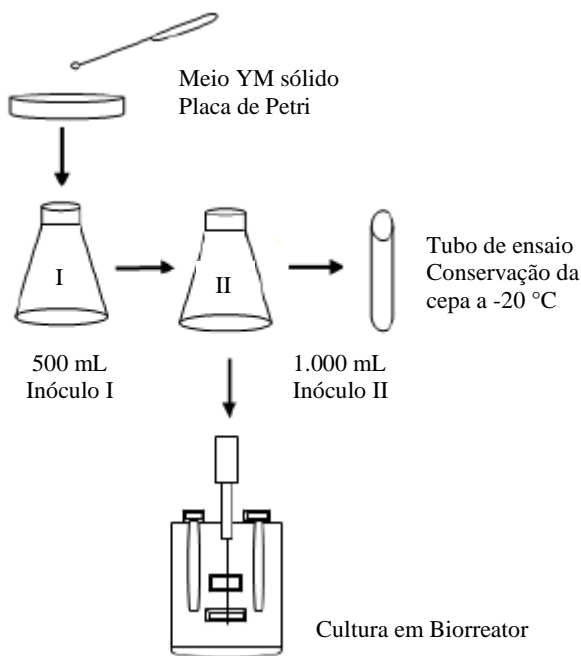
Figura 10. Cultura de *S. ruberrimus* em meio YM sólido (a) em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL (b).



Fonte: Autor.

Na segunda etapa, frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL, contendo 200 mL de meio líquido de YM foram inoculados com a suspensão de leveduras, correspondendo a 10 % do volume total do cultivo. Esses frascos foram incubados nas mesmas condições do inóculo I. Esta cultura foi utilizada como inóculo da fermentação em biorreator, Figura 11. Para cada cultivo em biorreator um novo inóculo foi preparado.

Figura 11. Diferentes etapas de pré-cultura para o cultivo em biorreator.



Fonte: Adaptado de Cardoso (2008).

O pH do meio de cultivo foi ajustado a 6,0 utilizando soluções de hidróxido de sódio (NaOH - 2N) ou ácido fosfórico ( $H_3PO_4$  - 2N) e não foi controlado durante o processo de fermentação em frascos.

Para a conservação da cepa, 8 mL do inóculo II foram acondicionados em tubos de ensaio esterilizados e conservados a -20 °C.

### 3.3.2 Condições de cultivo descontínuo em biorreator

Ensaios foram realizados em biorreator de 7,5 L (Tecnal – TEC-BIO-T, Brasil) com volume útil de 4 L, Figura 12. As condições de cultivo constantes foram: temperatura de 27 °C, pH 6 e concentração de glicose. A concentração de oxigênio dissolvido variou de 20, 50 e 80 %.

O sistema de transferência de oxigênio constante foi assegurado pelo controle da agitação e aeração do meio de cultivo. A frequência de rotação do motor variou entre 200 a 800 rpm e a vazão de aeração foi

fixado a um volume de ar por volume de meio por minuto (vvm). Logo, a vazão de ar injetado foi de 4 L por minuto. Não foi utilizado oxigênio puro no sistema de aeração.

O pH do meio foi ajustado com a adição de solução de NaOH (2N) ou  $H_3PO_4$  (2N). A temperatura constante foi mantida pela circulação de água termo regulada por uma jaqueta d'água.

O biorreator contendo 3,6 L de meio YM enriquecido, composição descrita na Tabela 2, foi inoculado com 400 mL de pré-cultura cultivada conforme procedimento descrito no item 3.3.1, inóculo II. Para controlar a formação de espuma no biorreator foi adicionado no meio de cultivo antiespumante orgânico (Hodag K-60K), adequado para aplicações de aditivos alimentares diretos e indiretos.

Figura 12. Foto do biorreator - 7,5 L (Tecnal – TEC-BIO-T, Brasil).



Fonte: Autor.

### 3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

Como os carotenoides estão armazenados no interior das células da levedura *S. ruberrimus* (carotenogênese intracelular) foram testados diferentes métodos de ruptura celular, a fim de avaliar o rendimento da extração dos pigmentos.

### 3.4.1 Definição da técnica de extração de pigmentos, em escala laboratorial, para quantificar a produção de metabólitos

As amostras utilizadas foram fermentadas em frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL, contendo 200 mL de meio líquido de *Yeast Malt* enriquecido conforme composição descrita na Tabela 2. O inóculo correspondeu a 10 % do volume total de cultivo. Os frascos foram incubados em agitador orbital horizontal (Incubadora TE-420, Tecnal - Brasil) a 27 °C, 210 rpm, com duração de 64 horas.

No término da fermentação, 2 mL de meio de cultura foram inseridos em tubos *ependorf* e centrifugados (Hsiangiai Machinery - MCD 2000) a 3.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram congeladas a - 20 °C.

Cinco métodos de extração foram testados utilizando agente de lise químico e mecânico, Quadro 4. Para definir a metodologia de extração foram determinados os carotenoides totais e específicos, o rendimento global, além da análise em cromatografia em fina camada do extrato obtido. As células após os tratamentos de ruptura foram liofilizadas e observadas quanto a sua morfologia, em microscopia eletrônica de varredura. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Quadro 4. Métodos de extração de carotenoides com agentes de lise mecânico, químico e combinado.

N	Tratamento
1	Pérola de vidro e vórtex
2	DMSO e vórtex
3	DMSO, pérola de vidro e vórtex
4	DMSO e ultrassom
5	DMSO, ultrassom, pérola de vidro e vórtex

Fonte: Autor.

Os experimentos relativos ao tratamento 1, ruptura celular por ação mecânica utilizando pérola de vidro (1-2 mm), foram realizados seguindo a metodologia descrita por Sedmak *et al.* (1990) com modificações. A moagem foi realizada em agitador vórtex (AP 56 - Brasil), com 0,20 g de pérolas de vidro até a completa extração dos carotenoides. As extrações foram efetuadas utilizando a mistura de solvente éter de petróleo: acetona (7:3, v/v).

As extrações de carotenoides utilizando dimetilsulfóxido como agente de lise foram adaptadas de acordo com o procedimento relatado por Sedmak *et al.* (1990). No segundo tratamento, 0,5 mL de DMSO foram adicionados ao tubo *eppendorf* contendo as células e agitados em vórtex (AP 56 – Brasil) com 1 mL da mistura de solvente éter de petróleo: acetona (7:3, v/v), até extrair completamente os pigmentos.

Já o terceiro tratamento, mesclou as técnicas de extração utilizando agente químico e mecânico. 0,5 mL de DMSO, 0,20 g de pérola de vidro (1-2 mm) e 1 mL da mistura de solvente éter de petróleo: acetona (7:3, v/v) foram adicionados às células e agitados em vórtex (AP 56 – Brasil) até as células perderem a pigmentação.

As extrações de carotenoides utilizando DMSO e banho de ultrassom foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por Medeiros *et al.* (2008), com modificações. O banho de ultrassom empregado foi Unique Ultra Sonic Cleaner-750 com frequência de 25 kHz. No quarto tratamento, 0,5 mL de DMSO e 1 mL da mistura de solvente éter de petróleo: acetona (7:3, v/v) foi adicionada ao tubo *eppendorf* contendo as células e mantidos em banho de ultrassom durante 40 minutos.

No último tratamento, 0,5 mL de DMSO e 1 mL da solução de éter de petróleo: acetona (7:3, v/v) foram mantidos em banho de ultrassom durante 40 minutos. Após essa primeira etapa de ruptura celular, acrescentou-se 0,20 g de pérola de vidro (1-2 mm) e a agitação foi realizada em vórtex (AP 56 – Brasil) até a completa extração dos carotenoides.

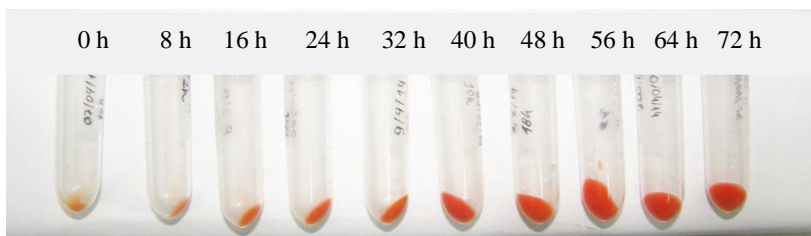
Nos cinco experimentos descritos acima, o sobrenadante foi obtido por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Mini Spin - Eppendorf, AG 22331). Uma amostra de 0,5 mL do extrato foi evaporada a 35 °C em estufa a vácuo (Estufa a vácuo- MA 030) e os pigmentos foram solubilizados em 1,0 mL de éter de petróleo para a quantificação dos carotenoides totais e específicos.

#### **3.4.2 Extração mecânica de carotenoides para o estudo da cinética de produção de pigmentos**

Dois mililitros de amostra foram coletados a cada 8 h de fermentação em biorreator (conforme descrito no item 3.3.2), centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Mini Spin - Eppendorf, AG 22331) e o sobrenadante foi utilizado para quantificar o substrato, Figura 13.



Figura 13. Amostras de células recuperadas a cada 8h de fermentação em biorreator, a 50 % de oxigênio dissolvido, para extração de pigmentos.



Fonte: Autor.

A extração dos carotenoides foi realizada pela técnica de ruptura celular por ação mecânica de abrasão. Em um *eppendorf* contendo a amostra foi adicionado 20 g de pérola de vidro (1-2 mm), um mililitro da mistura de solvente éter de petróleo: acetona (7:3, v/v). A extração foi realizada agitando vigorosamente os tubos em agitador vórtex (AP 56 – Brasil) até a completa extração dos carotenoides, isto é, até as células ficarem incolor.

Para obter o extrato pigmentado, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, por 15 minutos (Centrífuga Mini Spin - Eppendorf, AG 22331) e 0,5 mL do sobrenadante foi evaporado a 35 °C em estufa a vácuo (MA 030). O extrato foi solubilizado em 1,0 mL de éter de petróleo para a quantificação dos carotenoides totais e específicos.

### 3.4.3 Extração supercrítica

Após 72 h de fermentação em biorreator, as amostras das células pigmentadas foram centrifugadas (centrífuga MPW – 350R) a 4.000 rpm (1566 G), por 20 minutos, a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi congelada em congelador *freezer* a -20 °C. As células foram liofilizadas (Liofilizador L101 Liotop/ Brasil) por 48 horas e estocadas a -20 °C, Figura 14.

Figura 14. Amostras de células liofilizadas produzidas em biorreator, com concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.



Fonte: Autor.

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) da UFSC.

Os parâmetros operacionais de extração supercrítica (ESC) praticados foram adaptados de Monks (2013). A pressão aplicada foi de 300 bar, temperatura de 35 °C, tempo de extração de 2 h, vazão fixa de solvente de  $8,3 \pm 2 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$  e a vazão do co-solvente correspondeu a 5 % (m/m) do volume de solvente.

O solvente empregado foi o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a 99,9 % de pureza, fornecido pela White Martins, Brasil. Os co-solventes utilizados foram a solução de éter de petróleo (P.A.): acetona (P.A.) (7:3, v/v) e etanol (P.A.). Os experimentos foram realizados no modo dinâmico, isto é, o  $\text{CO}_2$  supercrítico passou pela matriz sólida de forma contínua.

Cinco gramas de células liofilizadas, com ou sem pré-tratamento (Quadro 5), foram utilizados para o preenchimento do leito de extração. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão, para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração, e o espaço restante da coluna de ESC, precedente ao leito de partículas, foi preenchido com esferas de vidro.

Quadro 5. Tratamento experimental para extração supercrítica.

N	Pré-tratamento	Co-solvente
1	Sem tratamento	Éter de petróleo: acetona (7:3,v/v)
2	Maceração após congelamento com nitrogênio líquido	Éter de petróleo: acetona (7:3,v/v)
3	Maceração após congelamento com nitrogênio líquido	Etanol

Fonte: Autor.

A unidade de extração utilizada foi composta por um reservatório de solvente, um banho termostático (Microquímica-MQBTZ99-20), uma bomba de ar impulsionado (Maximator M111, Alemanha) e uma célula de aço inoxidável de 32 cm de comprimento e capacidade de 100 cm<sup>3</sup> (Figura 15). A temperatura foi controlada por um banho termostato (Microquímica-MQBTZ99-20), enquanto que o fluxo de solvente foi ajustado e monitorado por válvulas de alta pressão, reguladores e manômetros. Para a adição de co-solvente ao aparato experimental, uma bomba de co-solvente (Constametric 3200, USA), que opera em vazões de 0,1 até 10 mL. min<sup>-1</sup>, foi acoplada ao equipamento.

Os extratos obtidos das ESC passaram pelo processo de eliminação de solvente, em rota evaporador (ISATOM – 801/802) com arrefecimento (MQBTZ99-20) e controle de vácuo (NT613). A temperatura de evaporação foi ajustada a 35 °C e o vácuo calibrado em 650 mmHg. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador *freezer* à -20 °C para futuras análises.

Os experimentos foram efetuados em duplicata e os resultados foram expressos em rendimento global (%) e concentração de carotenoides totais. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia em fina camada.

Figura 15. Aparato experimental de ESC do LATESC, utilizado na extração dos carotenoides.



Fonte: Autor.

## 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.5.1 Coleta de amostras

A coleta de 15 mL de amostra ocorreu a cada 4 h. O volume obtido foi distribuído para as seguintes análises: 6 mL para extração dos carotenoides e o sobrenadante para a quantificação de glicose, 2 mL para determinação da biomassa e 4 mL de amostra foram congeladas.

### 3.5.2 Determinação da concentração de biomassa

A concentração em biomassa da levedura *S. Ruberrimus* foi estimada por uma correlação entre a concentração celular mássica por volume de meio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a medida da densidade ótica (DO), a 600 nm.

A concentração celular mássica foi determinada pelo método gravimétrico, que consiste em conhecer a massa de células secas resultante de soluções de densidade ótica conhecidas.

O procedimento consistiu em filtrar em Funil de *Buchner* 5 mL de cultura, em membrana de acetato de celulose (poro de 0,45  $\mu\text{m}$ )

previamente seca (estufa a 60 °C por 24 h) e pesada. Após a filtração, a membrana foi seca a 105 °C até peso constante.

A fim de conhecer a massa seca de biomassa presente inicialmente na amostra, a nova massa da membrana foi determinada, após o resfriamento em dessecador. Calculou-se a diferença de massa expressa em  $\text{g.L}^{-1}$ . A análise foi realizada em triplicata.

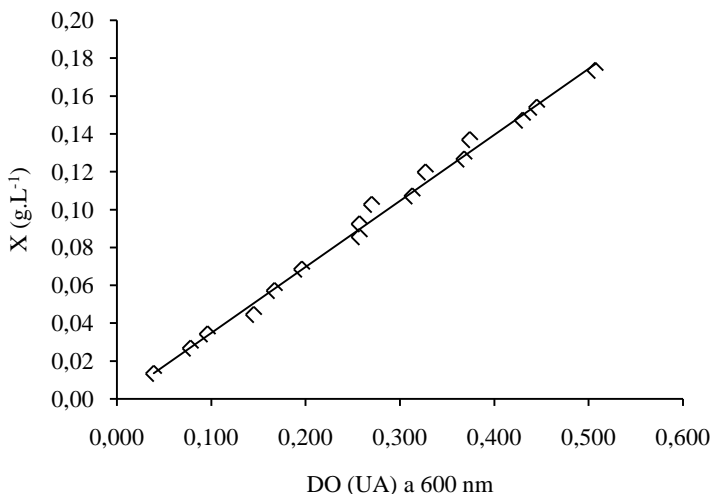
A concentração da biomassa foi estimada pelo método de análise de espectrometria. A precisão desse método é mais elevada quando a absorção está entre 0,1 e 0,5 UA, produzindo uma relação linear entre o número de células e a absorbância.

Desta maneira, fez-se necessário diluir a amostra em concentrações de modo que a leitura da DO estivesse dentro do intervalo de precisão. A análise foi realizada em espectrofotômetro (Spectrophotometer UV - 1601, Shimadzu) a 600 nm. A correlação foi expressa pela regressão linear, equação (1), da Figura 16, com coeficiente de determinação igual a 0,984.

$$y = 0,361 x \quad (1)$$

Onde  $y$  corresponde à concentração de biomassa em gramas por litro e  $x$  a densidade ótica em unidade de absorbância (UA).

Figura 16. Correlação entre densidade ótica (DO) a 600 nm e a concentração celular mássica de *S. ruberrimus*.



Fonte: Autor.

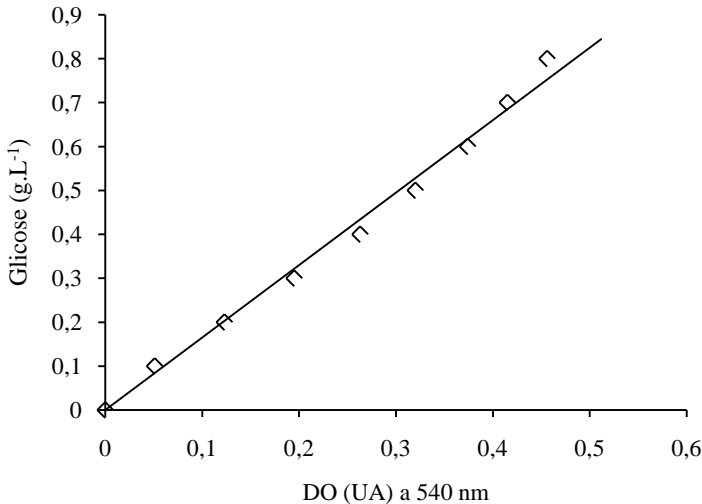
### 3.5.3 Determinação de substrato (açúcar redutor DNS)

Para a determinação do substrato foi utilizada a metodologia proposta por Miller (1959) para a quantificação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), em espectrofotômetro (Spectrophotometer UV -1601, Shimadzu), a 540 nm e comparado com a curva padrão de glicose, na faixa de 0,2 a 1,0 g.L<sup>-1</sup>. A correlação foi expressa pela equação (2) com o coeficiente de determinação correspondendo a 0,990 (Figura 17).

$$y = 1,649 x \quad (2)$$

Onde  $y$  corresponde à concentração de glicose em gramas por litro e  $x$  a densidade ótica em unidade de absorbância (UA).

Figura 17. Correlação entre a concentração da solução de glicose (g.L<sup>-1</sup>) e a densidade ótica (DO) a 540 nm.



Fonte: Autor.

### 3.5.4 Determinação de carotenoides totais

Os carotenoides totais foram determinados após a etapa de extração dos pigmentos.

Os pigmentos foram solubilizados em éter de petróleo e determinados por espectrofotômetro UV-visível (Hitachi U-2900, China). O valor de máxima absorvância foi obtido pela varredura do comprimento de onda entre 350 nm a 600 nm. A concentração de carotenoides totais foi estimada na absorvância máxima de 480 nm, utilizando a equação (3) descrita por Davies (1976).

$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ de célula seca}) = \frac{\lambda_{m\acute{a}x} \cdot V \cdot 10^4}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \cdot W} \quad (3)$$

Onde  $\lambda_{m\acute{a}x}$  é a absorvância máxima (UA),  $V$  (mL) é o volume de solvente,  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  é 2.592 para éter de petróleo e  $W$  (g) é a massa de célula seca do *S. ruberrimus*.

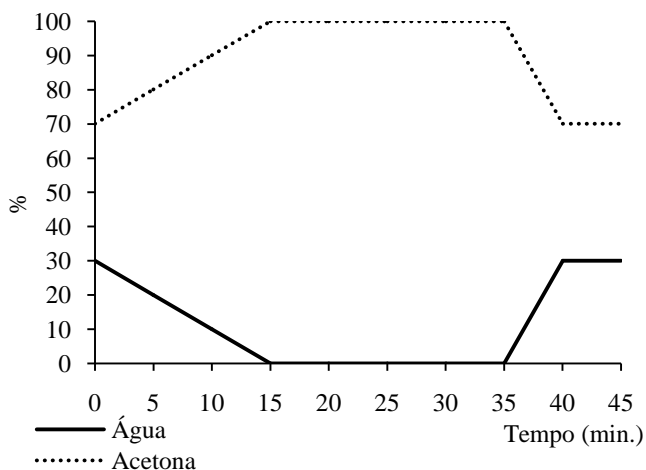
Os valores dos carotenoides totais apresentados nos resultados das curvas de cinética de produção de metabólitos foram determinados pelo somatório dos três principais pigmentos individuais (Torularrodina, toruleno e  $\beta$ -caroteno) estimada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores foram expressos em miligrama de carotenoides totais por litro de meio de cultivo.

### 3.5.5 Determinação de carotenoides específicos

A determinação da concentração dos carotenoides específicos do extrato obtido solubilizado em acetona e filtrado em filtro seringa de 22  $\mu\text{L}$  foi estimada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os parâmetros operacionais da análise foram os propostos por Weber *et al.* (2007), com modificações. O equipamento utilizado foi o Shimadzu SPD -20A - UV/ VIS, com Coluna Vertisep GES C18 (4,6 mm \* 250 mm \* 5  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel utilizada foi acetona HPLC (Vertec - 99,8 %), com o gradiente de solvente A (acetona) e B (água) 70:30 (A:B) mantidos por 5 min, chegando a 100:0 (A:B) aos 15 min e mantidos por 20 min, retornando a 70:30 (A:B) após 40 min (Figura 18). A vazão foi de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40 °C e detecção foi determinada no comprimento de onda de 480 nm. O volume de injeção da amostra correspondeu a 10  $\mu\text{L}$ .

Figura 18. Perfil do eluente água/ acetona utilizado para a separação dos carotenoides em HPLC.



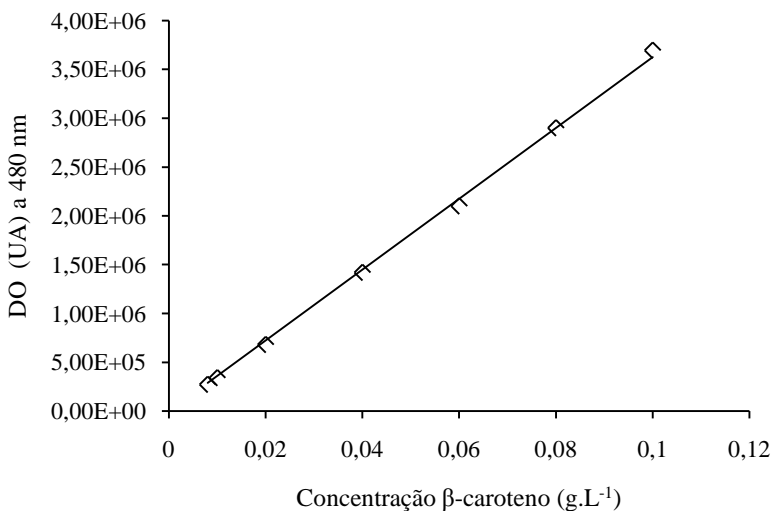
Fonte: Autor.

Uma curva de calibração do  $\beta$ -caroteno foi construída a partir de uma solução padrão de concentrações entre 0,008 a 0,1 g.L<sup>-1</sup>. A equação da regressão linear obtida expressou a correlação entre a unidade de absorbância (y) e a concentração de  $\beta$ -caroteno, em gramas por litro, equação (4). O coeficiente de determinação correspondeu a 0,999 (Figura 19).

$$y = 36.260.037,448 x \quad (4)$$



Figura 19. Correlação entre a concentração de  $\beta$ -caroteno ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a unidade de absorvância (UA), a 480 nm. Condições cromatográficas citadas no texto.



Fonte: Autor.

Apenas o  $\beta$ -caroteno foi utilizado como padrão, pois foi o único carotenoide disponível neste estudo, dentre os produzidos pela levedura *S. ruberrimus*. Assim, antes de cada série de análise no HPLC, uma amostra de  $0,008 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno foi injetada para a normalização da concentração dos outros carotenoides, assumindo uma resposta proporcional de todos os carotenoides em UA.

### 3.5.6 Determinação do rendimento global de extração

O rendimento global de extração é definido como a quantidade de extrato extraível presente na matriz sólida, referente a uma dada condição de extração. O rendimento das extrações foi calculado através da razão entre a massa de extrato obtida e a massa de amostra utilizada na extração.

### 3.5.7 Análise dos carotenoides em cromatografia em fina camada

As análises em cromatografia em fina camada (TLC) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Park *et al.* (2007). Placas de sílica em gel (Sílica em gel 60, F<sub>254</sub>, Merck, Alemanha) foram

empregadas como fase estacionaria e como fase móvel hexano: acetona (7:3, v/v). Uma amostra de 20  $\mu$ L de extrato de carotenoides solubilizados em éter de petróleo: acetona (7:3, v/v) foi analisada.

### 3.5.8 Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a obtenção de informações estruturais e averiguação de modificações após os tratamentos de rompimento celular, as células foram recuperadas, liofilizadas (Liotop L101, Brasil) por 24 h, armazenadas a -20 °C e submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As análises do MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras (Quadro 6) foram fixadas em stub de metal, revestidas com uma fina camada de ouro (LEICA EM SCD - 500) e levadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV) ajustado para uma tensão de aceleração de 15 kV. As imagens foram gravadas e digitalizadas.

Quadro 6. Amostras submetidas à análise do MEV.

Ensaio	Tratamentos
1	Célula sem tratamento
2	Célula após ruptura celular com pérola de vidro e vórtex
3	Célula após ruptura celular com DMSO e vórtex
4	Célula após ruptura celular com DMSO e ultrassom
5	Célula após ruptura celular com DMSO, ultrassom, pérola de vidro e vórtex

Fonte: Autor.

## 3.6 PARÂMETROS CINÉTICOS

As relações utilizadas nos cálculos dos parâmetros cinéticos foram baseadas nas equações apresentadas por Schmidell *et al.* (2001).

Para cada tratamento (fermentação com concentração de 20, 50, 80 % de oxigênio dissolvido), os parâmetros cinéticos relativos à evolução da biomassa, ao consumo de substrato (glicose) e a produção de carotenoides totais (produto) foram acompanhados ao longo do tempo.

### 3.6.1 Velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) dos ensaios em biorreator, durante a fase exponencial de crescimento, foi calculada a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano ( $\ln X$ ) da biomassa residual com o tempo ( $t$ ), de acordo com a equação (5).

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\text{máx}} * t \quad (5)$$

Onde  $X$  corresponde à biomassa ao longo da fase exponencial ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $X_0$  a biomassa no início da fase exponencial ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\mu_{\text{máx}}$  a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ ) e  $t$  o tempo (h).

### 3.6.2 Velocidades específicas

As velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de pigmentos, nos ensaios em biorreator, foram determinadas pelas equações (6), (7), (8), respectivamente. O cálculo foi realizado a partir da derivada do polinômio, ajustado à curva de crescimento pelo alisamento dos resultados (Apêndice).

Devido ao fato de que a concentração microbiana ( $X$ ) aumenta durante um cultivo descontínuo, elevando conseqüentemente à concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato ( $S$ ) no produto ( $P$ ), as velocidades específicas de transformação referem-se à concentração microbiana em um dado instante, conforme indicam as expressões:

$$\mu_x = \frac{1}{X} * \frac{dx}{dt} \quad (6)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} * \left(-\frac{dS}{dt}\right) \quad (7)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} * \frac{dP}{dt} \quad (8)$$

Sendo que  $\mu_x$  é a velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ),  $\mu_S$  é a velocidade específica de consumo de substrato, expresso em grama de

substrato por grama de célula por hora,  $\mu_P$  é a velocidade específica de produção de carotenoides totais em miligrama de carotenoides totais por grama de célula por hora e  $t$  é o tempo em horas.

### 3.6.3 Fatores de conversão

Considerando um determinado tempo ( $t$ ) de fermentação, os correspondentes valores de biomassa ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e produto ( $P$ ) foram relacionados entre si através dos fatores de conversão, definidos pelas equações (9), (10), (11).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (9)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad (10)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (11)$$

Onde  $X_0$ ,  $S_0$  e  $P_0$  são as concentrações iniciais de biomassa, de substrato e de produto definidos no início do cultivo.

### 3.6.4 Produtividade média

A produtividade média de células foi determinada pela diferença entre a maior concentração celular ( $X_{\text{máx}}$ ) em ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a concentração inicial de células ( $X_0$ ) em ( $\text{g.L}^{-1}$ ) dividido pelo intervalo de tempo final de fermentação ( $t_f$ ) em (h), conforme a equação (12).

$$P_{\text{células}} (\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{X_{\text{Máx}} - X_0}{t_f} \quad (12)$$

A mesma definição foi aplicada para o cálculo da produtividade de pigmentos ( $P_{\text{produto}}$ ), equação (13).

$$P_{\text{Produto}} (\text{mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{P_{\text{Máx}} - P_0}{t_f} \quad (13)$$

### 3.6.5 Classificação dos processos fermentativos

Os comportamentos relativos das funções  $\mu = \mu(t)$  fornecem a base para uma importante classificação dos processos fermentativos proposta por Garden (1955).

Quando a curva da velocidade específica de crescimento do microrganismo correlaciona muito bem com a curva de formação de metabólito, classifica-se este processo como associado ao crescimento e pode ser expresso pela equação (14):

$$\mu_p = \alpha * \mu_x \quad (14)$$

Luedeking e Piret (1959) obtiveram uma expressão empírica (15) que relacionaram a velocidade específica de formação de produto com a velocidade específica de crescimento do microrganismo.

$$\mu_p = \alpha * \mu_x + \beta \quad (15)$$

Onde  $\alpha$  representa a constante empírica que descreve a dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular e  $\beta$  a constante empírica que descreve a não dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular.

Essa equação indica a existência de dois mecanismos de formação de produto: um deles associado à multiplicação microbiana (representada pela parcela  $\alpha * \mu_x$ ) e o outro independente ao crescimento do microrganismo (representado pelo termo  $\beta$ ).

O processo é classificado como não associado ao crescimento, quando a velocidade específica de formação de produto correlacionada com a velocidade específica de crescimento do microrganismo expressa apenas o termo independente ao crescimento ( $\beta$ ), conforme equação (16).

$$\mu_p = \beta \quad (16)$$

### 3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey Post-hoc* com auxílio do software Statistica versão 8.0, com nível de significância de 95% de confiança, ( $p < 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados referentes à cinética microbiana de *Sporobolomyces ruberrimus* em biorreator sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e frequência de agitação no meio de cultivo, definição da técnica de extração de pigmentos, quantificação da produção de carotenoides totais e específicos e a extração de carotenoides utilizando a tecnologia supercrítica.

### 4.1 CINÉTICA MICROBIANA

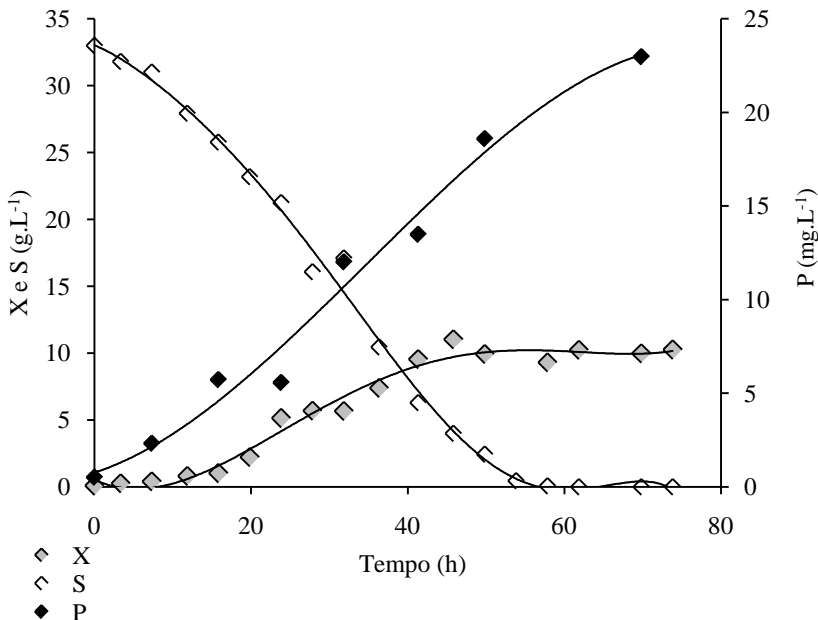
A influência do efeito de três diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (20, 50 e 80 %) no meio de cultivo visando gerar um ambiente de estresse oxidativo (radicais livres) foi estudada através dos parâmetros da cinética microbiana da levedura *Sporobolomyces ruberrimus*.

#### 4.1.1 Estudo da cinética microbiana, em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo

Para elucidar a produção de pigmentos em biorreator na concentração de 20 % de oxigênio dissolvido foram avaliados os parâmetros da cinética de *S. ruberrimus*. A Figura 20 apresenta o comportamento do consumo de substrato, crescimento microbiano e produção de carotenoides totais ao longo das 72 h de fermentação.

Observou-se o consumo gradativo de glicose até 60 h de fermentação, quando então, esta se esgotou. O cultivo foi iniciado com uma concentração de biomassa inicial de  $0,087 \text{ g.L}^{-1}$ , chegando a uma concentração máxima de  $11,036 \text{ g.L}^{-1}$ , em aproximadamente 46 h.

Figura 20. Consumo de substrato (S), crescimento celular (X) e produção de carotenoides totais (P), ao longo de 72 h de fermentação em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.



A produção de carotenoides totais elevou com o tempo e atingiu a concentração máxima de  $22,967 \text{ mg.L}^{-1}$ , em 72 h de fermentação (Figura 20). Como observado neste estudo, Razavi e Marc (2006) também obtiveram a produção máxima de pigmentos na levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, após a fase exponencial de crescimento.

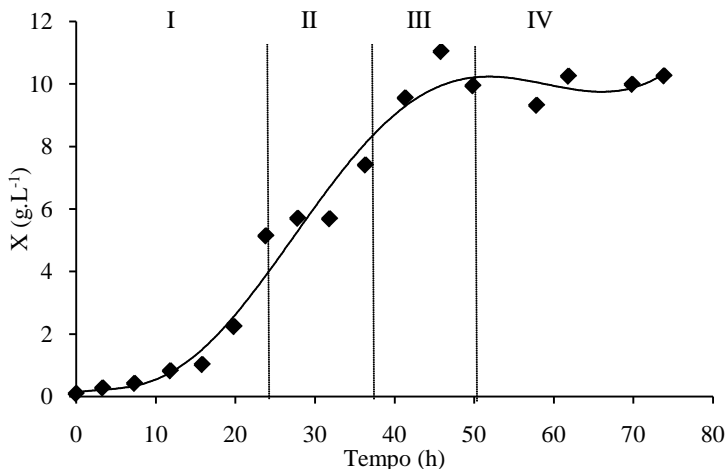
A levedura *S. ruberrimus* entra na fase estacionária quando a concentração de glicose tende a zero (Figura 20). Há um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do microrganismo ( $\mu_x = 0$ ).

Na curva de obtenção de biomassa (Figura 21) foram identificadas quatro fases: exponencial (I), linear (II), desaceleração (III) e estacionária (IV). A fase de latência não foi observada. O fato de o cultivo iniciar na fase exponencial pode ser elucidado devido as condições do pré-cultivo (meio de cultura, frequência de agitação, pH, temperatura) serem semelhantes as condições do cultivo em biorreator, indicando que a levedura não precisou de um tempo de adaptação. Além



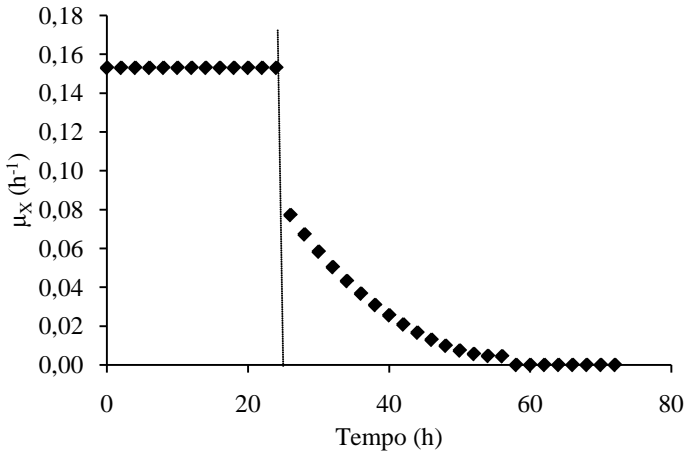
disso, o pré-cultivo foi preparado exclusivamente para cada tratamento e inoculado quando este estava na fase exponencial de crescimento. Assim, a velocidade específica de crescimento no início da fermentação em biorreator, já era constante e máxima (Figura 22).

Figura 21. Cinética de crescimento de *S. ruberrimus* em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.



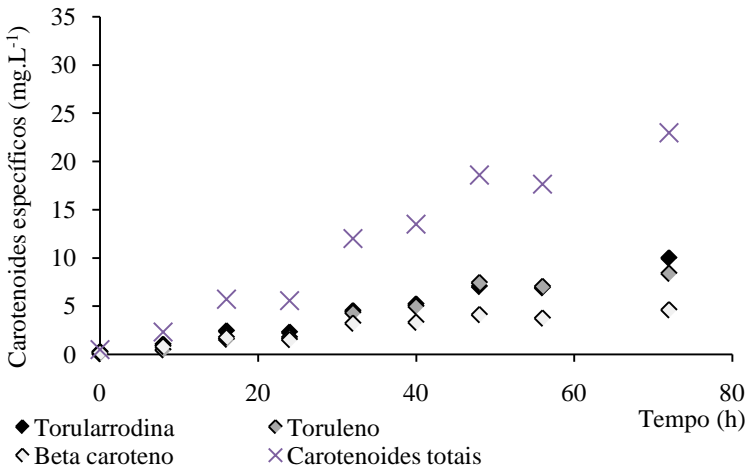
A fase exponencial de crescimento teve uma duração de 24 h e o valor da velocidade máxima específica de crescimento foi de  $0,153 \text{ h}^{-1}$ . A fase linear iniciou após 24 h de fermentação e pode ser observada na Figura 22, quando ocorre o decréscimo da velocidade específica em função do aumento da concentração celular, ao longo do tempo. A fase de declínio ou lise não foi observada neste cultivo (Figura 21).

Figura 22. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h, considerando a fase exponencial de crescimento.



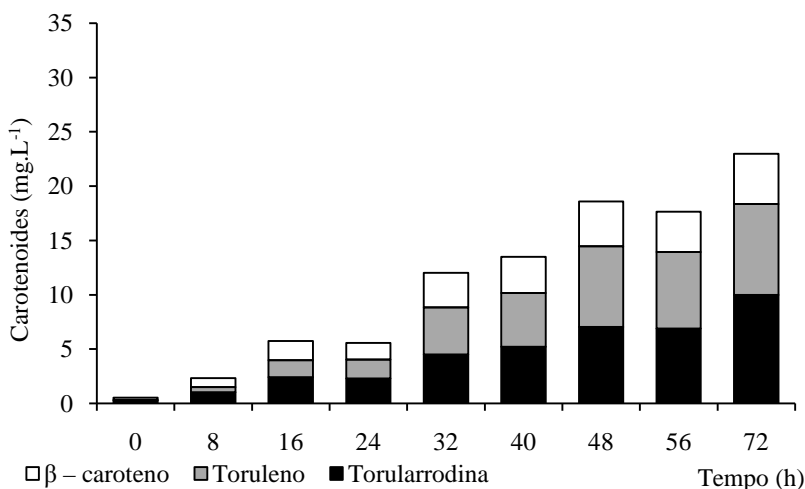
O conteúdo dos carotenoides específicos, ao longo do tempo de fermentação, pode ser verificado na Figura 23. O toruleno e a torularrodina apresentaram um perfil de produção semelhante.

Figura 23. Produção dos principais carotenoides específicos produzidos por *S. ruberrimus* no cultivo em biorreator em 72 h, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.



Comparando os valores de produtividade observou que a torularrodina foi o carotenoide específico que apresentou a maior produtividade  $0,135 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , seguido pelo toruleno ( $0,116 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e em menor produção, o  $\beta$ -caroteno ( $0,061 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). A composição final dos três principais carotenoides sintetizado constituiu-se de 43,40 % de torularrodina, de 36,53 % de toruleno e de 20,07 % de  $\beta$ -caroteno, (Figura 24).

Figura 24. Composição do extrato de pigmentos extraídos pela técnica de abrasão mecânica em amostragem a cada 8 h de fermentação, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.

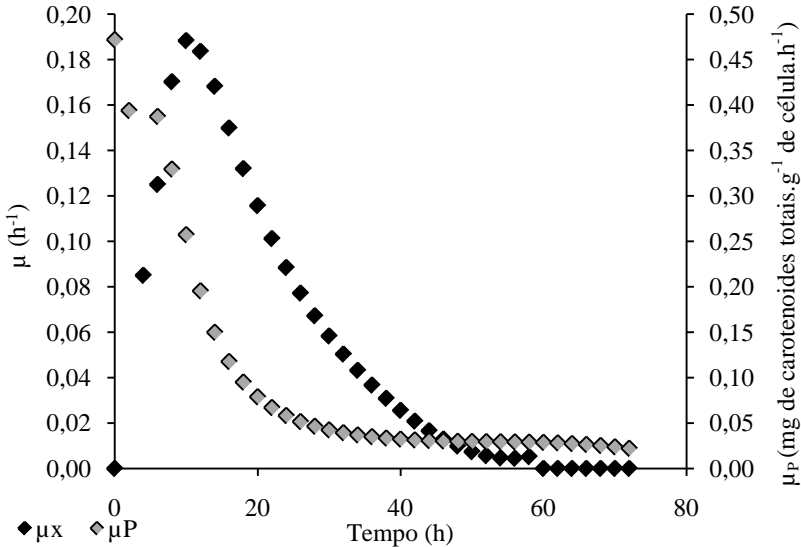


No processo fermentativo, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, a produção de carotenoides totais foi parcialmente associado ao crescimento microbiano. As constantes empíricas da equação (17) foram calculadas (Apêndice A) e a

Figura 25 demonstra os valores de  $\mu_X$  e  $\mu_P$  plotados em relação ao tempo.

$$\mu_P = 0,489 * \mu + 0,023 \quad (17)$$

Figura 25. Produção de carotenoides totais parcialmente associada ao crescimento de *S. ruberrimus*, em biorreator, em 72 h de fermentação, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido.

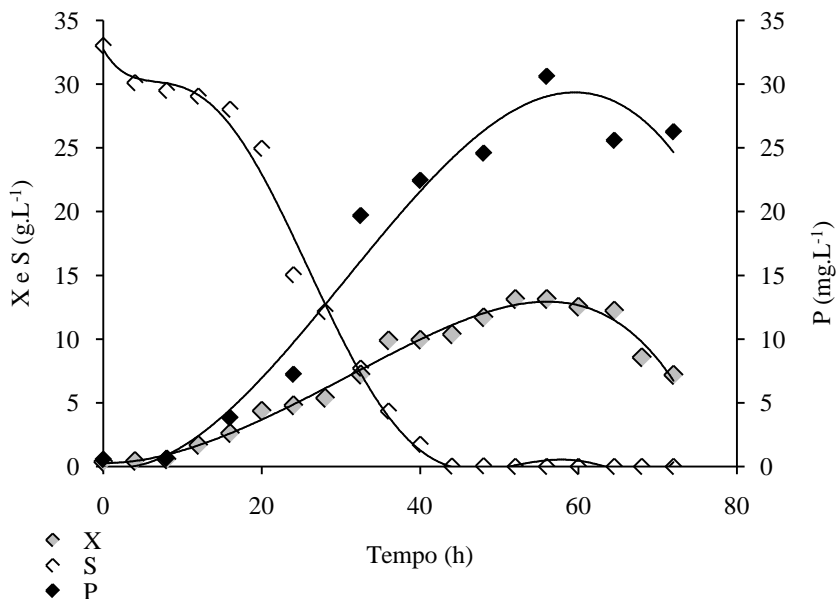


#### 4.1.2 Estudo da cinética microbiana, em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo

A Figura 26 apresenta o comportamento do consumo de glicose, obtenção de biomassa e produção de carotenoides totais ao decorrer das 72 h de fermentação em biorreator, na concentração de 50 % de oxigênio dissolvido.

A concentração inicial de biomassa foi de 0,374 g.L<sup>-1</sup>, atingindo uma concentração máxima de 13,126 g.L<sup>-1</sup>, em 56 h de fermentação. As primeiras 24 h de cultivo corresponderam à fase exponencial de crescimento, no qual a levedura consumiu metade do substrato inicial, que se esgotou em aproximadamente 50 h de cultivo.

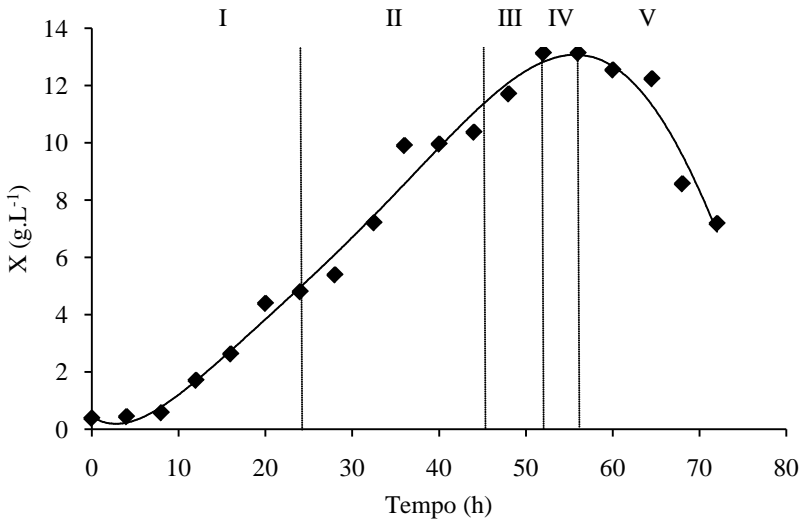
Figura 26. Consumo de substrato (S), crescimento celular (X) e produção de carotenoides totais (P), em 72 h de fermentação em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido.



Na Figura 26 podemos observar que a produção de carotenoides totais se eleva após a fase exponencial de crescimento, atingindo uma concentração máxima de 30,607 mg.L<sup>-1</sup>, em 56 h de fermentação. Neste momento, o substrato do meio de cultivo estava esgotado.

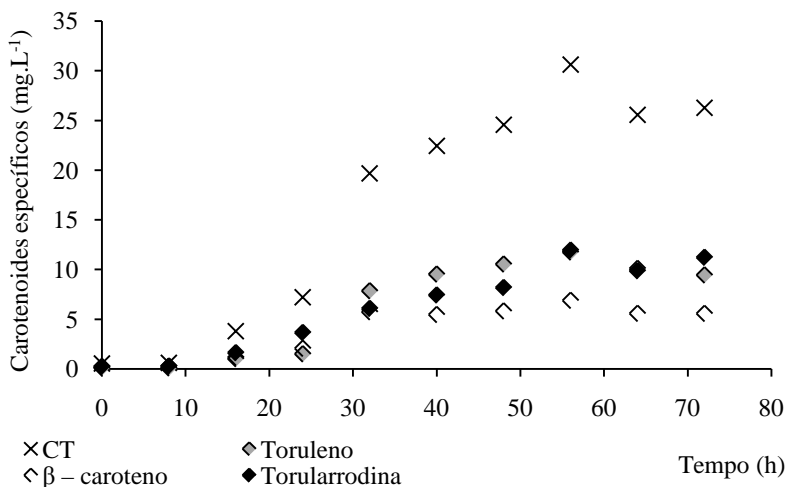
A curva de crescimento (Figura 27) apresentou cinco fases: exponencial (I), linear (II), desaceleração (III), estacionária (IV) e declínio ou lise (V). A fase exponencial durou 24 h, com  $\mu_{\text{máx}}$  correspondendo a 0,123 h<sup>-1</sup>. A fase de desaceleração ocorreu após 40 h de fermentação, provavelmente quando houve o esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura necessários ao crescimento. Quando a concentração de glicose ficou limitada no meio, a levedura entrou na fase estacionária e após zerar (56 h) ocorreu à lise celular, diminuindo a concentração de biomassa.

Figura 27. Cinética de crescimento de *S. ruberrimus* em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.



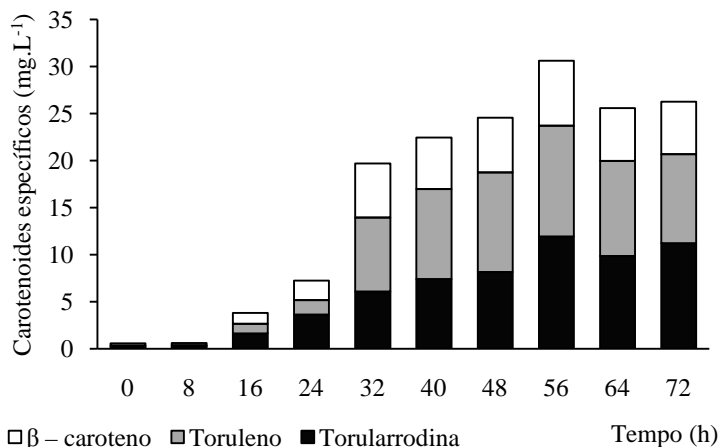
A produção dos carotenoides específicos, na concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, apresentou um perfil semelhante para cada pigmento identificado (Figura 28), porém com produtividades distintas. Dentre os compostos analisados, a torularrodina foi a que obteve a maior produtividade ( $0,163 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), seguida pelo toruleno ( $0,162 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e pelo  $\beta$ -caroteno ( $0,093 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

Figura 28. Produção dos principais carotenoides específicos produzidos por *S. ruberrimus* no cultivo em biorreator a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido.



No ponto máximo de produção de carotenóides totais (56 h), a composição do extrato constitui 39,04 % de torularrodina, de 38,42 % de toruleno e apenas de 22,55 % de β-caroteno, (Figura 29).

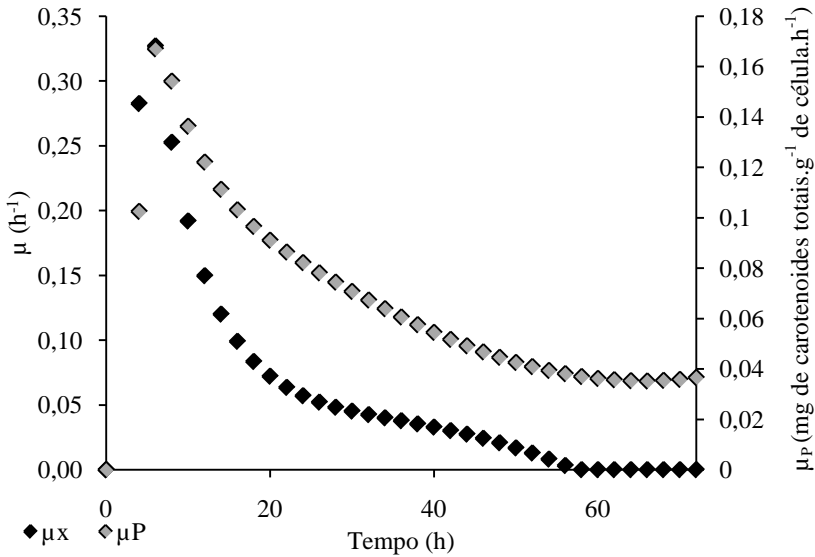
Figura 29. Composição do extrato de pigmentos composto por β-caroteno, toruleno e torularrodina, a cada 8 h de fermentação, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.



Os valores de  $\mu_X$  e  $\mu_P$  foram plotados em relação ao tempo, (Figura 30), para verificação da dependência da produção de pigmentos em relação ao crescimento da levedura. O processo fermentativo a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido foi classificado como parcialmente associado ao crescimento e a equação (18) correlaciona a velocidade específica de produção de carotenoides totais com a velocidade específica de obtenção de biomassa (Apêndice B).

$$\mu_P = 0,465 * \mu + 0,042 \quad (18)$$

Figura 30. Produção de carotenoides totais parcialmente associada ao crescimento microbiano em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.



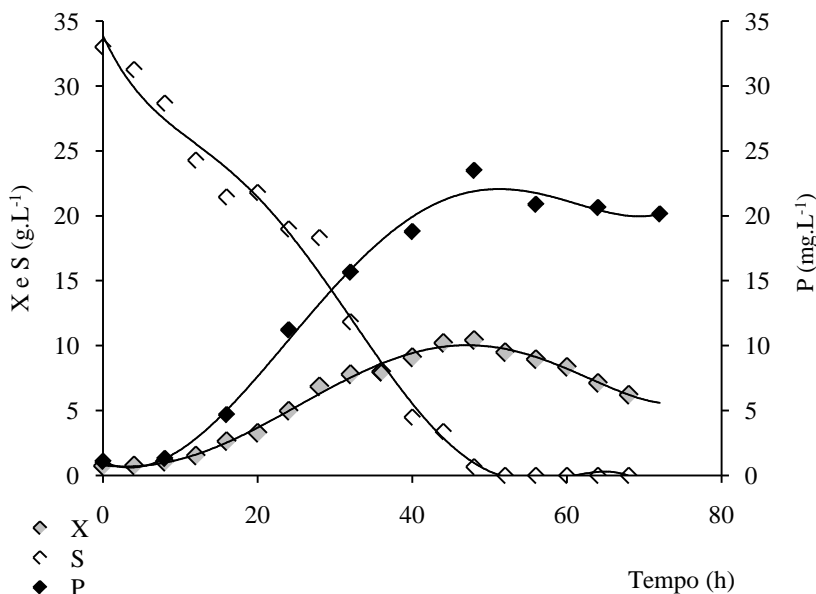
#### 4.1.3 Estudo da cinética microbiana, em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo

A Figura 31 apresenta o comportamento do consumo de substrato, crescimento microbiano e produção de carotenoides totais ao decorrer de 72 h. O ensaio foi realizado em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido.



A fermentação iniciou com uma concentração de  $0,739 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa e alcançou uma concentração máxima de  $10,421 \text{ g.L}^{-1}$ , em 48 h de fermentação. O consumo de glicose ocorreu gradativamente até 52 h, quando esta se esgotou.

Figura 31. Consumo de substrato (S), obtenção de biomassa (X) e produção de carotenoides totais (P), em 72 h de fermentação em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido.

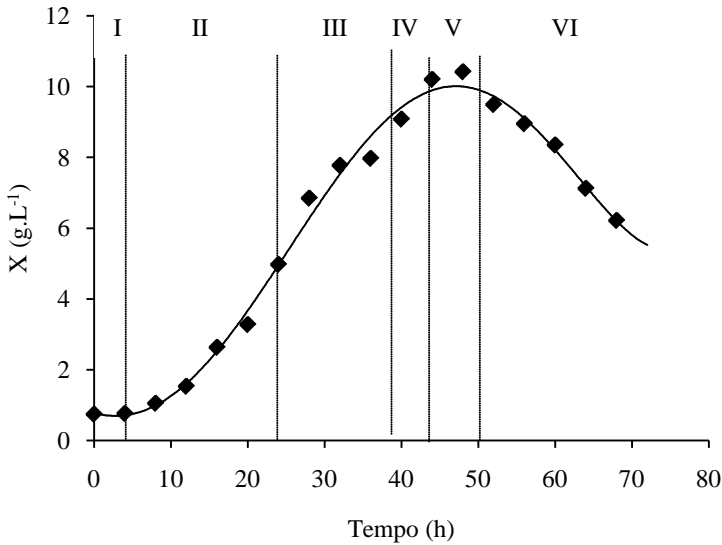


Na

Figura 31 podemos observar que a produção de carotenoides totais acompanha o perfil da curva de crescimento, atingindo uma concentração máxima de  $23,475 \text{ mg.L}^{-1}$ , em 48 h de fermentação, no mesmo momento em que a biomassa também atinge sua concentração mais elevada.

A curva de crescimento (Figura 32) apresentou seis fases: “lag” ou latência, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio ou lise.

Figura 32. Curva de crescimento de *S. ruberrimus* em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

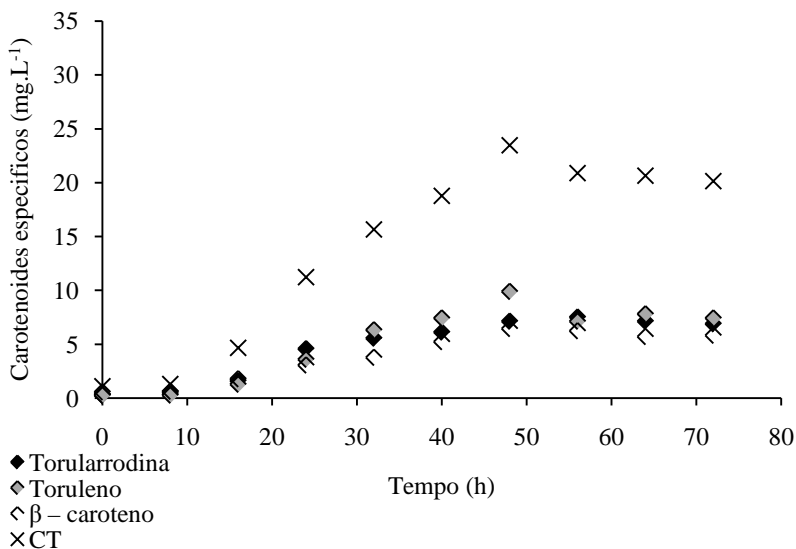


Na fase de latência observou-se o período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo presentes ao meio, Figura 32. No fim dessa fase, que durou 4 h, a população inteira começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo, caracterizando a fase exponencial de crescimento, que permaneceu até 24 h. A velocidade específica máxima de crescimento observada foi de  $0,093 \text{ h}^{-1}$ .

A fase linear, caracterizada pela velocidade de reprodução constante, foi observada após 24 horas de fermentação. A fase de desaceleração ocorreu após as 40 h de cultivo, seguida pela fase estacionária, onde a levedura atingiu a concentração máxima de  $10,421 \text{ g.L}^{-1}$  (48 h). Em seguida, o valor da concentração celular diminuiu a uma velocidade que excede a velocidade de células novas, ocorrendo o declínio da concentração celular, Figura 32.

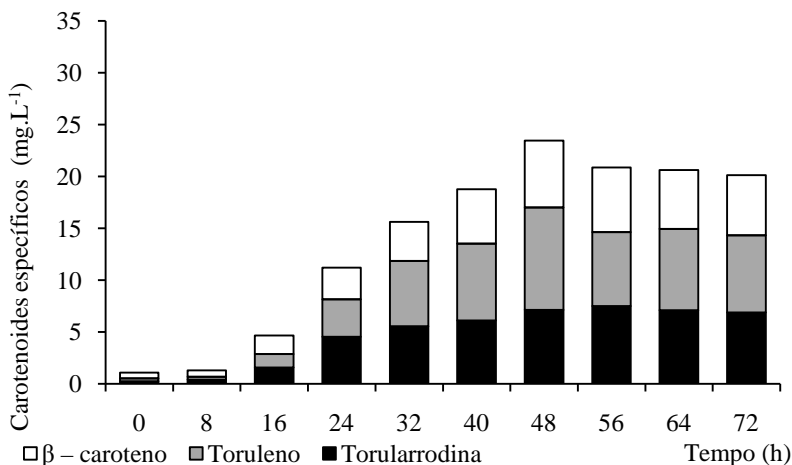
A produção de carotenoides específicos, ao longo do tempo de fermentação, pode ser verificada na Figura 33. Todos os três compostos analisados apresentaram uma curva de produção similar.

Figura 33. Produção dos principais carotenoides específicos produzidos por *S. ruberrimus* no cultivo a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.



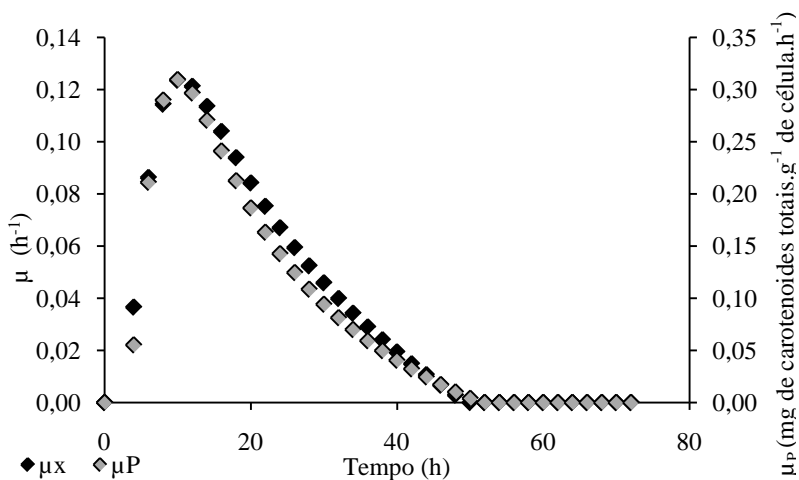
Comparando os valores de produtividade observou-se que a toruleno ( $0,105 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi o carotenoide específico que apresentou o maior valor, seguido pela torularrodina ( $0,101 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e em menor produção, o  $\beta$ -caroteno ( $0,082 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). A composição no ponto máximo de produção (48 h) desses carotenoides constituiu-se de 42,15 % de toruleno, de 30,39 % de torularrodina e de 27,46 % de  $\beta$ -caroteno. Essa condição de cultivo foi favorável para a produção de toruleno, Figura 34.

Figura 34. Composição do extrato de pigmentos composto por  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, a cada 8 h de fermentação, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido.



Os valores de  $\mu_X$  e  $\mu_P$  foram plotados em relação ao tempo (Figura 35). A classificação do processo fermentativo foi realizada conforme a verificação da dependência da produção de pigmentos em relação ao crescimento de *S. ruberrimus*.

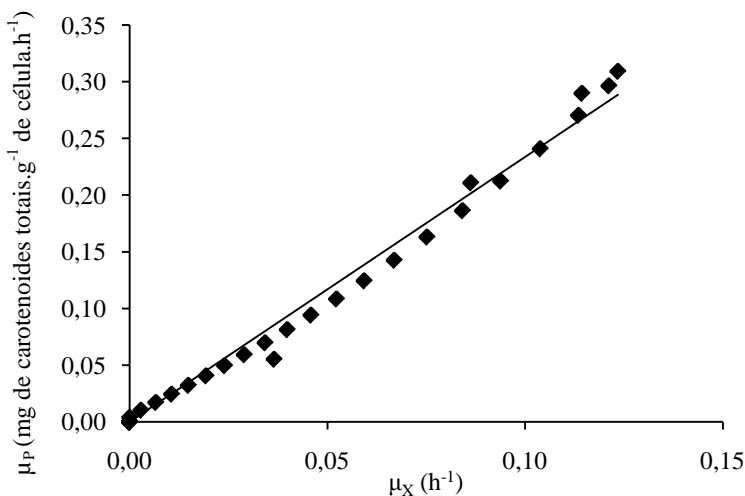
Figura 35. Produção de carotenoides totais associada ao crescimento microbiano, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.



O coeficiente da expressão de Garden (1959) foi obtido (Figura 36) e o processo foi classificado como associado ao crescimento, com coeficiente de correlação equivalente a 0,990 equação (19).

$$\mu_P = 2,337 * \mu \quad (19)$$

Figura 36. Obtenção da constante empírica ( $\alpha$ ) da equação de produção de carotenoides totais associado ao crescimento, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido.



#### 4.1.4 Análise da influência da concentração oxigênio dissolvido no meio de cultivo e da frequência de agitação nos parâmetros cinéticos de *S. ruberrimus*

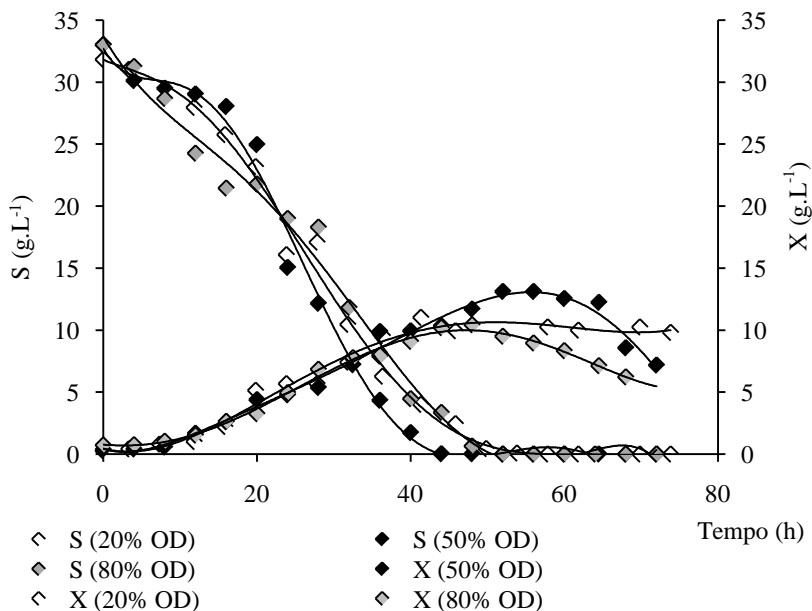
Os processos biotecnológicos de interesse industrial normalmente envolvem cultivo de células aeróbias. Esses processos exigem um adequado sistema de transferência de oxigênio, pois este gás é muito pouco solúvel em água. No entanto, ele necessita estar dissolvido na fase líquida (meio de cultura), de onde o microrganismo irá consumi-lo para a respiração e para o surgimento de novas células.

Os microrganismos aeróbicos, assim como *S. ruberrimus*, cujo crescimento (metabolismo primário) é dependente do fornecimento de oxigênio necessitam da definição das melhores condições de aeração e agitação. No entanto, em condições de estresse oxidativo, ambiente rico em radicais livres ( $^1O_2$ ), acredita-se que o metabolismo das leveduras é

estimulado a elevar a biossíntese de carotenoides, como a de torularrodina que apresenta uma atividade antioxidante, com o objetivo de prevenir a oxidação.

Nas primeiras 48 h de cultivo, as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no meio parecem não influenciarem no crescimento celular e consumo de substrato de *S. ruberrimus*. Observou-se que as curvas praticamente se sobrepuseram (Figura 37). Após este tempo, o substrato passou a ser limitante ou nulo no meio, de acordo com cada tratamento. A partir deste instante, o comportamento das curvas de crescimento demonstrou perfil diferentes para cada concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, conforme observado na Figura 37. Todos os três tratamentos apresentaram uma fase exponencial de 24 h.

Figura 37. Influência da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento e no consumo de substrato de *S. ruberrimus*, em 72 h de fermentação em biorreator.

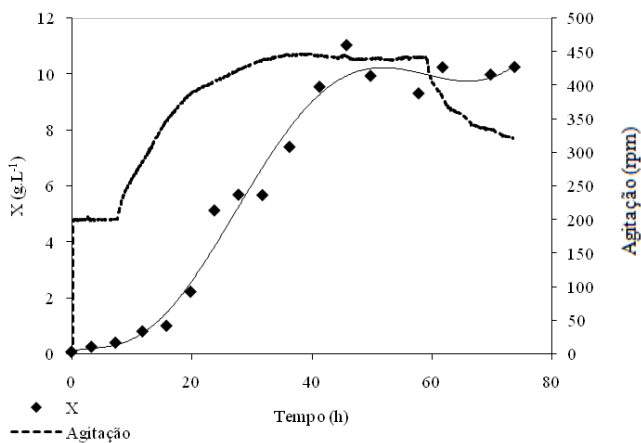


Nos três tratamentos foi possível verificar que a demanda de oxigênio estava diretamente relacionada com o crescimento celular (Figura 38). Assim, quando compararmos o perfil das curvas de

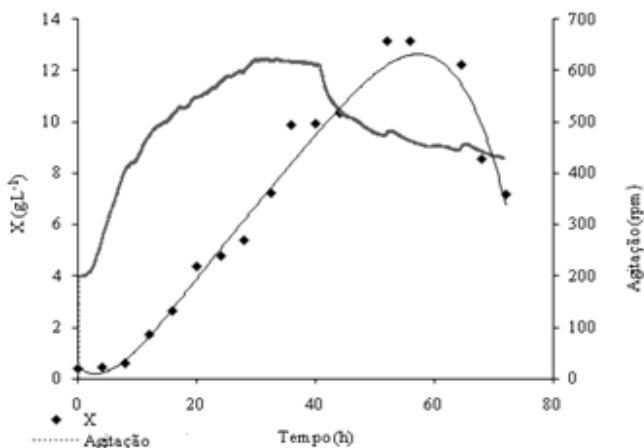
obtenção de biomassa e da frequência de agitação (parâmetro responsável em manter a concentração de oxigênio dissolvido constante), ao longo do tempo, percebemos a dependência desses dois fatores.

Figura 38. Perfil do crescimento celular e da frequência de agitação versus tempo, nos tratamentos de concentração de: (a) 20 %, (b) 50 % e (c) 80 % de oxigênio dissolvido.

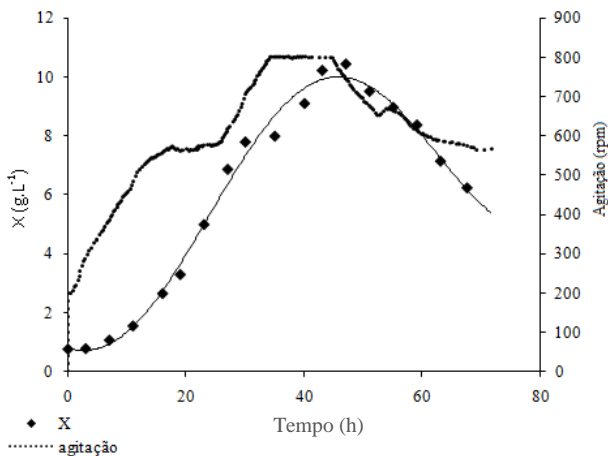
(a)



(b)



(c)

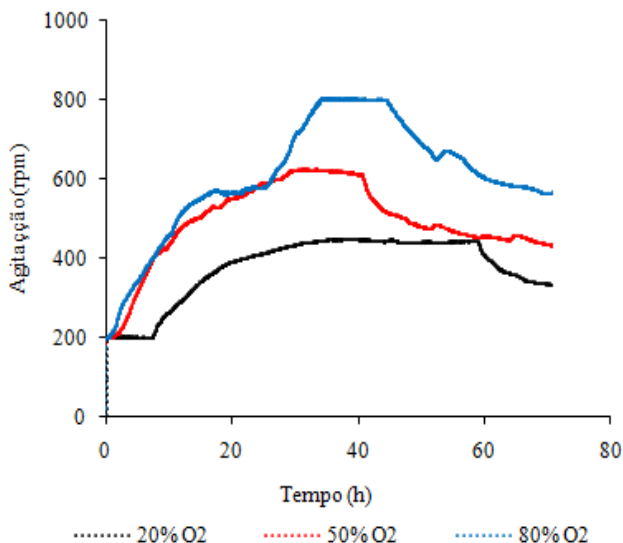


O controle da condição de aeração foi realizada fixando uma vazão de entrada de ar (1 vvm) e variando a frequência de agitação, que chegou a alcançar a 800 rpm, valor muito elevado.

O tratamento com concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, a agitação variou de 200 a 400 rpm, frequência moderada, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 39). Já o tratamento com 50 % de oxigênio dissolvido, a frequência de agitação variou de 200 à aproximadamente 600 rpm. Este tratamento expressou resultados melhores em relação à concentração de biomassa e produção de carotenoides totais e específicos. Logo, a agitação pode ter favorecido o transporte de nutrientes e oxigênio à interface microrganismo-meio. A concentração de 50 % de oxigênio dissolvido supriu a necessidade das atividades vitais da célula e aludiu propiciar um ambiente de estresse oxidativo ideal para a produção de carotenoides totais.



Figura 39. Curvas de frequência de agitação versus tempo, para as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em produção de *S. ruberrimus* em biorreator, em 72 h de fermentação.



No tratamento com concentração de 80 % de oxigênio dissolvido notamos que houve dificuldade em manter o nível constante de oxigênio, ocorrendo pequenas oscilações na concentração de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo (verificar gráfico plotado com os dados fornecidos pelo biorreator, apêndice C). A agitação chegou a atingir uma frequência de 800 rpm (Figura 39) e foi observado uma formação excessiva de espuma, sendo necessário a adição de um volume significativo de antiespumante. Esses dois fatores: alta frequência de agitação e excessiva adição de antiespumante foram avaliados como fatores que podem ter influenciado negativamente no transporte de massa, na transferência de gases e ter causado lise celular, devido o alto cisalhamento no meio. A injeção de oxigênio puro e a fixação de uma frequência de agitação moderada (250 rpm) poderia contribuir para amenizar estes problemas.

Acreditamos que a elevada frequência de rotação dos agitadores no meio foi responsável pela lise celular por cisalhamento ocorrida no tratamento de concentração de 80 % oxigênio dissolvido. Logo, com o rompimento de algumas células, o conteúdo intracelular (proteínas, lipídeos e carotenoides) foi liberado para o meio favorecendo a

formação de biofilme, imobilizado na parede do biorreator e /ou sobre partículas sólidas em suspensão, empregadas como suporte (Figura 40).

Figura 40. (a) Cultivo a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido (b) Formação de espuma.

(a)



(b)



Os parâmetros cinéticos representam um conjunto de dados que possibilitam uma comparação quantitativa entre diferentes condições de

cultivo (temperatura, pH, frequência de agitação e aeração) por intermédio de variáveis como velocidade específica, fatores de conversão e valores de produtividade do produto de interesse econômico. Os parâmetros cinéticos estão descritas na Tabela 3 e os respectivos gráficos utilizados para determiná-los, encontram-se no apêndice.

Entre os tratamentos estudados, o que obteve a concentração máxima de biomassa ( $13,126 \text{ g.L}^{-1}$ , em 52 h) e de carotenoide totais ( $30,607 \text{ g.L}^{-1}$ , em 56 h) foi o de 50 % de oxigênio dissolvido. Foi também a condição de cultivo que alcançou os melhores valores de fator de conversão de  $Y_{P/X}$  ( $2,317 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e  $Y_{P/S}$  ( $0,826 \text{ mg.g}^{-1}$ ).

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de diferentes condições de concentração de oxigênio dissolvido, em 72 h de fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*.

Grandeza	20 % OD	50 % OD	80 % OD
$X_{\text{máx}} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	11,036 (46 h)	13,126 (52 h)	10,421(48 h)
$P \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	22,967 (72 h)	30,607 (56 h)	23,475(48 h)
$P_{\text{produto}} \text{ (mg.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$	0,312	0,417	0,311
$\mu_{\text{máx}} X \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,153	0,123	0,093
$Y_{X/S} \text{ (g.g}^{-1}\text{)}$	0,328	0,326	0,318
$Y_{P/X} \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$	1,564	2,317	2,356
$Y_{P/S} \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$	0,608	0,826	0,658

Cardoso (2008) realizou um estudo do cultivo de *S. ruberrimus* variando as concentrações de oxigênio dissolvido no meio. As fermentações foram realizadas em biorreator, a  $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 6, meio de cultura YM e fonte de carbono glicerol enriquecido com ácido oléico.

Na fermentação com concentração de 10 % de oxigênio dissolvido e duração de 90 h, Cardoso (2008) encontrou os seguintes parâmetros cinéticos:  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,058 \text{ h}^{-1}$  e  $Y_{X/S}$  de  $0,55 \text{ g.g}^{-1}$ . Já na fermentação com concentração de 50 % de oxigênio dissolvido e tempo de cultivo de 67 h obteve  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,068 \text{ h}^{-1}$  e  $Y_{X/S}$  de  $0,57 \text{ g.g}^{-1}$ . O último tratamento com concentração de 80 % de oxigênio dissolvido durou 63 h e os parâmetros cinéticos:  $\mu_{\text{máx}}$  foi de  $0,066 \text{ h}^{-1}$  e  $Y_{X/S}$  foi de  $0,63 \text{ g.g}^{-1}$ . Comparando com os dados apresentados neste estudo, a velocidade específica de crescimento máxima encontrada foi maior em todos os tratamentos, porém, a conversão de substrato em biomassa, utilizando apenas glicose como fonte energética, demonstrou menor eficiência que

a glicerina enriquecida com ácido oléico, independente da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.

Em outro estudo, Aksu *et al.* (2007) cultivaram a levedura *Rhodotorula glutinis* utilizando meio YM e 15 g.L<sup>-1</sup> de glicose como fonte de carbono. A fermentação foi realizada em frascos *Erlemeyer*, a temperatura 30 °C, pH 6, frequência de agitação de 100 rpm e vazão específica de aeração variando de 0, 1,2 a 2,4 vvm. No primeiro tratamento, sem vazão específica de aeração, observaram uma concentração máxima de biomassa de 4,7 g.L<sup>-1</sup> e de carotenoides totais de 63,4 mg.L<sup>-1</sup>. Ao injetar ar a uma vazão específica de 1,2 vvm, houve um incremento no valor da concentração celular (5,1 g.L<sup>-1</sup>) e carotenoides totais (96,2 mg.L<sup>-1</sup>). Concluíram que o estresse oxidativo pode beneficiar a performance de crescimento e biossíntese de pigmentos, pois com vazão específica de aeração de 2,4 vvm encontraram 5,4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa e 105,5 mg.L<sup>-1</sup> de carotenoides totais.

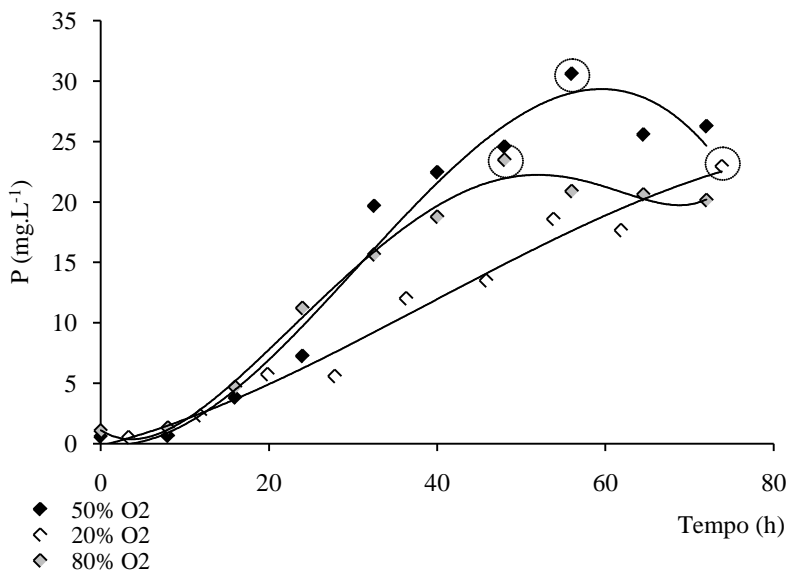
#### **4.1.5 Análise da concentração de carotenoides totais e específicos, sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultivo**

Estudos propõem que os carotenoides protegem as células contra espécies de oxigênio ativo (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Assim, em situações em que ocorre estresse oxidativo, acredita-se que as células elevam a biossíntese de pigmentos, com o objetivo de prevenir a oxidação. A torularrodina vem sendo citada como um carotenoide protetor contra espécies de oxigênio ativas, em células de levedura, devido sua propriedade antioxidante (SCHROTT, 1985; SAKAKI *et al.*, 2000; SAKAKI *et al.*, 2002). O teor de carotenoides totais e específicos foi investigado quanto à alteração da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

Assim, analisando a curva de produção de metabólitos (Figura 41), percebemos que o conteúdo de carotenoides totais máximos encontrados no tratamento com concentração de 20 % e 80 % de oxigênio dissolvido apresentou uma diferença de apenas 2 %. Porém, o tempo que cada tratamento obteve a concentração máxima de pigmentos variou 24 h. Assim, em alta concentração de oxigênio (80 % de oxigênio dissolvido) a produção de carotenoides foi associada ao crescimento celular e o valor máximo (23,475 mg.L<sup>-1</sup>) atingido foi em apenas 48 h de fermentação. Devido a este fato, seria justificável encerrar a fermentação antes das 72 h, diminuindo assim, os gastos com a fermentação e o tempo de cultivo, tornando este tratamento vantajoso quanto à produção de metabólitos de interesse industrial. No entanto,

deve-se considerar ainda o alto custo energético inerente ao processo de agitação.

Figura 41. Perfil das curvas de carotenoides totais, em diferentes condições de concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo de *S. ruberrimus*, em 72 h de fermentação em biorreator.



Já na fermentação em baixas concentrações de oxigênio (20 % de oxigênio dissolvido), o crescimento celular foi parcialmente associado à produção de pigmentos. O valor máximo de carotenoides totais (22,967 mg.L<sup>-1</sup>) obtido foi em 72 h. Assim, analisando a curva de produção de metabólitos (Figura 41), percebemos que o conteúdo de carotenoides totais máximos encontrados no tratamento com concentração de 20 % e 80 % de oxigênio dissolvido apresentou uma diferença de apenas 2 %. Porém, o tempo que cada tratamento obteve a concentração máxima de pigmentos variou 24 h. Assim, em alta concentração de oxigênio (80 % de oxigênio dissolvido) a produção de carotenoides foi associada ao crescimento celular e o valor máximo (23,475 mg.L<sup>-1</sup>) atingido foi em apenas 48 h de fermentação. Devido a este fato, seria justificável encerrar a fermentação antes das 72 h, diminuindo assim, os gastos com a fermentação e o tempo de cultivo, tornando este tratamento vantajoso quanto à produção de metabólitos de interesse industrial. No entanto,

deve-se considerar ainda o alto custo energético inerente ao processo de agitação, Figura 41. No entanto, é interessante investigar novos tempos de fermentação, a fim de conhecer o melhor parâmetro tempo versus concentração de metabólitos, para este tratamento.

A Tabela 4, que apresenta os valores da produtividade de carotenoides específicos, sob diferentes condições de transferência de oxigênio, o tratamento que propiciou condições favoráveis de cultivo de *S. ruberrimus*, em termo de produção de carotenoides totais (30,607 mg.L<sup>-1</sup>) e de torularrodina (0,163 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi o com concentração de 50 % de oxigênio dissolvido.

Tabela 4. Produtividade dos carotenoides específicos em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, em 72 h de fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*.

Tratamento	Produtividade (mg.L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )			
	Torularrodina	Toruleno	β-caroteno	Carotenoides totais
20 % OD	0,135	0,116	0,061	0,312
50 % OD	0,163	0,162	0,093	0,417
80 % OD	0,101	0,105	0,082	0,311

Alguns trabalhos da literatura apresentam dados de cultivo de leveduras vermelhas, utilizando diferentes condições ambientais, com o objetivo de produzir carotenoides. Valduga *et al.* (2008) observaram que uma máxima concentração de carotenoides (0,541 mg.L<sup>-1</sup>) foi obtida em 100 h de fermentação de *Sporobolomyces salmonicolor* CBS 2636, usando substrato agroindustrial. Cabral *et al.* (2011) encontrou uma máxima concentração de pigmentos totais de 0,850 mg.L<sup>-1</sup>, produzidos por *Sporidiobolus pararoseus*, em meio sintético, no mesmo tempo de fermentação do trabalho anteriormente citado. Em 2013, Valduga *et al.* obtiveram uma concentração máxima de carotenoides totais de 0,842 mg.L<sup>-1</sup>, em aproximadamente 9 h de fermentação de *Sporidiobolus pararoseus*, verificando que o crescimento celular estava associado à biossíntese de metabólitos.

Os valores encontrados nesta pesquisa relatam condições que obtiveram elevadas concentrações de pigmentos em *S. ruberrimus*, comparando com os demais trabalhos citados (20 % oxigênio dissolvido: 22,967 mg.L<sup>-1</sup> (72 h), 50 % oxigênio dissolvido: 30,607 mg.L<sup>-1</sup> (56 h) e 80 % oxigênio dissolvido: 23,475 mg.L<sup>-1</sup> (48 h)). Nos três tratamentos com diferentes frequências de agitação e concentração

de oxigênio dissolvido, a levedura *S. ruberrimus* sintetizou em maior quantidade os carotenoides específicos torularrodina e toruleno, e em menor quantidade, o  $\beta$ -caroteno. Analisando a Figura 42 (b) e (c) constatou-se que em 56 h de fermentação em concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, a concentração de carotenoides específicos mais elevadas foram encontradas para toruleno e torularrodina, Figura 42.

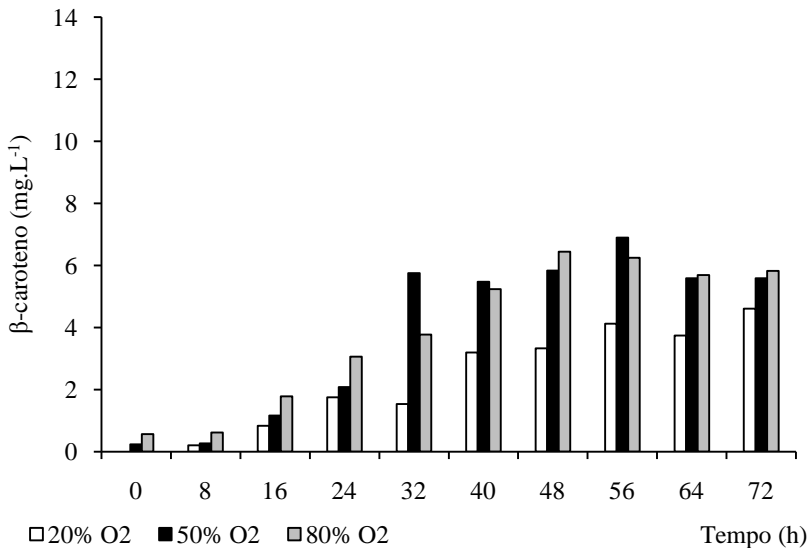
Razavi *et al.* (2006) separaram em HPLC e identificaram em APCI-MS os dois principais carotenoides produzidos por *S. ruberrimus*:  $\beta$ -caroteno e torularrodina. O valor de biomassa produzida foi de 11,3 g.L<sup>-1</sup>, a concentração de torularrodina foi de 31,54 mg.L<sup>-1</sup> e de  $\beta$ -caroteno foi de 7,21 mg.L<sup>-1</sup>. Comparando com os dados obtidos neste estudo, o tratamento de 50 % de oxigênio dissolvido produziu 13,13 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, 6,90 mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno e 11,95 mg.L<sup>-1</sup> de torularrodina. Percebemos que a concentração de torularrodina foi inferior neste estudo, porém devemos considerar o acréscimo da concentração de toruleno (11,759 mg.L<sup>-1</sup>), carotenoide não encontrado por Razavi *et al.* (2006).

O total de carotenoides, assim como, as quantidades relativas dos pigmentos individuais, variam em função da cepa e das diferentes condições de cultivo. Squina e Mercadante (2003) avaliaram cinco linhagens de *Rhodotorula* e, em todas elas, os principais carotenoides encontrados foram torularrodina, toruleno,  $\gamma$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno.

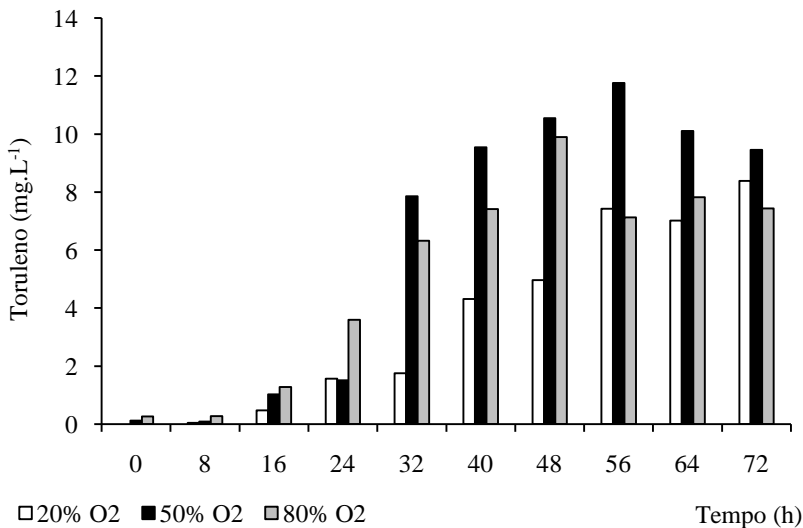
Analisando a Figura 42 (b) e (c) constatou-se que em 56 h de fermentação em concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, a concentração de carotenoides específicos mais elevadas foram encontradas para toruleno e torularrodina.

Figura 42. Concentração dos carotenoides específicos identificados no conteúdo extraído ao longo das 72 h de fermentação, em três condições de oxigênio dissolvido (20, 50 e 80 %): (a)  $\beta$ -caroteno, (b) toruleno e (c) torularrodina.

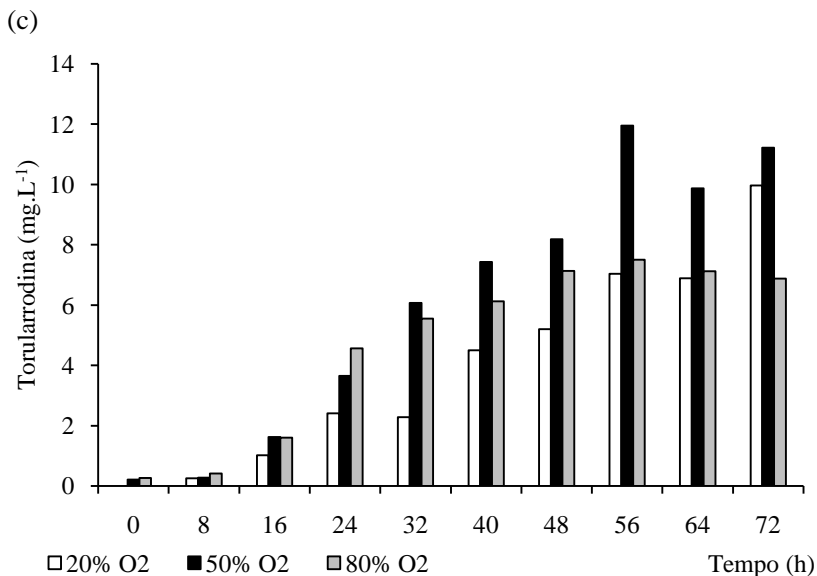
(a)



(b)







## 4.2 DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES PARA OBTENÇÃO DA CURVA DE METABÓLITOS

As análises de cromatografia qualitativas e quantitativas foram empregadas para identificar e caracterizar os extratos dos carotenoides. Foram isolados três principais pigmentos da levedura vermelha *S. ruberrimus*. As amostras utilizadas para esta etapa do trabalho estão descritas no item 3.4.1.

### 4.2.1 Análise dos carotenoides por TLC

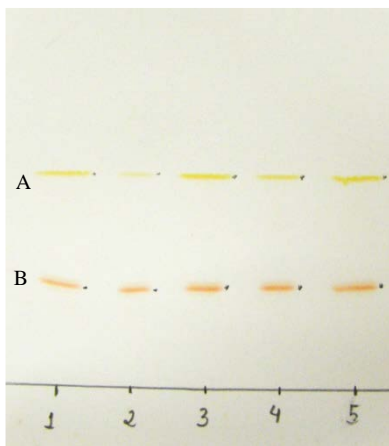
A cromatografia em fina camada (TLC) separa os carotenoides a partir da afinidade das moléculas com a placa de sílica (fase estacionária) e o eluente (fase móvel). A TLC apresentou uma resolução satisfatória, pois duas bandas foram formadas permitindo identificar visualmente os principais carotenoides produzidos pela *S. ruberrimus*. Conforme a Figura 43, a banda amarela (A) corresponde ao  $\beta$ -caroteno, que migrou rapidamente, seguida pela torularrodina, banda vermelha (B), que revelou mobilidade mais lenta. Esperava-se encontrar a banda

laranja, próxima à banda amarela, que representa a molécula de torularrodina, porém ela não foi identificada pela TLC.

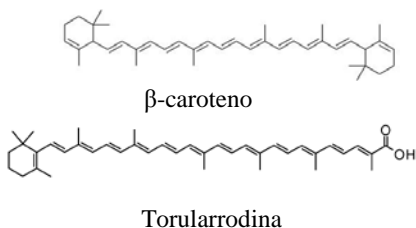
A migração lenta da torularrodina durante a separação cromatográfica (TLC) é devido ao fato de que, ao contrário do  $\beta$ -caroteno, a torularrodina transporta um grupo carboxílico numa extremidade da molécula, que é responsável pelas suas propriedades polares e, portanto, tem uma alta afinidade com a fase estacionária de sílica (Park *et al.*, 2007).

Figura 43. (a) Placa de sílica em gel com os extratos separados de *S. ruberrimus*. (b) Estrutura molecular dos principais carotenoides supostos produzidos pela *S. ruberrimus* e separados por TLC.

(a)



(b)



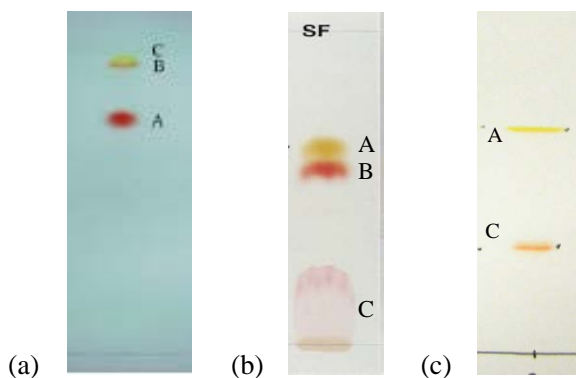
Onde a numeração inferior identifica os tratamentos aplicados: (1) Pérola de vidro e vórtex (2) DMSO e vórtex, (3) DMSO, pérola de vidro e vórtex (4) DMSO e ultrassom e (5) DMSO, ultrassom, pérola de vidro e vórtex.

Um aspecto importante da cromatografia é que, em um dado sistema cromatográfico, o movimento relativo de um composto em relação à frente do solvente é uma propriedade característica e reprodutível. No caso da TLC este movimento é expresso pela relação de fluxo ( $R_f$ ), sendo a relação entre a distância percorrida simultaneamente da origem até o centro da banda e o limite do eluente.

A relação de fluxo do  $\beta$ -caroteno obtido foi de 0,96, correspondente exatamente ao dobro do Rf da torularrodina (0,48).

Park *et al.* (2007) também identificou e caracterizou os carotenoides pigmentados extraídos de *Rhodotorula glutinis* utilizando a técnica TLC. Os três principais pigmentos isolados:  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina tiveram o mesmo perfil de migração encontrado neste estudo (Figura 44). Os pigmentos foram identificados com base nos espectros de UV-visível característico. As moléculas menos polares  $\beta$ -caroteno (A) e toruleno (B) mostraram espectros de UV-visível com máximos de absorção em comprimentos de onda de 450 e 484 nm, enquanto que a torularrodina (C), mais polar, apresentou um máximo de absorção no UV-visível a 501 nm. Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com os dados obtidos por Davoli e Weber (2002). As bandas, amarelo ( $\beta$ -caroteno) e laranja (toruleno) migraram rapidamente enquanto que a banda vermelha (torularrodina) se encontrou próximo à linha de depósito do extrato bruto (Figura 44). Davoli e Weber (2002) realizaram a identificação preliminar das moléculas por espectro UV-visível e confirmaram por análise em espectro de massa.

Figura 44. Perfil de migração do  $\beta$ -caroteno (C), toruleno (B) e torularrodina (A) em placa de sílica em gel. Resultado obtido por: (a) Park *et al.* (2007), (b) Davoli e Weber (2002) e (c) este estudo.



#### 4.2.2 Determinação dos carotenoides totais

Estudos têm relatado diversas técnicas de extração de carotenoides de células de microrganismos (DAVOLI e WEBER, 2002; PARK *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2007; GU *et al.*, 2008; MONKS *et*

al., 2013), porém existem poucos relatos sobre a extração de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus*.

Neste trabalho foram estudados e comparados cinco métodos de extração de carotenoides com agentes de lise celular mecânico, químico e combinados. A Tabela 5 apresenta o conteúdo total de carotenoides extraído expressos em  $\mu\text{g}$  por grama de célula liofilizada, pelos diferentes métodos aplicados. Todos os métodos foram capazes de extrair os carotenoides, porém foi observada uma diferença de desempenho entre eles, quanto à concentração de carotenoides totais extraíveis e rendimento do conteúdo bruto.

Tabela 5. Concentração de carotenoides totais e rendimento obtido por diferentes métodos de extração.

N	Tratamento	Carotenoides totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ célula seca)	Rendimento (%)
1	Pérola de vidro e vórtex	184,65	67,20 a
2	DMSO e vórtex	135,02	40,23 b
3	DMSO, Pérola de vidro e vórtex	61,83	37,96 b
4	DMSO e ultra-som	103,04	38,27 b
5	DMSO, ultra-som, pérola de vidro e vórtex	175,61	34,30 b

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), Teste de *Tukey*.

O conteúdo de carotenoides totais variou entre um valor máximo de  $184,65 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula para a extração com pérola de vidro e agitação em vórtex e um valor mínimo de  $61,83 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula para o método de extração combinando DMSO, pérola de vidro e agitação em vórtex, representando uma diferença de 33,5 % de carotenoides totais. Esperava-se que com a combinação dos agentes de lise: químico (DMSO) e mecânico (pérola de vidro) houvesse uma interação sinérgica entre eles, elevando assim, o poder de extratibilidade do conteúdo de carotenoides totais extraído. Porém este resultado não foi o observado.

O rendimento do extrato obtido por cada tratamento foi quantificado e apresentado na Tabela 5. Após o rompimento celular, todas as moléculas solúveis em éter de petróleo e acetona podem estar presentes na composição do extrato, como proteínas e lipídeos, além dos carotenoides. O tratamento que obteve o maior rendimento de extrato foi à extração por abrasão de pérola de vidro e agitação em vórtex (67,20

%). O rendimento obtido nos métodos de extração utilizando o agente de lise químico DMSO sugere que o dimetilsulfóxido apresenta características químicas capazes de degradar o conteúdo intracelular extraído. Os tratamentos utilizando o agente de lise DMSO não apresentaram diferença significativa no teste de *Tukey*, para  $p < 0,05$ .

Squina e Mercadante (2003) analisaram os carotenoides das linhagens de *Rhodotorula*, para isso, dois métodos de extração foram realizados, um usando DMSO e outro abrasão com areia em agitador vórtex. Verificaram que a trituração da biomassa seca de leveduras com areia tratada promoveu a extração exaustiva de até 2 g de amostra seca com acetato de etila, sem necessidade de aquecimento, sendo efetiva para todas as cepas estudadas. Já a técnica de extração utilizando DMSO mostrou-se eficiente para baixas quantidades de amostra. Entretanto, quando maiores quantidades de levedura foram utilizadas, houve a formação de uma interface pigmentada insolúvel, indicativa de extração incompleta. O emprego do método de extração com DMSO extraiu carotenoides das cepas *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula rubra*, porém não foi eficiente para a extração exaustiva dos pigmentos de *Rhodotorula minuta*. Outra desvantagem do método é o uso de solvente a 55 °C, pois pode ocorrer a insaturação e /ou oxidação das moléculas, devido à instabilidade dos carotenoides à temperatura elevada.

No trabalho de Gu *et al.* (2008) para a otimização da extração de carotenoides de *Rhodobacter shaeroides*, foram testadas três técnicas de rompimento celular por: ultrassom, moagem com areia em vórtex e HCl. A técnica que conseguiu obter o maior conteúdo de extrato de carotenoides foi a utilizando o HCl (4,650 mg.g<sup>-1</sup> de célula), seguida por abrasão com areia (1,615 mg.g<sup>-1</sup> de célula) e por último com ultrassom (0,664 mg.g<sup>-1</sup> de célula). Sabemos que o tratamento com ácido pode ser utilizado para destruir as membranas celulares das células de levedura, porém, o tratamento com ácido pode resultar em danos consideráveis aos carotenoides (PARK *et al.*, 2007).

Alguns estudos na literatura relatam a extração de carotenoides de microrganismos utilizando a técnica de abrasão com pérola de vidro ou areia utilizam agitador tipo vórtex (HAARD, 1988; SEDMAK *et al.*, 1990; DAVOLI et WEBER, 2002; SQUINA e MERCADANTE, 2003; ASKU *et al.*, 2007; PENNACCHI *et al.*, 2015).

Sabemos que a composição dos carotenoides em leveduras pigmentadas depende dos gêneros, das condições de cultura e da metodologia de extração. Assim, o conteúdo de carotenoides totais extraído neste trabalho (184,65 µg.g<sup>-1</sup> de célula seca, tratamento 1: Pérola de vidro e vórtex), para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*

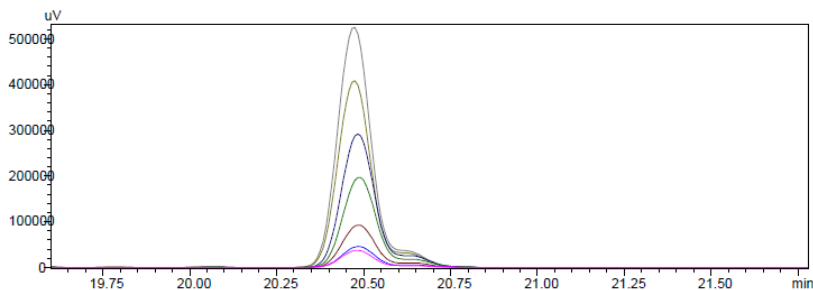
foi superior aos encontrados por Maldonade *et al.* (2008). Em seu estudo da composição de carotenoides em leveduras pigmentadas isoladas no Brasil, a levedura *Rhodotorula glutinis* obteve o maior rendimento de carotenoides totais ( $132 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula), seguido por *Rhodotorula mucilaginosa*-108 ( $76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula) e *Sporobolomyces roseus* ( $72 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula).

#### 4.2.3 Identificação e quantificação dos carotenoides específicos

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando uma coluna C18 é uma análise frequente para a separação e quantificação de carotenoides em extratos de amostras isoladas a partir de matrizes biológicas. Como existem poucos padrões de carotenoides disponíveis comercialmente, não existem estudos utilizando padronização externa por HPLC para quantificar os principais carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus*. Para contornar essa dificuldade, outras alternativas têm sido utilizadas por autores, como a determinação de carotenoides totais por espectrometria, porcentagens relativas aos principais pigmentos por HPLC ou a quantificação baseada no padrão  $\beta$ -caroteno.

Desta forma, a quantificação dos carotenoides específicos foi obtida através da relação linear entre a concentração de  $\beta$ -caroteno e a unidade de absorvância (UA), Figura 45 e Figura 46. O tempo de retenção do padrão  $\beta$ -caroteno, nas condições de análise do HPLC descritas no texto, foi de 20,4 – 20,6 min. Petrik *et al.* (2013) em seu estudo da produção de biomassa, carotenoides e outros metabólitos por leveduras vermelhas também se apropriou deste recurso para a quantificação de carotenoides.

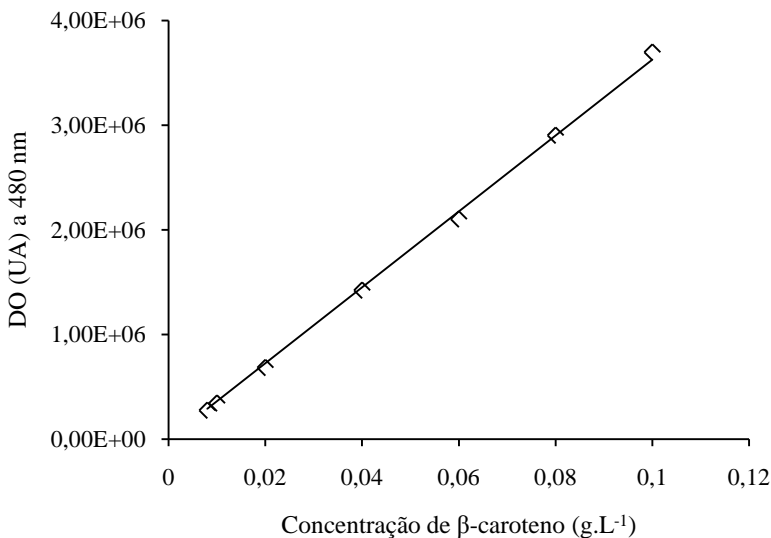
Figura 45. Cromatograma das soluções de 0,008 a 0,1 g.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno, a 480 nm. Condições cromatográficas citadas no texto.



Assumindo que existe uma resposta proporcional de todos os carotenoides em unidade de absorbância (UA), a equação (20) da curva padrão do  $\beta$ -caroteno foi utilizada para a determinação dos carotenoides específicos. O coeficiente de determinação encontrado foi de 0,999.

$$y = 36.260.037,448 x \quad (20)$$

Figura 46. Curva de calibração do padrão comercial de  $\beta$ -caroteno para a determinação dos carotenoides específicos identificados por HPLC e quantificados pela equação 20.



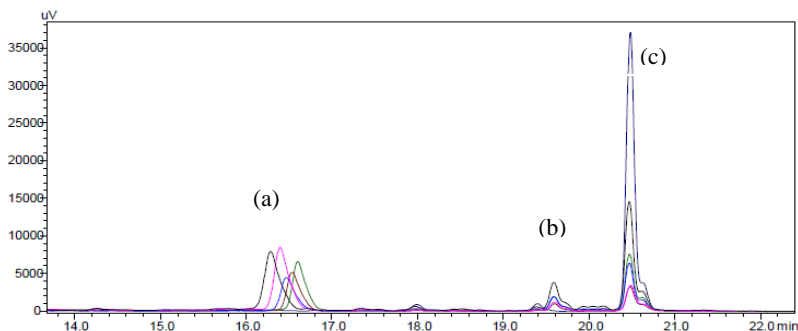
A separação dos carotenoides, utilizando como fase móvel acetona e água, gradiente de 100 – 70 % ocorreu em 30 minutos de corrida, além disso, foi necessário mais 15 minutos para o acondicionamento da coluna. A identificação dos picos e o tempo de retenção estão representados na Figura 47 e na Tabela 6.

Tabela 6. Tempo de retenção dos principais carotenoides específicos extraídos de *S. ruberrimus* identificados por HPLC.

Pico*	Carotenoide	$t_R$ (min.)
a	Torularrodina	16,0 – 16,8
b	Toruleno	19,4 – 19,8
c	$\beta$ -caroteno	20,4 – 20,8

\* Identificação do pico conforme os cromatogramas da Figura 47.

Figura 47. Cromatograma obtido a partir de diferentes técnicas de extração de carotenoides e os tempos de retenção dos três principais compostos identificados: Torularrodina (a), Toruleno (b) e  $\beta$ -caroteno (c). Condições cromatográficas citadas no texto.



Na Figura 47, o cromatograma preto corresponde aos resultados da extração com pérola de vidro e vórtex, rosa, extração com DMSO e vórtex, azul, método combinado de DMSO, pérola de vidro e vórtex, marrom, extração com DMSO e ultrassom, verde, método combinado de DMSO, ultrassom, pérola de vidro e vórtex e o cromatograma azul escuro apresenta o pico do padrão  $\beta$ -caroteno na concentração de  $0,008 \text{ g.L}^{-1}$ .

A composição dos principais carotenoides extraídos da levedura *S. ruberrimus* variou conforme o método de extração utilizado. O



primeiro tratamento (Tabela 7) extraiu os carotenoides através da ruptura celular por abrasão entre as pérolas de vidro e as células em forte agitação em vórtex. Este método foi capaz de extrair o toruleno ( $794,50 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e o  $\beta$ -caroteno ( $3.046,73 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em rendimentos superiores aos outros métodos estudados. O conteúdo encontrado de torularrodina ( $2.672,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) não difere significativamente do tratamento 2. Após a completa extração dos carotenoides, as células da levedura *S. ruberrimus* não apresentaram pigmentação visível a olho nu.

Tabela 7. Concentração dos carotenoides específicos obtidos a partir de diferentes métodos de extração, quantificados a partir da curva padrão de  $\beta$ -caroteno, equação 20.

N	Tratamento	Torularrodina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Toruleno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
1	Pérola de vidro e vórtex	2672,35 ab	794,5 a	3046,73 a
2	DMSO e vórtex	2908,92 a	250,01 c	1029,03 c
3	DMSO, pérola de vidro e vórtex	1695,81 c	565,95 abc	1901,35 abc
4	DMSO e ultrassom	2411,06 abc	705,17 ab	2188,59 ab
5	DMSO, ultrassom, pérola de vidro, vórtex	1980,54 bc	366,31 bc	1194,58 bc

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), Teste de *Tukey*.

O tratamento 2 que utilizou o agente químico de lise (DMSO) apresentou o conteúdo extraído da molécula de torularrodina de  $2.908,92 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Devido suas características polares, não obteve bons resultados na extração do toruleno ( $250,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e  $\beta$ -caroteno ( $1.029,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), que são moléculas mais apolares. Assim, ao final da extração, as células apresentaram uma coloração amarelo-alaranjado (Figura 48), indicando ainda a presença desses carotenoides.

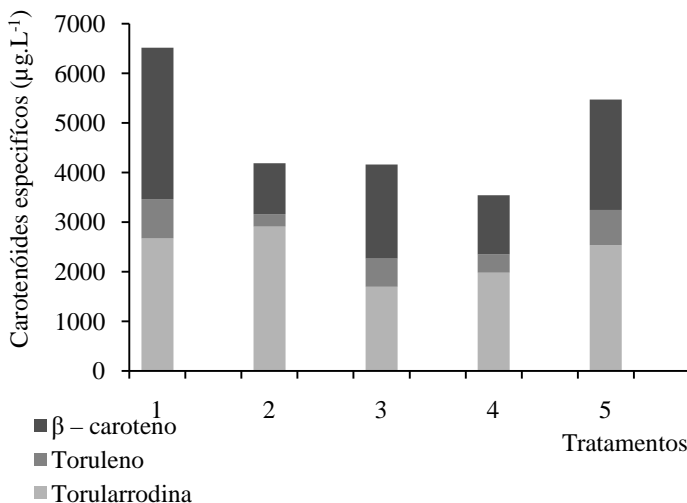
Figura 48. (a) células antes da extração, células após técnica de extração com: (b) perola de vidro e vórtex, (c) DMSO e vórtex.



O uso do banho ultrassom mostrou ser efetivo para a extração de carotenoides, porém, deve-se aprofundar os estudos, a fim de descobrir um agente de lise que aumente o rendimento do conteúdo extraído. Era esperado que os métodos de extração combinando agentes de lise químico e mecânico (tratamento 3 e 5), obtivessem rendimentos superiores aos outros métodos, porém, não foi o observado. De acordo com os resultados obtidos na microscopia eletrônica de varredura, é possível afirmar que cada agente de lise age separadamente, não intensificando assim, a ruptura celular.

Conforme os resultados do conteúdo dos carotenoides específicos obtidos pela extração do tratamento 1, o  $\beta$ -caroteno (46,77 %) foi o carotenoide predominante entre os três pigmentos principais, como mostrado na Figura 49, seguido pela torularrodina (41,03%) e, com uma porcentagem inferior, encontra-se o toruleno, com apenas 12,20% da composição do extrato.

Figura 49. Composição dos três principais carotenoides específicos encontrados no conteúdo extraído de células de *S. ruberrimus*, conforme análise em HPLC.



Cardoso (2008) identificou através de análises em HPLC e confirmadas por espectro de massa, que a levedura vermelha *Sporobolomyces ruberrimus* foi capaz de produzir quatro carotenoides principais, sendo eles: torularrodina, toruleno, β-caroteno e γ-caroteno. Ao contrário dos resultados obtidos neste estudo, Razavi e Marc (2006) indicaram que *S. ruberrimus* H110 produz essencialmente torularrodina e uma pequena quantidade de β-caroteno.

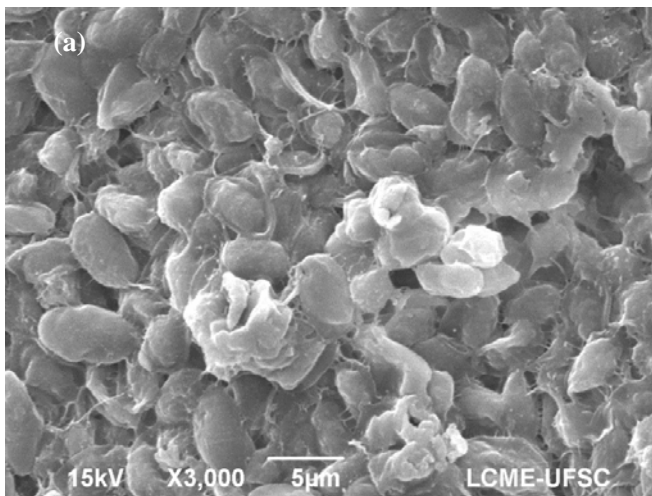
Essa diferença de resultados na composição dos carotenoides específicos, tanto em relação a outros autores, quanto ao encontrado neste estudo nas fermentações em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, pode ser explicada devido as amostras para o estudo da determinação da técnica de extração foram fermentadas em francos *Erlenmeyer*, em condições não controladas de pH e oxigênio dissolvido. Assim, podemos sugerir que o pH e as condições de oxigênio dissolvido influenciam diretamente na produção dos carotenoides torularrodina, toruleno e β-caroteno de *S. ruberrimus*.

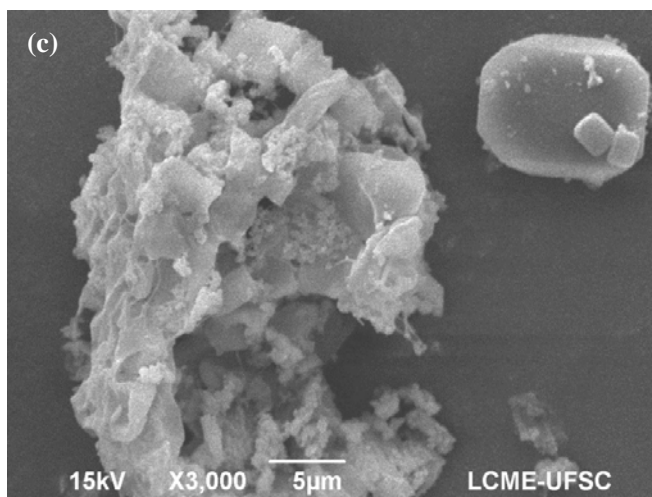
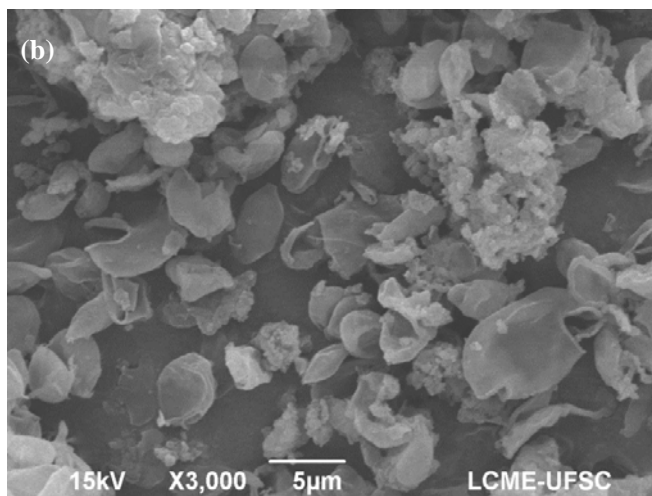
#### 4.2.4 Efeito dos tratamentos de lise na estrutura celular de *S. ruberrimus*

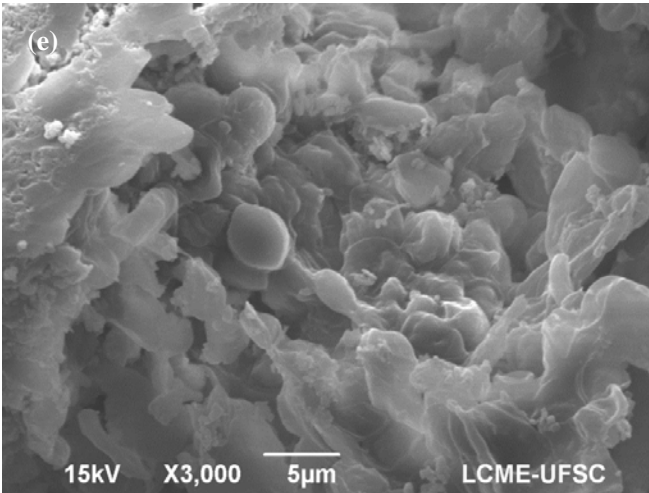
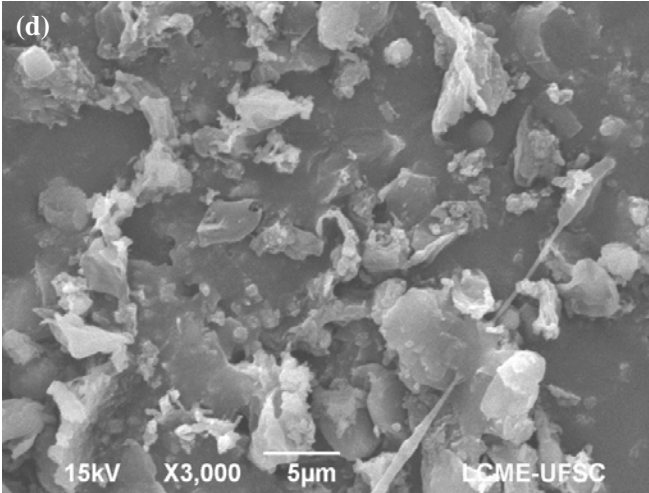
Os métodos químicos, mecânicos e combinados foram aplicados neste estudo visando romper a parede das células para a obtenção da

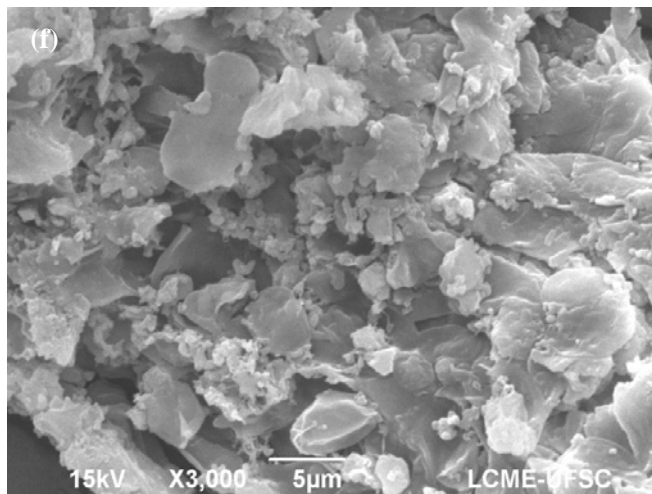
carotenogênese intracelular de *S. ruberrimus*. No entanto, para compreender melhor os resultados foi necessário avaliar a ação dos tratamentos sobre a degradação da célula da levedura, o que pode ser verificado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Figura 50. A partir da Figura 50 é possível notar que o tratamento utilizando pérola de vidro como agente de abrasão foi capaz de romper a parede celular da levedura, disponibilizando para o solvente todo o conteúdo intracelular, aumentando assim, a recuperação de carotenoides (b). Já na extração utilizando o agente químico DMSO, observa-se que ele age corroendo a parede celular, degradando a estrutura da levedura, que perde sua forma original (c). A combinação de agentes de lise: químico e mecânico, não permitiu aumentar o rendimento de extração dos carotenoides, pois, eles agiram sem sinergia. Logo, é possível identificar na figura (d), células que apresentaram rompimento na membrana e células degradadas por corrosão.

Figura 50. Microscopia eletrônica de varredura em célula liofilizada (a), após os diferentes métodos de extração: pérola de vidro e vórtex (b), DMSO e vórtex (c), DMSO, pérola de vidro e vórtex (d), DMSO e ultrassom (e) e DMSO, ultrassom, pérola de vidro e vórtex (f).









Não foram encontrados estudos na literatura que abordam a estrutura da morfologia celular de *Sporobolomyces ruberrimus*, nem como, imagens de outros microrganismos após o tratamento celular utilizando abrasão com pérola de vidro, DMSO, ultrassom ou essas técnicas combinadas.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EMPREGANDO TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA

A recuperação intracelular dos carotenoides de células liofilizadas da levedura *S. ruberrimus* foi realizada após 72 h de fermentação em biorreator, à concentração de 20 % de oxigênio dissolvido. Nas amostras pré-tratadas, o rompimento celular foi obtido pela maceração com nitrogênio líquido. O solvente empregado foi o CO<sub>2</sub> supercrítico. Diferentes co-solventes pré-selecionados foram utilizados na extração. Os parâmetros de temperatura, pressão e tempo de extração foram eleitos após uma revisão de dados da literatura e estão baseados no estudo de Monk *et al.* (2012).

Os parâmetros aplicados nos tratamentos de extração com fluido supercrítico foram: 5 g de massa de amostra, temperatura de 35 °C, pressão de 300 bar, tempo de extração de 120 min. em modo contínuo, vazão de solvente de 0,5 Kg.h<sup>-1</sup>. O acréscimo de co-solvente foi contínuo e representou 5 % (m/m) da vazão do solvente (CO<sub>2</sub>). Os co-

solventes utilizados foram uma mistura de éter de petróleo: acetona (7:3, v/v) e etanol puro.

A Tabela 8 apresenta o conteúdo e o rendimento de carotenoides totais obtidos de células liofilizadas e pré-tratadas com dois co-solventes distintos. Os dados apresentados estão expressos em  $\mu\text{g}$  de carotenoides por g de célula seca. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 8. Resultados obtidos nos ensaios de extração realizados em alta pressão a 35 °C, 300 bar, tempo de extração de 120 min. em modo contínuo, vazão de solvente de 0,5  $\text{Kg.h}^{-1}$  e 5 % (m/m) de co-solvente.

Ensaio	Amostra	Co- solvente	Rend. (%)	CT ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de célula)
1	CL	Éter de petróleo:	$0,931 \pm 0,026$ c	$11,751 \pm 0,836$ b
		acetona		
2	CL + $\text{MN}_2$	Éter de petróleo:	$2,111 \pm 0,207$ b	$27,666 \pm 0,283$ a
		acetona		
3	CL + $\text{MN}_2$	Etanol	$3,107 \pm 0,183$ a	$28,992 \pm 0,058$ a

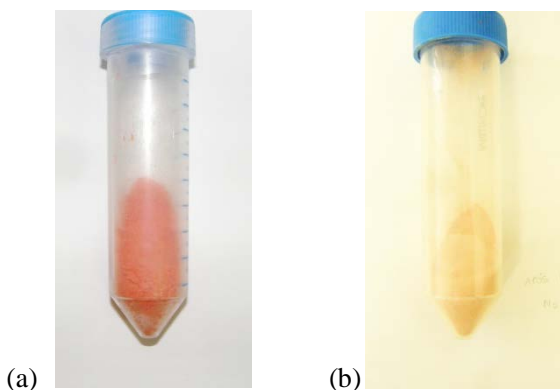
Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), Teste de *Tukey*.

Onde CL é célula liofilizada e CL +  $\text{MN}_2$  é célula liofilizada macerada com nitrogênio líquido.

A extração que propiciou o maior rendimento em conteúdo extraído (3,107 %) foi o do ensaio 3, que utilizou célula liofilizada macerada e etanol como co-solvente (Figura 51). Este ensaio se diferenciou dos demais estatisticamente, pelo teste de *Tukey*, a 5 %. Os outros ensaios foram capazes de extrair carotenoides, porém, em um rendimento inferior. Nota-se que o método de maceração utilizando nitrogênio líquido, responsável pelo rápido congelamento das células, foi efetivo no rompimento da parede celular. Facilitando assim, a extração com fluido pressurizado dos compostos de interesse localizados no interior das células. A utilização de etanol como co-solvente, mostrou ser interessante devido suas propriedades polares, visto que, o solvente escolhido  $\text{CO}_2$  é um elemento apolar.

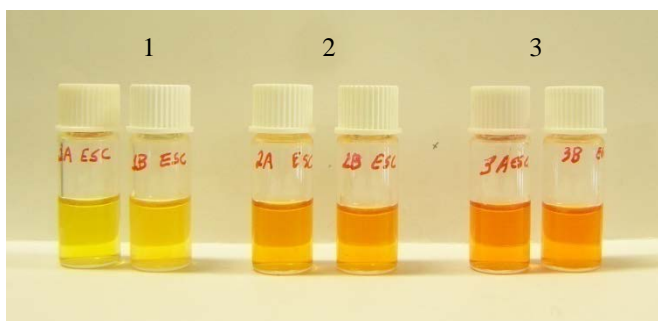


Figura 51. Amostras de células liofilizadas e maceradas com nitrogênio líquido (a) antes e (b) após a ESC.



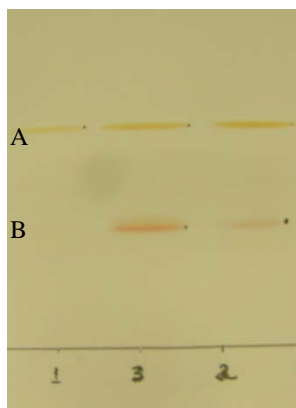
A concentração máxima de carotenoides alcançada foi  $28,992 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  de célula seca, obtida no ensaio 3. Estatisticamente, os ensaios 2 e 3 não se diferem pelo teste de *Tukey*, a 5 %, quando comparados aos resultados quantitativos. Analisando a Figura 52 verificamos que existe uma diferença visual do conteúdo extraído. O primeiro ensaio apresentou uma tonalidade amarela, o segundo alaranjado e o terceiro alaranjado – avermelhado. Essas diferenças qualitativas demonstram a característica da seletividade da ESC, do solvente e co-solventes na extração dos carotenoides específicos produzidos por *S. ruberrimus*.

Figura 52. Extratos obtidos em diferentes ensaios de ESC dissolvidos em éter de petróleo.



Análises qualitativas foram realizadas com o objetivo de caracterizar as amostras extraídas. O resultado da cromatografia em fina camada (TLC) está representado na Figura 53. A TLC demonstrou uma resolução satisfatória formando duas bandas distintas, permitindo identificar visualmente os principais carotenoides extraídos. A banda amarela (A) corresponde ao  $\beta$ -caroteno, que migrou rapidamente, seguida pela torularrodina, banda vermelha (B), que revelou mobilidade mais lenta. Esperava-se encontrar a banda laranja, próxima a banda amarela, que representa a molécula de toruleno, porém, ela não foi identificada.

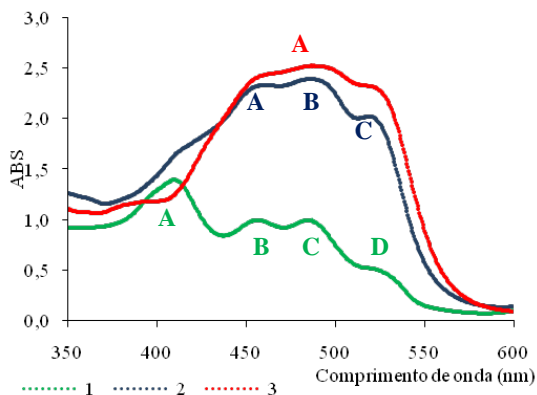
Figura 53. Placa de sílica após a separação dos pigmentos extraídos em diferentes condições de ESC (1, 2 e 3). (A) corresponde a molécula de  $\beta$ -caroteno e (B) Torularrodina.



Onde ensaio 1 corresponde a extração de células liofilizadas e co-solvente éter de petróleo e acetona (7:3, v:v), ensaio 2 corresponde a extração de células liofilizadas e macerada com nitrogênio líquido e co-solvente éter de petróleo e acetona (7:3, v:v) e ensaio 3 corresponde a extração de células liofilizadas e macerada com nitrogênio líquido e co-solvente etanol.

A relação de fluxo ( $R_f$ ) do  $\beta$ -caroteno obtido foi de 0,96 e da torularrodina de 0,51. Esses valores estão próximos aos dados encontrados no item 4.2.1. Os pigmentos foram identificados com base nos espectros UV-visível característicos e comparados com dados da literatura.

Figura 54. Espectro UV-visível obtido de extrato bruto dos três ensaios da ESC.



Onde ensaio 1 corresponde a extração de células liofilizadas e co-solvente éter de petróleo e acetona (7:3, v:v), ensaio 2 corresponde a extração de células liofilizadas e macerada com nitrogênio líquido e co-solvente éter de petróleo e acetona (7:3, v:v) e ensaio 3 corresponde a extração de células liofilizadas e macerada com nitrogênio líquido e co-solvente etanol.

Para esta análise foi utilizado o extrato bruto, sem separar previamente os compostos por cromatografia em camada delgada, como o encontrado em alguns estudos na literatura, Figura 54. Assim, os espectros UV-visível contêm uma mistura das moléculas  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, em diferentes proporções (Tabela 9). No entanto, não descartamos a possibilidade do extrato conter outras moléculas, como lipídeos e proteínas. Outro fator, que pode ter influenciado negativamente nos resultados, foi o uso de amostras muito concentradas.

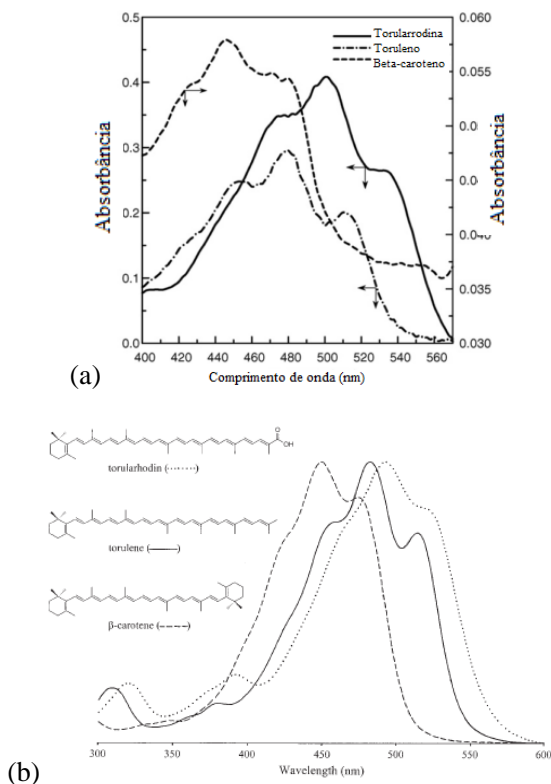
Tabela 9. Dados obtidos da análise do UV-visível característico dos extratos da ESC.

Ensaio	Picos	$\lambda$ (nm)	ABS
1	1A	409,5	1,393
	1B	456,0	0,995
	1C	459,0	0,988
	1D	489,0	0,991
2	2A	460,0	2,331
	2B	485,5	2,390
	2C	519,5	2,019
3	3A	488,0	2,519

Park *et al.* (2007) e Davoli e Weber (2002) também se apropriaram dessa técnica de cromatografia para separar, identificar e caracterizar os carotenoides pigmentados extraídos de leveduras. Os resultados obtidos estão coerentes com os dados aqui apresentados. As bandas, amarelo ( $\beta$ -caroteno) e laranja (toruleno) migraram rapidamente enquanto que a banda vermelha (torularrodina) apresentou uma mobilidade mais lenta. Os compostos foram identificados com base nos espectros de UV-visível característico e confirmados por análise em espectro de massa.

Park *et al.* 2007 verificaram que as moléculas menos polares  $\beta$ -caroteno (A) e toruleno (B) mostraram espectros de UV-visível com máximo de absorção em comprimentos de onda de 450 e 484 nm, enquanto que a torularrodina (C), mais polar, apresentou um máximo de absorção no UV-visível a 501 nm, conforme Figura 55a. Davioli e Weber (2002), que analisaram o conteúdo extraído de *Sporobolomyces roseus*, verificaram que os pigmentos amarelo e laranja mostraram ser menos polares no espectro UV-visível de absorção máxima, no comprimento de onda de 430,450 e 475 nm para a banda amarela, 459,482 e 515 nm para a banda laranja e 470, 492 e 521 nm para a banda vermelha. Suas identificações como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina foram sustentadas pela análise de espectro de massa.

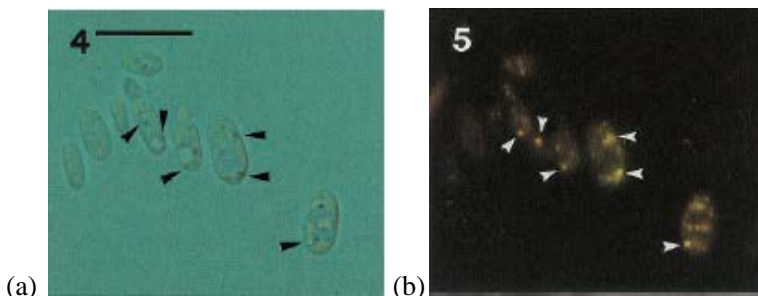
Figura 55. Espectro UV-visível característico dos principais carotenoides extraído (torularrodina, toruleno e  $\beta$ -caroteno) de: (a) *Rhodotorula glutinis* (b) *Sporobolomyces Roseus*.



Fonte: (a) Park *et al.* (2007) (b) Davioli et Weber (2002).

O primeiro ensaio, em que a amostra utilizada não passou por um pré-tratamento de rompimento celular, extraiu majoritariamente a molécula de  $\beta$ -caroteno. Davioli e Weber identificaram a localização dos carotenoides das células da levedura *Sporobolomyces roseus* e relataram que os pigmentos estão armazenados em pequenas gotas de lipídeos intracelulares (Figura 56). O  $\beta$ -caroteno tem propriedade apolar, o que lhe conferiu uma alta solubilidade com o dióxido de carbono supercrítico (solvente), que foi capaz de extrair seletivamente esta molécula do extrato de carotenoides através da parede celular.

Figura 56. Células de *Sporobolomyces roseus* analisadas em microscópio (Barra = 10  $\mu\text{m}$ ). (a) Organelas coloridas apresentaram propriedades típicas de gotículas de lipídeos (b) Gotículas de lipídeos identificadas pelo amarelo/ verde fluorescente na presença da tintura vermelha. Os pontos de referência estão marcados por setas, em ambas as imagens.



Fonte: Davioli e Weber (2007).

Nos outros dois ensaios, as células passaram por um pré-tratamento de rompimento celular, que diminuiu a gramatura da amostra. Acredita-se que com a lise da parede celular, diminuiu a barreira de proteção, favorecendo a difusão do solvente e do co-solvente no interior da célula, extraindo compostos com uma gama maior de polaridade. Assim, o uso de um co-solvente polar, no caso do etanol, propiciou a extração elevada de toruleno e torularrodina.

Monk *et al.* (2012) obtiveram a máxima concentração de carotenoides totais ( $2,90 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) no tratamento usando  $\text{CO}_2$  supercrítico (300 bar/ 40  $^\circ\text{C}$ ), seguida pela extração com DMSO e a mistura de solventes acetona/metanol (7:3, v/v). Concluindo que essa técnica resultou em dados atrativos para novos estudos.

Apesar do baixo rendimento do conteúdo extraído (3,11% utilizando etanol como co-solvente) quando comparado às técnicas convencionais de extração, em escala laboratorial (67,20 % extração de abrasão com vórtex e pérola de vidro), a tecnologia supercrítica continua sendo uma opção promissora para novos estudos. Esta tecnologia deve ser aprimorada através de técnicas de extração em grande escala por meio de pesquisas que investiguem: a melhor afinidade solvente/ co-solvente/ soluto; a combinação de técnicas de pré-tratamento mecânico de lise celular; os estudos da cinética de extração; extração em série ou fracionada.

Os parâmetros de temperatura, pressão e tempo de despressurização merecem uma pesquisa aprofundada. Além disso, a extração supercrítica apresenta vantagens por ser uma tecnologia limpa, por utilizar solvente atóxico e reutilizável, pelo processamento em curto espaço de tempo, pela simplicidade e pelo seu custo relativamente baixo de operação, após os investimentos iniciais (instalação).





## 5 CONCLUSÃO

A cinética de crescimento e produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* visando potencializar a biossíntese de torularrodina através de estresse oxidativo no cultivo em biorreator e a determinação de metodologias de extração de pigmentos empregando técnicas mecânicas, química e tecnologia supercrítica foram investigadas neste estudo.

O cultivo em biorreator de três concentrações de oxigênio dissolvido (20, 50 e 80%) foi avaliado quanto aos parâmetros cinéticos de crescimento celular e obtenção de carotenoides visando verificar a influência do estresse oxidativo na biossíntese dos carotenoides específicos: torularrodina, toruleno e  $\beta$ -caroteno. O tratamento com 50 % de oxigênio dissolvido foi selecionado como o mais apropriado aos critérios investigados. Este tratamento obteve uma biomassa máxima de  $13,126 \text{ g.L}^{-1}$ , velocidade específica de crescimento de  $0,123 \text{ h}^{-1}$  e uma produtividade de pigmentos de  $0,417 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A concentração de carotenoides totais foi obtida em 56 h de fermentação, correspondendo a  $30,607 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os pigmentos individuais foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. A produção máxima alcançada foi de  $11,948 \text{ mg.L}^{-1}$  de torularrodina e  $11,759 \text{ mg.L}^{-1}$  de toruleno, e em menor quantidade,  $\beta$ -caroteno com  $6,901 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Cinco métodos de lise celular foram testados e comparados através de análises de cromatográficas e de microscopia eletrônica de varredura. A extração pela abrasão de pérola de vidro e agitação em vórtex mostrou ser a mais efetiva na recuperação dos principais carotenoides produzidos pela *S. ruberrimus*. O conteúdo de carotenoides totais extraído foi de  $0,184 \text{ mg.g}^{-1}$  de célula seca e específicos de  $3,046 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno,  $2,672 \text{ mg.L}^{-1}$  de torularrodina e  $0,794 \text{ mg.L}^{-1}$  de toruleno.

Método alternativo de extração com dióxido de carbono supercrítico foi avaliado em amostras de células secas, após 72 h de fermentação, e sugere ser uma técnica promissora nos dias atuais. O valor agregado dos carotenoides e a demanda do mercado torna-se importante aprofundar pesquisas neste tema.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Pela experiência adquirida neste trabalho acerca da produção de carotenoides de *S. ruberrimus* (cultivo em biorreator em condições de estresse oxidativo), da avaliação dos métodos de rompimento celular e da investigação de técnicas de extração, análise e quantificação de pigmentos, pode-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

- Realizar novas fermentações mantendo fixa a agitação do biorreator e controlar a concentração de oxigênio dissolvido, a partir da injeção de oxigênio puro, a fim de diminuir o cisalhamento no meio;

- Aprofundar as investigações das extrações utilizando a tecnologia supercrítica, através do estudo da cinética de extração, da escolha de solvente/ co-solvente, além de testar outros parâmetros de pressão, temperatura, vazão de solvente;

- Identificar os carotenoides específicos extraídos por espectrometria de massas sequencial com ionização química a pressão atmosférica (APCI - MS);

- Verificar a morfologia celular, após os tratamentos de ruptura das células em alta pressão, de *S. ruberrimus* pela análise de microscopia eletrônica de varredura.

## REFERÊNCIAS

[1] Disponível em: <http://www.chemspider.com/> Acessado em: 03/01/2015.

ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy and Food Sciences**, v.6, n.1, p. 71-78, 2011.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 107–113, 2007.

AMORIM-CARRILHO, K.T.; CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 56 p.49–73, 2014.

ASENJO J. A.; ANDREWS, B. A.; HUNTER, J. B.; LE CORRE, S. Microbial cell- lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 158-164, 1985.

BISWAS, S. K.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA K.; MIYAJI, M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1191–1199, 2001.

BRITTON, G.; JENSEN, L. S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: **Carotenoids: isolation and analysis**. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag. Cap. 2, p. 13-26, 1995.

BUZZINI, P.; MARTINI, A.; GAETANI, M.; TURCHETTI, B.; PAGNONI, U. M.; DAVOLI, P. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 36, p.687–692, 2005.

CABRAL, M.M.S., CENCE, K., ZENI, J., TSAI, S.M., DURRER, A., FOLTRAN, L.L., TONIAZZO, G., VALDUGA, E., TREICHEL, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **Euro Food Res Technology**. v. 233, p. 159–166, 2011.

CARDOSO, L. A. C. **Identification de facteurs opératoires influents em vue d'une production microbienne optimale de torularhodine et as fonctionnalisation enzymatique, à partir d'études cinétiques.** 2008. 163 f. thèse em Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. École Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement. L'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, França, 2008.

CHOUDHARI, S. M.; SINGHAL, R. S. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene from mated cultures of *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896, **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 349–354, 2008.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2012.

DAS, A.; YOON, S. H.; LEE, S. L.; KIM, J. Y.; OH, D. K.; KIM, S. W. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 505–512, 2007.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In T. W. Goodwin (Ed.), **Chemical biochemistry plant pigments**. New York: Academic, 1976.

DAVOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R. W. S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 4, p 392–397, 2004.

DAVOLI, P.; WEBER, R. W. S. Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*. **Mycologist**, v. 16, n. 3, 2002.

DE MIGUEL, T. J.; DIAZ, A.; VILLA, T. G. The genus *Rhodospiridium*: a potencial source of  $\beta$ -carotene. **Microbiology**, v. 9, p. 373-375, 1997.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389-406, 2005.

EGYHÁZI, A.; DIENES, D.; RÉCZEY, K.; SIMÁNDI, B. Examination of cellulase enzyme production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using supercritical carbon dioxide cell disruption. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, p. 18, v. 3, p. 257–261, 2004.

- FARKADE, V. D.; HARRISON, S.; PANDIT, A. B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering**, v. 23, p. 247–257, 2005.
- FELL, J. W.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A.; PINEL, N.; YARROW, D. Recognition of the *basidiomycetous* yeast *Sporobolomyces ruberrimus* sp. nov. as a distinct species based on molecular and morphological analyses. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 4, p. 265–270, 2002.
- FILHO, G. L.; ROSSO, V. V. DE; MEIRELES, M. A. A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p. 33–39, 2008.
- FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal Biotechnology**, v. 10, p. 1165–1171, 2001.
- FONSECA, R.A.S.; RAFAEL, R.S.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biochemical**, v. 10, p. 1165–1171, 2011.
- FONTANA, J. D.; CZECZUGA, B.; BONFIM, T.M.B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H.; GUIMARÃES, M. F.; BARON, M., Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugar cane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 121–125, 1996.
- FONTANA, J.D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. Carotenoides Cores Atraentes e Ação Biológica. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 13, p. 40-45, 2000.
- FOOTE, C. S.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen X carotenoid quenching parallels biological protection. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 92, p. 5216-5218, 1970.
- FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of  $\beta$ -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656- 663, 2009.

FRANCIS, F. J. Handbook of food colorant patents. **Food and Nutrition Press Inc.** USA, 1986.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 163–80, 2009.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, v.17, p.1001-1006, 1995.

GARDEN, E. L. Jr. Fermentation kinetics and productivity. *Chemistry and Industry*, February 12, p. 154 – 159, 1955.

GOODWIN, T. W. **The compative biochemistry of carotenoids.** Chapman & Hall LTD., 1<sup>a</sup> edition, London, 1952.

GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I. Empis, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3-4, p. 362–367, 2006.

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

GU, Z.; DEMING, C.; YONGBIN, H.; ZHIGANG, C.; FEIRONG, G. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacters phaeroides*. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1082–1088, 2008.

HAARD, N. F. Astaxantin formation by yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnology Letter**, Dordrecht, v. 10, p. 609-614, 1988.

HARI, R. P. K.; PATEL, T.; MARTIN, A. M. Studies on a new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 43-51, 1992.

HERZ, S.; WEBER, R. W. S.; ANKE, H., MUCCI, A.; DAVOLI, P. Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). **Phytochemistry**. v. 68, n. 20, p. 2503–2511, 2007.

IRAZUSTA, V.; NIETO-PENÁLVOR, C. G.; CABRAL, M. E.; AMOROSO, M. J.; FIGUEROA, L. I. C. Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 803–809, 2013.

JIN, E.; POLLE, J. E. W.; LEE, H. K. K.; HYUN, S. M.; CHANG, M. Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Applications. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, n.2, v. 13, p. 165-174, 2003.

JOMOVA, .K; VALKO M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 102-110, 2013.

JONHSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v.11, p.297-326, 1995.

KAISER, P.; SURMANN, P.; VALLENTIN, G.; FUHRMANN, H. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 1, p. 142–149, 2007.

KARRER, P.; HELFENSTEIN, A.; WEHRLI, H.; WETTSTEIN, A. Pflanzenfarbstoffe XXV Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. **Helvetica Chimica Acta**, v. 13, n. 5, 1930.

KNOWLES, D. E.; RICHTER, B.E.; WYGANT, M. B.; NIXON, L.; ANDERSEN, M. R. Supercritical fluid chromatography: a new technique for Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). **Journal Association of Analytical Chemistry**, v.71, n.3, p. 451-457, 1988.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003 – 1010, 1994.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 5<sup>o</sup> ed. London, UK: Elsevier, v.3, 2011.

LIM, G.; LEE, S.; LEE, E.; HAAM, S.; KIM, W. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Journal Biochemical Engineering**, v. 11, p. 181–187, 2002.

LIU, Y.S.; WU, J.Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Journal of Biochemical Engineering**, v.36, p. 182–189, 2007.

LOPANDIC, K.; PRILLINGER, H.; MOLNAR, O.; GIMÉNEZ-JURADO, G. Molecular characterization and genotypic identification of *Metschnikowia* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 393-402, 1996.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation in batch process at controlled pH. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Technology Engineering**, v. 1, n. 4, p. 393-411, 1959.

MACHMUDAH, S.; KAWAHITO, Y.; SASAKI, M.; GOTO, M. Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 308–314, 2008.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v.107, n.1, p.145–150, 2008.

MACÍAS-SANCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; L.M. LUBIAN, MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and *chlorophyll* from *Dunaliella salina*, *Talanta* 77 (3) (2009) 948.

MCBRIDE, J. It plants pigments paint an antioxidants substance rainbow. **Agricultural Research**, Washington, v. 44, Iss. 11, p. 4- 8, 1996.

MEDEIROS, F.O.; ALVES, F.G.; LISBOA, C.R.; MARTINS, D.S.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, p. 336–339, 2008.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides em los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, n. 2, v. 54, p. 209-215, 2004.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue : Supercritical fluid extraction of carotenoid fraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 22–33, 2013.

MICHELON, M.; BORBA, T.M.; RAFAEL, R.S.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a



comparison between different techniques of cell disruption.. **Food Science Biotechnology**, v. 21, p. 1–8, 2012.

MILLER, G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p.426-428, 1959.

MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. **Biocatalysis and Agricultural biotechnology**, v.2, n.2, p. 165–169, 2013.

MONKS, L.; TIGGEMANN, L.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, V. J.; VALDUGA, E. Assessment of Carotenoids Recovery through Cell Rupture of *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 Using Compressed Fluids. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2353- 2359, 2012.

MONTERO, O.; MACÍAS- SÁNCHEZ, M. D.; LAMA, C. M.; LUBÍAN, L. M.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; OSSA, E. M. DE LA. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -Carotene from a Marine Strain of the *Cyanobacterium Synechococcus* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9701-9707, 2005.

MORAIS, F. L. **Carotenoides: Características Biológicas e Químicas**. Monografia – Curso de Qualidade em Alimentos IV – Universidade de Brasília CET – Centro de Excelência em Turismo, Brasília, 2006.

OLIVIER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543-555, 2000.

PARK, P. K.; KIM, E. Y.; CHU, K. H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. **Separation and Purification Technology**, v.53, n. 2, p. 148–152, 2007.

PETRIK, S.; MAROVA, I.; HARONIKOVA, A.; KOSTOVOVA, I.; BREIEROVA, E. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1537–1551, 2013.

PENNACCHI, M. G. C; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D.; VENDRUSCOLO, F.; MARANHO, L. T.; MARC, I.; CARDOSO, L. A. C. A comparison of cell disruption procedures for the recovery of intracellular carotenoids from

*Sporobolomyces ruberrimus* H110. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 6, p. 136-143, 2015.

RAZAVI, S. H. UV-HPLC / APCI-MS Method for Separation and Identification of the Carotenoids Produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H110. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. v.25, n.2, p. 1-10, 2006.

RAZAVI, S. H.; MARC, I. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid productions by *Sporobolomyce sruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, Iran, v. 25, p. 59-64, 2006.

RECANSENS, F.; ABAROUDI, K.; TRABELSI, F.; CALLOUD-GABRIEL, B. Mass transport enhancement in modified supercritical fluid. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 3505-3518, 1999.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blücher Ltda, 1ª edição, São Paulo, p.155-157, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p.726–740, 2010.

SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; SATONAKA, K.; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. Properties of a high torularhodin producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 2, p. 203–205, 2000.

SAKAKI, H.; NOCHIDE, H.; KOMEMUSHI, S.; MIK 12, W. Effect of Active Oxygen Species on the Productivity of Torularhodin by *Rhodotorula glutin* N° 21. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 3, p. 338-340. 2002.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. Volume. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 1ª ED, 2001.

SCHROTT, E. L. **Carotenoids in plant photoprotection**. Pure Apply Chemistry. Volume 57, p.729-734, 1985.

SEDMAK J J; WEERASIGNHE D K; JOLLY S O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffiarhodozyma*. **Biotechnology Techniques**, n.4, p.107-112, 1990.

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

SQUINA, F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2003.

TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1996.

**The Global Market for Carotenoids**. Code - FOD025D, Published - September 2011, Analyst - Ulrich Marz, Category - Food And Beverage. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>. Acessado em 07/01/2015.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2551 – 2557, 2005.

UNGUREANU, C.; FERDES, M.; CHIRVASE, A. A.; MOCANU, E. Method for torularhodin separation and analysis in the yeast *rhodotorula rubra* aerobically cultivated in lab bioreactor. **International. Conference on Chemical and Process Engineering**, v. 24, p. 943-948, 2011.

UNGUREANU, C.; MARCHAL, L.; CHIRVASE, A. A.; FOUCAULT, A. Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 406–409, 2013.

VALDUGA, E; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2429 – 2436, 2009a.

VALDUGA, E.; RAUSCH RIBEIRO, A. H.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207–213, 2013.

VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TATSCH, P.O.; TREICHEL, H.; FURIGO, A.J.; DI LUCCIO, M. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food Bioprocess Technology**, v.2, p. 234–238, 2009 b.

VALDUGA, E., VALERIO, A., TREICHEL, H., DI LUCCIO, M., FURIGO, A.J. Study of the bio- production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre- treated agro-industrial substrates. **Journal Chemical Technology Biotechnology**. v.83, p. 1267–1274, 2008.

VEGA, P. J.; BALABAN, M.O.; SIMS, C.A.; O'KEEFE, S.F.; CORNELL, J. A. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RRSM. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 757- 759, 1996.

VILLELA, G. G. **Pigmentos Animais: Zoocromos**. Editado pela Academia Brasileira de Ciências, p. 5-31, 1976.

WEBER, R. W. S.; HEIDRUN, A.; DAVOLI, P. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). **Journal of chromatography**, v. 1145, p.118–122, 2007.

WILEY, J.; SONS, I. **Experimental biochemistry a laboratory manual**. New York, p.127-133, 1960.

YAMASAKI, I; FUJII, H. Studies on *Sporobolomyces* red yeast. Part 7. Classification of the genero *Sporobolomyces* and *Bullera*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 24, p.11-15, 1950.

ZAIDI, A.; LI, H.; SLIWKA, H. R.; PARTALI, V.; ERNST, H.; MELO, T. B. Energy and electron transfer reactions of polyenic acids with variable chain lengths. **Tetrahedron**, v. 69, p. 219–227, 2013.

**APÊNDICE A – Tratamento de dados da cinética de fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, em 72 h, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.**

Tabela 1A. Concentração de biomassa (X), substrato (S) e carotenoides totais (P) obtidos experimentalmente na fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

Tempo (h)	X (g.L <sup>-1</sup> )	Ln(X)	S (g.L <sup>-1</sup> )	P (mg.L <sup>-1</sup> )
0,00	0,087	-2,440	33,000	
3,33	0,269	-1,315	31,805	0,509
7,33	0,415	-0,879	31,019	
11,83	0,818	-0,201	27,936	2,324
15,83	1,019	0,018	25,766	
19,83	2,233	0,804	23,186	5,728
23,83	5,136	1,636	21,253	
27,83	5,698	1,740	16,087	5,566
31,83	5,682	1,737	17,097	
36,33	7,404	2,002	10,452	12,014
41,33	9,550	2,257	6,281	
45,83	11,036	2,401	4,002	13,490
49,83	9,940	2,297	2,451	
53,83	-	2,388	0,454	18,590
57,83	9,314	2,231	0,079	
61,83	10,245	2,327	0,000	17,649
69,83	9,985	2,301	0,000	
73,83	10,256	2,328	0,000	22,967

Tabela 2A. Concentração e produtividade de carotenoides totais e específicos. Dados referentes à fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

Tempo (h)	Torularrodina (mg.L <sup>-1</sup> )	Toruleno (mg.L <sup>-1</sup> )	β – caroteno (mg.L <sup>-1</sup> )	CT (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0,256	0,047	0,206	0,509
8	1,018	0,472	0,834	2,324
16	2,409	1,570	1,749	5,728
24	2,280	1,754	1,533	5,566
32	4,502	4,314	3,199	12,014
40	5,201	4,962	3,327	13,490
48	7,039	7,428	4,123	18,590
56	6,894	7,019	3,736	17,649
72	9,967	8,389	4,610	22,967
<b>Produtividade</b>				
<b>(mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	0,135	0,116	0,061	0,312

Figura 1A. Concentração celular de *S. ruberrimus* (X) ajustado ao polinômio de sexto grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

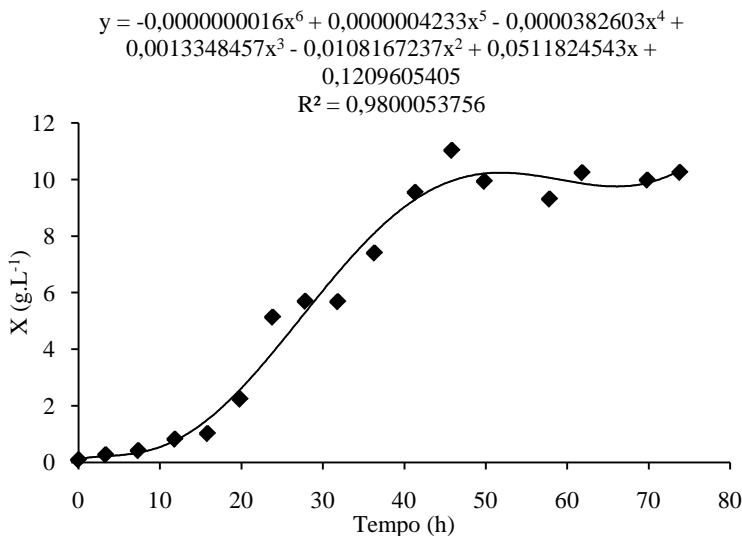


Figura 2A. Consumo de substrato (S) por *S. ruberrimus* ajustados ao polinômio de sexto grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

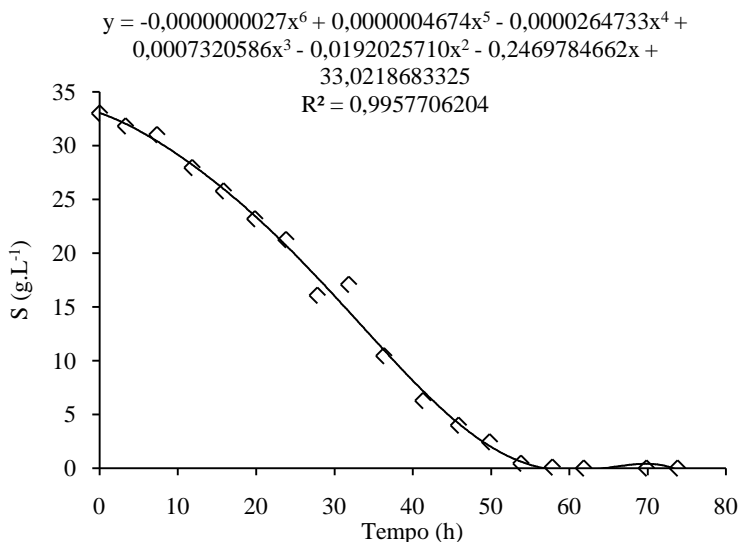


Figura 3A. Produção de carotenoides totais (P) por *S. ruberrimus* ajustados a regressão linear. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 20 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

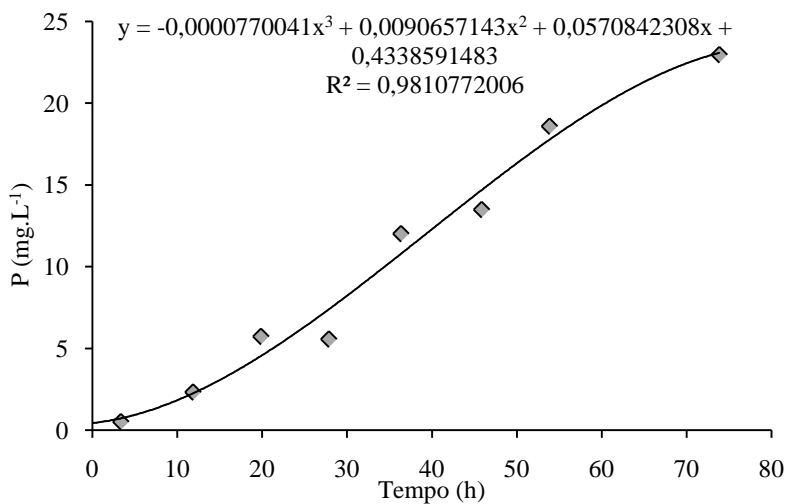


Figura 4A. Determinação da fase exponencial de crescimento de *S. ruberrimus* e da velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). Dados referentes à fermentação em biorreator a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

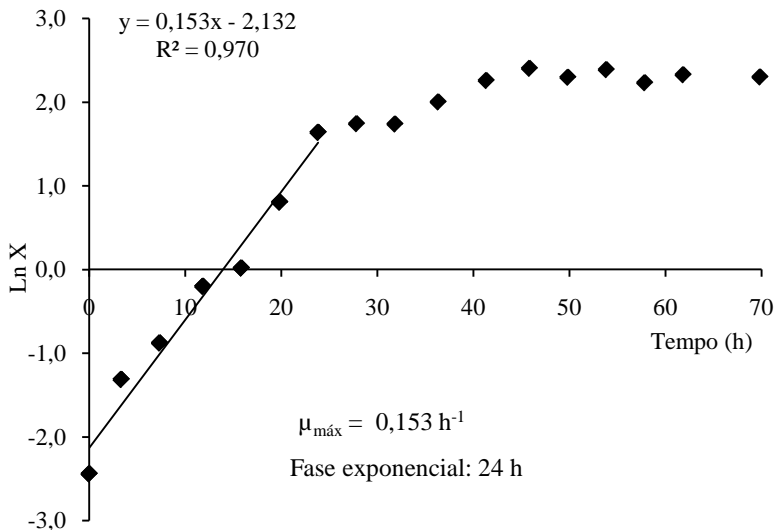


Figura 5A. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* ( $\mu_x$ ), sem considerar a fase exponencial de crescimento. Fermentação em biorreator, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

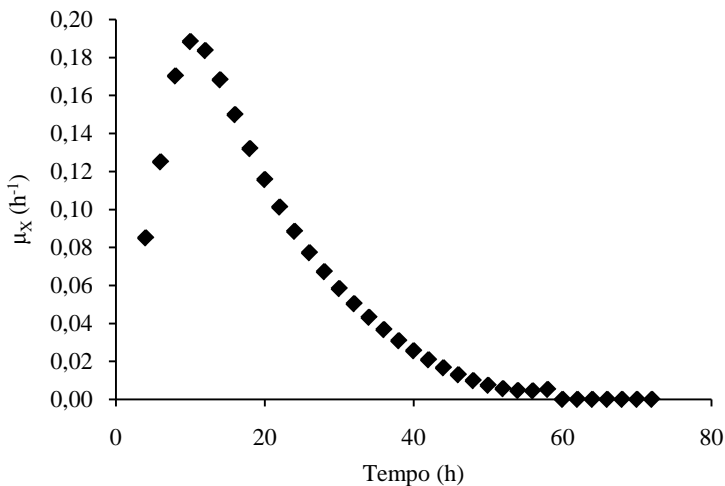




Figura 6A. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* ( $\mu_x$ ), considerando a fase exponencial de crescimento. Fermentação em biorreator, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

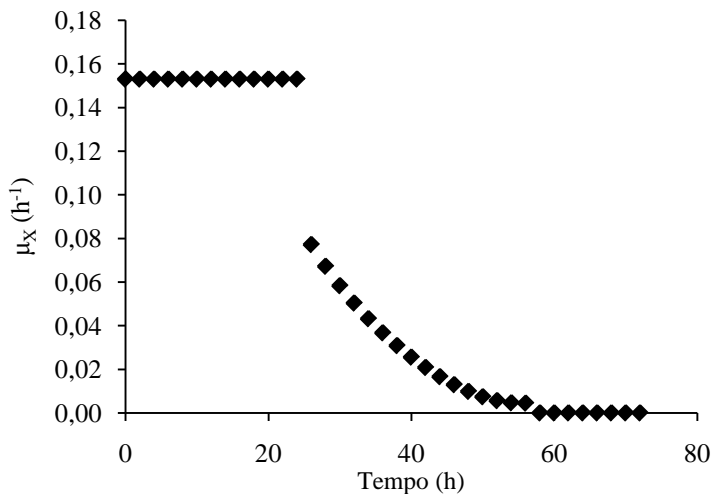


Figura 7A. Velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) por *S. ruberrimus*. Fermentação em biorreator, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

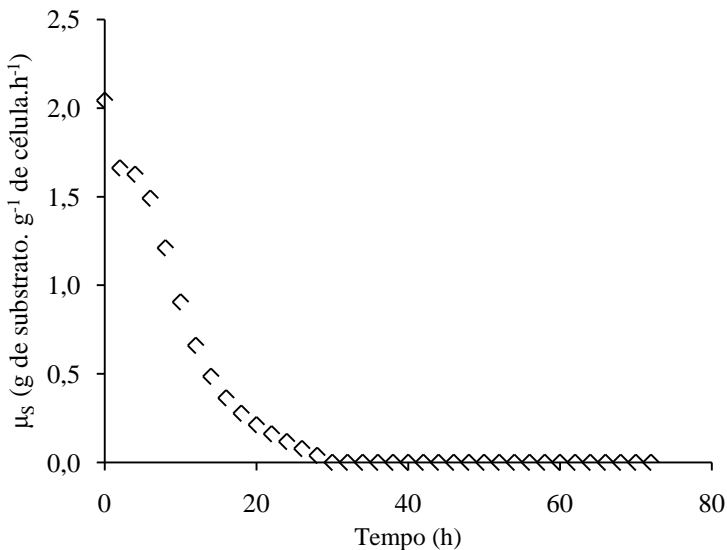


Figura 8A. Velocidade específica de produção de carotenoides totais ( $\mu_P$ ) por *S. ruberrimus*. Fermentação em biorreator, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

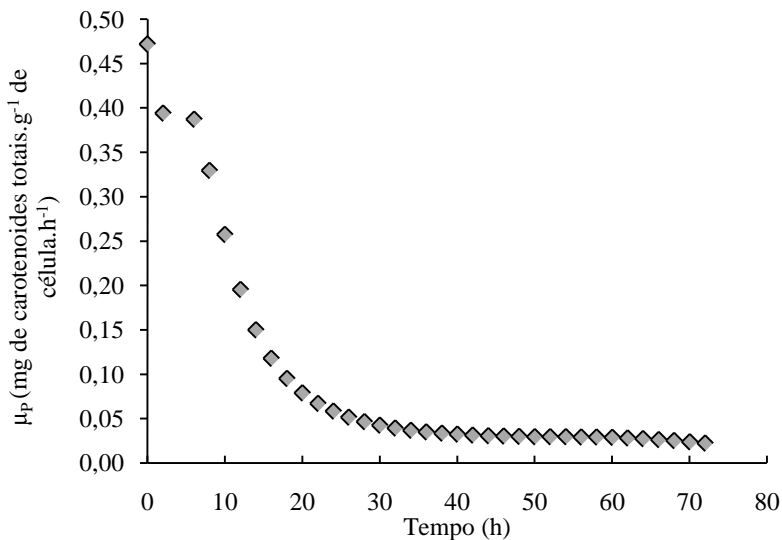


Figura 9A. Coeficiente de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ;  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

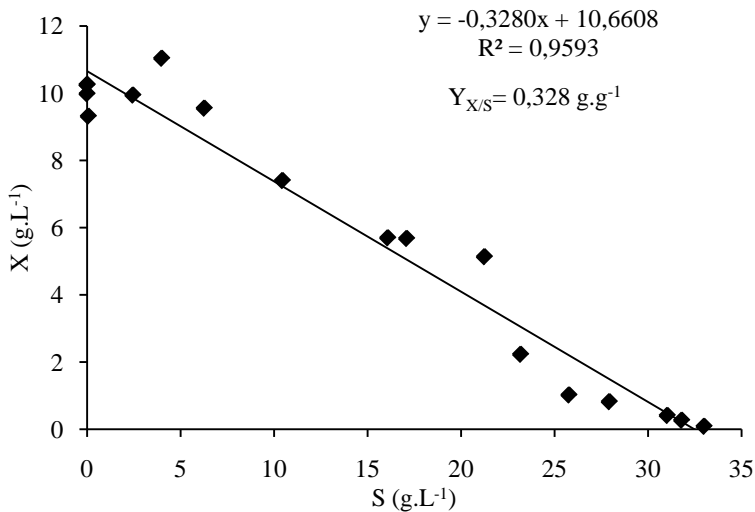


Figura 10A. Coeficiente de conversão de biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ;  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

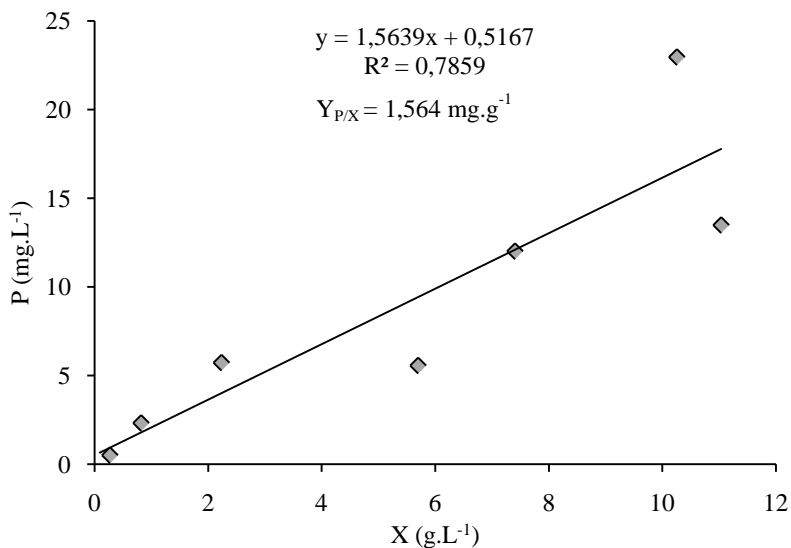


Figura 11A. Coeficiente de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ;  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

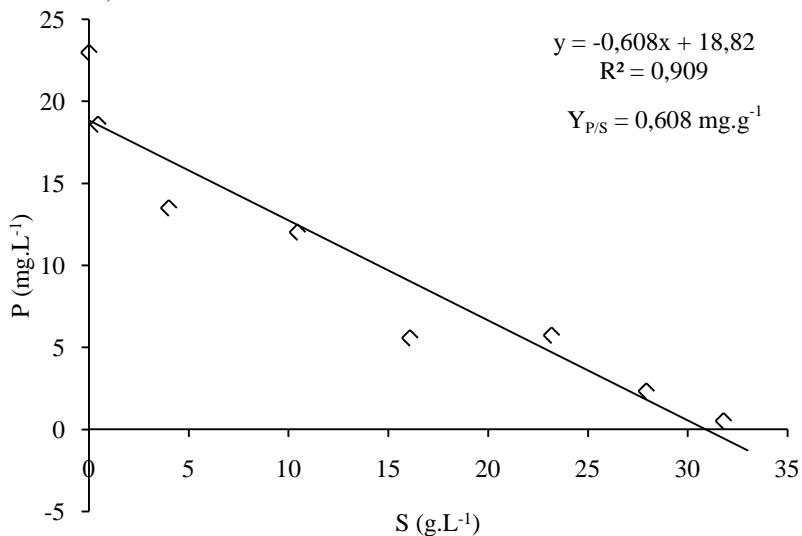


Figura 12A. Obtenção das constantes empíricas da equação de crescimento de *S. ruberrimus* parcialmente associado ao produto. Fermentação em biorreator a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

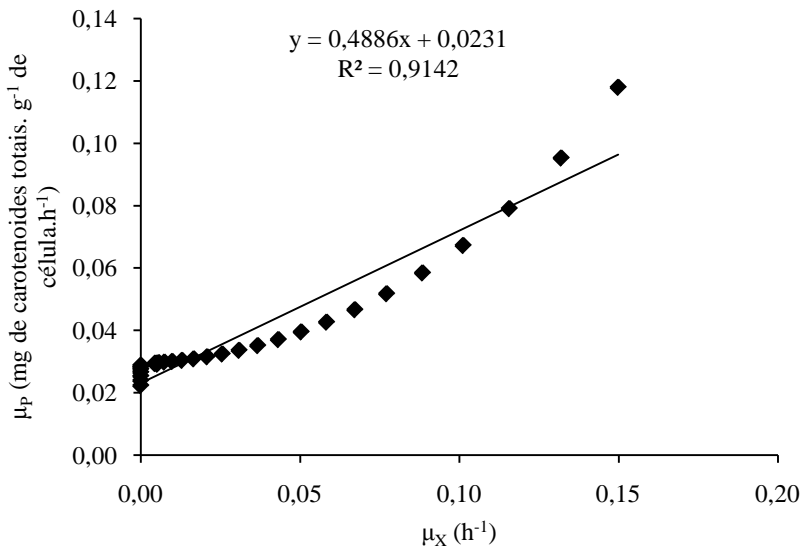


Figura 13A. Dados de controle registrados durante a fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 20 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

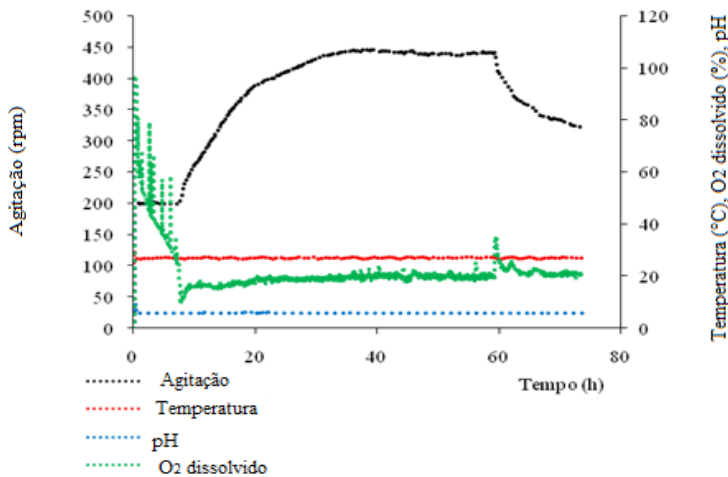


Figura 14A. Amostras para determinação de carotenoides específicos em HPLC. Extrato de carotenoides totais extraídos por abrasão com pérola de vidro e vórtex, em diferente tempo de fermentação em biorreator a 20 % de oxigênio dissolvido.

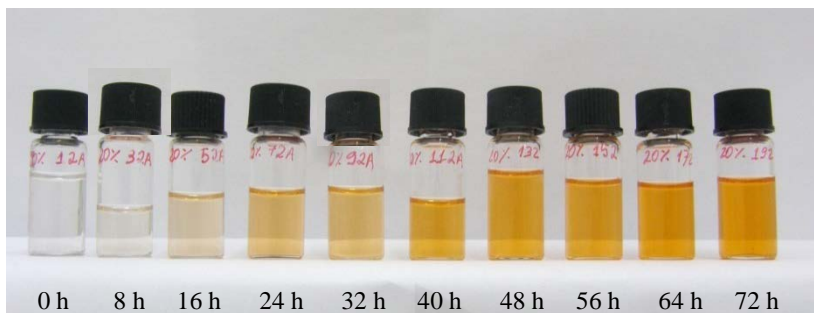


Figura 15A. Cromatograma obtido da análise em HPLC para quantificação de carotenoides específicos das amostras da figura 14A.

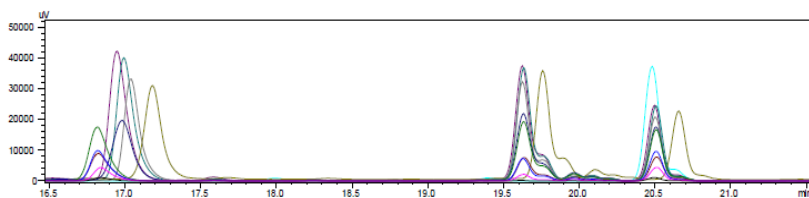


Tabela 3A. Legenda do cromatograma da figura 15A.

Amostra	Legenda	Tempo (h)
1	Preto	0
2	Rosa	8
3	Azul	16
4	Marrom	24
5	Verde	32
6	Azul escuro	40
7	Verde musgo	48
8	Cinza	56
9	Azul grafite	64
10	Roxo	72
11	Verde água (padrão $\beta$ -caroteno)	0,008 g/L



**APÊNDICE B – Tratamento de dados da cinética de fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, em 72 h, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.**

Tabela 1B. Concentração de biomassa (X), substrato (S) e carotenoides totais (P) obtidos experimentalmente na fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

Tempo (h)	X (g.L <sup>-1</sup> )	Ln(X)	S (g.L <sup>-1</sup> )	P (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0,374	-0,984	33,000	0,564
4	0,431	-0,842	30,106	
8	0,567	-0,567	29,489	0,627
12	1,700	0,531	29,033	
16	2,621	0,964	28,015	3,809
20	4,386	1,478	24,951	
24	4,795	1,568	15,046	7,232
28	5,383	1,683	12,157	
32,5	7,201	1,974	7,703	19,682
36	9,899	2,292	4,348	
40	9,952	2,298	1,729	22,442
44	10,364	2,338	0,028	
48	11,701	2,460	0,047	24,564
52	13,126	2,575	0,012	
56	13,126	2,575	0,000	30,607
60	12,538	2,529	0,000	
64,5	12,231	2,504	0,000	25,569
68	8,563	2,147	0,000	
72	7,174	1,971	0,000	26,262

Tabela 2B. Concentração e produtividade de carotenoides totais e específicos. Dados referentes à fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

Tempo (h)	Torularrodina (mg.L <sup>-1</sup> )	Toruleno (mg.L <sup>-1</sup> )	β – caroteno (mg.L <sup>-1</sup> )	CT (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0,214	0,117	0,233	0,564
8	0,271	0,092	0,264	0,627
16	1,620	1,023	1,167	3,809
24	3,648	1,510	2,075	7,232
32	6,074	7,856	5,752	19,682
40	7,428	9,538	5,476	22,442
48	8,180	10,549	5,835	24,564
56	11,948	11,759	6,901	30,607
64	9,869	10,108	5,591	25,569
72	11,223	9,453	5,586	26,262
<b>Produtividade</b>				
(mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,163	0,162	0,093	0,417

Figura 1B. Concentração celular de *S. ruberrimus* (X) ajustado ao polinômio de sexto grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

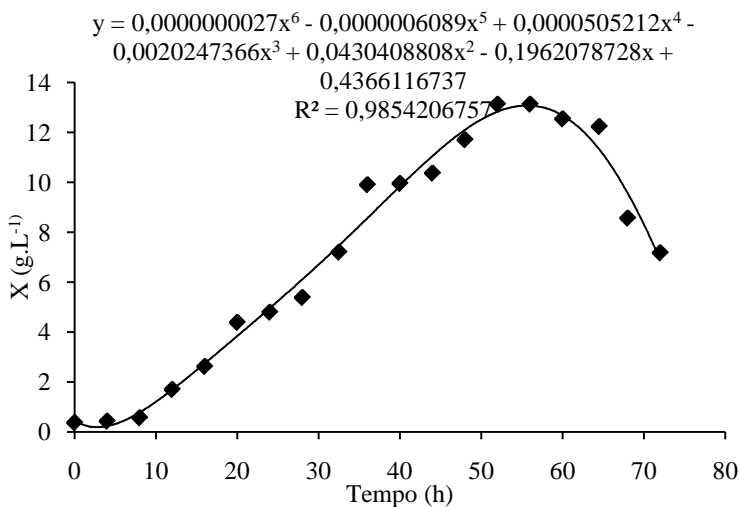




Figura 2B. Consumo de substrato (S) por *S. ruberrimus* ajustados ao polinômio de sexto grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

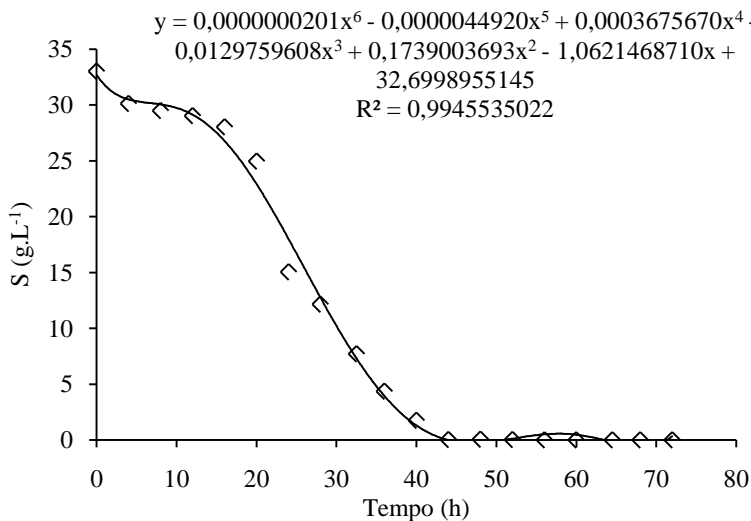


Figura 3B. Produção de carotenoides totais (P) por *S. ruberrimus* ajustados ao polinômio do terceiro grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 50 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

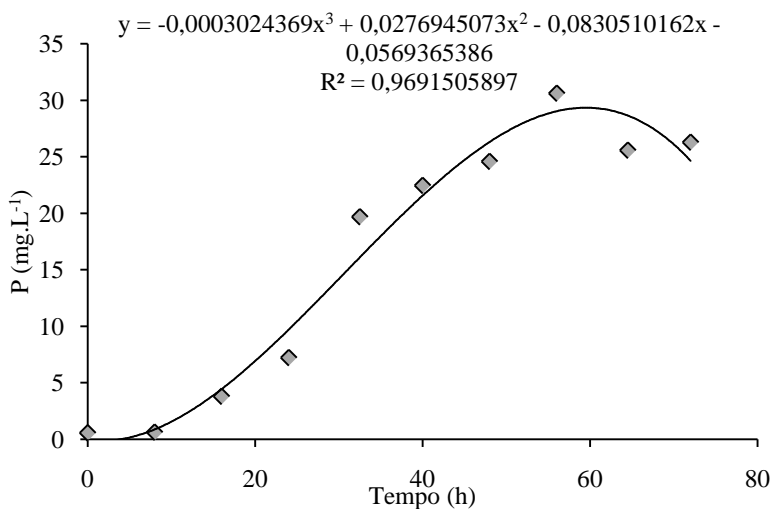


Figura 4B. Determinação da fase exponencial de crescimento de *S. ruberrimus* e da velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). Dados referentes à fermentação em biorreator a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

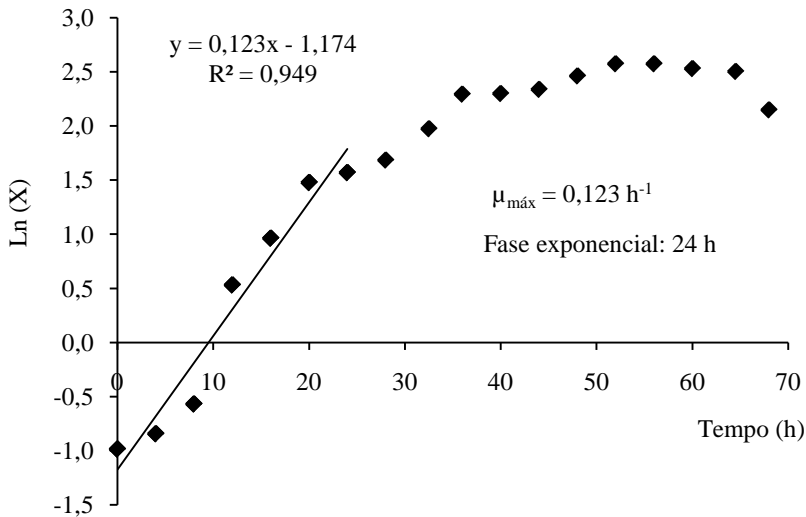


Figura 5B. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* ( $\mu_x$ ), sem considerar a fase exponencial de crescimento. Fermentação em biorreator, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

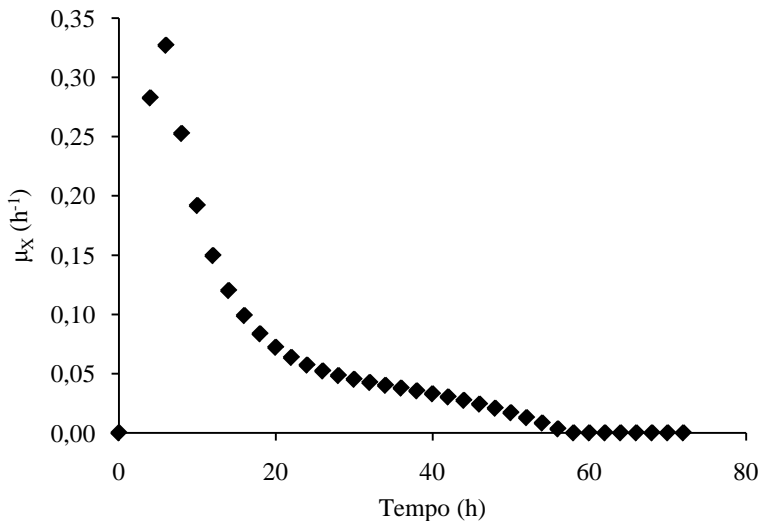


Figura 6B. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* ( $\mu_x$ ), considerando a fase exponencial de crescimento. Fermentação em biorreator, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

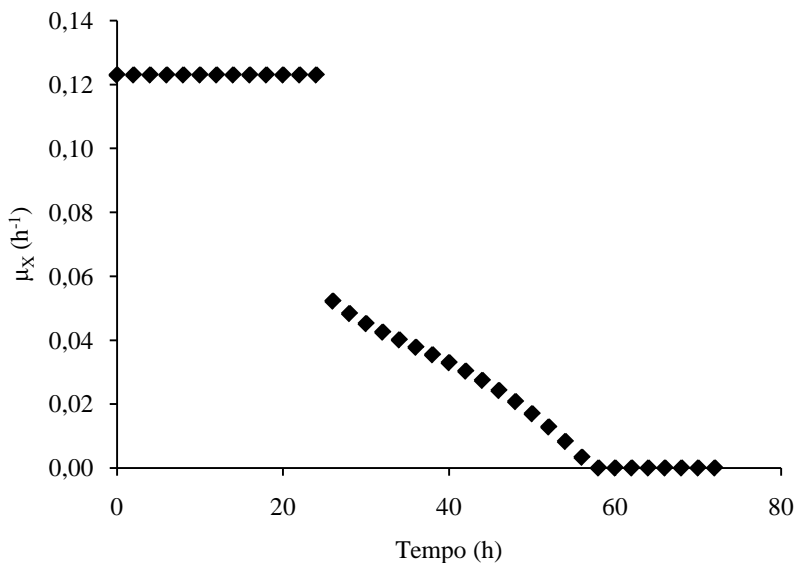


Figura 7B. Velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) por *S. ruberrimus*. Fermentação em biorreator, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

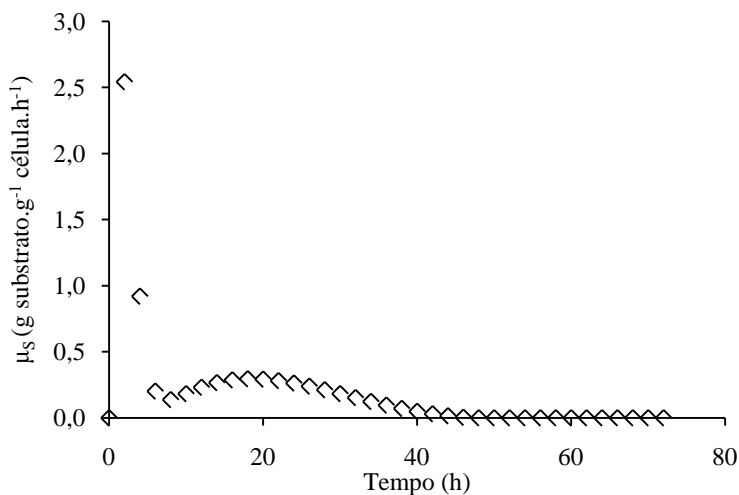


Figura 8B. Velocidade específica de produção de carotenoides totais ( $\mu_p$ ) por *S. ruberrimus*. Fermentação em biorreator, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

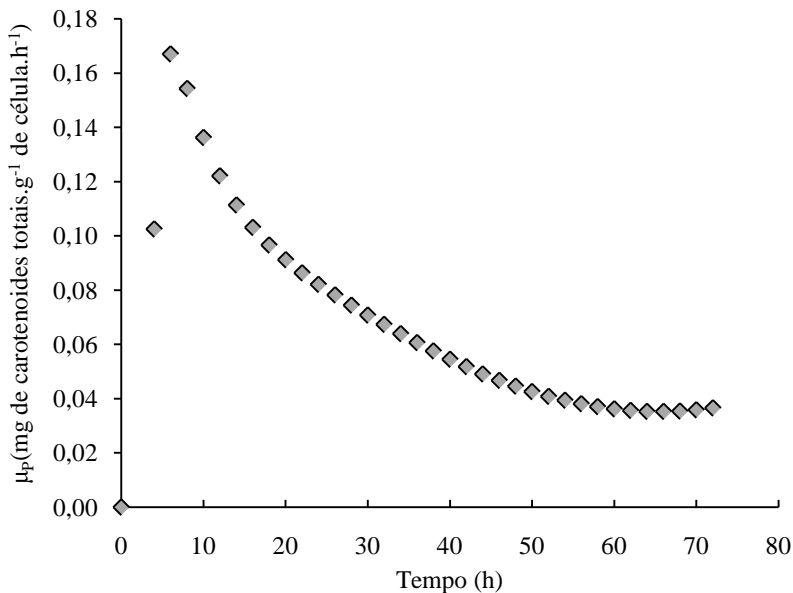


Figura 9B. Coeficiente de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ; g.g<sup>-1</sup>). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

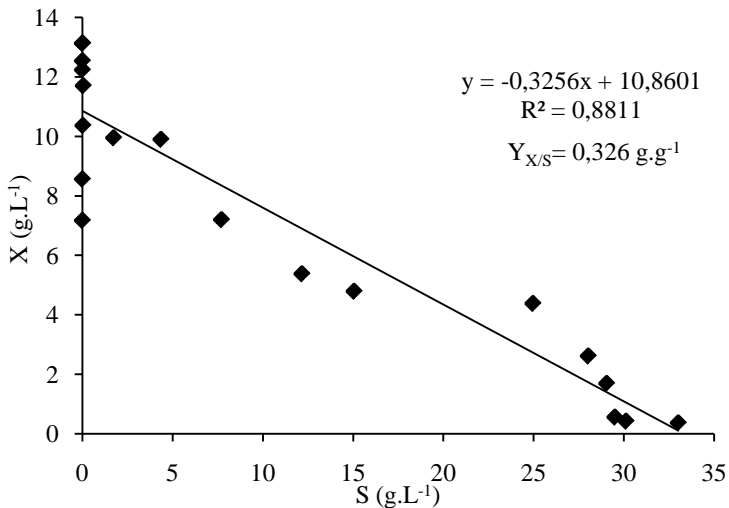


Figura 10B. Coeficiente de conversão de biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ;  $\text{mg.g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

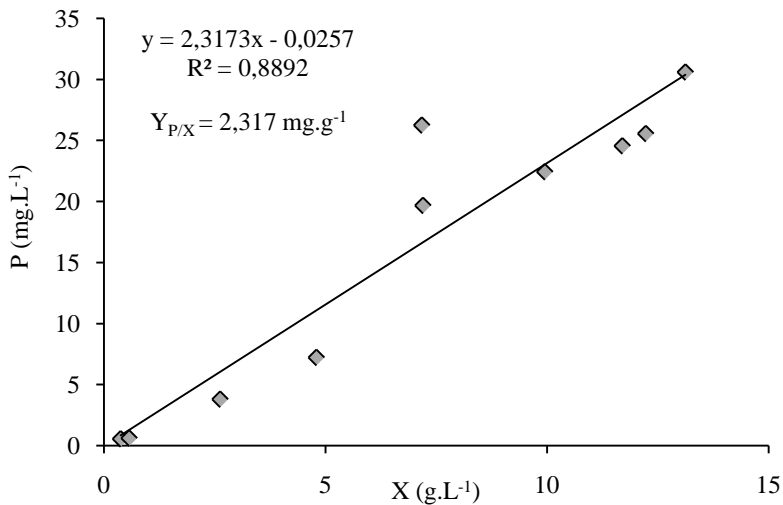


Figura 11B. Coeficiente de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ;  $\text{mg.g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

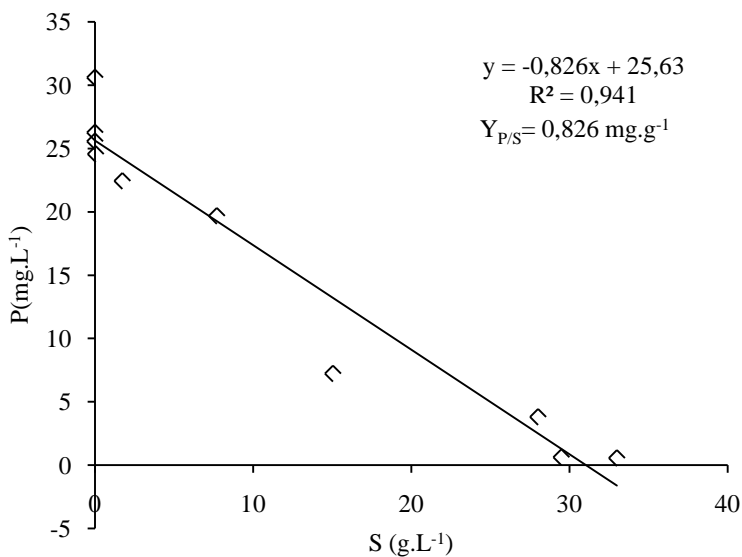


Figura 12B. Obtenção das constantes empíricas da equação de crescimento de *S. ruberrimus* parcialmente associado ao produto. Fermentação em biorreator a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

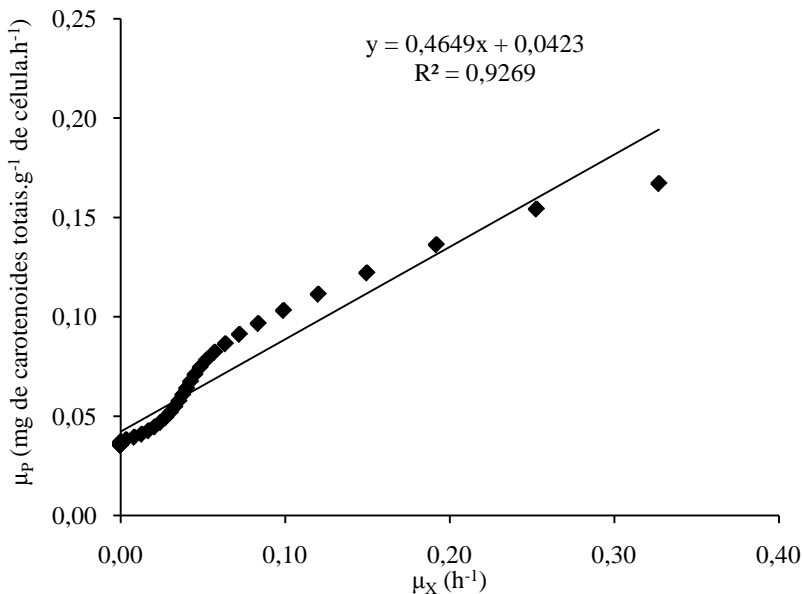


Figura 13B. Dados de controle registrados durante a fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 50 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

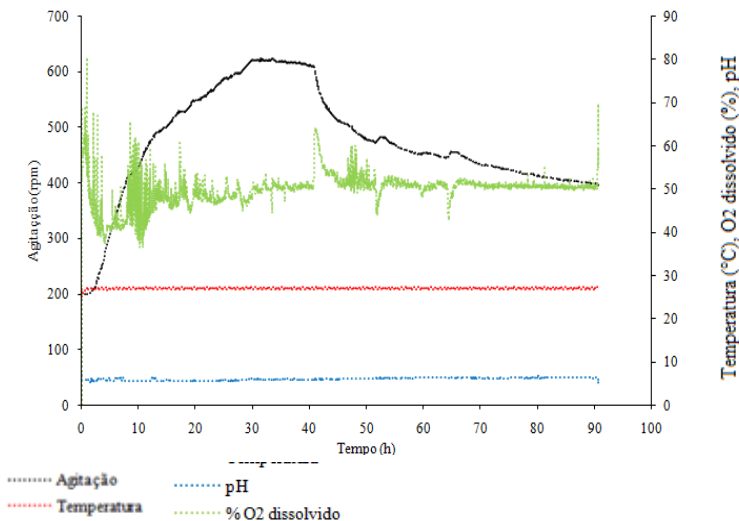


Figura 14B. Amostras para determinação de carotenoides específicos em HPLC. Extrato de carotenoides totais extraídos por abrasão com pérola de vidro e vórtex, em diferente tempo de fermentação em biorreator a 50 % de oxigênio dissolvido.

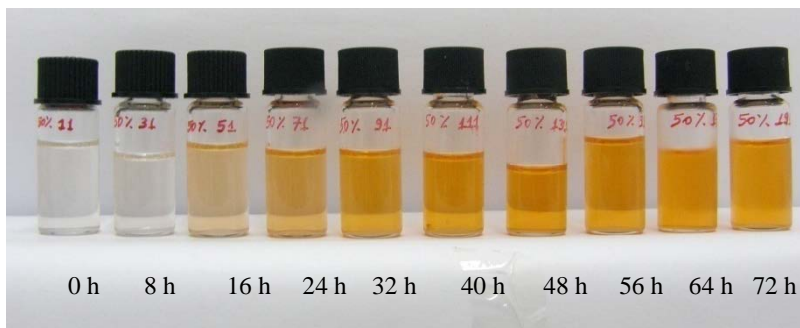


Figura 15B. Cromatograma obtido da análise em HPLC para quantificação de carotenoides específicos das amostras da figura 14B.

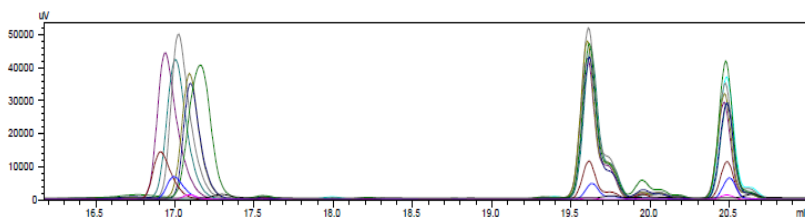


Tabela 3B. Legenda do cromatograma da figura 15B.

Amostra	Legenda	Tempo (h)
1	Preto	0
2	Rosa	8
3	Azul	16
4	Marrom	24
5	Verde	32
6	Azul escuro	40
7	Verde musgo	48
8	Cinza	56
9	Azul grafite	64
10	Roxo	72
11	Verde água (padrão $\beta$ -caroteno)	0,008 g/L





**APÊNDICE C – Tratamento de dados da cinética de fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, em 72 h, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.**

Tabela 1C. Concentração de biomassa (X), substrato (S) e carotenoides totais (P) obtidos experimentalmente na fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

Tempo (h)	X (g.L <sup>-1</sup> )	Ln(X)	S (g.L <sup>-1</sup> )	P (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0,739	-0,303	33,000	1,085
4	0,760	-0,275	31,243	
8	1,047	0,046	28,671	1,303
12	1,528	0,424	24,263	
16	2,630	0,967	21,439	4,666
20	3,273	1,186	21,777	
24	4,972	1,604	18,986	11,216
28	6,847	1,924	18,305	
32	7,775	2,051	11,829	15,639
36	7,971	2,076	7,907	
40	9,081	2,206	4,468	18,767
44	10,204	2,323	3,369	
48	10,421	2,344	0,656	23,475
52	9,494	2,251	0,000	
56	8,953	2,192	0,000	20,878
60	8,351	2,122	0,000	
64	7,124	1,963	0,000	20,636
68	6,216	1,827	0,000	
72	-	-	0,000	20,138

Tabela 2C. Concentração e produtividade de carotenoides totais e específicos. Dados referentes à fermentação em biorreator de *Sporobolomyces ruberrimus*, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

Tempo (h)	Torularrodina (mg.L <sup>-1</sup> )	Toruleno (mg.L <sup>-1</sup> )	β – caroteno (mg.L <sup>-1</sup> )	CT (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0,265	0,261	0,559	1,085
8	0,415	0,274	0,615	1,303
16	1,602	1,284	1,780	4,666
24	4,564	3,594	3,058	11,216
32	5,553	6,317	3,769	15,639
40	6,120	7,411	5,236	18,767
48	7,134	9,895	6,446	23,475
56	7,504	7,129	6,245	20,878
64	7,123	7,819	5,694	20,636
72	6,882	7,435	5,821	20,138
<b>Produtividade (mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>				
	0,101	0,105	0,082	0,311

Figura 1C. Concentração celular de *S. ruberrimus* (X) ajustado ao polinômio de sexto grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

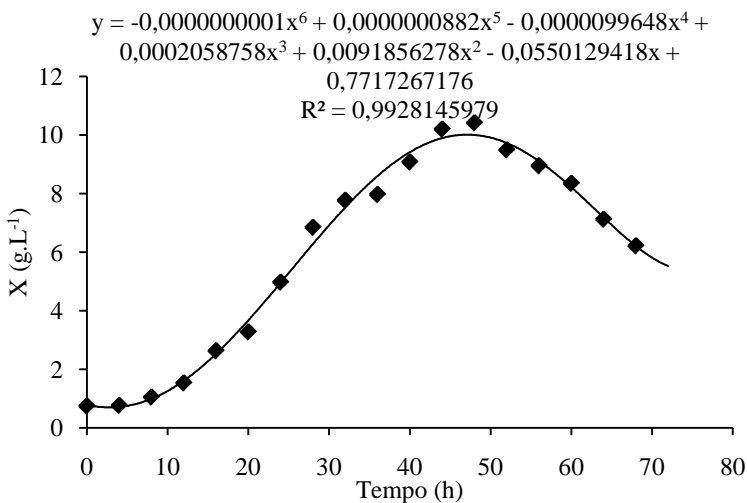


Figura 2C. Consumo de substrato (S) por *S. ruberrimus* ajustados ao polinômio de sexto grau. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

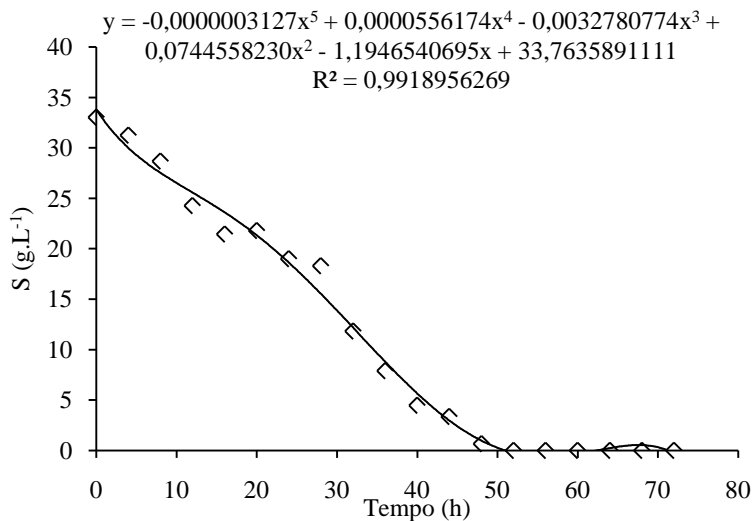


Figura 3C. Produção de carotenoides totais (P) por *S. ruberrimus* ajustados a regressão linear. Dados referentes à fermentação em biorreator, a concentração de 80 % de oxigênio dissolvido, em 72 h.

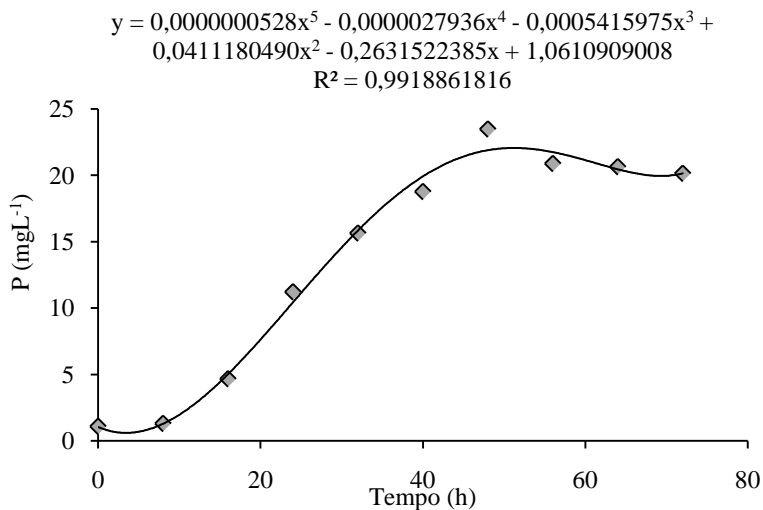


Figura 4C. . Determinação da fase exponencial de crescimento de *S. ruberrimus* e da velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). Dados referentes à fermentação em biorreator a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

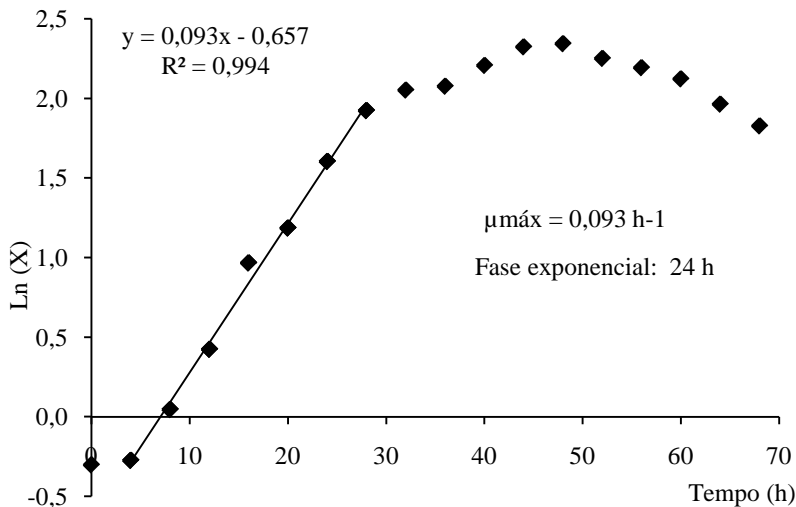


Figura 5C. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* ( $\mu_x$ ), sem considerar a fase exponencial de crescimento. Fermentação em biorreator, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

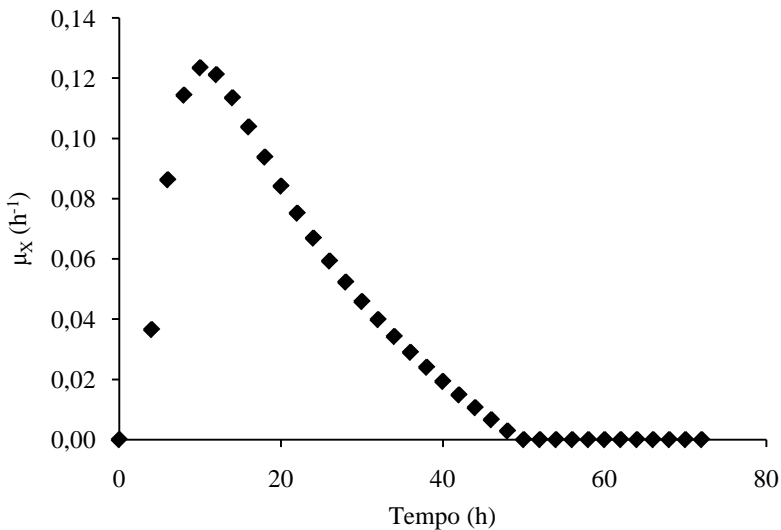


Figura 6C. Velocidade específica de crescimento de *S. ruberrimus* ( $\mu_x$ ), considerando a fase exponencial de crescimento. Fermentação em biorreator, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

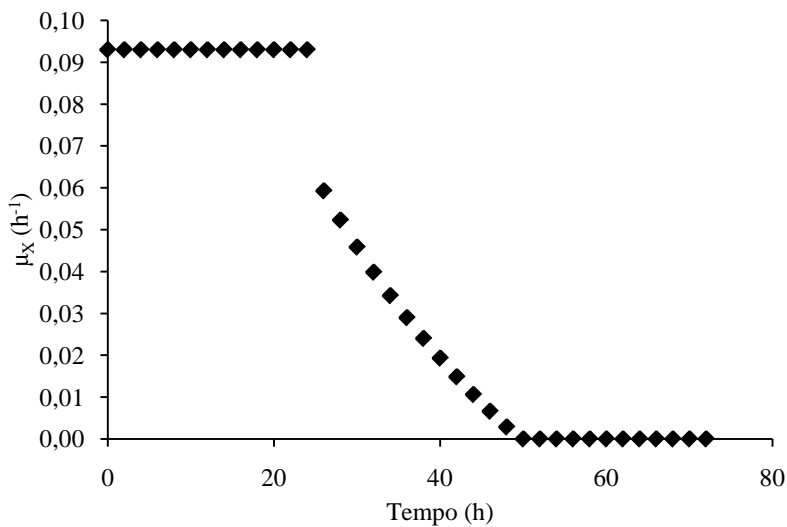


Figura 7C. Velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) por *S. ruberrimus*. Fermentação em biorreator, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

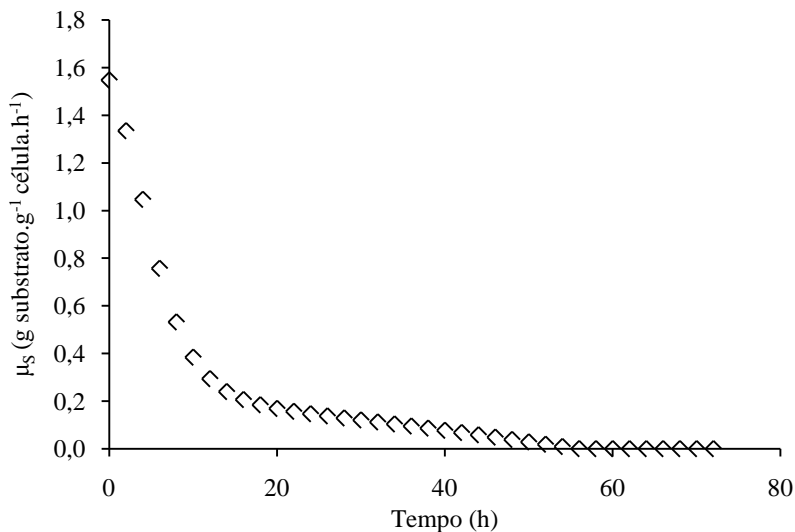


Figura 8C. Velocidade específica de produção de carotenoides totais ( $\mu_P$ ) por *S. ruberrimus*. Fermentação em biorreator, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

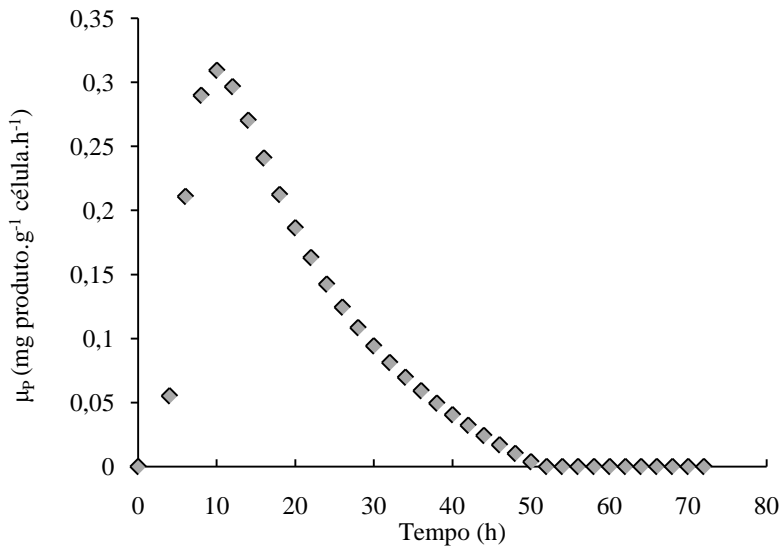


Figura 9C. Coeficiente de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ; g.g<sup>-1</sup>). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

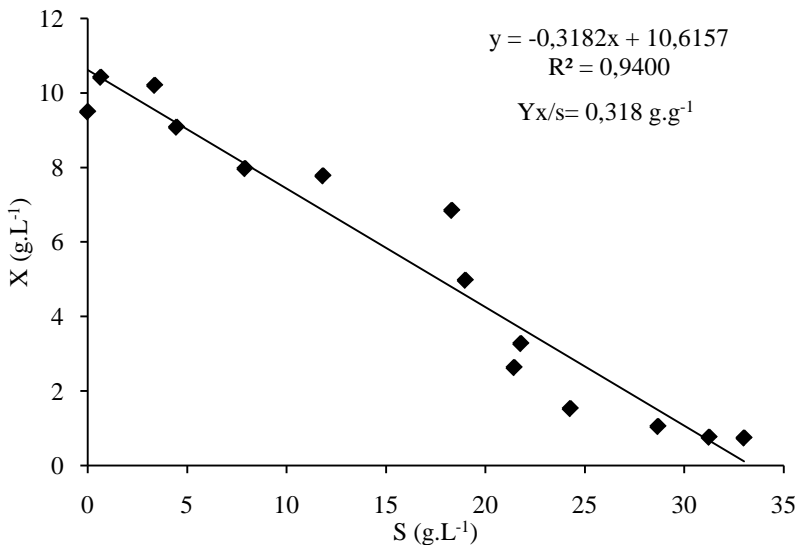


Figura 10C. Coeficiente de conversão de biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ;  $\text{mg.g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

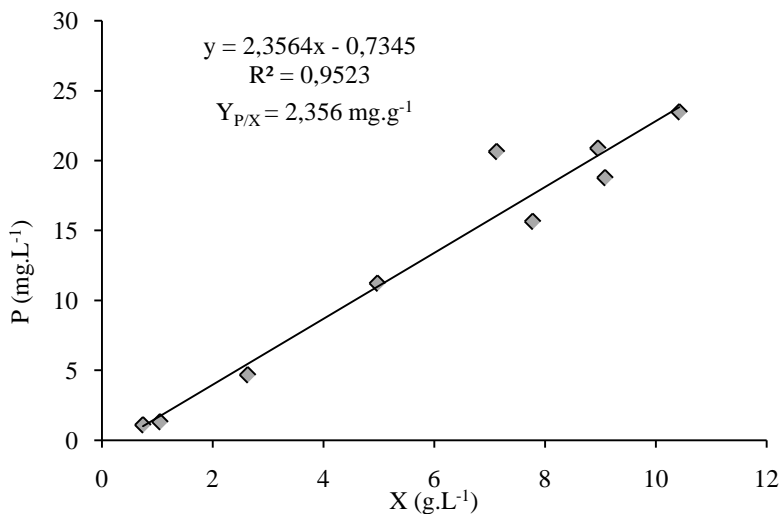


Figura 11C. Coeficiente de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ;  $\text{mg.g}^{-1}$ ). Fermentação em biorreator de *S. ruberrimus*, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

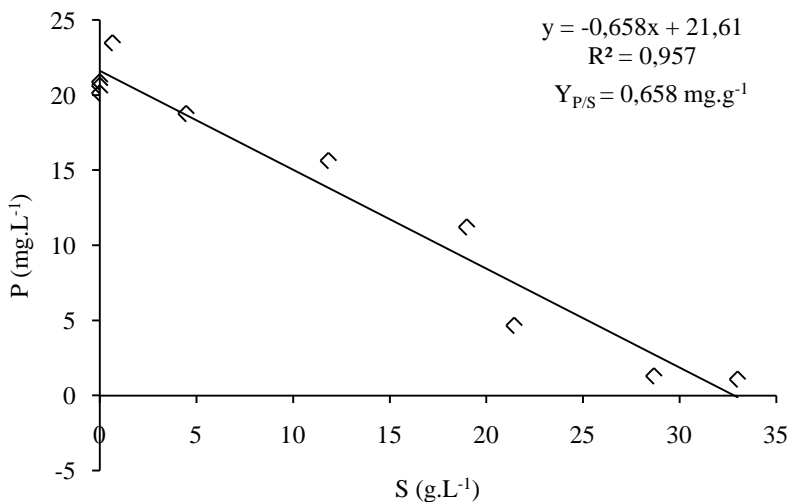


Figura 12C. Dados de controle do biorreator registrados durante a fermentação de *S. ruberrimus*, a concentração de 80 % oxigênio dissolvido, em 72 h.

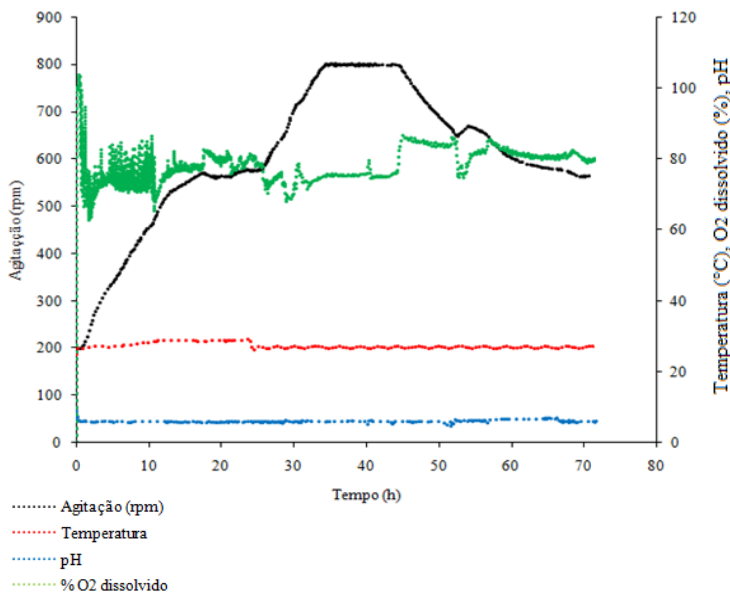


Figura 13C. Amostras para determinação de carotenoides específicos em HPLC. Extrato de carotenoides totais extraídos por abrasão com pérola de vidro e vórtex, em diferente tempo de fermentação em biorreator a 80 % de oxigênio dissolvido.

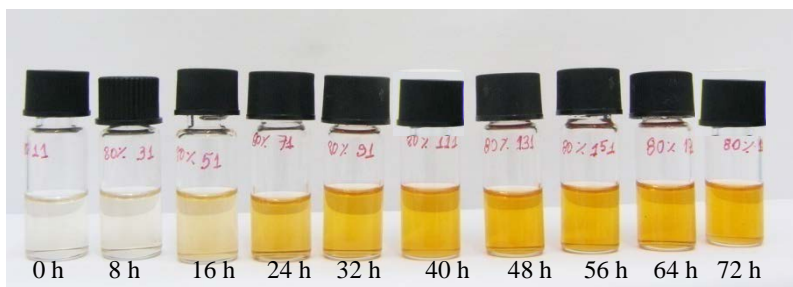




Figura 14C. Cromatograma obtido da análise em HPLC para quantificação de carotenoides específicos das amostras da figura 14C.

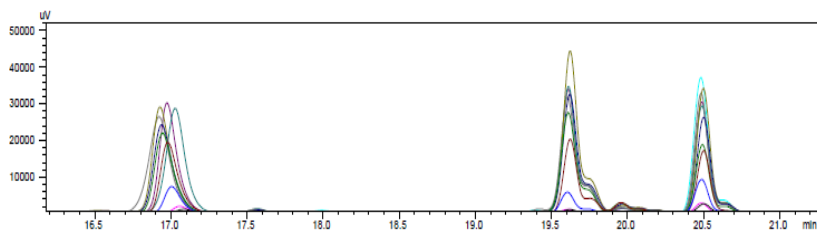


Tabela 3C. Legenda do cromatograma da figura 15C.

Amostra	Legenda	Tempo (h)
1	Preto	0
2	Rosa	8
3	Azul	16
4	Marrom	24
5	Verde	32
6	Azul escuro	40
7	Verde musgo	48
8	Cinza	56
9	Azul grafite	64
10	Roxo	72
11	Verde água (padrão $\beta$ -caroteno)	0,008 g/L