

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/09/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Carolina Sangalli Dardani

**Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando
glicose e manipueira**

São José do Rio Preto
2022

Carolina Sangalli Dardani

**Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando
glicose e manipueira**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Coorientadores: Dr. Whallans Raphael Couto
Machado

Dra. Ana Lúcia Ferrarezi Duarte

São José do Rio Preto
2022

D215p	Dardani, Carolina Sangalli Produção de carotenoides por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> utilizando glicose e manipueira / Carolina Sangalli Dardani. -- São José do Rio Preto, 2022 110 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi 1. Bioprocess technology. 2. Pigmentos. 3. Leveduras (Fungos). I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Carolina Sangalli Dardani

**Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*
utilizando glicose e manipueira**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Maurício Bonatto Machado de Castilhos
UEMG – Universidade do Estado de Minas Gerais

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

São José do Rio Preto
8 de setembro de 2022

Dedico este trabalho a minha
família e a todos que
acreditaram na minha
capacidade. Em especial, ao
meu avô Lázaro, que finalizou
sua missão neste mundo
enquanto este trabalho era
conduzido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelas infinitas bênçãos, por ter me iluminado nos momentos mais difíceis, por me dar saúde e coragem para viver essa etapa. À Nossa Senhora de Guadalupe, por sempre me guardar e iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Cleusa e Antonio, pelos ensinamentos que me fizeram chegar até aqui, por me apoiarem, incentivarem meus sonhos e sempre fazerem de tudo para que se concretizassem.

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, pela acolhida, orientação, ensinamentos (acadêmicos e de vida), paciência, amizade durante essa jornada e pelo exemplo de ser humano que és.

Ao Dr. Whallans Raphael Couto Machado, meu coorientador, por toda a ajuda, paciência e por ter aceito esse desafio.

À Dra. Ana Lúcia Ferrarezi Duarte, minha coorientadora, e toda a equipe da Biomade – Soluções Biotecnológicas, em especial à Janaína, Thiago e Gustavo, por terem confiado na minha capacidade e no meu trabalho, por toda a ajuda com as análises cromatográficas, pelo carinho e amizade de sempre. Agradeço também à técnica Daniela por todo o auxílio e paciência.

À Farinheira Primavera Indústria e Comércio Ltda, de Santa Maria da Serra (SP), pela receptividade e por ter fornecido a manipuleira utilizada nesse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Bioprocessos, que me acolheram com tanto carinho: à Mariana, por toda a ajuda com os perrengues e gambiarras, pelo alto astral e por sempre ter uma palavra amiga; ao Igor, por todas as cervejas, risadas, apoio e pelas conversas sobre os mais variados assuntos; ao Jorge, pela ajuda desde antes de ingressar no mestrado, por todos os cafés e pela parceria; ao Rafael, pelas conversas nos finais de tarde, pelo desespero compartilhado, pelo apoio e por me arrancar as risadas mais escandalosas; à Luciana, por deixar o laboratório sempre “cheiroso” (ela sabe do eu eu estou falando), pela energia boa, pelas risadas e experiências compartilhadas; ao Onildo, pelas conversas, risadas e pelo café que me mantinha acordada nessa reta final; à Giovana, pela parceria nessa jornada e pela ajuda com uma parte dos experimentos; ao Breno e Monique, pelo incentivo e por me fazerem rir. Agradeço pela ajuda, amizade, conselhos e paciência de cada um. Me sinto privilegiada por ter vocês ao meu lado!

Aos meus amigos de Departamento: ao Marcello, por me fazer companhia até tarde no laboratório, pelos conselhos, risadas, parceria e por todas as conversas; à Victoria, por me ajudar a tirar um pássaro (quase do tamanho de uma galinha) de dentro do prédio em plena pandemia (nunca vou esquecer disso!), pelo fornecimento de uvas-passas, pela imensa ajuda com a análise de cor, por todos os cafés, risadas e apoio; à Yara, pelo carinho, amizade sincera e por me fazer manter a calma durante os desesperos; ao Carlos, meu compadre (e à Sara, minha comadre), por todas as brincadeiras, por sempre me fazer sorrir, por toda ajuda e parceria; à Bruna, pela sintonia, carinho, amizade e palhaçadas; à Danúbia, pela alegria contagiante e por cair na gargalhada comigo; à Francieli, Mariana e João, por todos os cafés, risadas e

boas conversas; à Maíra, por todo o carinho e por compartilhar os perrengues e alegrias dessa etapa. Vocês fizeram o mestrado ser muito mais leve e divertido!

Aos técnicos, Luís e Tânia, sem vocês eu não teria conseguido fazer nem metade desse trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade em ajudar, pelos ensinamentos e por todo o carinho.

Às professoras Vânia, Cida e Ellen, por emprestarem diversas vezes as estufas e ao Adilson, Carol e Miriam pela disponibilidade em sempre ajudar.

Ao professor Crispin, por sempre emprestar a centrífuga e à Mariane pela ajuda, conversas e disponibilidade.

Ao professor Reinaldo Gaspar Bastos, do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, pela disponibilidade e auxílio com as análises de carbono e nitrogênio.

À Camila, minha irmã de alma, pelos muitos anos de amizade, por toda a força que me deu durante esse processo, pelo carinho e por se fazer sempre presente.

Aos meus amigos-irmãos de Santa Adélia, Jéssica, Jaqueline, Gabriel e Kelson, pelo incentivo, por me alegrarem nos momentos estressantes e entenderem minha ausência em diversas ocasiões.

Às minhas amigas da graduação, Gabriela, Tayla, Ana, Maria Gabriela e Beatriz, por se fazerem sempre presentes (apesar da distância), pela torcida, apoio, conversas e palavras carinhosas.

A toda minha família, pelo incentivo e torcida para que tudo desse certo.

Aos membros da banca, por terem aceito o convite, pela disponibilidade, considerações e sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos e ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) por fornecerem a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

Continue a nadar!
(Procurando Nemo)

RESUMO

Carotenoides são pigmentos cujas cores variam do amarelo ao vermelho, podendo ser produzidos sinteticamente ou de maneira considerada natural, através de plantas e micro-organismos. A utilização desses micro-organismos em processos fermentativos para a produção dos pigmentos em questão tem sido estimulada devido a relatos de alterações metabólicas advindas de corantes sintéticos. Além disso, tal produção pode ter seu custo reduzido ao utilizar coprodutos agroindustriais como substrato. Adicionalmente, esse processo requer uma extração eficiente dos pigmentos realizada, na maioria dos casos, pelo dimetilsulfóxido, um solvente tóxico. Assim, esse estudo pesquisou a utilização da manipueira e glicose como substratos para a produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409, bem como o uso de técnicas e solventes alternativos para a extração dos pigmentos e a quantificação do β -caroteno obtido nesse processo. Os resultados mostraram aumentos de 92,89% e 85,59% nas eficiências de produção volumétrica de carotenoides e de produção de biomassa, respectivamente, quando o meio de cultivo era composto por 8% v/v de manipueira e 50 g/L de glicose em relação ao meio contendo 4% v/v do coproduto e 30 g/L de glicose. Também foi verificado que o uso de etanol ou dimetilsulfóxido, independentemente da técnica combinada, não apresentou diferença significativa na extração dos pigmentos, apesar da maior recuperação de β -caroteno ter sido observada quando o primeiro solvente foi utilizado na extração. Dessa maneira, demonstrou-se o potencial do uso de coprodutos agroindustriais como substratos em processos fermentativos para a obtenção de carotenoides e verificou-se que o etanol, associado a ultrassom ou pérolas de vidro, pode ser utilizado como um substituinte ao dimetilsulfóxido na extração desses pigmentos.

Palavras-chave: Pigmentos. Coprodutos agroindustriais. β -caroteno. Extração.

ABSTRACT

Carotenoids are pigments whose colors vary from yellow to red and can be produced synthetically or in a natural way, by plants and microorganisms. The use of these microorganisms in fermentation processes for the production of the pigments in question has been stimulated due to reports of metabolic alterations resulting from synthetic dyes. Moreover, such production can have the cost reduced by using agroindustrial coproducts as substrate. Additionally, this process requires an efficient extraction of the pigments carried out, in most cases, by dimethyl sulfoxide, a toxic solvent. Thus, this study investigated the use of cassava wastewater and glucose as substrates for the production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409, as well as the use of alternative techniques and solvents for the extraction of pigments, and the quantification of β -carotene obtained in this process. The results showed increases of 98.89% and 85.59% in the efficiencies of volumetric production of carotenoids and biomass production, respectively, when the culture medium was composed by 8% v/v of cassava wastewater and 50 g/L of glucose in relation to the medium containing 4% v/v of the coproduct and 30 g/L of glucose. It was also verified that the use of ethanol or dimethyl sulfoxide, regardless of the combined technique, did not present a significant difference in the extraction of pigments, despite the higher recovery of β -carotene being observed when the first solvent was used in the extraction. In this way, the potential of using agroindustrial coproducts as substrates in fermentation processes to obtain carotenoids was demonstrated and it was verified that ethanol, associated with ultrasound or glass beads, can be used as a substitute for dimethyl sulfoxide in the extraction of these pigments.

Keywords: Pigments. Agroindustrial coproducts. β -carotene. Extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 – Emprego de coprodutos agroindustriais como substrato para a produção de carotenoides microbianos

Figura 1 – Fluxograma do processo de produção da farinha de mandioca.....	27
Figura 2 – Carotenos (a) e xantofilas (b).....	29
Figura 3 – Estrutura da β -ionona.....	30
Figura 4 – Biossíntese de carotenoides em leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i>	33
Figura 5 - Esquema de rompimento celular utilizando pérolas de vidro.....	36
Figura 6 - Esquema de rompimento celular utilizando banho ultrassônico.....	37

Capítulo 2 – Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando glicose e manipueira

Figura 1 – Coleta da manipueira.....	53
Figura 2 – Manipueira antes da esterilização.....	54
Figura 3 – Levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM 7409.....	54
Figura 4 - Cultivos após 144 horas.....	56
Figura 5 - Biomassa após secagem.....	58
Figura 6 – Gráficos de Pareto para efeito das variáveis concentração de glicose e concentração de manipueira nas eficiências da produção de biomassa (a), de carotenoides específicos (b), de carotenoides volumétricos (c), do consumo de açúcares (d) e da redução da DQO (d).....	65
Figura 7 - Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno das eficiências da produção de biomassa (a e b), de carotenoides específicos (c e d) e de carotenoides volumétricos (e e f) com relação às concentrações de glicose e manipueira.....	67
Figura 8 - Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno das eficiências do consumo de açúcares (g e h) e da redução da DQO (i e j) com relação às concentrações de glicose e manipueira.....	68

Capítulo 3 – Extração de carotenoides microbianos por metodologias alternativas e quantificação de β -caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência

Figura 1 – Imagens da estrutura microbiana após secagem em estufa (a, b e c) e após maceração e peneiramento anteriores às extrações (d e e).....	91
Figura 2 – Imagens da estrutura da parede celular da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM 7409 após a extração com pérolas de vidro juntamente com os solventes: DMSO (a e b), metanol (c e d) e etanol (e e f).....	93
Figura 3 - Imagens da estrutura da parede celular da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM 7409 após a extração com ultrassom juntamente com os solventes: DMSO (a e b), metanol (c e d) e etanol (e e f).....	94

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Emprego de coprodutos agroindustriais como substrato para a produção de carotenoides microbianos

Tabela 1 – Micro-organismos e seus respectivos carotenoides produzidos por vias biotecnológicas.....	31
--	----

Capítulo 2 – Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando glicose e manipueira

Tabela 1 – Variáveis e níveis para o DCCR.....	56
Tabela 2 – Delineamento composto central rotacional (valores reais e codificados).	62
Tabela 3 – Delineamento composto central rotacional (valores reais e codificados) (continuação).....	63
Tabela 4 - Erros médios dos pontos centrais para as variáveis dependentes.....	74

Capítulo 3 – Extração de carotenoides microbianos por metodologias alternativas e quantificação de β -caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 1 – Parâmetros de cor obtidos para os diferentes extratos.....	89
Tabela 2 – Concentrações de carotenoides e β -caroteno obtidas através de diferentes métodos de rompimento celular e extração.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$A_{1cm}^{1\%}$	Absorbância específica
Car_i	Concentração de açúcares redutores totais inicial
Car_f	Concentração de açúcares redutores totais final
C/N	Razão Carbono/Nitrogênio
CE	Carotenoides específicos
COT	Carbono Orgânico Total
CV	Carotenoides volumétricos
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3-5 dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO_i	Demanda Química de Oxigênio inicial
DQO_f	Demanda Química de Oxigênio final
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBILCE/UNESP	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
m_{amostra}	Massa celular seca
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Na₂SO₄	Sulfato de sódio anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
NT	Nitrogênio Total
NaCl	Cloreto de Sódio
PTFE	Politetrafluoretileno

rpm Rotações por minuto

YMA Yeast Malt Agar

YM Yeast Malt

LISTA DE SÍMBOLOS

a*	Coordenada vermelho/verde
b*	Coordenada amarelo/azul
β	Beta
C*	Cromaticidade
ΔE	Diferença total de cor
h°	Ângulo hue
L*	Luminosidade
mg/L	Miligramas por litro
%	Porcentagem
g/L	Gramas por litro
α	Alfa
γ	Gama
μg/L	Microgramas por litro
°C	Graus Celsius
μg/g	Microgramas por grama
Y_{x/s}	Produção de biomassa em relação a quantidade de substrato consumido
Y_{p/x}	Produção de carotenoides em relação a quantidade de biomassa obtida
g/100g	Gramas por cem gramas
g/g	Gramas por grama
v/v	Volume por volume
mL	Mililitros
células/mL	Células por mililitro
nm	Nanômetros
g	Gramas
g/mL	Gramas por mililitro
kHz	Quilohertz
mL/min	Mililitros por minuto
μL	Microlitros
μm	Micrometros
mg/L O₂	Miligramas por litro de gás oxigênio
p	Nível de significância

R	Coeficiente de determinação
R_{aj}	Coeficiente de determinação ajustado

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
Capítulo 1 – Emprego de coprodutos agroindustriais como substrato para a produção de carotenoides microbianos	
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	25
3 MANDIOCA.....	26
3.1 Manipueira.....	27
4 CAROTENOIDES MICROBIANOS.....	29
4.1 Leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i>	34
5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	36
5.1 Métodos físicos.....	36
5.2 Métodos químicos.....	38
5.3 Combinação de métodos físicos e químicos para ruptura celular.....	38
6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
Capítulo 2 - Produção de carotenoides por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> utilizando glicose e manipueira	
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Material.....	53
2.1.1 Manipueira.....	53
2.1.2 Micro-organismo.....	54
2.2 Inóculo.....	55
2.3 Otimização do meio de cultivo e bioprodução dos carotenoides.....	55
2.4 Métodos analíticos.....	56
2.4.1 Determinação da razão carbono/nitrogênio (C/N).....	56
2.4.2 Determinação da concentração de biomassa.....	57
2.4.3 Recuperação dos carotenoides totais.....	57
2.4.4 Determinação da concentração de carotenoides específicos e volumétricos...58	
2.4.5 Determinação do pH.....	58

2.4.6	Determinação do consumo de açúcares redutores totais.....	58
2.4.7	Determinação da redução da DQO.....	59
2.5	Análise estatística.....	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Capítulo 3 – Extração de carotenoides microbianos por metodologias alternativas e quantificação de β -caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência

1	INTRODUÇÃO.....	83
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1	Bioprodução dos carotenoides.....	84
2.2	Métodos analíticos.....	84
2.2.1	Determinação da razão carbono/nitrogênio (C/N).....	84
2.2.2	Determinação da concentração de biomassa.....	84
2.2.3	Determinação do pH.....	85
2.2.4	Determinação do consumo de açúcares redutores totais.....	85
2.2.5	Determinação da redução da demanda química de oxigênio (DQO).....	85
2.3	Metodologias alternativas de extração e recuperação de carotenoides..	86
2.3.1	Abrasão com pérolas de vidro.....	86
2.3.2	Banho ultrassônico.....	86
2.4	Avaliação da cor.....	87
2.5	Análise Cromatográfica.....	87
2.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	88
2.7	Análise estatística.....	88
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1	Avaliação da cor.....	89
3.2	Estrutura celular após os processos de extração e quantificação de carotenoides e β -caroteno.....	91
4	CONCLUSÕES.....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
	APÊNDICE A – Testes iniciais realizados com a levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM 7409.....	102

APÊNDICE B – Curva padrão de biomassa para a levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM 7409.....	104
APÊNDICE C – Curva padrão de açúcares redutores totais.....	105
APÊNDICE D – Relatório de atividades referente ao período 09/03/2020 – 08/09/2022.....	106

INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenoides são pigmentos cujas cores variam do vermelho ao amarelo, podendo ser produzidos por plantas, algas, micro-organismos e sinteticamente. Estes últimos, no entanto, podem provocar reações imunológicas e até algumas doenças quando utilizados em alimentos, aumentando a procura, por parte do setor industrial, por compostos inócuos e naturais.

Dessa maneira, destacam-se os pigmentos produzidos por leveduras através de processos fermentativos. Além da alta produtividade em um curto espaço de tempo (quando comparado à produção através de plantas), o custo desse processo pode ser diminuído quando se utilizam coprodutos agroindustriais como substrato para o crescimento do micro-organismo.

Além disso, como tais pigmentos são produzidos intracelularmente, é evidente a procura por metodologias alternativas de recuperação desses compostos que não envolvam o uso de reagentes tóxicos.

Portanto, esse trabalho teve por objetivo geral mensurar a produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 cultivada em um meio contendo coproduto agroindustrial e testar metodologias alternativas para a extração desses pigmentos.

Como objetivos específicos, buscou-se a formulação de um meio de cultivo contendo glicose e manipueira que proporcionasse altas eficiências na produção de carotenoides volumétricos e de biomassa, bem como de redução de DQO; o uso de métodos físicos aliado a solventes alternativos que proporcionasse uma extração eficiente dos pigmentos e a quantificação do β -caroteno presente nesses extratos, além da avaliação da cor desses e a verificação da estrutura celular da levedura após as extrações.

Essa dissertação foi dividida em 3 capítulos, sendo:

Capítulo 1 - Emprego de coprodutos agroindustriais como substrato para a produção de carotenoides microbianos: Revisão bibliográfica sobre o uso de coprodutos agroindustriais para a obtenção de diversos bioprodutos, processo produtivo de mandioca, manipueira, leveduras produtoras de carotenoides e metodologias de extração destes.

Capítulo 2 - Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando glicose e manipueira: Estudo da combinação de diferentes

concentrações de glicose e manipueira visando elevadas eficiências na produção de carotenoides volumétricos e de biomassa, além da redução da DQO.

Capítulo 3 - Extração de carotenoides microbianos por metodologias alternativas e quantificação de β -caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência: Avaliação de diferentes métodos físicos aliados a solventes alternativos para a extração de carotenoides, quantificação do β -caroteno advindo dos diferentes extratos, verificação da cor destes e da estrutura celular da biomassa após os processos de extração.

4 CONCLUSÕES

Os extratos obtidos pela técnica de ultrassom se apresentaram menos amarelados e menos intensos quando comparados àqueles obtidos pelo uso de pérolas de vidro. Entretanto, aos olhos humanos, eles apresentaram pouca diferença de cor.

A extração e recuperação de carotenoides específicos e volumétricos utilizando as técnicas de ultrassom ou pérolas de vidro associadas a etanol ou DMSO não apresentaram diferença significativa entre si. Contudo, a recuperação de β -caroteno mostrou-se maior quando utilizado o etanol, independentemente da técnica combinada. Além disso, as imagens obtidas por microscopia confirmam a ruptura eficiente das células microbianas quando utilizada essa associação alternativa.

Dessa maneira, pode-se concluir que as combinações de etanol e pérolas de vidro ou etanol e ultrassom tratam-se de técnicas tão eficientes quanto o uso de DMSO para a obtenção de carotenoides da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 nas condições estudadas, além de reduzir a toxicidade dos extratos e possibilitar sua utilização em diversos setores industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEKUNTE, A. O. *et al.* Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 500–507, 2010.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23th. ed. Washington, DC, New York: American Public Health Association, 2017.
- Association of Official Analytical Chemists – **AOAC**.; **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**, 15th ed., AOAC International: Arlington, 1990.
- BORRONI, V.; GONZÁLEZ, M. T.; CARELLI, A. A. Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 128–134, 2017.
- CABRAL, M. M. S. *et al.* Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus paroseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 1, p. 159–166, 2011.
- CIPOLATTI, E. P. *et al.* Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1982–1988, 2015.
- DAVIES, B. H. Chemical Biochemistry Plant Pigments; GOODWIN, T. W., ed.; **Academic Press**: Nova Iorque, 1976.
- FONSECA, R. A. S. *et al.* Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 10, n. 7, p. 1165–1171, 2011.
- GHILARDI, C. *et al.* Influence of olive mill waste phenolic compounds levels on carotenoid production by *Rhodotorula spp.* **Process Biochemistry**, v. 120, p. 275–286, 2022.
- GOGATE, P. R.; NADAR, S. G. Ultrasound-assisted Intensification of Extraction of Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Indian Chemical Engineer**, v. 57, n. 3–4, p. 240–255, 2015.
- KUSDIYANTINI, E. *et al.* Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 10, p. 929–934, 1998.
- LOPES, N. A. **Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular**. 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.
- LOPES, N. A. *et al.* Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporidiobolus paroseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 759–766, 2017.
- MACHADO, W. R. C. **Bioprospecção de leveduras para produção de carotenoides microbianos**. 2018. 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade

Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2018.

MACHADO, W. R. C. *et al.* Optimization of agro-industrial coproducts (molasses and cassava wastewater) for the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102342, 2022.

MACHADO, W. R. C.; SOARES, A. B. V.; DEL BIANCHI, V. L. Produção de carotenoides por meio de fermentação em estado sólido com *Rhodotorula mucilaginosa* em bagaço de laranja (*Citrus cinensis*). **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 48–57, 2019.

MARTÍNEZ, J. M. *et al.* Organic-solvent-free extraction of carotenoids from yeast *Rhodotorula glutinis* by application of ultrasound under pressure. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 61, p. 104833, 2020.

MEDEIROS, F. O. DE *et al.* Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336–339, 2008.

MICHELON, M. *et al.* Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, 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. *et al.* 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.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Integrative platform for the selective recovery of intracellular carotenoids and lipids from: *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 yeast using mixtures of bio-based solvents. **Green Chemistry**, v. 22, n. 23, p. 8478–8494, 2020.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. **Separation and Purification Technology**, v. 266, p. 118548, 2021.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 36–60, 2013.

RIBEIRO, J. E. S. *et al.* *Rhodotorula glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington D. C.: International Life Science Institute, 2001. 64 p.

ROCHA, L. M.; CAMPANHOL, B. S.; BASTOS, R. G. Solid-State Cultivation of *Aspergillus niger*–*Trichoderma reesei* from Sugarcane Bagasse with Vinasse in Bench Packed-Bed Column Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 9, p. 2983–2992, 2021.

SANT'ANNA, V. *et al.* Tracking bioactive compounds with colour changes in foods -

A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 3, p. 601–608, 2013.

SHARMA, R.; GHOSHAL, G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, n. e00407, 2020.

SQUINA, F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 3, p. 309–318, 2003.

URNAU, L. *et al.* Extraction of carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using ultrasound-assisted and chemical cell disruption methods. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 9999, 2017.

VALDUGA, E. *et al.* Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1860–1866, 2007.