



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
$\mu\text{g/L}$	Microgramas por litro
°C	Graus Celsius
$\mu\text{g/g}$	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.

Capítulo 1

Emprego de coprodutos agroindustriais como substrato para a produção de carotenoides microbianos

RESUMO

O presente capítulo apresenta uma revisão de literatura sobre a utilização de coprodutos agroindustriais, especialmente a manipueira, em processos fermentativos para a obtenção de carotenoides. Foram abordados os diversos micro-organismos que podem ser utilizados para esse fim, destacando as leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula*. O capítulo também fornece informações sobre tipos de carotenoides, estruturas e a biossíntese destes nos micro-organismos citados, evidenciando os compostos mais comumente encontrados em cada um. Além disso, aborda metodologias alternativas para a ruptura da parede celular e recuperação dos carotenoides, como ultrassom, pérolas de vidro e solventes menos tóxicos, e as relaciona com a identificação cromatográfica desses compostos.

Palavras-chave: Coprodutos agroindustriais. Carotenoides. Leveduras. Extração. Cromatografia.

ABSTRACT

This chapter presents a literature review on the use of agroindustrial coproducts, especially cassava wastewater, in fermentation processes to obtain carotenoids. The various microorganisms that can be used for this purpose were discussed, highlighting the yeasts belonging to the genus *Rhodotorula*. The chapter also provides information on types of carotenoids, structures and their biosynthesis in the mentioned microorganisms, highlighting the compounds most commonly found in each one. In addition, it addresses alternative methodologies for cell wall rupture and carotenoid recovery, such as ultrasound, glass beads, and less toxic solvents, and relates them to the chromatographic identification of these compounds.

Keywords: Agroindustrial coproducts. Carotenoids. Yeasts. Extraction. Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

Coprodutos agroindustriais podem ser utilizados como meios de cultivo para a obtenção de diversos bioprodutos através do cultivo de bactérias (PINHO et al., 2019; SAHOO et al., 2020), fungos (MAGALHÃES et al., 2019; SEPÚLVEDA et al., 2020), microalgas (RIBEIRO et al., 2017; YEW et al., 2020) e leveduras (MACHADO et al., 2022; RIBEIRO et al., 2019).

A manipueira, coproduto gerado em abundância (DEL BIANCHI, 1998) durante a produção de farinha de mandioca, apresenta açúcares fermentescíveis (SENTANIN, 2011) e diversos minerais importantes para o crescimento de leveduras, com destaque para as do gênero *Rhodotorula*, e consequente produção de carotenoides.

A produção desses pigmentos de origem microbiana vem sendo estudada como um possível substituinte aos corantes sintéticos utilizados em alimentos devido às preocupações dos consumidores frente a aditivos químicos adicionados nesses produtos (VALDUGA et al., 2009).

A extração e recuperação de carotenoides também é objeto de estudo. Por serem produzidos intracelularmente pelas leveduras, é necessário que haja uma ruptura da parede celular e posterior recuperação desses compostos (MICHELON et al., 2012), sendo o dimetilsulfóxido (DMSO) o solvente mais utilizado para esse fim (BORRONI; GONZÁLEZ; CARELLI, 2017; CIPOLATTI et al., 2015; MACHADO; SOARES; DEL BIANCHI, 2019; RIBEIRO et al., 2019). Contudo, sua alta toxicidade (MICHELON et al., 2012) estimula a busca por novos extratores inócuos e que não gerem resíduos.

Diante do exposto, o presente capítulo tem objetivo ressaltar a utilização de coprodutos agroindustriais, mais especificamente a manipueira, em processos fermentativos para a obtenção de carotenoides, abordar a biossíntese desses compostos pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* e evidenciar a necessidade da procura por metodologias de extração alternativas ao DMSO e eficientes, visando a produção de compostos menos tóxicos.

2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Resíduos gerados pelo setor agroindustrial e seus coprodutos são objetos de investigação de inúmeros pesquisadores pela possibilidade de conversão desses materiais em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos (MACHADO, 2020; MAGALHÃES et al., 2019; PINHO et al., 2019), biossurfactantes (DAS; KUMAR, 2018; NAGY, 2018; VERA et al., 2018), enzimas (MAHMOODI; NAJAFPOUR; MOHAMMADI, 2019; MELNICHUK et al., 2020) e pigmentos (MONTEIRO, 2016; RODRIGUES, 2018; VISENTIN, 2020).

Essa conversão é realizada através de bioprocessos utilizando microalgas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de se desenvolverem em diversos substratos, como soro de queijo (ASUNIS et al., 2019; SAHOO et al., 2020), vinhaça de cana de açúcar (ALMEIDA et al., 2017; FUESS et al., 2020; YEW et al., 2020), resíduos do processamento de laranja (DE LA TORRE et al., 2019; SEPÚLVEDA et al., 2020), água de maceração de milho (AMADO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019) e manipueira (MACHADO, 2018; RIBEIRO et al., 2019).

A utilização desses coprodutos como novas matérias-primas apresenta vantagem econômica devido a sua boa disponibilidade, baixo custo e presença de substâncias com potencial para serem convertidas em outros produtos, além da contribuição para a redução da poluição ambiental (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Os mesmos autores, no entanto, pontuam que a utilização desses materiais também apresenta desvantagens, como a variação na composição destes em função de condições climáticas e de processamento, presença de lotes não homogêneos e sem garantia de padronização, e a presença de componentes tóxicos ou interferentes que impedem a utilização imediata do material, necessitando de pré-tratamentos e aumentando o custo do bioprocessos. Também destacam que coprodutos possuem composição complexa, ou seja, alguns componentes são dificilmente metabolizados por micro-organismos.

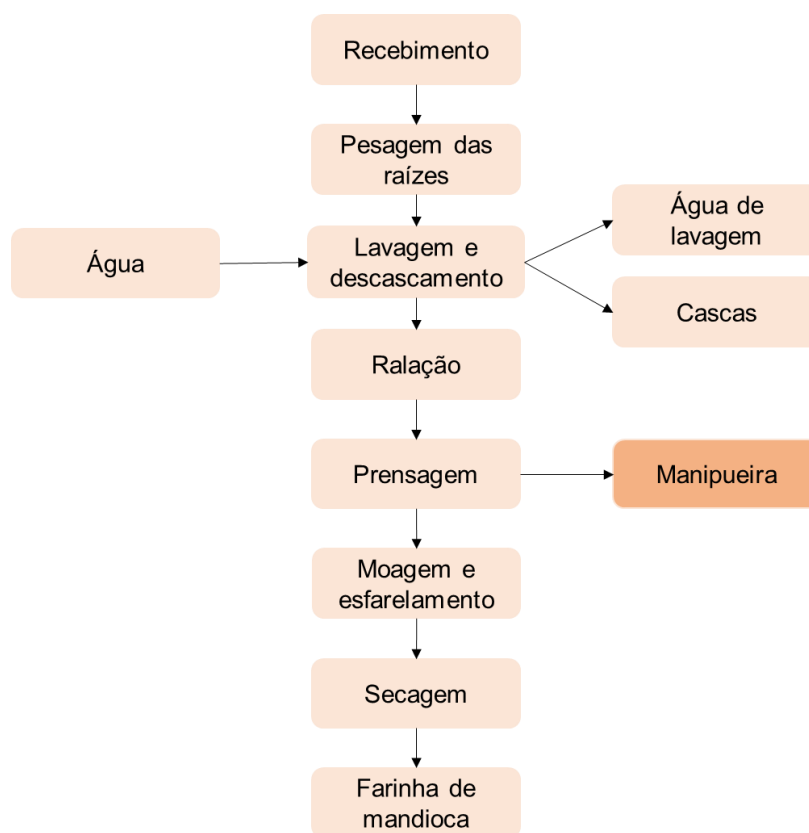
3 MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ) trata-se de uma planta cultivada em todo o território nacional e de grande importância socioeconômica para o país (FERREIRA FILHO et al., 2013). Dados divulgados pelo IBGE (2020) revelam uma produção nacional de aproximadamente 19 milhões de toneladas de mandioca nas safras de 2019 e 2020, com mais de 1.200.000 hectares de área colhida.

Tal planta é amplamente utilizada para consumo animal e humano (FERREIRA FILHO et al., 2013). Os mesmos autores apontam que esse consumo pode ser na forma “in natura” ou processada na forma de farinha, fécula, beiju, polvilho ou ainda em produtos de panificação.

No processo de produção de farinha de mandioca (Figura 1), as raízes passam por procedimentos de lavagem, descascamento e trituração, originando uma massa que, posteriormente, é prensada para remoção de umidade antes de ser encaminhada para moagem e secagem (RIBEIRO, 2018). A manipueira trata-se do líquido residual obtido após essa prensagem da massa (WOICIECHOWSKI et al., 2013), com a geração de 267 a 419 litros do coproduto para cada tonelada de raiz processada (DEL BIANCHI, 1998).

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção da farinha de mandioca.



Fonte: Adaptado de Ribeiro (2018).

3.1 Manipueira

A manipueira apresenta potencial poluidor centenas de vezes maior que o esgoto doméstico, elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), além de apresentar elevada toxicidade devido a presença de ácido cianídrico (TSCHOEKE et al., 2017).

Ao analisar esse coproduto proveniente de farinheiras no estado de Pernambuco, os mesmos autores verificaram que a média dos valores de DQO foi de 158.347 mg/L, indicando elevado conteúdo de matéria orgânica e, consequentemente, grande potencial poluidor se não for tratada e descartada corretamente.

Apesar desse potencial poluidor, a manipueira apresenta em sua composição alto teor de macro e micronutrientes, como magnésio, fósforo, potássio, enxofre e cálcio, além de nitrogênio e açúcares fermentescíveis (SENTANIN, 2011). Todos esses compostos tornam esse coproduto um substrato promissor para processos fermentativos e obtenção de diversos bioprodutos.

Como exemplo, a lipase produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* em manipueira apresentou máxima atividade enzimática após 48 horas de cultivo e maior produção quando comparada àquela obtida em meio utilizando solução de amido 1% (VIEIRA DE JESUS et al., 2016).

Essa mesma espécie bacteriana foi utilizada no estudo de Maia (2017) para a produção de bioemulsificantes tendo somente a manipueira como meio de cultivo. A autora obteve uma molécula com ótima estabilidade térmica, iônica e de pH, capaz de reduzir a viscosidade de derivados de petróleo e adsorver corante têxtil, indicando potencial aplicação na biorremediação de solos e água.

A manipueira também apresentou-se como fonte promissora de nutrientes para a produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger*, resultando em uma produção de 78,4 g/L do ácido em 24 horas de fermentação quando o meio foi suplementado com ureia e sulfato de amônio (PASTORE, 2010).

Tal coproduto também foi utilizado para o cultivo da microalga *Desmodesmus armatus* e consequente produção de lipídios, visando a produção de biodiesel (OKPOZU et al., 2019). Os autores verificaram que o cultivo mixotrófico desse microorganismo proporcionou a maior concentração de lipídeos, sendo o éster metílico de ácido linolelaídico presente em maior quantidade.

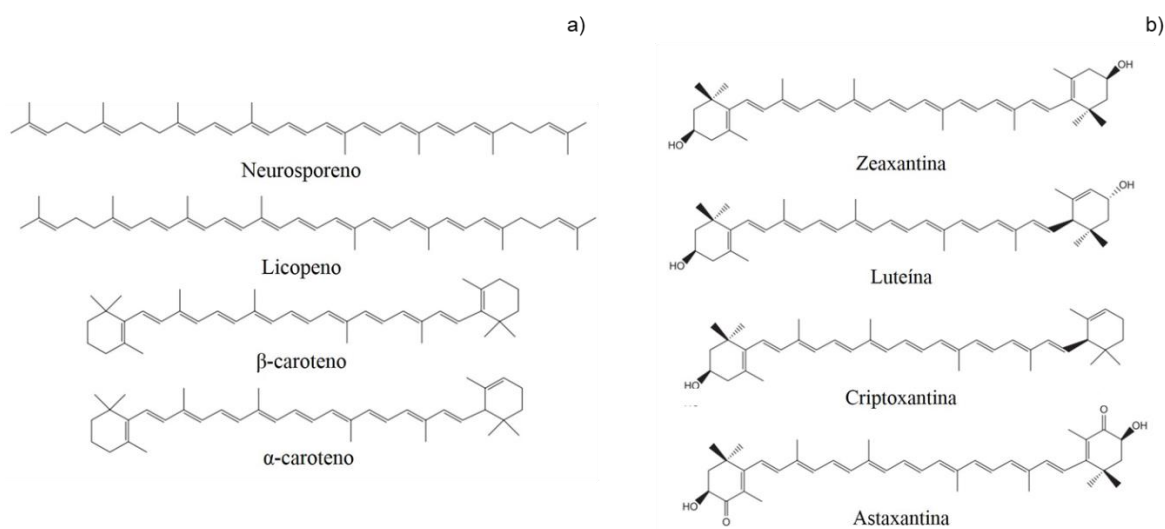
Lipídios também podem ser obtidos quando esse coproduto é utilizado como meio de cultivo para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (MACHADO et al., 2022). Quando o meio de cultivo sintético foi substituído por um meio contendo manipueira e melaço de cana, os autores verificaram um incremento de aproximadamente 16 mg na produção de ácidos graxos saturados e 56 mg na de ácidos graxos insaturados.

O coproduto em questão também tem sido amplamente investigado pelo potencial na bioprodução de carotenoides microbianos (MACHADO et al., 2022; RIBEIRO et al., 2019), sendo que seu uso pode proporcionar maior produção de carotenoides totais quando comparado à produção em meio sintético (SENTANIN, 2011).

4 CAROTENOIDES MICROBIANOS

Carotenoides são isoprenoides lipofílicos produzidos por organismos fotossintetizantes, como plantas, algas e microalgas, e também por fungos e algumas bactérias (BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006). Segundo os mesmos autores, esses compostos podem ser divididos em duas classes: os carotenos e as xantofilas. Os primeiros são hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades, como β -caroteno, α -caroteno, licopeno e neurosporeno (Figura 2a). As xantofilas, em contrapartida, são os derivados oxigenados dos carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (Figura 2b).

Figura 2 – Carotenos (a) e xantofilas (b).



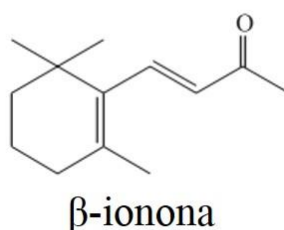
Fonte: Adaptado de Valduga et al. (2009).

A maioria dos carotenoides são tetraterpenoides (C_{40}) (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009) e as duplas ligações conjugadas encontradas na parte central da molécula atuam como um grupo cromóforo, sendo responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha desses compostos (YAHIA et al., 2018).

Os mesmos autores apontam que, por serem altamente insaturados, os carotenoides são suscetíveis a oxidações e isomerizações, sendo que estas últimas podem ser ocasionadas pelo calor, luz e ácidos. Relatam também que a isomerização dos carotenoides *trans* (configuração usual) para a forma *cis* tem como resultado perdas de cor e de atividade de pró-vitamina A.

Como tal atividade está diretamente relacionada à presença da estrutura retinoide (com o anel β -ionona) (Figura 3) na configuração do carotenoide, o β -caroteno trata-se do pigmento que apresenta maior atividade devido a presença de dois desses anéis em sua estrutura (SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010). Os mesmos autores revelam ainda que o α -caroteno e a β -criptoxantina também apresentam pró-atividade vitamínica A, porém menor que a proporcionada pelo β -caroteno.

Figura 3 - Estrutura da β -ionona.



Fonte: Adaptado de Uenojo, Junior e Pastore. (2007).

A vitamina mencionada apresenta potencial antioxidante, contribuindo para a prevenção de doenças provocadas por radicais livres, como alguns tipos de câncer, doenças do coração e problemas de visão, além de sua deficiência estar relacionada com distúrbios imunológicos (KUMAR; KAMBOJ; VIRENDER, 2021; UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007).

Os carotenoides utilizados industrialmente são produzidos por síntese química ou extraídos de vegetais (VALDUGA et al., 2009). O mesmo estudo revela que a crescente preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos proporcionou a investigação da produção desses pigmentos por vias biotecnológicas (utilizando micro-organismos), pois, além de serem naturais, podem ser obtidos em qualquer época do ano e em curto prazo.

Além dos fatores citados, a via microbiológica de produção de carotenoides possibilita pequeno espaço de produção, não dependência de condições ambientais adequadas (como clima, composição do solo e estação do ano), maior controle das condições de cultivo e uso de substratos de baixo custo (HAYMAN et al., 1974). Tal produção também é responsável por despertar a consciência ambiental, além de contribuir com benefícios nutricionais (ABEROUMAND, 2011).

Dentre os carotenoides microbianos mais investigados encontram-se astaxantina, β -caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno (VALDUGA et al., 2009), conforme evidenciado na Tabela 1.

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

Organismos	Espécies	Carotenoides
Cianobactérias	<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
	<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina
	<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
Fungos e leveduras	<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno
	<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -caroteno
	<i>Rhodospiridium sp</i>	Toruleno e β -caroteno
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularrodina, β -caroteno e toruleno
	<i>Rhodotorula graminis</i>	Toruleno
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno
	<i>Rhodotorula rubra</i>	β -caroteno
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	β -caroteno
	<i>Sporidiobolus sp</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno
	<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularrodina, β -caroteno e toruleno
	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Torularrodina e β -caroteno
	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina
Bactérias	<i>Mycobacterium brevicale</i>	Cantaxantina
	<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina
	<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas

Fonte: Adaptado de Valduga et al. (2009).

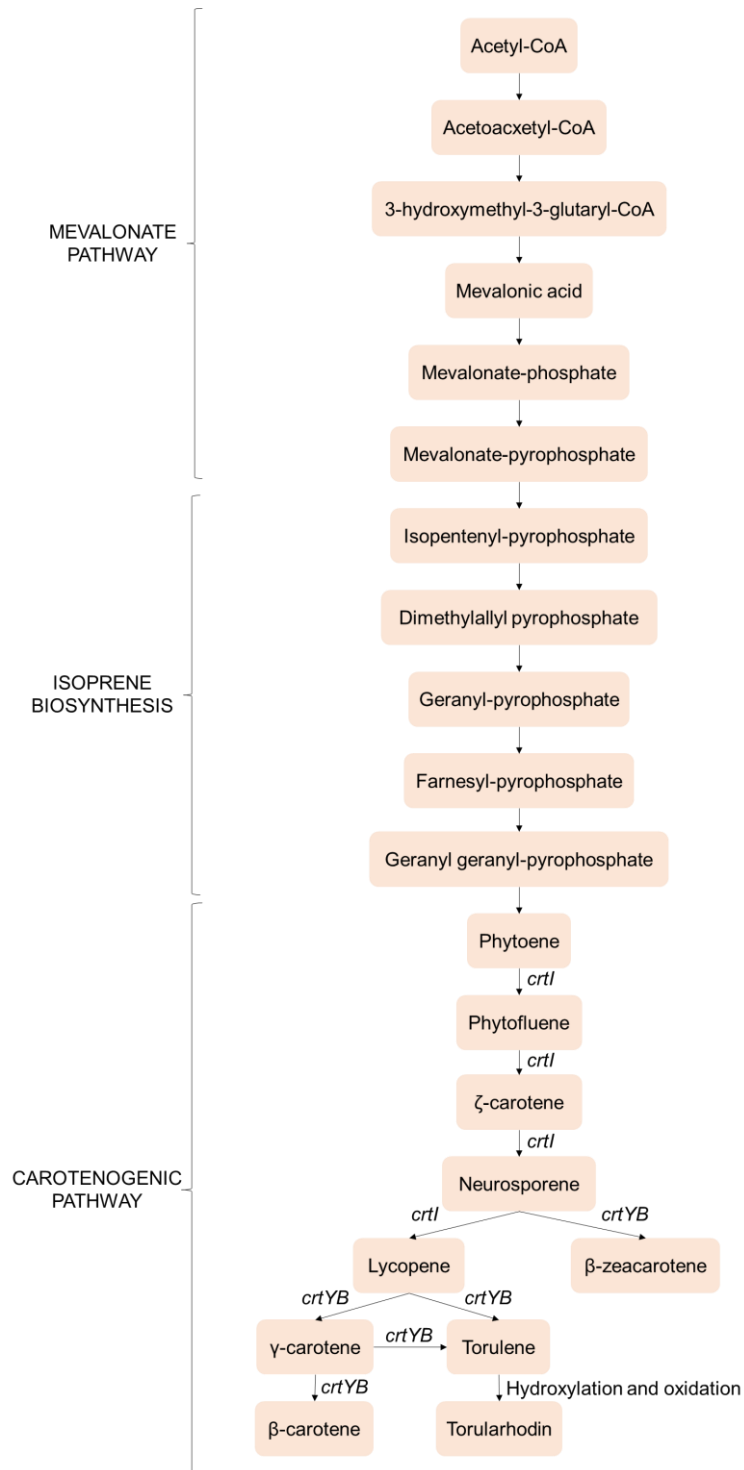
Esses compostos já foram produzidos utilizando diferentes coprodutos agroindustriais como substratos alternativos, como soro de queijo (RIBEIRO et al., 2017), resíduos dos processamentos de laranja (KANTIFEDAKI et al., 2018) e de azeite (BORRONI; GONZÁLEZ; CARELLI, 2017), lodo de fábrica de papel (MAJUMDAR et al., 2019), água de parboilização de arroz (RIOS et al., 2015), melaço de cana-de-açúcar (SAEJUNG; PUENSUNGNERN, 2020), glicerol (PEREIRA et al., 2019) e águas residuárias de cervejaria (SCHNEIDER et al., 2013).

Dentre os diversos micro-organismos estudados para a produção de carotenoides, as leveduras se destacam industrialmente pela possibilidade de cultivo em meios com alto teor de açúcares e baixo custo (HAYMAN et al., 1974), de altas taxas de crescimento e de biomassa e pela capacidade de acúmulo de pigmentos em suas células (BRAUNWALD et al., 2013) durante a fase estacionária de crescimento (DWORECKA-KASZAK; KIZERWETTER-SWIDA, 2011).

Através dos trabalhos de Simpson, Nakayama e Chichester (1964) e Goodwin (1980;1993), a biossíntese de carotenoides em leveduras pode ser esclarecida. Esses autores afirmam que o ácido mevalônico é o primeiro precursor específico desse processo, que envolve uma série de reações mediadas por enzimas. O licopeno age como precursor de carotenoides cíclicos e sofre várias transformações para originar β -caroteno, γ -caroteno, toruleno e torularrodina (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009) (Figura 4).

Tais descobertas aumentaram o interesse no potencial desses micro-organismos, visto que seu uso era restrito pela escassez de informações sobre o mecanismo de biossíntese dos pigmentos em questão (BARBOSA, 2017).

Figura 4 - Biossíntese de carotenoides em leveduras do gênero *Rhodotorula*.



Fonte: Adaptado de Frengova e Beshkova (2009) e Tang et al. (2019).

crtI: phytoene desaturase encoding gene; *crtYB*: bifunctional lycopene cyclase/phytoene synthase encoding gene.

Os principais carotenoides produzidos pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* são β -caroteno, toruleno e torularrodina (VALDUGA et al., 2009), sendo o primeiro presente em maior quantidade (cerca de 70% dos carotenoides totais) na maioria das espécies (PERRIER; DUBREUCQ; GALZY, 1995). Entretanto, as concentrações desses pigmentos variam conforme as diferentes cepas da mesma espécie e as condições de cultivo (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

4.1 Leveduras do gênero *Rhodotorula*

A levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 1576 foi utilizada nos estudos de Sentanin (2011) para a produção de carotenoides através da otimização do cultivo em manipueira. O ensaio com as condições mais próximas da ótima permitiu a obtenção de 2068 $\mu\text{g/L}$ de carotenoides totais e 699 $\mu\text{g/L}$ de β -caroteno a 25°C, 230 rpm, pH 7,0 e 7,5% de volume de inóculo. A autora ainda afirma que tal produção foi superior àquela obtida pelo cultivo da levedura em meio sintético (Yeast Malt) sem otimização (30°C, 200 rpm, pH 6,0 e 10% de inóculo), que proporcionou 899 $\mu\text{g/L}$ de carotenoides totais e 361 $\mu\text{g/L}$ de β -caroteno.

Uma levedura dessa mesma espécie foi investigada por Ribeiro et al. (2019) para a produção dos mesmos pigmentos em manipueira (pH 6,0) durante 120 horas a 30°C e 200 rpm. Os autores verificaram maior produção de carotenoides volumétricos (1,03 mg/L) e específicos (167,23 $\mu\text{g/g}$) quando a manipueira foi utilizada na concentração de 24% e suplementada com sulfato de amônio (5 g/L) e minerais. No entanto, a utilização apenas do coproduto como fonte de nutrientes e nessa mesma concentração permitiu a obtenção de uma quantidade muito próxima da citada de carotenoides, sendo 0,98 mg/L para carotenoides volumétricos e 139,18 $\mu\text{g/g}$ para os específicos.

Nesse mesmo estudo foi observado que, dentre os meios que continham apenas manipueira como fonte de nutrientes, aqueles com maiores concentrações do coproduto permitiram menor acúmulo de carotenoides pelas leveduras e menores valores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) e de biomassa em carotenoides ($Y_{p/x}$). Tal observação confirma o resultado obtido por Braunwald et al. (2013), em que a produção de carotenoides (e de lipídeos) é tanto maior quanto maior a razão carbono/nitrogênio (C/N) do meio de cultivo.

A manipueira também foi utilizada como substrato para a produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 (SILVA et al., 2018). Os cultivos foram realizados a 30°C, 200 rpm e pH 5,26 por 120 horas em meios contendo 50, 75 e 100% do coproduto (acrescidos de 3 g/L de extrato de levedura) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo cultivo em um meio sintético. Os autores verificaram que a maior produção de biomassa e lipídios ocorrida no meio sintético provavelmente está relacionada a alta razão C/N, que contribui para o crescimento celular e também proporciona o acúmulo de lipídios pelo excesso de carbono e limitação de nitrogênio.

Silva et al. (2018) também observaram que, dentre os meios contendo manipueira, aquele com 50% do coproduto, e maior razão C/N, proporcionou maior teor de lipídios (13,33 g/100g) e maior coeficiente de conversão de substrato em produto (0,0637 g/g). Os autores também enfatizaram a redução na produção de lipídios quando se aumentou a concentração do coproduto.

Tal substrato também foi utilizado em diferentes concentrações (20, 40, 60 e 80 g/L) pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 para a produção de carotenoides no estudo de Machado (2018) em pH 6,5, 130 rpm e 25°C durante 168 horas. O autor verificou maior produção de biomassa (5,41 g/L) no ensaio com a concentração de 60 g/L do coproduto, enquanto o maior teor de carotenoides específicos (132,59 µg/g) foi obtido no ensaio com 20 g/L, devido à maior razão C/N, e a maior concentração de carotenoides volumétricos (351,24 µg/L) foi observada quando se utilizou um meio de cultivo contendo 40 g/L de manipueira.

Mediante o exposto, é notável o potencial da manipueira por si só como meio de cultivo para leveduras do gênero *Rhodotorula* e consequente produção de pigmentos devido a presença de açúcares, nitrogênio e diversos minerais.

5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

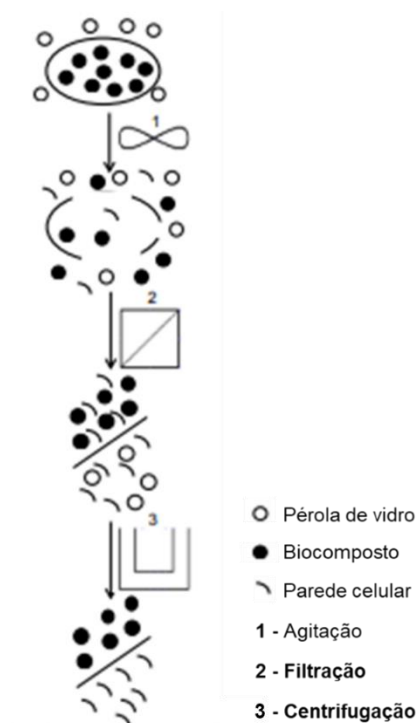
Os carotenoides provenientes de leveduras são produzidos de maneira intracelular, de modo que são necessários extratores que atuem no rompimento da membrana celular e permitam a liberação dos pigmentos para o meio (MICHELON et al., 2012).

Tais extratores podem ser físicos, químicos e/ou enzimáticos.

5.1 Métodos físicos

Pérolas de vidro podem ser utilizadas como abrasivos no rompimento de células microbianas. Tal método se assemelha ao moinho de esferas e consiste em um agitador rotativo preenchido com pérolas de vidro e a cultura celular. Dessa maneira, o rompimento é realizado pela combinação da colisão, agitação e moagem dos grânulos (Figura 5) (LOPES, 2014).

Figura 5 - Esquema de rompimento celular utilizando pérolas de vidro.

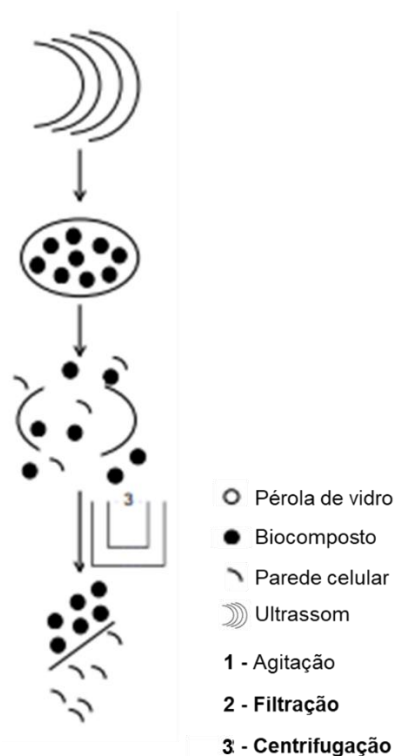


Fonte: Adaptado de Lemes, Álvares e Kalil (2013).

A técnica do banho ultrassônico, por sua vez, se baseia no fenômeno de cavitação, onde há formação, crescimento e colapso de microbolhas no interior de um

líquido que foi submetido a ondas sonoras de alta frequência (GOGATE; NADAR, 2015; MARTÍNEZ et al., 2020). Segundo esses mesmos autores, o colapso dessas bolhas gera colisão das moléculas umas com as outras, originando ondas de choque, responsáveis pela turbulência e tensão de cisalhamento verificadas no meio (Figura 6).

Figura 6 - Esquema de rompimento celular utilizando banho ultrassônico.



Fonte: Adaptado de Lemes, Álvares e Kalil (2013).

Tais estratégias foram utilizadas no trabalho de Michelon et al. (2012) para obtenção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268. Os autores obtiveram 75,42 µg/g de carotenoides quando utilizadas as pérolas de vidro e 79,20 µg/g quando utilizado o ultrassom, sendo a biomassa congelada em ambos os casos. Também observaram que esses métodos se mostraram mais eficientes do que técnicas químicas, como o uso de bicarbonato de sódio (36,96 µg/g) e dos ácidos clorídrico (65,37 µg/g), láctico (20,20 µg/g) e acético (24,63 µg/g).

Ao estudar diferentes métodos de ruptura celular de *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, Lopes et al. (2017) também observaram melhores resultados utilizando pérolas de vidro (144,2 µg/g) e o método ultrassônico (202,4 µg/g), em comparação

com métodos químicos que fizeram uso dos ácidos clorídrico (78,4 µg/g), láctico (76,9 µg/g) e acético (93,2 µg/g).

5.2 Métodos químicos

Os métodos químicos de rompimento celular e extração de pigmentos abrangem diversos reagentes e solventes, dentre eles o dimetilsulfóxido (DMSO), amplamente utilizado para extração e quantificação de carotenoides (CIPOLATTI et al., 2015; BORRONI; GONZÁLEZ; CARELLI, 2017; MACHADO; SOARES; DEL BIANCHI, 2019; RIBEIRO et al., 2019).

Contudo, a presença de compostos tóxicos nos extratos, provavelmente derivados desse solvente, torna mais dificultosa a sua utilização para a produção industrial de carotenoides microbianos e estimula a busca por novos extratores considerados alternativos (MICHELON et al., 2012), como o etanol e o metanol.

Michelon et al. (2012) fizeram uso de diferentes ácidos (clorídrico, láctico e acético) e bicarbonato de sódio para verificar a eficiência destes na ruptura celular e consequente extração de carotenoides de *Phaffia rhodozyma*. Os autores verificaram maior extração dos compostos quando foi utilizado ácido clorídrico aliado ao congelamento da biomassa (65,37 µg/g), entretanto esse valor ainda apresenta-se menor que o obtido quando foi utilizado DMSO nas mesmas condições (155,72 µg/g).

Com objetivo semelhante, Lopes et al. (2017) compararam o uso dos mesmos reagentes para extração e recuperação de carotenoides das leveduras *Sporodiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* sem congelamento. Os autores verificaram que, dentre os métodos menos tóxicos, o ácido clorídrico foi o mais eficiente na ruptura celular para *S. pararoseus* (18,8 µg/g), enquanto o ácido acético se mostrou mais eficiente para *R. mucilaginosa* (89,2 µg/g). Porém, tais ácidos ainda apresentaram eficiência inferior ao DMSO para ambas as leveduras (87,3 µg/g para *S. pararoseus* e 234,1 µg/g para *R. mucilaginosa*).

5.3 Combinação de métodos físicos e químicos para ruptura celular

Ultrassom e pérolas de vidro associados a diferentes ácidos foram utilizados no estudo de Machado (2018) para a extração de carotenoides da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. O autor verificou acréscimos de 113,6% e

46,3% na extração quando os ácidos acético e clorídrico foram combinados a pérolas de vidro, respectivamente, e de 18% e 28,18% quando esses mesmos ácidos foram combinados com a técnica de ultrassom.

Por sua vez, Gogate e Nadar (2015) utilizaram ultrassom para a ruptura celular de *Phaffia rhodozyma* MTCC 7536 e posterior recuperação de astaxantina utilizando diferentes solventes, como éter de petróleo, acetona, etanol e metanol, verificando melhores resultados quando utilizado o etanol (114,28 µg/g), seguido de metanol (107,63 µg/g), acetona (94,32 µg/g) e éter de petróleo (60,23 µg/g).

Entretanto, todas essas técnicas ainda se mostram menos eficientes que a ruptura celular por DMSO, enfatizando a necessidade da procura por técnicas de rompimento celular eficientes e recuperação de carotenoides por solventes que não agridam o meio ambiente e que possam ser utilizados em diferentes setores industriais.

Aliado a essa constatação, encontra-se o fato de que carotenoides extraídos de células de leveduras são misturas de vários compostos (LIU et al., 2021) e há dificuldade na completa dissolução destes em alguns solventes (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Dessa maneira, uma análise cromatográfica dos diferentes extratos pode verificar se as extrações propostas diferem na recuperação do β -caroteno produzido pela levedura estudada.

6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Nos anos de 1960 a 1970, a separação de carotenoides provenientes de leveduras do gênero *Rhodotorula* era realizada através de cromatografia de coluna aberta seguida pela quantificação em espectrofotômetro (PETERSON et al., 1958; SIMPSON; NAKAYAMA; CHICHESTER, 1964).

Entretanto, com o advento da cromatografia líquida de alta eficiência, a quantificação desses compostos provenientes de fontes microbianas tornou-se mais eficaz, como no trabalho de Squina e Mercadante (2003), que analisaram os carotenoides produzidos por cinco linhagens de *Rhodotorula*. Os autores utilizaram um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e fase móvel composta por acetonitrila, metanol, acetato de etila e trietilamina para a quantificação dos compostos em questão. Majoritariamente, foram encontrados: torularrodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno. Apesar da maior concentração de carotenoides (251,7 $\mu\text{g/g}$) ter sido encontrada no extrato proveniente da levedura *Rhodotorula glutinis*, a maior produção de β -caroteno (24,6 $\mu\text{g/g}$) foi verificada no extrato proveniente de *Rhodotorula araucariae*.

A quantificação desses pigmentos, produzidos pela cepa *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11, também foi realizada no estudo de Irazusta et al. (2013). Os autores utilizaram um cromatógrafo líquido de alta eficiência de fase reversa com detector de arranjo de diodos, coluna C18 e fase móvel composta por acetona e água, detectando a presença de três carotenoides dentre os citados anteriormente. Dessa maneira, confirmaram que torularrodina, toruleno e β -caroteno são pigmentos característicos desse gênero.

No trabalho de Mussagy et al. (2021), por sua vez, os autores extraíram os carotenoides de *Rhodotorula glutinis* CCT 2186 e os separaram em cromatografia de coluna aberta antes da quantificação em cromatógrafo líquido de alta eficiência de fase reversa. Através desse processo, os autores verificaram maior produção de β -caroteno (220,93 mg/L), seguida de torularrodina (252,01 mg/L) e toruleno (28,20 mg/L).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de coprodutos agroindustriais como substratos para a obtenção de diversos bioprodutos por vias biotecnológicas foi apresentado nesse capítulo, bem como os diversos micro-organismos que podem atuar nessa transformação, como fungos, microalgas, bactérias e leveduras.

Além disso, pela variedade de pesquisas apresentadas, verificou-se a utilidade da manipueira como substrato em cultivos para a obtenção de carotenoides microbianos, contribuindo para a redução da poluição ambiental e consequente geração de um produto considerado natural, quando comparado aos carotenoides sintéticos.

Também destacou-se a dificuldade de extração desses pigmentos devido à toxicidade dos solventes extratores. Assim, evidenciou-se a busca por metodologias alternativas de recuperação dos carotenoides, através de tecnologias que não gerem resíduos ao meio ambiente ou que sejam menos tóxicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 71–78, 2011.
- ALMEIDA, D. G. *et al.* Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.
- AMADO, I. R. *et al.* Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.
- ASUNIS, F. *et al.* Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 289, 2019.
- BARBOSA, A. F. S. **Cultivo de *Rhodotorula glutinis* em manipueira para a produção de suplemento vitamínico e proteico**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.
- 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.
- BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369–381, 2006.
- BRASIL. IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola – novembro 2020**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em: 24 dez. 2020.
- BRAUNWALD, T. *et al.* Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6581–6588, 2013.
- 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.
- DAS, A. J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 233–240, 2018.
- DE LA TORRE, I. *et al.* On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 145, p. 162–169, 2019.
- DEL BIANCHI, V. L. **Balanço de massa e de Energia do Processamento de**

Farinha de Mandioca em uma Empresa de Médio Porte do Estado de São Paulo. 1998. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DWORECKA-KASZAK, B.; KIZERWETTER-SWIDA, M. Pseudomycelium forming *Rhodotorula*–unusual picture of biofilm. **Mikologia Lekarska**, v. 18, n. 2, p. 74-78, 2011.

FERREIRA FILHO, J. R. *et al.* **Cultivo, processamento e uso da mandioca:** instruções práticas. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2013. 32 p.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia* : yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 163–180, 2009.

FUESS, L. T. *et al.* Biochemical butyrate production via dark fermentation as an energetically efficient alternative management approach for vinasse in sugarcane biorefineries. **Renewable Energy**, v. 158, p. 3–12, 2020.

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.

GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids. In: _____. **The biochemistry of the carotenoids**. Vol 1. Londres: Chapman and Hall, 1980. p. 33-76.

GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids: na overview. In: PACKER, L. **Methods in enzymology carotenoids**. Part B. Metabolism, genetic and biosynthesis. San Diego: Academic, 1993. p. 330-340.

HAYMAN, E. P. *et al.* Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v. 120, n. 3, p. 1339–1343, 1974.

IRAZUSTA, V. *et al.* Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 803–809, 2013.

KANTIFEDAKI, A. *et al.* Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. **Journal of Cleaner Production**, v. 185, p. 882–890, 2018.

KUMAR, A.; KAMBOJ, M.; VIRENDER, V. A review on photometric methods for the quantitation of vitamin A. **Microchemical Journal**, v. 171, p. 106791, 2021.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extração de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, 2013.

LIU, Z. *et al.* Strategies for an improved extraction and separation of lipids and carotenoids from oleaginous yeast. **Separation and Purification Technology**, v. 257, 2021.

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 *Sporodibolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 759–766, 2017.

MACHADO, J. **Otimização da produção de ácido láctico em biorreatores por *Lactobacillus plantarum* BL011 em hidrolisados de casca de soja**. 2020. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

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.

MAGALHÃES, N. *et al.* Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 1, p. 101–107, 2019.

MAHMOODI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 2019.

MAJUMDAR, S. *et al.* Exploring *Planococcus* sp. TRC1, a bacterial isolate, for carotenoid pigment production and detoxification of paper mill effluent in immobilized fluidized bed reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1389–1402, 2019.

MAIA, P. C. V. S. **Produção e aplicação de bioemulsificante isolado de *Bacillus subtilis* UCP 0146 por fermentação submersa em manipueira**. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2017.

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.

MELNICHUK, N. *et al.* Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-

amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. **Waste Management**, v. 106, p. 155–161, 2020.

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.

MONTEIRO, A. B. P. **Produção de pigmento vermelho pelo fungo *Monascus ruber* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na elaboração de pães**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. **Biochemical Engineering Journal**, v. 165, 2021.

NAGY, G. M. **Produção de biossurfactante de baixo custo a partir de resíduos agroindustriais**. 2018. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

OKPOZU, O. O. *et al.* Phycoremediation of cassava wastewater by *Desmodesmus armatus* and the concomitant accumulation of lipids for biodiesel production. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. June, p. 100255, 2019.

PASTORE, N. S. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como substrato**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

PEREIRA, R. N. *et al.* Simultaneous lipid and carotenoid production by stepwise fed-batch cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* with crude glycerol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 3, p. 1099–1108, 2019.

PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 173–179, 1995.

PETERSON, W. J. *et al.* Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. **Journal of bacteriology**, v. 75, p. 586–591, 1958.

PINHO, C. L. C. DE *et al.* Produção de ácido láctico em meio à base de efluentes da indústria de alimentos por cultura láctea mista imobilizada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–10, 2019.

RIBEIRO, J. E. S. R. **Utilização de resíduos agroindustriais para a obtenção de moléculas bioativas a partir de microrganismos**. 2018. 112 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

RIBEIRO, J. E. S. *et al.* Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll and carotenoids using the dairy industry by-product scotta as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 207–213, 2017.

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.

RODRIGUES, T. V. D. **Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodotorula mucilaginosa***. 2018. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

RODRIGUES, T. V. D. *et al.* Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388–398, 2019.

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

RIOS, D. A. DA S. *et al.* Rice parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 401–410, 2015.

SAEJUNG, C.; PUENSUNGNERN, L. Evaluation of Molasses-Based Medium as a Low Cost Medium for Carotenoids and Fatty Acid Production by Photosynthetic Bacteria. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 143–152, 2020

SAHOO, A. *et al.* Nattokinase production from *Bacillus subtilis* using cheese whey: Effect of nitrogen supplementation and dynamic modelling. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, 2020.

SCHNEIDER, T. *et al.* Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 1–10, 2013.

SCHWARTZ, S. J.; ELBE, J. H. V.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução de Adriano Brandelli *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 445-498.

SENTANIN, M. A. **Obtenção e propriedades de toruleno da levedura *Rhodotorula glutinis***. 2011. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SEPÚLVEDA, L. *et al.* Ellagic acid production using polyphenols from orange peel waste by submerged fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 1–7, 2020.

SILVA, J. DA *et al.* Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 11 out. 2018.

SIMPSON, K. L.; NAKAYAMA, T. O.; CHICHESTER, C. O. Biosynthesis of Yeast Carotenoids. **Journal of bacteriology**, v. 88, n. 6, p. 1688–1694, 1964.

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.

TANG, W. *et al.* Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 507–517, 2019.

TSCHOEKE, I. C. P. *et al.* Análise da carga orgânica da manipueira em casas de farinha. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, 2017.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.

VALDUGA, E. *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009.

VERA, E. C. S. *et al.* Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 168–178, 2018.

VIEIRA DE JESUS, M. *et al.* Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, p. 1–7, 2016.

VISENTIN, T. G. **Produção de bioprodutos a partir do cultivo batelada e batelada alimentada de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar**. 2020. 117 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2020.

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L. **Biotecnologia de Alimentos**. Atheneu, 2013. p. 143-171.

YAHIA, E. M. *et al.* Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. In: - _____. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health**. 2. ed. Wiley Blackwell, 2018. p. 285-345.

YEW, G. Y. *et al.* A novel lipids recovery strategy for biofuels generation on microalgae *Chlorella* cultivation with waste molasses. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, 2020.

Capítulo 2

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

RESUMO

A produção de carotenoides por leveduras é vantajosa devido a alta produtividade e possibilidade de diminuição de custo quando são utilizados coprodutos agroindustriais como substrato. A manipueira, líquido obtido no processamento da farinha de mandioca e altamente poluente, pode ser utilizada como fonte de minerais e nitrogênio para esses processos. O objetivo desse trabalho foi otimizar a produção carotenogênica da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 utilizando um meio de cultivo composto por manipueira e glicose, como fonte simples de carbono, obtendo elevadas eficiências nas produções de carotenoides volumétricos e de biomassa, bem como eficiente redução desse potencial poluidor do coproduto ao final do processo. Os ensaios foram conduzidos utilizando um delineamento composto central rotacional, onde as concentrações de manipueira e glicose variaram de 3,17 a 8,83% v/v e 25,86 a 54,14 g/L, respectivamente. Os parâmetros analisados foram o pH, a biomassa, as concentrações de carotenoides específicas e volumétricas, o consumo de açúcares e a redução da DQO. Verificou-se que todos os modelos matemáticos obtidos para as diferentes variáveis foram validados. Os aumentos das concentrações de manipueira (4% v/v para 8% v/v) e de glicose (30 g/L para 50 g/L) proporcionaram incrementos de 92,89% e 85,59% nas eficiências de produção volumétrica de carotenoides e de biomassa, respectivamente. Dessa maneira, foi possível elucidar com mais clareza a influência da razão C/N na síntese de carotenoides por leveduras e averiguar, através da redução da DQO, a diminuição do potencial poluidor da manipueira ao final do processo. Tais resultados evidenciam a capacidade de utilização da manipueira para novos processos que culminam na obtenção de novos produtos ao mesmo tempo que reduzem a poluição ambiental.

Palavras-chave: Pigmentos. Bioprocessos. Micro-organismos. Mandioca.

ABSTRACT

The production of carotenoids by yeasts has advantages due to the high productivity and the possibility of cost reduction when agroindustrial coproducts are used as substrate. Cassava wastewater, liquid obtained in the processing of cassava flour and highly polluting, can be used as a source of minerals and nitrogen for these processes. The objective of this work was to optimize the carotenoid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using a culture medium composed by cassava wastewater and glucose, as a simple source of carbon, obtaining high efficiencies in the production of volumetric carotenoids and biomass, as well as an efficient reduction of this polluting potential of the coproduct at the end of the process. The assays were conducted using a central rotational composite design, where cassava wastewater and glucose concentrations ranged from 3.17 to 8.83% v/v and 25.86 to 54.14 g/L, respectively. The parameters analyzed were pH, biomass, specific and volumetric carotenoid concentrations, sugar consumption, and COD reduction. It was verified that all the mathematical models obtained for the different variables were validated. The increases in the concentrations of cassava wastewater (4% v/v to 8% v/v) and glucose (30 g/L to 50 g/L) provided rises of 92.89% and 85.59% in the efficiencies of volumetric production of carotenoids and biomass production, respectively. Thus, it was possible to elucidate more clearly the influence of the C/N ratio on the synthesis of carotenoids by yeasts and to verify, through the COD reduction, the decrease in the polluting potential of cassava wastewater at the end of the process. Such results show the ability to use cassava wastewater for new processes which culminate in obtaining new products while reducing environmental pollution.

Keywords: Pigments. Bioprocess. Microorganisms. Cassava.

1 INTRODUÇÃO

Diversos micro-organismos produtores de carotenoides vêm sendo estudados, como bactérias, fungos filamentosos, microalgas e leveduras.

Os pigmentos gerados por uma bactéria do gênero *Planococcus*, estudada por Majumdar et al. (2019), apresentaram coloração laranja amarelada e boa atividade antioxidante, além de contribuir para a redução da demanda química de oxigênio (DQO) e dos teores de lignina e fenol de efluente de fábrica de papel. A bactéria *Rhodopseudomonas faecalis*, por sua vez, utilizada no estudo de Saejung e Puensungnern (2020), apresentou produtividade de carotenoides semelhante quando cultivada em meio sintético e em meio contendo melaço de cana, sendo que este permitiu uma redução de cerca de 90% do custo do meio de cultivo.

O fungo filamentoso *Blakeslea trispora*, cultivado em meio contendo pó de milho e pó de soja foi capaz de produzir β -caroteno com atividade antioxidante, anti-inflamatória e hematoprotetora quando testado em peixe-zebra (*Danio rerio*) (WANG et al., 2022).

A produção de carotenoides pelas microalgas *Haematococcus pluvialis* (VIEIRA; DERNER; LEMOS-SENNA, 2021) e *Chlorella thermophila* (SARKAR et al., 2020) também foram estudadas, verificando, respectivamente, o potencial antioxidante nos pigmentos obtidos e o desenvolvimento de uma extração rápida e econômica que pode ser ampliada para o nível comercial.

Tais pigmentos também podem ser produzidos por leveduras dos gêneros *Phaffia* (MUSSAGY et al., 2022; ZHANG et al., 2022), *Sporodiobolus* (KOT et al., 2021; LOPES et al., 2017) e *Rhodotorula*. Estudando a levedura *Rhodotorula glutinis*, Mussagy et al. (2021) observaram que o cultivo em biorreator de 5 litros promoveu um incremento de 25,83% na produção de β -caroteno em relação à produção realizada em erlenmeyers. Rodrigues et al. (2019), por sua vez, verificaram um aumento de 17% na produção de carotenoides volumétricos quando uma levedura desse mesmo gênero foi cultivada em meio agroindustrial em relação ao meio sintético.

A vantagem da utilização das leveduras para esse processo encontra-se na possibilidade de cultivo em meios contendo alto teor de açúcares (HAYMAN et al., 1974), na alta taxa de crescimento e acúmulo de pigmentos (BRAUNWALD et al., 2013).

Tais meios podem ser constituídos de coprodutos agroindustriais, com o intuito de diminuir o custo desses processos (HAYMAN et al., 1974), além de contribuir para a redução da poluição ambiental.

A manipueira, líquido obtido pela prensagem da massa ralada na produção de farinha de mandioca (WOICIECHOWSKI et al., 2013), apresenta diversos minerais importantes para o crescimento de leveduras e síntese de carotenoides (SENTANIN, 2011) e já foi investigada em outros trabalhos (MACHADO et al., 2022; RIBEIRO et al., 2019).

Entretando, sabe-se que a produção carotenogênica pelos micro-organismos em questão é diretamente influenciada pela razão carbono/nitrogênio (C/N) do meio de cultivo. Maiores razões C/N promovem maior acúmulo de carotenoides nas células das leveduras devido ao estresse gerado pelo excesso de carbono (BRAUNWALD et al., 2013). Esse acúmulo também pode influenciar diretamente a produção volumétrica desses pigmentos.

Apesar dos estudos já realizados nesse âmbito, ainda se faz necessária a otimização de um meio de cultivo contendo manipueira e uma fonte de carbono simples, como a glicose. Assim, a influência da razão C/N na produção de carotenoides seria melhor elucidada e o potencial da manipueira para a produção desses pigmentos seria evidenciado.

Aliada a essa necessidade, também é importante verificar, ao final dos cultivos, se tal processo se mostra eficiente na redução do potencial poluidor do coproduto utilizado.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 cultivada em um meio composto de manipueira e glicose, visando elevadas eficiências na produção de biomassa e de carotenoides volumétricos, além de verificar a redução do potencial poluidor da manipueira ao final do processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Manipueira

A manipueira utilizada nos experimentos foi gentilmente cedida pela farinheira Primavera Indústria e Comércio Ltda, localizada no município de Santa Maria da Serra – SP. O subproduto foi coletado em fevereiro de 2021 (Figura 1), armazenado em recipientes de polietileno e mantido sob congelamento.

Figura 1 - Coleta da manipueira.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Antes da realização dos experimentos, a manipueira foi centrifugada a 4500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para os cultivos (SILVA et al., 2018) (Figura 2), sendo previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Figura 2 - Manipueira antes da esterilização.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

2.1.2 Micro-organismo

A levedura utilizada foi a *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 (Figura 3), pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBILCE/UNESP), campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Tal micro-organismo foi isolado do próprio ambiente universitário por Machado (2018) e encontra-se armazenado na Micoteca URM – Universidade Federal de Pernambuco, estando disponível para qualquer pesquisador. O micro-organismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio de cultivo Yeast Malt Agar (YMA) inclinado e cobertos por uma camada de óleo mineral.

Figura 3 - Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

2.2 Inóculo

As colônias recobertas por óleo mineral foram repicadas em tubos de ensaio com meio de cultivo YMA inclinado e incubadas a 25°C durante 48 horas (MACHADO, 2018). Após esse tempo de crescimento, foi realizada uma suspensão de células e posterior transferência destas para erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL de caldo YM (Yeast Malt), previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos (MACHADO, 2018; VALDUGA et al., 2007). Com base nos mesmos autores, os frascos foram incubados a 130 rpm, 25°C por 42 horas.

2.3 Otimização do meio de cultivo e bioprodução dos carotenoides

Foram realizados alguns ensaios iniciais com base nos estudos de Ribeiro et al. (2019) e Silva et al. (2018) para verificar o comportamento da levedura e a consequente produção de carotenoides em meios de cultivo com diferentes concentrações de manipueira (50% v/v, 30% v/v, 10% v/v e 6% v/v). Tais meios foram suplementados com 40 g/L de glicose devido aos resultados obtidos por Machado (2018), nos quais tal concentração de glicose estimularia a produção de carotenoides por leveduras do gênero *Rhodotorula*. Esses resultados encontram-se no APÊNDICE A.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios iniciais, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 (4 ensaios + 4 ensaios no ponto axial + 3 pontos centrais), com as variáveis independentes estudadas e seus respectivos níveis apresentados na Tabela 1. As variáveis dependentes estudadas foram as eficiências na produção de biomassa, de carotenoides específicos e de carotenoides volumétricos, bem como do consumo de açúcares e da redução da DQO.

Tabela 1: Variáveis e níveis para o DCCR

Variáveis	Níveis das variáveis codificadas e decodificadas				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Manipueira (% v/v)	3,17	4	6	8	8,83
Glicose (g/L)	25,86	30	40	50	54,14

Os ensaios foram realizados em agitador orbital LUCA - 222 e em erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL dos meios de cultivos a pH 6,0, sendo este ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl). A concentração celular inicial dos cultivos foi de 10^6 células/mL (advindas do inóculo) e as condições operacionais foram 25°C, 130 rpm durante 144 horas (Figura 4). Tais condições operacionais foram escolhidas com base no estudo de Machado (2018), o qual verificou a temperatura e agitação consideradas ótimas para a produção de carotenoides pela levedura em questão. Também estudou a cinética de produção desses pigmentos por esse micro-organismo em um meio sintético, observando máxima produção carotenogênica em 144 horas e um decaimento dessa produção após o período mencionado.

Figura 4 - Cultivos após 144 horas.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Determinação da razão carbono/nitrogênio (C/N)

A razão C/N da manipueira e dos diferentes meios de cultivo foi determinada pela análise do teor de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) através de um Analisador TOC – LCPN SHIMADZU® (ROCHA; CAMPANHOL; BASTOS, 2021).

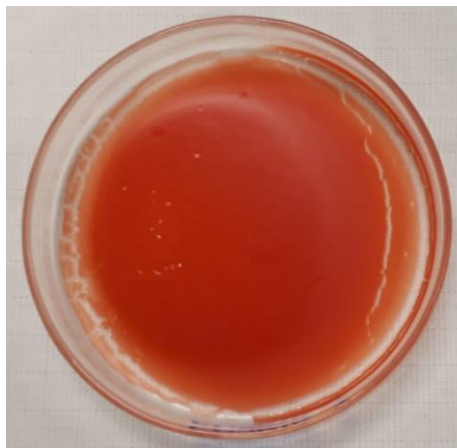
2.4.2 Determinação da concentração de biomassa

O cultivo foi centrifugado (3500 rpm por 10 minutos) e a biomassa ressuspensa em água destilada. Uma alíquota da suspensão foi submetida a leitura da absorbância a 620nm e a biomassa quantificada através de uma curva padrão (KUSDIYANTINI et al., 1998), APÊNDICE B.

2.4.3 Recuperação dos carotenoides totais

De acordo com metodologias descritas por Fonseca et al. (2011) e Michelon et al. (2012) e adaptadas por Cipolatti et al. (2015), a biomassa foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, transferida para placas de petri e seca em estufa com circulação de ar por 48 horas (Figura 5). Posteriormente, foi macerada em almofariz e padronizada em peneira Tyler 115. Em seguida, pesou-se 0,05g de massa seca e esta foi submetida a uma lise com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), adicionada de 1,1g/mL de pérolas de vidro e homogeneizada em agitador vórtex por 1 minuto. A cada 15 minutos, foi realizada nova homogeneização, até o tempo total de 1 hora. Então, adicionou-se 6 mL de acetona e realizou-se nova centrifugação (5000 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi separado e, caso a biomassa ainda estivesse pigmentada, era realizada nova extração. Ao sobrenadante foram adicionados 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 20% e a mesma quantidade de éter de petróleo, seguida de homogeneização. Após a formação das fases, a fase apolar foi submetida a uma filtração e o excesso de água retirado com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), originando os extratos.

Figura 5 - Biomassa após secagem.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

2.4.4 Determinação da concentração de carotenoides específicos e volumétricos

Os extratos foram analisados em espectrofotômetro por meio da absorbância a 448 nm (CABRAL et al., 2011) e expressos em termos de seu carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absorbância de $A_{1cm}^{1\%} = 2592$), através da seguinte equação (DAVIES, 1976):

$$CE = \frac{A * V * 10^6}{A_{1cm}^{1\%} * 100 * m_{amostra}}$$

Em que CE é a concentração específica de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$), A é a absorbância, V é o volume (mL) proveniente da filtração, $m_{amostra}$ é a massa celular seca (g) e $A_{1cm}^{1\%}$ é a absorbância específica.

A partir da concentração específica de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$) e do valor da biomassa (g/L), foi possível calcular o teor de carotenoides volumétricos ($\mu\text{g/L}$) pela seguinte equação:

$$CV = CE * Biomassa$$

2.4.5 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura do sobrenadante dos cultivos em medidor de pH, segundo AOAC (1990).

2.4.6 Determinação do consumo de açúcares redutores totais

Inicialmente, alíquotas do meio de cultivo inicial e do sobrenadante dos cultivos ao final das 144 horas passaram por um processo de hidrólise baseado no trabalho de Machado et al. (2022). Os hidrolisados foram, então, submetidos à análise de açúcares redutores totais pelo método espectrofotométrico com ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) com leitura da absorbância a 540 nm (MILLER, 1959). A concentração de açúcares redutores totais (g/L) foi estimada através de uma curva padrão (APÊNDICE C) e o consumo destes foi calculado pela seguinte equação:

$$Cart (\%) = \frac{(Car_i - Car_f) * 100}{Car_i}$$

Onde Cart é o consumo de açúcares redutores totais, Car_i é a concentração de açúcares redutores totais do meio de cultivo inicial e Car_f é a concentração de açúcares redutores totais presentes no sobrenadante após o tempo de cultivo.

2.4.7 Determinação da redução da DQO

A determinação da DQO do meio de cultivo inicial e do sobrenadante obtido após as 144 horas de cultivo foi realizada pelo método colorimétrico e leitura da absorbância a 620 nm, segundo APHA (2017). A redução da DQO foi calculada pela equação:

$$R_{DQO}(\%) = \frac{(DQO_i - DQO_f) * 100}{DQO_i}$$

Onde R_{DQO} é a redução da DQO, DQO_i é a demanda química de oxigênio (mg/L O₂) do meio de cultivo inicial e DQO_f é a demanda química de oxigênio (mg/L O₂) do sobrenadante após o tempo de cultivo.

2.5 Análise estatística

Os modelos matemáticos obtidos foram avaliados pelos coeficientes de determinação (R), pelos coeficientes de determinação ajustados (R_{aj}) e pela análise

de variância (ANOVA), com $p < 0,05$. Posteriormente, foram gerados os gráficos de pareto, superfícies de resposta e curvas de contorno para as variáveis estudadas utilizando o software Statistica 10.0 (Statsoft, Oklahoma, Tulsa, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manipueira utilizada nesse estudo apresentou uma razão C/N de 8,6.

O pH final dos ensaios apresentou-se em torno de $5,69 \pm 0,17$, próximo aos valores obtidos por Machado (2018) ao estudar a cinética de produção carotenogênica dessa mesma levedura em meio sintético, verificando pouca variação de pH ao longo do processo.

Devido a variação da atividade da levedura ao longo do experimento, a estratégia escolhida encontra-se na apresentação dos resultados através das eficiências de produção de biomassa, de carotenoides específicos e de carotenoides volumétricos. Os resultados obtidos no Ensaio 1 foram fixados como 100% (Tabela 2), sendo seus valores brutos: $1,17 \pm 0,003$ g/L para biomassa, $60,55 \pm 0,36$ µg/g para carotenoides específicos e $70,73 \pm 0,58$ µg/L para carotenoides volumétricos. Os dados brutos de consumo de açúcares e redução da DQO encontram-se na Tabela 3, juntamente com os cálculos de suas eficiências e também tomando o ensaio 1 como 100%. Dessa maneira, podemos justificar as eficiências de 274,49% no consumo de açúcares e 286,28% na redução da DQO do ensaio 3, tendo em vista que um consumo de açúcares de 9,37% e uma redução da DQO de 19,97% equivale a eficiências de 100% para ambos os casos. Os ensaios 9, 10 e 11 são os pontos centrais do delineamento.

Tabela 2: Delineamento composto central rotacional (valores reais e codificados)

Ensaio	C/N	Manipueira (% v/v)	Glicose (g/L)	Eficiência na produção de biomassa (%)	Eficiência na produção de CE (%)	Eficiência na produção de CV (%)
1	391/1	4 (-1)	30 (-1)	100,00	100,00	100,00
2	646/1	4 (-1)	50 (+1)	99,46	101,05	100,01
3	200/1	8 (+1)	30 (-1)	184,62	57,62	106,57
4	328/1	8 (+1)	50 (+1)	185,59	103,78	192,89
5	652/1	3,17 (-1,414)	40 (0)	85,59	113,02	97,02
6	240/1	8,83 (+1,414)	40 (0)	208,12	77,50	160,89
7	228/1	6 (0)	25,86 (-1,414)	86,80	87,31	75,46
8	469/1	6 (0)	54,14 (+1,414)	139,59	85,46	119,17
9	349/1	6 (0)	40 (0)	147,03	106,95	157,29
10	349/1	6 (0)	40 (0)	145,94	102,58	148,73
11	349/1	6 (0)	40 (0)	146,49	105,00	153,40

C/N: razão carbono/nitrogênio; CE: Carotenoides específicos; CV: Carotenoides volumétricos. Fonte:

Elaborado pela autora (2022).

Tabela 3: Delineamento composto central rotacional (valores reais e codificados) (continuação)

Ensaio	Consumo de açúcares (%)	Eficiência no consumo de açúcares (%)	Redução da DQO (%)	Eficiência na redução da DQO (%)
1	9,37	100	19,97	100
2	5,04	53,76	16,36	81,92
3	25,72	274,49	57,17	286,28
4	9,5	101,43	17,23	86,26
5	2,28	24,28	6,30	31,56
6	10,96	117,03	32,87	164,59
7	17,26	184,17	40,33	201,94
8	3,80	40,56	11,37	56,96
9	10,78	115,09	24,45	122,42
10	6,92	73,91	25,64	128,41
11	7,83	83,58	26,98	135,10

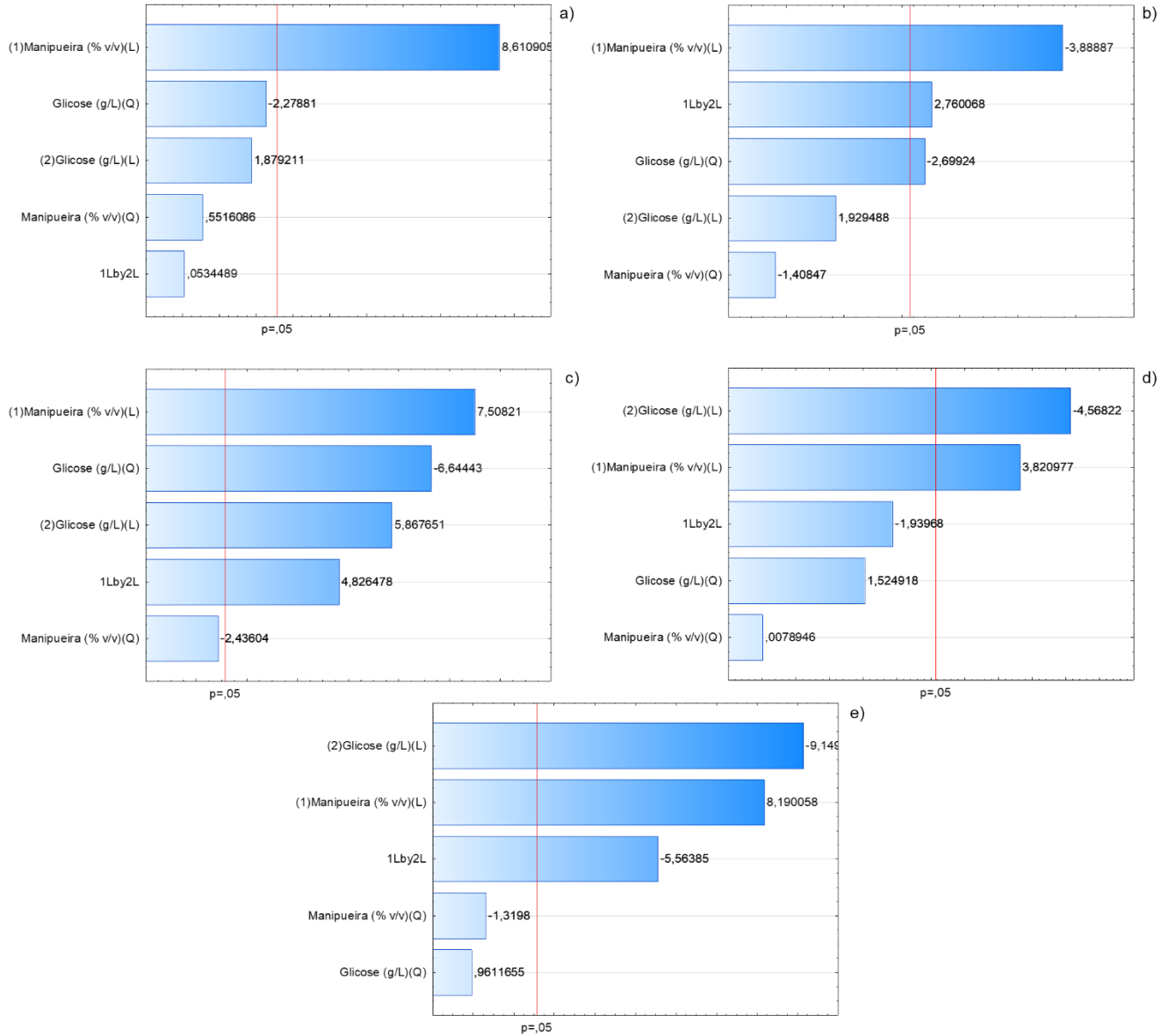
Elaborado pela autora (2022).

Realizou-se a verificação dos modelos, optando-se pelo modelo linear/quadrático com a interação dos fatores para todas as variáveis dependentes, sendo os coeficientes de determinação ajustados (R_{aj}) 0,88 para a eficiência de produção de biomassa, 0,74 para a de carotenoides específicos, 0,94 para a de carotenoides volumétricos, 0,79 para a do consumo de açúcares e 0,95 para a da redução da DQO, com $p < 0,05$.

Em seguida foram gerados os Gráficos de Pareto, de Superfícies de Resposta e as Curvas de Contorno para cada variável dependente, bem como as equações para as respostas em função das variáveis independentes (concentrações de glicose e de manipueira).

Os Gráficos de Pareto para as eficiências da produção de biomassa, de carotenoides específicos, de carotenoides volumétricos, do consumo de açúcares e da redução da DQO podem ser verificados na Figura 6.

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 (e).



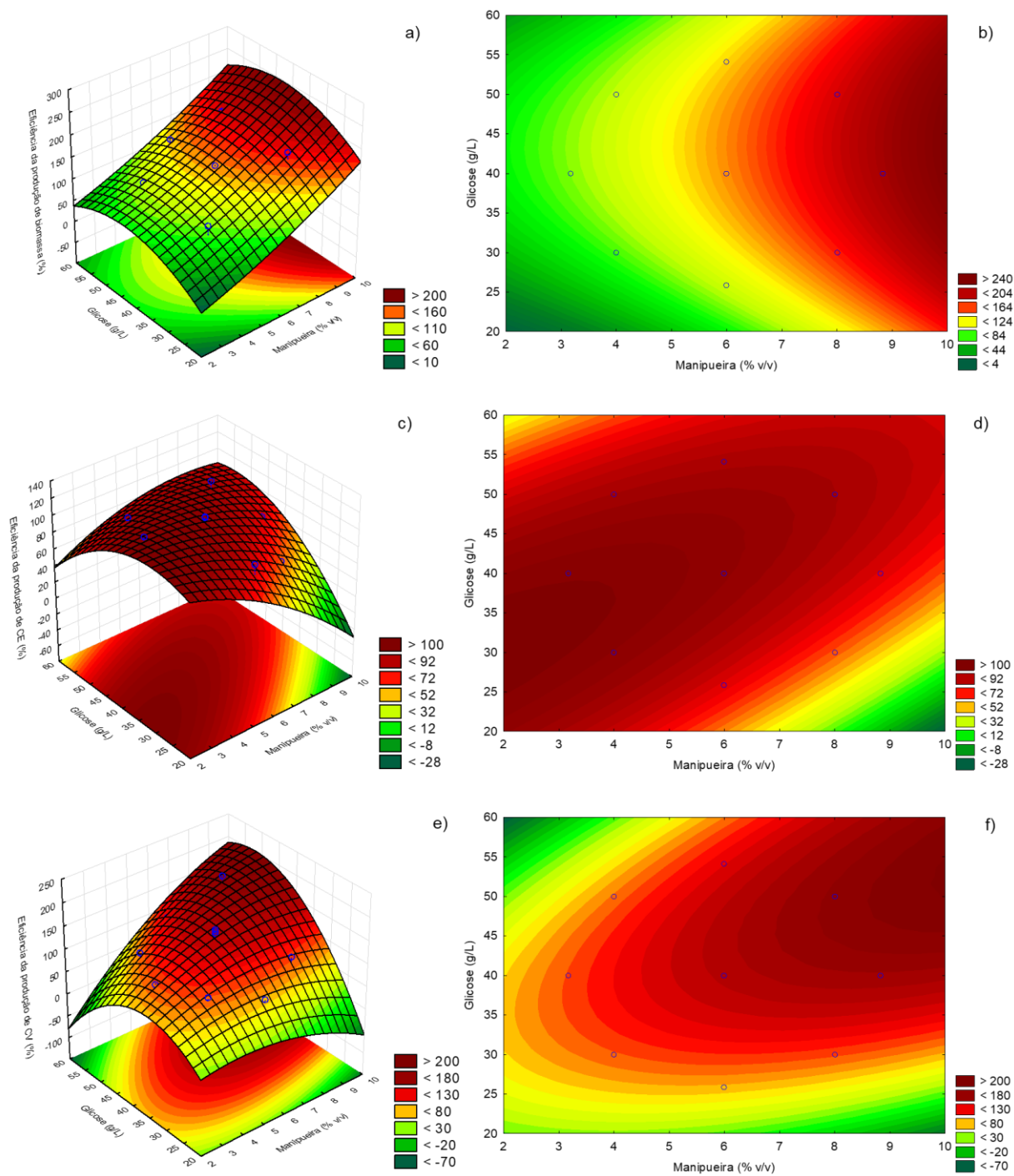
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Pelos gráficos apresentados, observa-se que a única variável significativa para a eficiência da produção de biomassa foi a concentração de manipueira (linear) ($p=0,000349$). Para a eficiência da produção de carotenoides específicos, a manipueira (linear), ($p=0,011538$), a glicose (quadrática) ($p=0,042823$) e a interação dessas variáveis ($p=0,039831$) foram significativas. Tal interação ($p=0,004771$) também foi significativa para a eficiência da produção de carotenoides volumétricos, bem como a manipueira (linear) ($p=0,000663$) e a glicose (linear e quadrática) ($p=0,002039$ e $p=0,001164$, respectivamente).

Em contrapartida, para as eficiências do consumo de açúcares e da redução da DQO, a manipueira (linear) ($p=0,012361$ e $p=0,000441$, respectivamente) e a glicose (linear) ($p=0,006012$ e $p=0,000261$, respectivamente) foram significativas. Entretanto, a interação entre as variáveis ($p=0,002581$) se mostrou significativa somente para a eficiência da redução da DQO.

As Superfícies de Reposta e Curvas de Contorno para as eficiências da produção de biomassa, de carotenoides específicos e de carotenoides volumétricos estão apresentadas na Figura 7.

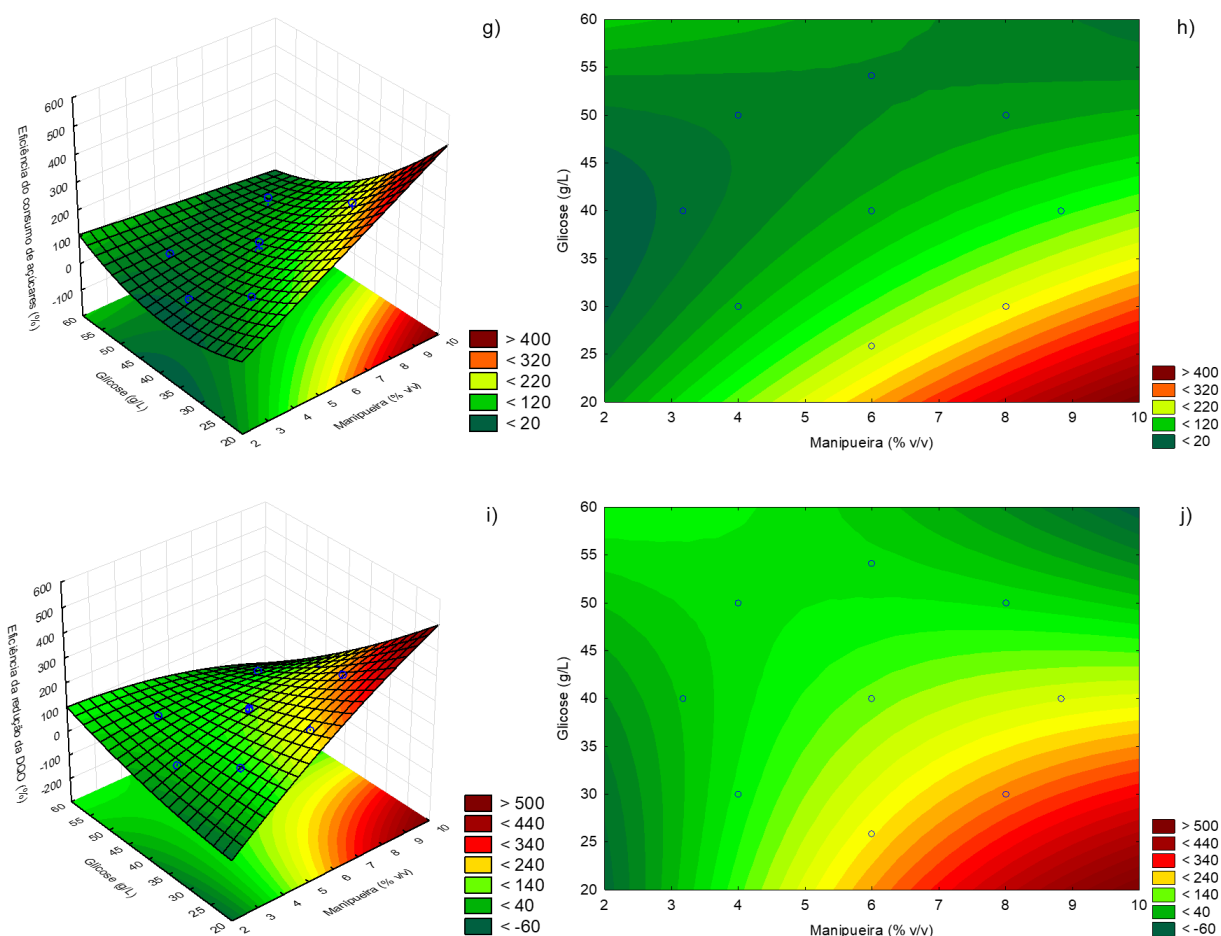
Figura 7 - Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno das eficiências da produção de biomassa (a e b), de carotenoides específicos (c e d) e de carotenoides volumétricos (e e f) com relação às concentrações de glicose e manipueira.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno para as eficiências do consumo de açúcares e da redução da DQO, por sua vez, estão apresentadas na Figura 8.

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 manípueira.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Pelos gráficos apresentados, pode-se verificar que produção de biomassa é mais eficiente em concentrações mais elevadas de manípueira (>10%) independentemente da concentração de glicose (como observado no Gráfico de Pareto para essa variável).

Tal observação pode ser explicada pela presença de íons metálicos (cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e cobre) e nitrogênio na manípueira (RIBEIRO et al., 2019). Tais íons estimulam o crescimento celular em leveduras carotenogênicas (CHENG; YANG, 2016; KOT et al., 2016) provavelmente devido a um mecanismo de

ativação de enzimas específicas (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009). O teor de nitrogênio, por sua vez, está diretamente relacionado à nutrição e crescimento celular da levedura, ou seja, quanto maior a presença desse elemento, maior será sua utilização pelo micro-organismo para a promoção de crescimento e multiplicação.

Essa constatação também foi feita no estudo de Ribeiro et al. (2019), no qual os autores verificaram maior produção de biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* CTT 2182 (12,78 g/L) no meio de cultivo que continha manipueira e suplementação de minerais e nitrogênio em relação ao meio de cultivo composto somente pelo coproduto (10,28 g/L). Também foi verificado que a adição de glicose (10 g/L) em um meio de cultivo contendo 74% de manipueira não proporcionou um crescimento celular diferente significativamente daquele produzido em um meio com a mesma concentração do coproduto e sem essa suplementação.

Ademais, esses mesmos autores relataram que os meios de cultivo que possuíam apenas glicose como fonte de carbono apresentaram menor crescimento celular em relação aos meios que continham esse açúcar acrescido de manipueira, comprovando que esse coproduto se trata de uma fonte de nutrientes que estimula a produção de biomassa de leveduras carotenogênicas.

Em relação aos carotenoides específicos, percebe-se que a produção pode ser mais eficiente quando o meio de cultivo é composto de 30 a 35 g/L de glicose e 2 a 3% de manipueira (Figura 7).

O maior acúmulo de carotenoides específicos quando a manipueira se encontra em baixas concentrações se deve ao estresse oxidativo proporcionado pelo excesso de carbono no meio e limitação de nitrogênio (BRAUNWALD et al., 2013; RIBEIRO et al., 2019). Tal estresse provoca uma resposta bioquímica que envolve o aumento da atividade de enzimas e do nível dos carotenoides (SALAR et al., 2013), visto que esses compostos são responsáveis pela desativação dos radicais livres produzidos durante o metabolismo celular, como oxigênio singlete, radical hidroxila, peróxidos e outros oxidantes (BERERA et al., 2010).

Esse estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado ao efeito Crabtree (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009), onde o excesso de carbono, na forma de glicose, no meio reacional reprime o crescimento celular da levedura e, conseqüentemente, proporciona acúmulo de carotenoides. Como verificado, a produção menos eficiente de biomassa (85,59%) foi obtida no ensaio 5, onde as concentrações de manipueira

(3,17%) e glicose (40 g/L) eram próximas às condições ótimas para a produção de carotenoides específicos (Figura 7).

Tal efeito já foi demonstrado no cultivo de *Phaffia rhodozyma* em batelada e batelada alimentada. No primeiro caso, os autores observaram que uma quantidade de carbono acima de 12 g/L gerou diminuição do rendimento de carotenoides volumétricos (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009; RAMIREZ; GUTIERREZ; GSCHAEGLER, 2001). No caso da batelada alimentada, foi verificado que a adição de 125 g/L de glicose ao meio de cultivo foi responsável pelo baixo rendimento de biomassa microbiana e pela produção de compostos secundários, como etanol e ácido acético (REYNDERS; RAWLINGS; HARRISON, 1997).

Ao estudar a produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* CTT 2182 em meios de cultivo contendo apenas manipueira como fonte de carbono, Ribeiro et al. (2019) verificaram que o meio reacional contendo a menor concentração do coproduto (24,6%) proporcionou a maior concentração de carotenoides específicos (167,23 µg/g).

Tal resultado também corresponde ao obtido por Kot et al. (2020), que verificaram a produção de 260,3 µg/g de carotenoides específicos pela levedura *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 cultivada em um meio com 3% de glicerol e água residuária de batata.

A eficiência na produção de carotenoides volumétricos, em contrapartida, pode ser incrementada quando o meio de cultivo apresenta concentrações de glicose entre 45 e 60 g/L e concentrações de manipueira acima de 9%.

Por estar relacionada à concentração de biomassa e à concentração de carotenoides específicos, a concentração de carotenoides volumétricos depende diretamente de ambas as variáveis.

Em nosso estudo, a produção mais eficiente de biomassa (208,12%, ensaio 6) não foi acompanhada pela mais eficiente de carotenoides volumétricos (192,89%, ensaio 4) e nem pela de carotenoides específicos (113,02%, ensaio 5).

Entretanto, verifica-se que o aumento ou diminuição da eficiência da produção de biomassa pode estar relacionada com o aumento ou diminuição da eficiência da produção de carotenoides volumétricos. Tal fenômeno pode ser verificado no ensaio 5, onde há diminuição das eficiências de produção de biomassa (85,59%) e carotenoides volumétricos (97,02%) e aumento da eficiência da produção de carotenoides específicos (113,02); e nos ensaios 3, 6 e 8, onde ocorre o aumento das

eficiências das produções de biomassa (184,62%, 208,12% e 139,59%, respectivamente) e de carotenoides volumétricos (106,57%, 160,89% e 119,17%, respectivamente) em detrimento da eficiência de produção de carotenoides específicos (57,62%, 77,50% e 85,46%, respectivamente).

Tal observação também foi realizada por Cheng e Yang (2016) ao estudar leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, que verificaram que a maior produção de carotenoides volumétricos (2611 µg/L) obtida em um meio contendo melaço não foi acompanhada pela maior produção de carotenoides específicos (268,6 µg/g) e sim pela maior produção de biomassa (9,72 g/L).

Ribeiro et al. (2019), em contrapartida, verificaram que os ensaios que obtiveram maiores concentrações de biomassa (12,78 g/L e 10,28 g/L) não foram acompanhados pelas maiores concentrações de carotenoides volumétricos (1,03 mg/L e 0,98 mg/L). Entretanto, todos esses ensaios não possuíam glicose na composição dos meios de cultivo, evidenciando, mais uma vez, a influência da manipueira nessas variáveis. Os mesmos autores apontam ainda que os ensaios com maiores concentrações de carotenoides específicos (167,23 µg/g e 139,18 µg/g), por sua vez, foram acompanhados de altas concentrações de carotenoides volumétricos, apesar da baixa biomassa obtida.

Logo, de maneira geral, pode-se concluir que existem duas estratégias para aumentar a concentração da variável de interesse: incrementar a produção de carotenoides específicos ou incrementar a produção de biomassa.

Sobre o consumo de açúcares e redução da DQO pela levedura estudada, percebe-se que concentrações mais elevadas do coproduto (>10%), aliado a concentrações de glicose próximas de 20 g/L, proporcionam maior eficiência na resposta dessas duas variáveis (Figura 8).

Tal informação se relaciona à eficiência da produção de biomassa, ou seja, maiores concentrações de manipueira fornecem maior quantidade de minerais e nitrogênio para o crescimento do micro-organismo (o qual também faz uso dos açúcares presentes no meio), culminando em maiores produções de biomassa, maior consumo dos açúcares presente nos meios e, por consequência, maior redução na DQO. Esse fenômeno pode ser verificado nos ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 6 e 5, 6, 9, 10 e 11.

Percebe-se também que o efeito Crabtree, mencionado anteriormente, reflete no consumo de açúcares pela levedura. Isto é, de modo geral, um aumento excessivo

na concentração de glicose ocasiona diminuição na eficiência da produção de biomassa (85,59%) e, conseqüentemente, na eficiência do consumo de açúcares (24,28%), como verificado no ensaio 5.

Entretanto, essa diminuição do consumo de açúcares também pode estar relacionada à presença da enzima β -glicosidase extracelular em algumas leveduras do gênero *Rhodotorula* (ZHANG et al., 2021). A enzima mencionada atua na hidrólise dos açúcares não redutores presentes na manipueira e é sensível à inibição por glicose, limitando sua atividade (SAHA; BOTHAST, 1996). Tal fato também foi verificado no estudo de Ribeiro et al. (2019), que observaram uma menor redução do consumo de açúcares pela levedura *Rhodotorula glutinis* quando 10g/L de glicose foi adicionada ao meio de cultivo.

Pelos ensaios 2 e 5 percebe-se também que uma diminuição simultânea de glicose (50g/L e 40g/L, respectivamente) e manipueira (4% e 3,17%, respectivamente) proporciona diminuição da eficiência da produção de biomassa (99,46% e 85,59%, respectivamente) e conseqüente diminuições das eficiências do consumo de açúcares (53,76% e 24,28%) e da redução da DQO (81,92% e 31,56%, respectivamente). Por outro lado, a produção de carotenoides específicos (101,05% e 113,02%, respectivamente) apresenta-se mais eficiente.

Tal fato pode ser explicado pela falta de nutrientes, ocasionada pelas baixas concentrações do coproduto, e concentrações elevadas de glicose, sendo ambas evidenciadas pelas altas razões C/N (646/1 e 652/1, respectivamente) desses ensaios. Essas razões C/N elevadas também causam estresse oxidativo no micro-organismo, proporcionando um incremento no acúmulo de carotenoides específicos (BRAUNWALD et al., 2013) e também podem se relacionar com a redução da DQO.

No trabalho de Machado et al. (2022), o cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em um meio contendo melaço de cana e manipueira em uma razão C/N próxima à 80 gerou 82,78% de redução na DQO após 192 horas. Esse resultado se mostra superior aos obtidos em nosso estudo, onde as razões C/N eram mais elevadas.

Em contrapartida, como evidenciado pelos ensaios 1 e 4, um aumento simultâneo de glicose (30g/L e 50g/L, respectivamente) e manipueira (4% e 8%, respectivamente) proporciona aumento da eficiência da produção de biomassa (100,00% e 185,59%, respectivamente) e conseqüente aumento da eficiência do consumo de açúcares (100,00% e 101,43%, respectivamente). De maneira

semelhante ao descrito no parágrafo anterior, tal fenômeno provavelmente pode estar associado a uma menor razão C/N em relação aos ensaios 2 e 5, o que proporciona maior quantidade de nutrientes e nitrogênio para o crescimento celular e, conseqüentemente, maior redução dos açúcares no meio, os quais também são utilizados para o crescimento do micro-organismo.

Com a geração dos gráficos foi possível obter as equações para as eficiências de produção de biomassa (Equação 1), de carotenoides específicos (Equação 2), de carotenoides volumétricos (Equação 3), do consumo de açúcares (Equação 4) e da redução da DQO (Equação 5).

$$\text{Biomassa (\%)} = -202,815 + 10,913.X + 0,819.X^2 + 11,665.Y - 0,135.Y^2 + 0,019.X.Y$$

(Eq.1)

$$\text{Carotenoides específicos (\%)} = 59,455 - 13,653.X - 1,21.X^2 + 4,602.Y - 0,093.Y^2 + 0,564.X.Y$$

(Eq.2)

$$\text{Carotenoides volumétricos (\%)} = -215,482 - 3,813.X - 2,287.X^2 + 15,372.Y - 0,25.Y^2 + 1,078.X.Y$$

(Eq.3)

$$\text{Consumo de açúcares (\%)} = 125,9 + 85,16.X + 0,027.X^2 - 12,556.Y + 0,21.Y^2 - 1,585.X.Y$$

(Eq.4)

$$\text{Redução da DQO (\%)} = -323,393 + 141,854.X - 2,268.X^2 + 3,064.Y + 0,066.Y^2 - 2,274.X.Y$$

(Eq.5)

Onde: X = Concentração de manipueira; Y = Concentração de glicose

O delineamento experimental proposto não foi capaz de indicar, precisamente, um ponto ótimo da eficiência da produção de carotenoides volumétricos. A realização de um outro delineamento experimental seria indicado nesse caso, com a

concentração de manipueira variando de 8% a 16% e a concentração de glicose variando de 30g/L a 60g/L. Esse novo planejamento deveria ser repetido para que fossem observadas as variações intra e intermodelo.

Entretanto, devido à escassez de tempo ocasionada pelo período de pandemia, à segunda parte do trabalho que ainda deveria ser realizada e ao fato de que a repetição dos pontos centrais é realizada para a análise da variação dos dados ao modelo matemático, acordamos em finalizar essa parte do trabalho utilizando os erros médios dos pontos centrais de cada variável dependente para a validação dos modelos em questão.

Dessa maneira, foram calculados os erros médios dos pontos centrais, apresentados na Tabela 3.

Tabela 4 - Erros médios dos pontos centrais para as variáveis dependentes.

Variável dependente	Erro médio (%)
Eficiência de produção de biomassa	0,50
Eficiência de produção de carotenoides específicos	2,81
Eficiência de produção de carotenoides volumétricos	3,78
Eficiência do consumo de açúcares	35,0
Eficiência da redução da DQO	6,33

Nota-se que, para as variáveis eficiências da produção de biomassa, de carotenoides específicos e de carotenoides volumétricos e da redução da DQO, o erro médio apresenta-se abaixo de 10%. Logo, conclui-se que os dados se ajustam aos modelos obtidos para essas variáveis.

A eficiência do consumo de açúcares, por sua vez, apresentou um erro médio acima de 10%. Tal fato se deve à maior variação observada entre as repetições, sendo responsável por uma queda no ajuste dos dados ao modelo matemático ($R = 0,89$ e $R_{aj} = 0,79$). Entretanto, como não somente as repetições dos pontos centrais são consideradas na validação de um modelo, pode-se concluir que um R_{aj} de 0,79 trata-se de um ajuste adequado.

Para a continuação do trabalho, estudando diferentes métodos alternativos de extração de carotenoides, foi escolhido o ensaio 6 (8,83% v/v de manipueira e 40g/L de glicose) devido às altas eficiências na produção de biomassa (208,12%) e de carotenoides volumétricos (160,89%), além das elevadas eficiências de consumo de

açúcares (117,03%) e de redução da DQO (164,59%). Também foi considerada, em detrimento do ensaio 3 (8% v/v de manipueira e 30g/L de glicose), a eficiência um pouco mais elevada na produção de carotenoides específicos (77,50%).

4 CONCLUSÕES

Os modelos matemáticos obtidos para as diferentes variáveis foram validados, sendo verificada a maior eficiência na produção de carotenoides volumétricos quando o meio de cultivo apresentava 8% de manipueira e 50g/L de glicose. Esse resultado foi acompanhado por elevadas eficiências na produção de biomassa e no consumo de açúcares.

Contudo, o ensaio que continha 8,83% de manipueira e 40g/L de glicose foi escolhido para a continuação do estudo devido à obtenção de elevadas eficiências de produção de carotenoides volumétricos e de biomassa, do consumo de açúcares e da redução da DQO.

Foi possível verificar, pelo bioprocesso estudado, que os minerais e o nitrogênio presentes na manipueira atuam diretamente na produção de carotenoides pelas leveduras e que o potencial poluidor desse coproduto pode ser diminuído ao final do processo.

Tal fato evidencia capacidade de utilização de coprodutos agroindustriais para atuarem como substratos em bioprocessos, culminando no aproveitamento de substâncias que seriam descartadas, na redução da poluição ambiental e na obtenção de novos produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BERERA, R. *et al.* The light-harvesting function of carotenoids in the cyanobacterial stress-inducible IsiA complex. **Chemical Physics**, v. 373, p. 65-70, 2010.
- BRAUNWALD, T. *et al.* Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6581–6588, 2013.
- CABRAL, M. M. S. *et al.* Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 1, p. 159–166, 2011.
- CHENG, Y. T.; YANG, C. F. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 61, p. 270-275, 2016.
- 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.
- FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia* : yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 163–180, 2009.
- HAYMAN, E. P. *et al.* Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v. 120, n. 3, p. 1339–1343, 1974.
- KOT, A. M. *et al.* *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6103-6117, 2016.
- KOT, A. M. *et al.* *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus* – non-conventional yeasts for use in industries. **Fungal Biology Reviews**, v. 37, p. 41–58, 2021
- 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. *et al.* Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* 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.

MAJUMDAR, S. *et al.* Exploring *Planococcus* sp. TRC1, a bacterial isolate, for carotenoid pigment production and detoxification of paper mill effluent in immobilized fluidized bed reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1389–1402, 2019.

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.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. **Biochemical Engineering Journal**, v. 165, 2021.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Recovery of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* biomass using aqueous solutions of cholinium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v. 290, p. 120852, 2022.

RAMIREZ, J.; GUTIERREZ, H.; GSCHAEDLER, A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. **J Biotechnol**, v. 88, p. 259–268, 2001.

REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 549–552, 1997.

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.

RODRIGUES, T. V. D. *et al.* Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388–398, 2019.

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

SAEJUNG, C.; PUENSUNGNERN, L. Evaluation of Molasses-Based Medium as a Low Cost Medium for Carotenoids and Fatty Acid Production by Photosynthetic Bacteria. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 143–152, 2020.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Production, purification, and characterization of a highly glucose- tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3165–3170, 1996.

SALAR, R. K. *et al.* Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. **3 Biotech**, v. 3, p. 53-60, 2013.

SARKAR, S. *et al.* Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. **Process Biochemistry**, v. 96, p. 58–72, 2020.

SENTANIN, M. A. **Obtenção e propriedades de toruleno da levedura *Rhodotorula glutinis***. 2011. 134f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SILVA, J. DA *et al.* Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 11 out. 2018.

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.

VIEIRA, M. V.; DERNER, R. B.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of *Haematococcus pluvialis* carotenoid-loaded PLGA nanocapsules in a gel system with antioxidant properties for topical application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102099, 2021.

WANG, Y. *et al.* β -Carotene extracted from *Blakeslea trispora* attenuates oxidative stress, inflammatory, hepatic injury and immune damage induced by copper sulfate in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 258, p. 109366, 2022.

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L. **Biotecnologia de Alimentos**. Atheneu, 2013. p. 143-171.

ZHANG, J. *et al.* Titanium dioxide-mediated fatty acids promoted carotenoid synthesis in *Phaffia rhodozyma* PR106 analyzed whole genome. **Bioresource Technology**, v. 347, p. 126699, 2022.

ZHANG, P. *et al.* Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103859, 2021.

Capítulo 3

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

RESUMO

O dimetilsulfóxido trata-se do solvente mais comumente utilizado para ruptura da parede celular de leveduras e recuperação de carotenoides. Entretanto, a presença de compostos tóxicos nos extratos impede sua utilização em diversos setores industriais. Dessa maneira, os objetivos desse trabalho foram: verificar a eficiência de etanol e metanol associados a pérolas de vidro e ultrassom, em comparação com o dimetilsulfóxido, para a extração de carotenoides e β -caroteno da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409; verificar a estrutura das células após essas extrações e avaliar se houve diferença na coloração dos extratos. Tal levedura foi cultivada em um meio contendo manipueira e glicose e, posteriormente, foram realizadas análises de pH, biomassa, consumo de açúcares e redução da DQO. Pelas diferentes metodologias de extração, foram calculadas as concentrações de carotenoides específicos e volumétricos e a quantificação de β -caroteno foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência. Em seguida, foram analisadas a coloração dos extratos e a estrutura das biomassas após os processos de extração. Verificou-se que a utilização de dimetilsulfóxido e etanol, independentemente da técnica combinada, não diferiu significativamente na extração de carotenoides específicos e volumétricos. Entretanto, a concentração de β -caroteno apresentou-se maior quando utilizado o etanol. Os extratos apresentaram pouca diferença de cor aos olhos humanos e as imagens de microscopia confirmaram a eficiência do etanol, combinado com pérolas de vidro ou ultrassom, na ruptura da parede celular e recuperação dos pigmentos. Tais fatos evidenciam que o dimetilsulfóxido pode ser substituído pelo etanol, associado a ultrassom ou pérolas de vidro, na extração de carotenoides provenientes da levedura estudada, resultando em extratos menos tóxicos e que podem ser utilizados industrialmente.

Palavras-chave: Carotenoides. Extração. Etanol. Ultrassom. Pérolas de vidro. β -caroteno.

ABSTRACT

Dimethyl sulfoxide is the most commonly used solvent for yeast cell wall rupture and carotenoid recovery. However, the presence of toxic compounds in the extracts prevents their use in several industrial sectors. Thus, the objectives of this work were: to verify the efficiency of ethanol and metanol associated with glass beads and ultrasound, in comparison with dimethyl sulfoxide, for the extraction of carotenoids and β -carotene from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409; to verify the structure of the cells after these extractions, and to evaluate if there was a difference in the color of the extracts. This yeast was cultivated in a medium containing cassava wastewater and glucose and, later, analyzes of pH, biomass, sugar consumption, and COD reduction were performed. By the different extraction methodologies, the concentrations of specific and volumetric carotenoids were calculated and the quantification of β -carotene was performed by high performance liquid chromatography. Then, the color of the extracts and the structure of the biomasses after the extraction processes were analyzed. It was found that the use of dimethyl sulfoxide and ethanol, regardless of the combined technique, did not significantly differ in the extraction of specific and volumetric carotenoids. However, the concentration of β -carotene was higher when ethanol was used. The extracts showed little difference in color to human eyes and the microscopy images confirmed the efficiency of ethanol, combined with glass beads or ultrasound, in the rupture of the cell wall and recovery of the pigments. These facts show that dimethyl sulfoxide can be replaced by ethanol, associated with ultrasound or glass beads, in the extraction of carotenoids from yeasts, resulting in less toxic extracts that can be used industrially.

Keywords: Carotenoids. Extraction. Ethanol. Ultrasound. Glass beads. β -carotene.

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides originários de leveduras são produzidos intracelularmente, logo há a necessidade de ruptura da parede celular para a recuperação desses compostos (MICHELON et al., 2012), sendo esse um dos grandes desafios para o uso desses pigmentos em diversos setores industriais.

Diferentes métodos de extração já foram utilizados, sendo eles físicos, como maceração com terra diatomácea, ultrassom e pérolas de vidro; ou químicos, como ácidos, bicarbonato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO) (FONSECA et al., 2011; LOPES et al., 2017; MACHADO, 2018; MICHELON et al., 2012, MONKS et al., 2013), metanol, etanol (MUSSAGY et al., 2020), acetato de etila (MUSSAGY et al., 2021), entre outros.

Apesar do DMSO ser o solvente mais comumente utilizado para esse fim (CIPOLATTI et al., 2015; BORRONI; GONZÁLEZ; CARELLI, 2017; MACHADO; SOARES; DEL BIANCHI, 2019; RIBEIRO et al., 2019), sua alta toxicidade impede que os extratos sejam utilizados industrialmente (MICHELON et al., 2012). Já foi verificado que o uso de ultrassom permite uma recuperação de carotenoides próxima àquela obtida com esse solvente (URNAU et al., 2017) e que algumas substâncias alternativas, como metanol e etanol, foram eficientes na recuperação de β -caroteno (MUSSAGY et al., 2020). Trabalhos que associam técnicas físicas e químicas também são encontrados na literatura, evidenciando que essa associação pode incrementar a extração carotenogênica (GOGATE; NADAR, 2015; MACHADO, 2018).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da combinação entre solventes alternativos, e menos tóxicos que o DMSO, e pérolas de vidro ou ultrassom na ruptura celular e recuperação de carotenoides produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. Também objetivou examinar a estrutura celular após essas rupturas, quantificar o β -caroteno obtido após esses processos e verificar se houve diferenças na coloração dos extratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução dos carotenoides

As colônias da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409, que estavam recobertas por óleo mineral, foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultivo Yeast Malt Agar (YMA) inclinado e incubadas a 25°C por 48 horas para reativação da cepa (MACHADO, 2018). Em seguida, realizou-se uma suspensão celular e a transferência desta para erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL de caldo Yeast Malt (YM), previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos, os quais foram incubados a 130 rpm e 25°C por 42 horas (MACHADO, 2018; VALDUGA et al., 2007).

A partir desse inóculo, foram realizados os cultivos em erlenmeyers de 250 mL com 125 mL de um meio composto por 8,83% (v/v) de manipueira e 40 g/L de glicose, com pH ajustado para 6,0 pela adição de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl). Tais erlenmeyers permaneceram por 144 horas em agitador orbital LUCA – 222 a 130 rpm e 25°C (MACHADO, 2018), sendo a concentração celular inicial de 10^6 células/mL.

Ao término desse período, foram realizadas análises de concentração de biomassa, pH, consumo de açúcares totais e redução da demanda química de oxigênio (DQO). Também foram efetuadas diferentes extrações para quantificação de carotenoides específicos e volumétricos, avaliação de cor, quantificação de β -caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) das biomassas após os processos de extração.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Determinação da razão carbono/nitrogênio (C/N)

A razão C/N do meio de cultivo foi calculada pelo teor de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) quantificados por um Analisador TOC – LCPN SHIMADZU® (ROCHA; CAMPANHOL; BASTOS, 2021).

2.2.2 Determinação da concentração de biomassa

Após as 144 horas, o cultivo foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos e a biomassa ressuspensa em água destilada. A concentração foi estimada pela leitura da absorbância a 620 nm de uma alíquota e quantificada através de uma curva padrão (KUSDIYANTINI et al., 1998), APÊNDICE B.

2.2.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura do sobrenadante dos cultivos em medidor de pH, segundo AOAC (1990).

2.2.4 Determinação do consumo de açúcares redutores totais

Inicialmente, alíquotas do meio de cultivo inicial e do sobrenadante dos cultivos ao final das 144 horas passaram por um processo de hidrólise baseado no trabalho de Machado et al. (2022). Os hidrolisados foram, então, submetidos à análise de açúcares redutores totais pelo método espectrofotométrico com ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) e leitura da absorbância a 540 nm (MILLER, 1959). A concentração de açúcares redutores totais (g/L) foi estimada através de uma curva padrão (APÊNDICE C) e o consumo destes foi calculado pela equação:

$$Cart (\%) = \frac{(Car_i - Car_f) * 100}{Car_i}$$

Onde Cart é o consumo de açúcares redutores totais, Car_i é a concentração de açúcares redutores totais do meio de cultivo inicial e Car_f é a concentração de açúcares redutores totais presentes no sobrenadante após o tempo de cultivo.

2.2.5 Determinação da redução da demanda química de oxigênio (DQO)

A determinação da demanda química de oxigênio do meio de cultivo inicial e do sobrenadante obtido após as 144 horas de cultivo foi realizada pelo método colorimétrico e leitura da absorbância a 620 nm, segundo APHA (2017). A redução da DQO foi calculada pela equação:

$$R_{DQO}(\%) = \frac{(DQO_i - DQO_f) * 100}{DQO_i}$$

Onde R_{DQO} é a redução da DQO, DQO_i é a demanda química de oxigênio (mg/L O_2) do meio de cultivo inicial e DQO_f é a demanda química de oxigênio (mg/L O_2) do sobrenadante após o tempo de cultivo.

2.3 Metodologias alternativas de extração e recuperação de carotenoides

A biomassa obtida foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, transferida para placas de petri e seca em estufa com circulação de ar a 30°C por 48 horas. Posteriormente foi macerada em almofariz e padronizada em peneira Tyler 115 (CIPOLATTI et al., 2015; DA FONSECA et al., 2011; MICHELON et al., 2012).

2.3.1 Abrasão com pérolas de vidro

Baseado no estudo de Medeiros et al. (2008) e na adaptação realizada por Machado (2018), 2 mL de solvente (DMSO, metanol ou etanol) e 1,1 g/mL de pérolas de vidro foram adicionados a 0,05g da biomassa mencionada. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e, a cada 15 minutos, realizou-se nova homogeneização até o tempo total de 1 hora.

2.3.2 Banho ultrassônico

Adaptando-se as metodologias dos trabalhos de Medeiros et al. (2008), Fonseca et al. (2011), Michelon et al. (2012), Lopes et al. (2017) e Machado (2018), 2 mL de solvente (DMSO, metanol ou etanol) foram adicionados a 0,05 g da biomassa mencionada. A mistura foi submetida a 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 minutos, sendo a água do banho trocada a cada ciclo.

Após os procedimentos de extração por pérolas de vidro e banho ultrassônico, foram adicionados aos frascos 6 mL de acetona, seguido de centrifugação (5000 rpm por 5 minutos). Em seguida, foram adicionados ao sobrenadante 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 20% e a mesma quantidade de éter de petróleo, seguida de homogeneização. Após a formação das fases, a fase apolar foi coletada e submetida a uma filtração, sendo o excesso de água retirado com sulfato de sódio

anidro (Na_2SO_4), originando os extratos (CIPOLATTI et al., 2015; FONSECA et al., 2011; MICHELON et al., 2012).

Tais extratos foram analisados em espectrofotômetro por meio da absorbância a 448 nm (CABRAL et al., 2011) e expressos em termos de seu carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absorbância de $A_{1\text{cm}}^{1\%}=2592$), através da seguinte equação (DAVIES, 1976):

$$CE = \frac{A * V * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * 100 * m_{\text{amostra}}}$$

Em que CE é a concentração específica de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$), A é a absorbância, V é o volume (mL) proveniente da filtração, m_{amostra} é a massa celular seca (g) e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ é a absorbância específica.

A partir da concentração específica de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$) e do valor da biomassa (g/L), foi possível calcular o teor de carotenoides volumétricos ($\mu\text{g/L}$) pela seguinte equação:

$$CV = CE * Biomassa$$

2.4 Avaliação da cor

A cor instrumental dos extratos foi analisada em espectrofotômetro de bancada (HunterLab, ColorFlex45/0, Estados Unidos) utilizando o software Universal 4.10. Considerando as coordenadas do espaço de cor CIELAB, foram determinados os valores de L^* , a^* e b^* com o iluminante D65 e observador a 10° (SHARMA; GHOSHAL, 2020). O equipamento em questão também forneceu os valores de cromaticidade ($Chroma$, C^*) e do ângulo hue (h°).

Através da equação abaixo, foi possível calcular se houve diferença total de cor (ΔE) entre os tratamentos (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013; SANT'ANNA et al., 2013).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta a * ^2 + \Delta b * ^2 + \Delta L * ^2}$$

2.5 Análise Cromatográfica

Os extratos obtidos foram evaporados até a secura em uma capela de exaustão e dissolvidos na fase móvel, adaptando a metodologia utilizada por Rodriguez-Amaya (2001).

Com base no estudo de Squina e Mercadante (2003), as amostras foram injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC DAD – Agilent Technologies 1220 Infinity), e sistema de aquisição e processamento de dados OpenLAB Control. A separação foi realizada em coluna C18 Supelcosil™ (25 cm x 4 mm, 5 µm), fluxo de 1 mL/min, injeção de 50 µL de amostra e temperatura da coluna mantida em 30°C. Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados a 460 nm. A quantificação do β-caroteno foi realizada através de uma curva analítica (100 µg/L a 1000 µg/L) utilizando o mesmo como padrão, sendo o tempo de retenção de 16,97 min. Como fase móvel foi utilizada uma solução metanol/acetato de etila/trietilamina (90:9,9:0,1) e modo isocrático.

Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico e todas as amostras foram previamente filtradas em filtro de seringa PTFE com 0,22 µm de poro antes de serem injetadas no cromatógrafo.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na biomassa recuperada das extrações foi realizada uma análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a fim de verificar a morfologia da parede celular das leveduras após esses processos (MONKS et al., 2013). Para tanto, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss, EVO LS15, Alemanha), com as resoluções de 2500x, 5000x e 10000x.

2.7 Análise estatística

Os dados de carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e β-caroteno obtidos pelas diferentes metodologias de extração, bem como os valores dos parâmetros L*, a*, b*, C*, h° e ΔE foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software Statistica 10.0 (Statsoft, Oklahoma, Tulsa, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da cor

Ao final das 144 horas de cultivo, o pH apresentou-se em torno de $5,82 \pm 0,06$, valores próximos aos obtidos nos cultivos do capítulo anterior e no trabalho de Machado (2018). Foram obtidos também uma biomassa de $4,31 \pm 0,02$ g/L, um consumo de açúcares de $39,48 \pm 1,02\%$ e $41,5 \pm 2,9\%$ de redução da DQO, sendo todos próximos aos valores brutos obtidos para o ensaio nas mesmas condições presente no capítulo anterior.

A Tabela 1 apresenta dos resultados obtidos em relação à avaliação da cor dos diferentes extratos.

Tabela 1: Parâmetros de cor obtidos para os diferentes extratos.

Extração	L*	a*	b*	C*	h°
Ultrassom + DMSO	$45,12 \pm 0,08^b$	$0,07 \pm 0,21^{bc}$	$2,53 \pm 0,30^b$	$2,54 \pm 0,30^b$	$88,85 \pm 4,57^{abc}$
Ultrassom + Metanol	$45,24 \pm 0,07^{ab}$	$-0,01 \pm 0,05^c$	$2,30 \pm 0,08^b$	$2,30 \pm 0,08^b$	$90,33 \pm 1,21^a$
Ultrassom + Etanol	$45,20 \pm 0,08^{ab}$	$0,04 \pm 0,10^{bc}$	$2,41 \pm 0,22^b$	$2,42 \pm 0,22^b$	$89,28 \pm 2,46^{ab}$
Pérolas de vidro + DMSO	$45,16 \pm 0,14^b$	$0,37 \pm 0,30^a$	$2,98 \pm 0,28^a$	$3,01 \pm 0,31^a$	$83,30 \pm 5,01^d$
Pérolas de vidro + Metanol	$45,34 \pm 0,13^a$	$0,24 \pm 0,09^{ab}$	$2,96 \pm 0,15^a$	$2,96 \pm 0,16^a$	$85,41 \pm 1,71^{bcd}$
Pérolas de vidro + Etanol	$45,25 \pm 0,10^{ab}$	$0,28 \pm 0,11^{ab}$	$2,87 \pm 0,23^a$	$2,88 \pm 0,24^a$	$84,48 \pm 1,91^{cd}$

Média $\pm$ desvio padrão (n = 8); Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as extrações ($p < 0,05$); L*: luminosidade; a*: parâmetro a; b*: parâmetro b; C*: cromaticidade; h°: ângulo hue. Fonte: Elaborado pela autora (2022).

De acordo com a luminosidade (L*), todas as cores podem ser incluídas em uma escala de cinza, variando entre preto (L*=0) e branco (L*=100) (SANT'ANNA et al., 2013). No presente estudo, foi observado que as extrações com DMSO proporcionaram uma queda nesse parâmetro em relação à extração com pérolas de vidro e metanol, com a obtenção de extratos ligeiramente mais escuros.

O parâmetro a* assume valores positivos para vermelho e negativos para verde (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013), não sendo verificada diferença significativa quando os diferentes solventes foram combinados com pérolas de vidro, evidenciando extratos mais próximos ao vermelho.

Segundo os mesmos autores, o parâmetro b^* assume valores positivos para tons amarelados e negativos para azulados e a cromaticidade (C^*) indica a intensidade da cor, sendo utilizada para determinar o grau de diferença de uma tonalidade em relação a uma cor cinza com a mesma luminosidade. Dessa maneira, Pathare, Opara e Al-Said (2013) apontam que, quanto maiores os valores de C^* , maior é a intensidade da cor das amostras percebidas pelos olhos humanos. Em nosso estudo, verificou-se que os valores dos parâmetros mencionados se apresentaram maiores quando as extrações foram realizadas utilizando pérolas de vidro (independentemente do solvente combinado) em relação aos extratos obtidos com ultrassom. Tal fato sugere que a técnica de ultrassom pode destruir o tom amarelado dos extratos e torná-los menos intensos.

O ângulo hue (h°), em contrapartida, é considerado o atributo segundo o qual as cores são tradicionalmente definidas como avermelhadas, esverdeadas, etc., sendo 0° para vermelho, 90° para amarelo, 180° para verde e 270° para azul aos olhos humanos (SANT'ANNA et al., 2013). O extrato obtido com ultrassom e metanol se apresentou ligeiramente mais amarelado em relação aos obtidos com pérolas de vidro, independentemente do solvente associado.

O valor da diferença total de cor (ΔE) pode assumir valores menores que 1,5 para indicar pouca diferença de cor entre as amostras aos olhos humanos, entre 1,5 e 3,0 para indicar cores distintas e maiores que 3,0 para indicar cores muito distintas (ADEKUNTE et al., 2010). Em nosso estudo, esse parâmetro não apresentou diferença significativa entre as extrações, obtendo-se um valor médio de $0,46 \pm 0,25$ e $p=0,0708$. Dessa maneira, conclui-se que, aos olhos humanos, os extratos obtidos possuem pouca diferença de cor.

No estudo realizado por Sharma e Ghoshal (2020), foram utilizadas cascas de cebola e batata como fonte de carbono e casca de feijão e vagem de ervilha como fonte de nitrogênio para a produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-1403. A fermentação ocorreu por 120 horas a 25°C , 110 rpm e pH inicial de 6,0 e a extração foi realizada com ácido clorídrico. Os autores verificaram que o parâmetro L^* variou de $2,62 \pm 0,30$ a $3,81 \pm 0,13$, o a^* de $0,01 \pm 0,36$ a $0,58 \pm 0,17$ e o b^* de $0,98 \pm 0,12$ a $2,26 \pm 0,17$.

Em nosso estudo, os valores de luminosidade apresentaram-se maiores, evidenciando, portanto, tons mais claros em relação ao estudo citado no parágrafo anterior. Tal fato pode ser explicado pela menor quantidade de carotenoides

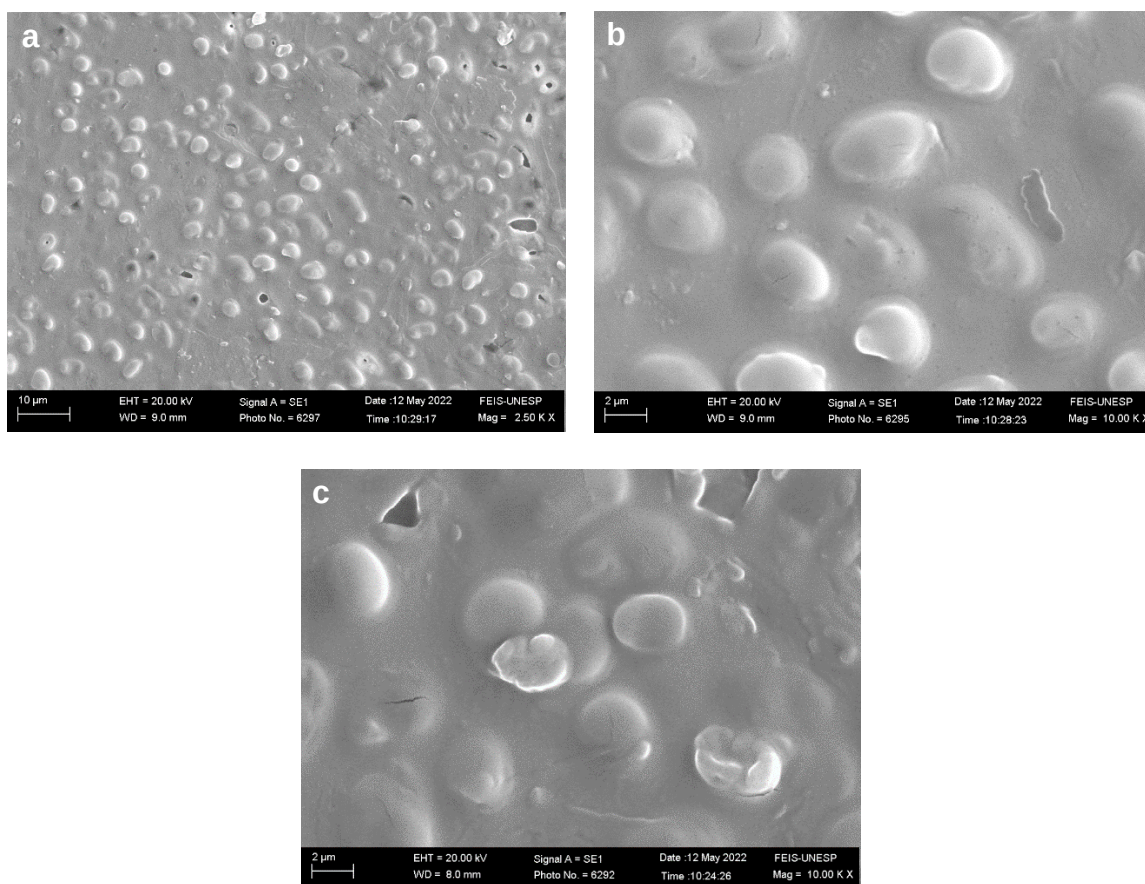
produzidos em nosso estudo ($47,46 \pm 1,07 \mu\text{g/g}$ a $68,01 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$) em relação ao citado ($526,77 \pm 29,00 \mu\text{g/g}$ a $717,82 \pm 27,64 \mu\text{g/g}$).

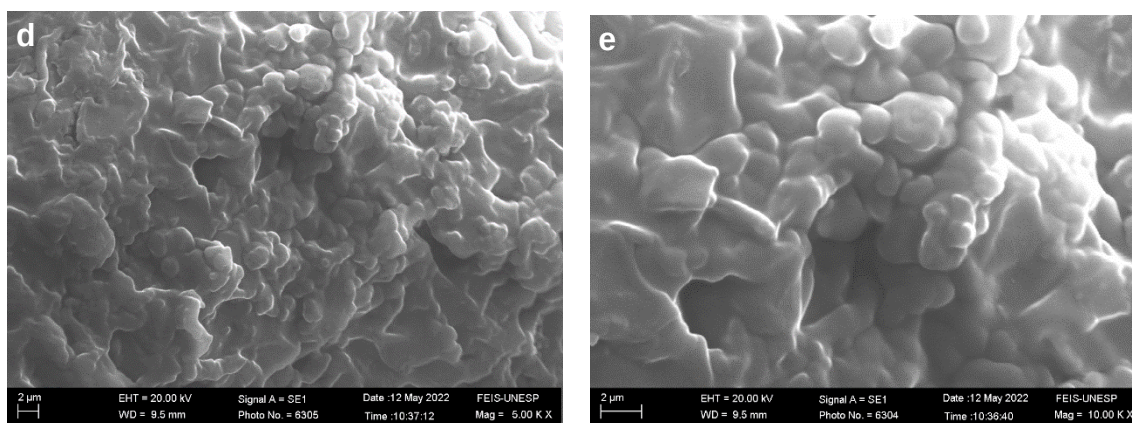
O parâmetro a^* , em contrapartida, apresentou valores extremamente próximos aos nossos, evidenciando carotenoides próximos ao vermelho. Por sua vez, o parâmetro b^* se mostrou ligeiramente maior do que o obtido no estudo citado, correspondendo a carotenoides ligeiramente mais amarelados.

3.2 Estrutura celular após os processos de extração e quantificação de carotenoides e β -caroteno

A Figura 1 apresenta a morfologia da biomassa seca antes das extrações. A quantificação dos carotenoides específicos e volumétricos e β -caroteno obtidos pelas diferentes extrações encontra-se na Tabela 1.

Figura 1 - Imagens da estrutura microbiana após secagem em estufa (a, b e c) e após maceração e peneiramento anterior às extrações (d e e).





* Da parte superior para a inferior, em cada linha, as micrografias possuem resolução de 2500x, 10000x, 10000x, 5000x e 10000x.

Tabela 2: Concentrações de carotenoides e β -caroteno obtidas através de diferentes métodos de rompimento celular e extração.

Extração	CE ($\mu\text{g/g}$)	CV ($\mu\text{g/L}$)	β -caroteno ($\mu\text{g/L}$)
Ultrassom + DMSO	$61,42 \pm 0,63$ ^{ab}	$264,80 \pm 1,34$ ^{ab}	$20,87 \pm 0,79$ ^{bc}
Ultrassom + Metanol	$47,46 \pm 1,07$ ^c	$205,25 \pm 4,86$ ^c	$9,93 \pm 2,59$ ^d
Ultrassom + Etanol	$65,88 \pm 1,94$ ^{ab}	$284,87 \pm 8,68$ ^{ab}	$30,06 \pm 4,60$ ^{ab}
Pérolas de vidro + DMSO	$64,8 \pm 5,59$ ^{ab}	$280,18 \pm 23,88$ ^{ab}	$19,28 \pm 2,32$ ^{cd}
Pérolas de vidro + Metanol	$56,78 \pm 1,80$ ^{bc}	$245,52 \pm 7,53$ ^{bc}	$13,43 \pm 1,14$ ^{cd}
Pérolas de vidro + Etanol	$68,01 \pm 0,16$ ^a	$294,09 \pm 0,37$ ^a	$32,96 \pm 0,39$ ^a

Média $\pm$ desvio padrão (n = 2); Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as extrações ($p < 0,05$); CE: Carotenoides específicos; CV: Carotenoides volumétricos; DMSO: Dimetilsulfóxido. Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Durante a execução da quantificação de β -caroteno, foi observado um pico de um outro composto que absorve luz no mesmo comprimento de onda do carotenoide desejado nesse estudo. É provável que, devido a esse fato, tenha havido uma interferência desse outro composto na análise de β -caroteno, tendo como consequência as baixas concentrações do composto de interesse observadas na Tabela 1. A identificação e quantificação desse outro composto só teria sido possível se houvesse um padrão, como foi feito para o β -caroteno, ou se o cromatógrafo estivesse acoplado a um detector de massas.

Observa-se que as concentrações de carotenoides específicos e volumétricos obtidas através das extrações com DMSO e etanol, independentemente do uso de ultrassom ou pérolas de vidro, não diferiram estatisticamente. A concentração de β -

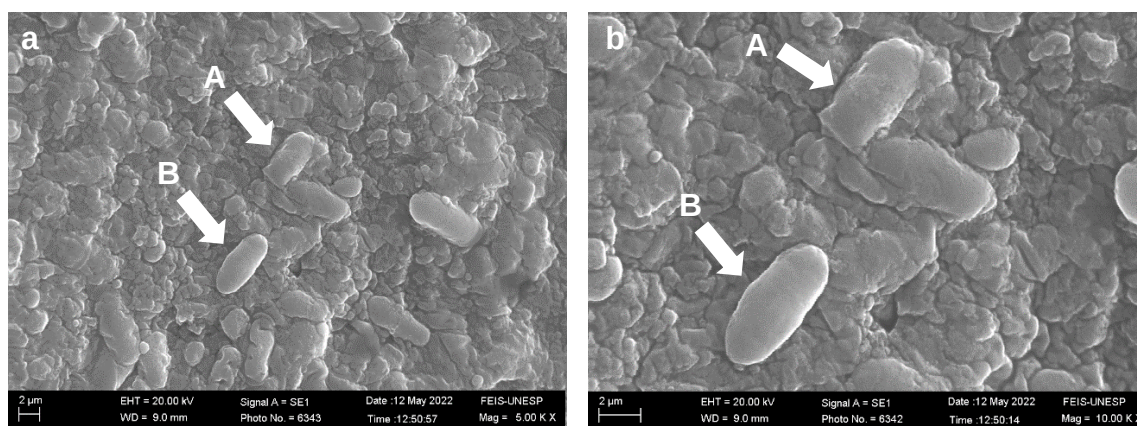
caroteno, entretanto, mostrou-se maior quando utilizado etanol (independentemente da técnica combinada). Em contrapartida, a menor recuperação de carotenoides (específicos e volumétricos) e β -caroteno foram verificadas quando utilizado metanol e ultrassom.

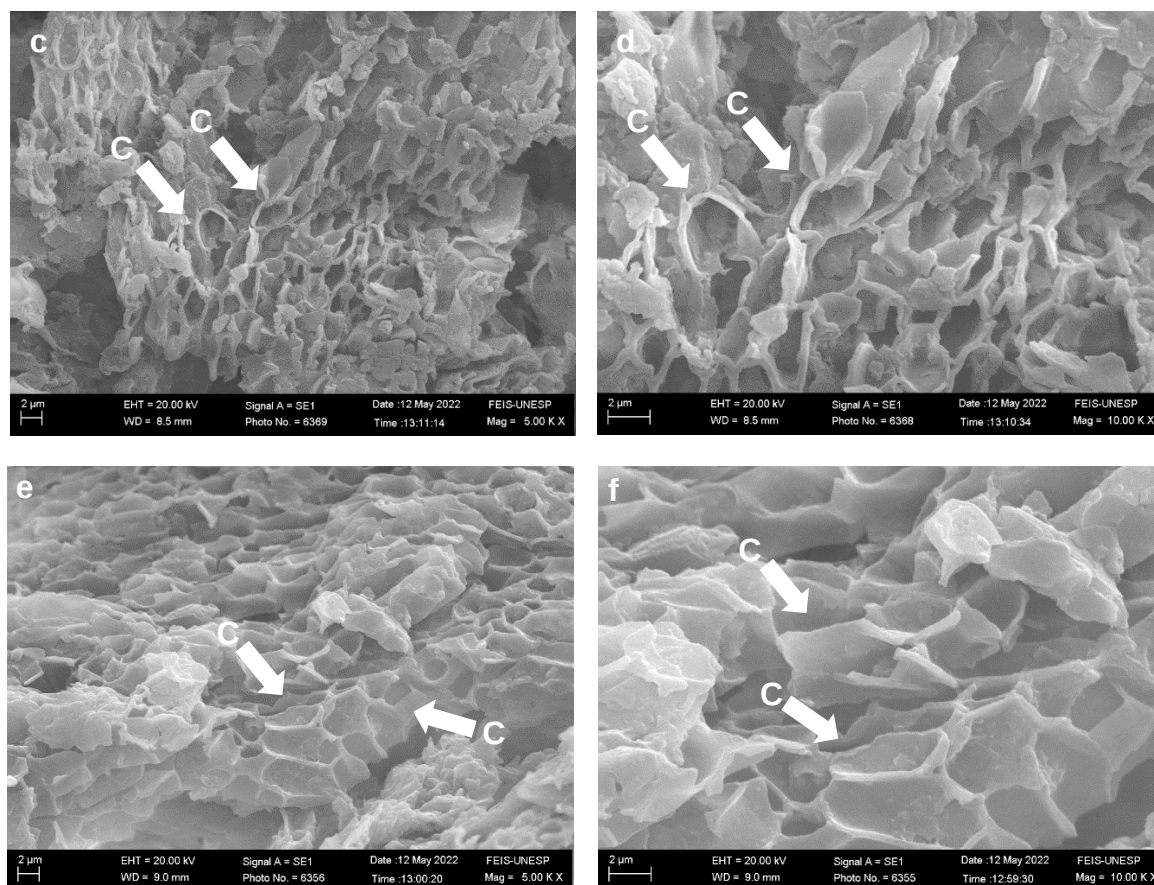
Dessa maneira, a colisão e agitação do meio (LOPES, 2014), proporcionado pelas pérolas de vidro, e o fenômeno de cavitação (GOGATE; NADAR, 2015; MARTÍNEZ et al., 2020) aliado à consequente tensão de cisalhamento, verificadas no uso de ultrassom, podem ter auxiliado a desestabilização da parede celular da levedura, conforme verificado pelas imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura (Figuras 2 e 3).

No caso da extração com pérolas de vidro e DMSO, algumas células aparecem intactas, enquanto outras aparecem rompidas, sugerindo uma extração não totalmente eficiente dos carotenoides ((Figura 2 (a e b)). Pela Figura 3 (a e b), é possível observar que, após a extração utilizando ultrassom e DMSO, a biomassa restante apresentava formatos um pouco irregulares, como também foi observado no trabalho de Urnau et al. (2017).

Entretanto, a associação entre pérolas de vidro ou ultrassom e metanol ou etanol promoveu efetivamente alterações estruturais e ruptura das células, conforme observado nas Figuras 2 (c, d, e e f) e 3 (c, d, e e f). É provável que tal fato tenha facilitado a penetração dos solventes para o meio intracelular e, consequentemente, favorecido a solubilização dos carotenoides.

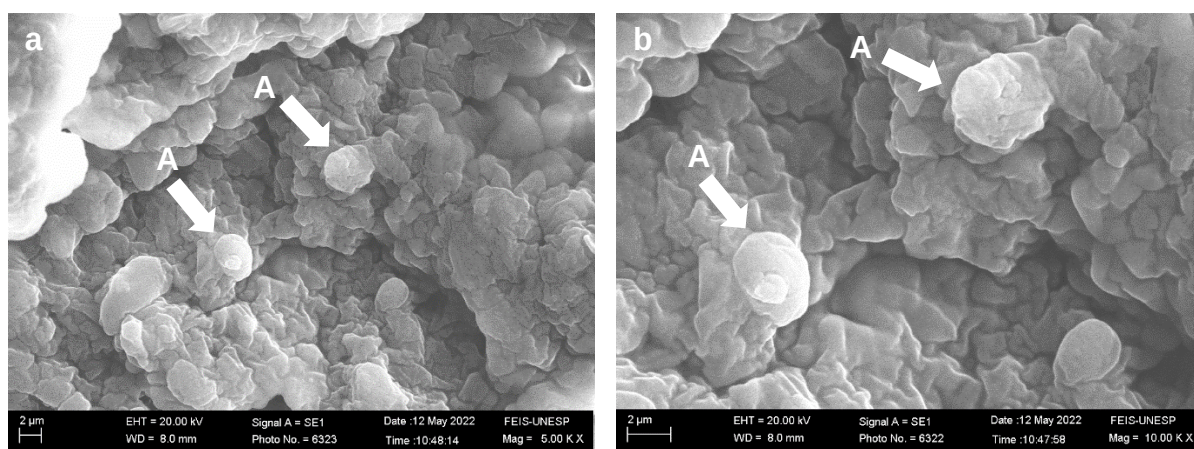
Figura 2 - Imagens da estrutura da parede celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 após a extração com pérolas de vidro juntamente com os solventes: DMSO (a e b), metanol (c e d) e etanol (e e f).

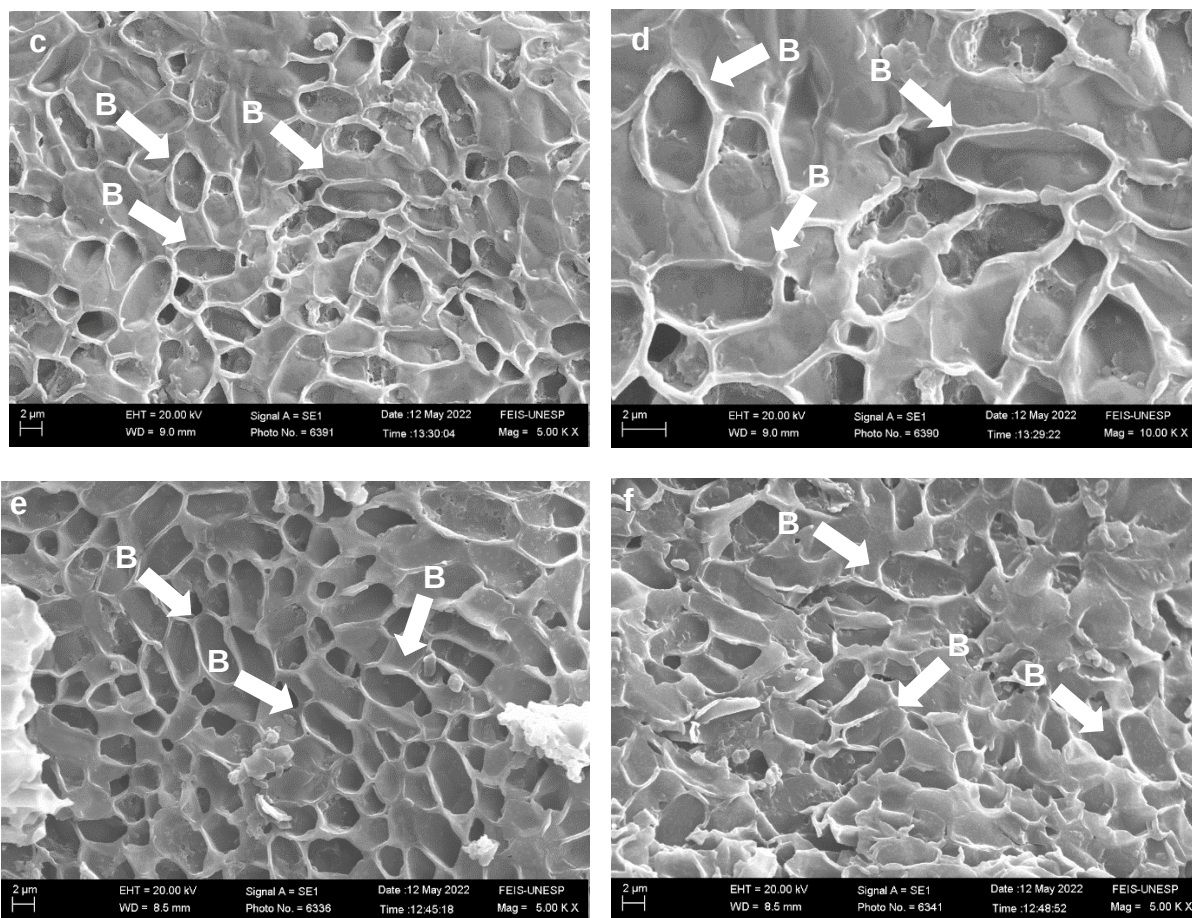




* Da parte superior para a inferior, em cada linha, as micrografias possuem resolução de 5000x, 10000x, 5000x, 10000x, 5000x e 10000x. Exemplos das seguintes formações são indicadas pelas setas: A, levedura parcialmente rompida; B, levedura intacta; C, estrutura microbiana rompida devido à colisão com as pérolas de vidro e agitação do meio.

Figura 3 - Imagens da estrutura da parede celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 após a extração com ultrassom juntamente com os solventes: DMSO (a e b), metanol (c e d) e etanol (e e f).





* Da parte superior para a inferior, em cada linha, as micrografias possuem resolução de 5000x, 10000x, 5000x, 10000x, 5000x e 5000x. Exemplos das seguintes formações são indicadas pelas setas: A, levedura com formato irregular; B, estrutura microbiana rompida devido ao fenômeno de cavitação e à tensão de cisalhamento.

Mussagy et al. (2020) verificaram a eficiência dos mesmos solventes utilizados em nosso estudo, incluindo isopropanol, acetato de etila, 2-metiltetraidrofurano e ciclohexano, na ruptura celular e recuperação de carotenoides de *Rhodotorula glutinis*. Os autores averiguaram que, dentre os solventes alternativos, o metanol se mostrou mais eficiente na extração de β -caroteno (33,18 $\mu\text{g/g}$), torularrodina (25,26 $\mu\text{g/g}$) e toruleno (11,22 $\mu\text{g/g}$), seguido pelo etanol (28,21 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, 24,11 $\mu\text{g/g}$ de torularrodina e 11,88 $\mu\text{g/g}$ de toruleno). Entretanto, a extração e recuperação com DMSO ainda se mostrou maior que as mencionadas, sendo 178 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, 104 $\mu\text{g/g}$ de torularrodina e 40 $\mu\text{g/g}$ de toruleno.

Os mesmos autores concluíram que solventes mais polares, como metanol e etanol, por serem miscíveis em água, podem ser mais eficientes na solubilização dos compostos da parede celular (proteínas e lipídios) em biomassas úmidas e, conseqüentemente, recuperarem com maior facilidade os carotenoides intracelulares.

Em contrapartida, solventes menos polares, como os demais, por serem menos solúveis em água, podem dificultar a recuperação dos pigmentos, caso a biomassa esteja úmida.

Esse mesmo micro-organismo foi utilizado por Mussagy et al. (2021) para a obtenção de β -caroteno através de diferentes solventes extratores. Ao utilizar etanol, acetato de etila, lactato de etila e diferentes misturas desses solventes, os autores verificaram que, dentre os solventes puros, o lactato de etila se mostrou mais eficiente no rompimento da parede celular e recuperação do composto em relação aos demais, independentemente do tratamento dado à biomassa. Porém, a maior recuperação do composto em questão foi obtida ao utilizarem uma mistura de solventes aliada ao congelamento, descongelamento e secagem da biomassa.

Tal fato se deve à formação de cristais de gelo, que podem ter sido responsáveis pelo rompimento da parede celular, e ao uso de solventes com diferentes polaridades, responsáveis pela solubilização de carotenoides e penetração no ambiente hidrofílico que envolve os solutos celulares (MUSSAGY et al., 2021).

A técnica de ultrassom também foi utilizada por Urnau et al. (2017) para a ruptura celular e recuperação de carotenoides de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, verificando que tal método mostrou recuperação próxima daquela quando utilizado o DMSO (614,2 $\mu\text{g/g}$ e 680,00 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).

Ultrassom associado a diferentes solventes também foi utilizado no trabalho de Gogate e Nadar (2015) para ruptura celular e recuperação de astaxantina da levedura *Phaffia rhodozyma*. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizado etanol (114,28 $\mu\text{g/g}$), seguido de metanol (107,63 $\mu\text{g/g}$), acetona (94,32 $\mu\text{g/g}$) e éter de petróleo (60,23 $\mu\text{g/g}$).

Ghilardi et al. (2022) também estudaram diferentes solventes para extração de carotenoides produzidos por *Rhodotorula glutinis* Y54, verificando maior eficiência quando utilizada a acetona e menor quando utilizado o metanol. Etanol e acetato de etila apresentaram valores intermediários para a extração de carotenoides totais, entretanto proporcionaram a maior recuperação de β -caroteno juntamente com a acetona, em detrimento do metanol.

Diante do exposto, nossos resultados demonstram que a associação entre ultrassom ou pérolas de vidro e etanol possui eficiência semelhante ao uso dessas técnicas aliadas ao DMSO na extração e recuperação de carotenoides produzidos por

leveduras. Tal fato evidencia que um solvente menos tóxico pode ser utilizado para esse fim, em detrimento do tradicionalmente utilizado.

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.

APÊNDICE A – Testes iniciais realizados com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409

Tabela 1: Composição dos meios de cultivo pertencentes aos ensaios iniciais

Tratamento	Manipueira (%)	Glicose (g/L)
1	50	40
2	30	40
3	10	40
4	6	40

Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software Statistica 10.0.

Tabela 2: Resultados dos testes iniciais em relação a pH, biomassa (g/L) e concentração de carotenoides específicos (CE) (µg/g).

Tratamento	pH	Biomassa (g/L)	CE (µg/g)
1	6,64 ± 0,01 ^a	8,56 ± 0,05 ^a	74,12 ± 1,29 ^c
2	4,28 ± 0,01 ^d	7,71 ± 0,04 ^b	109,98 ± 0,22 ^{bc}
3	5,68 ± 0,01 ^b	3,28 ± 0,00 ^c	134,71 ± 21,82 ^b
4	5,42 ± 0,03 ^c	2,22 ± 0,01 ^d	720,72 ± 14,22 ^a
SEM	0,316532	1,034429	100,9516
p-value	0,000000	0,000000	0,000003

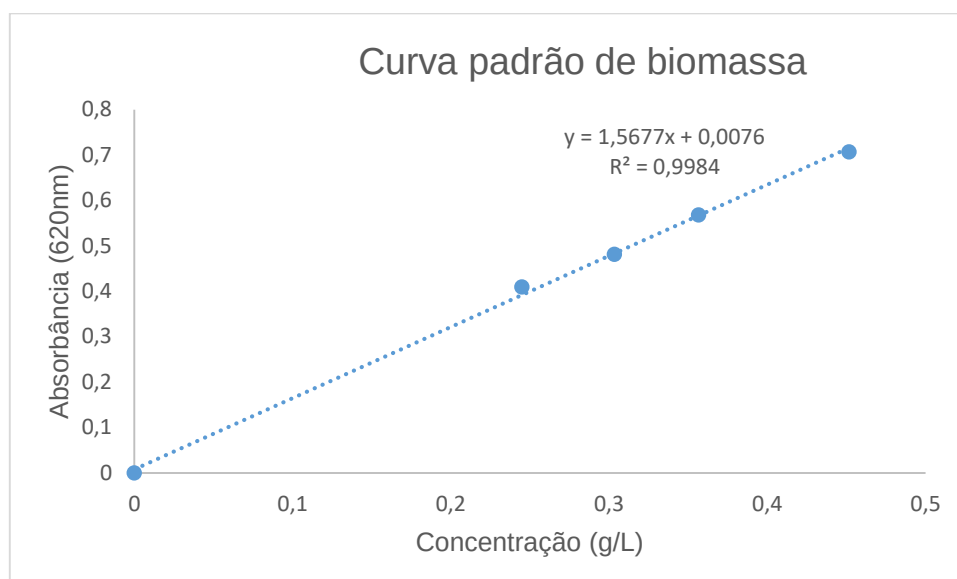
Média ± desvio padrão (n = 2); Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as extrações ($p < 0,05$); CE: Carotenoides específicos. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

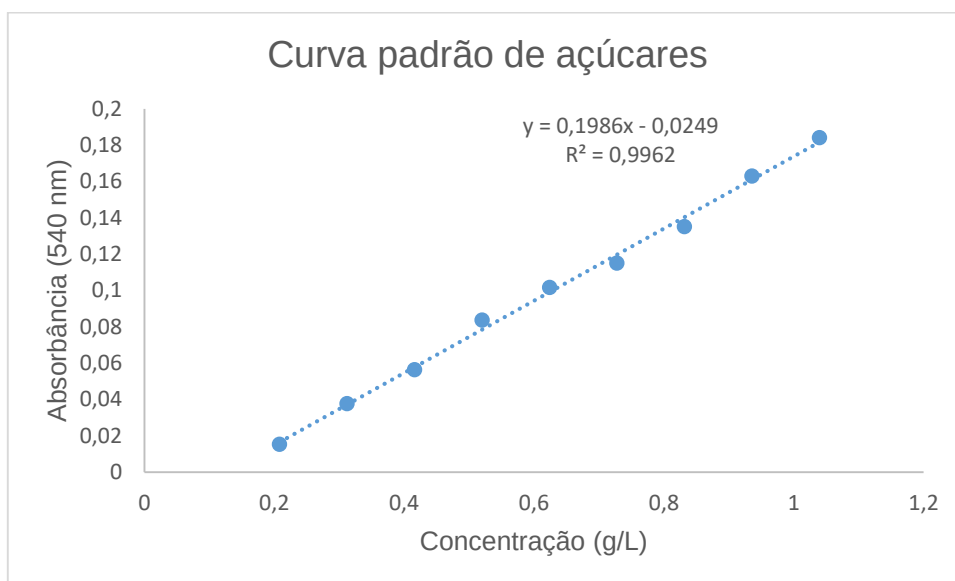
Tabela 3: Resultados dos testes iniciais em relação a concentração de carotenoides volumétricos (CV) ($\mu\text{g/L}$) e consumo de açúcares totais (%).

Tratamento	CV ($\mu\text{g/L}$)	Consumo de açúcares totais (%)
1	634,57 $\pm$ 7,04 ^c	76,90 $\pm$ 0,42 ^a
2	847,95 $\pm$ 6,20 ^b	56,62 $\pm$ 1,53 ^b
3	441,16 $\pm$ 71,45 ^d	27,38 $\pm$ 0,23 ^c
4	1599,49 $\pm$ 41,32 ^a	21,50 $\pm$ 3,00 ^c
SEM	166,3645	8,493306
p-value	000037	0,000015

Média $\pm$ desvio padrão ($n = 2$); Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as extrações ($p < 0,05$); CV: Carotenoides volumétricos. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

APÊNDICE B – Curva padrão de biomassa para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409



APÊNDICE C – Curva padrão de açúcares redutores totais

APÊNDICE D – Relatório de atividades referente ao período 09/03/2020 – 08/09/2022

Nome do aluno: Carolina Sangalli Dardani

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Linha de pesquisa: Microbiologia e Bioprocessos

Título do Projeto de Pesquisa: Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando glicose e manipueira.

Nível: Mestrado

Nome do orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Período do relatório: 09/03/2020 a 08/09/2022

Bolsista – Agência CNPq Duração da bolsa: 01/03/2020 – 01/03/2022

I – ATIVIDADES DIDÁTICAS

Código	Disciplina	Carga horária	Conceito	Créditos
ETA00053	Análise de Alimentos	120	A	8
ETA00017	Bioquímica de Alimentos	120	A	8
ETA00044	Estágio de Docência em Engenharia e Ciência de Alimentos I	60	A	4
ETA00011	Química de Alimentos	120	B	8
Total		420		28

II – ATIVIDADES DE FORMAÇÃO

Participação em eventos culturais e reuniões científicas

III Encontro de Tecnologia de Alimentos (Online) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *campus* Limoeiro do Norte, 07/07/2020 a 09/07/2020, sem apresentação de trabalho.

Minicurso “Bebidas Alcoólicas: Origem e Produção” (Online) - III Encontro de Tecnologia de Alimentos (Online) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *campus* Limoeiro do Norte, 07/07/2020.

Mesa Redonda Online “Valorização dos Resíduos Agroindustriais” – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 06/10/2020.

IV Simpósio de Ciência e Engenharia de Alimentos (Online) – Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças, 15 e 16/10/2020, sem apresentação de trabalho.

Semana Nacional da Microbiologia de Alimentos na Indústria (Online) – Agron Food Academy, 26/10/2020 a 30/10/2020, sem apresentação de trabalho.

Curso “Interpretação de Resultados Microbiológicos” - Semana Nacional da Microbiologia de Alimentos na Indústria (Online) – Agron Food Academy, 27/10/2020.

Curso “Como lidar com fungos e micotoxinas na indústria de bebidas” - Semana Nacional da Microbiologia de Alimentos na Indústria (Online) – Agron Food Academy, 30/10/2020.

VI Simpósio de Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (Online) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 22 e 23/09/2021, com apresentação de trabalho.

XIV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) (Online) – Campinas, 12 a 14/12/2021, com apresentação de trabalho.

Trabalhos apresentados em eventos culturais e reuniões científicas

Carolina Sangalli Dardani; Whallans Raphael Couto Machado; Vanildo Luiz Del Bianchi. Potencial da manipueira para a produção de carotenoides microbianos. 22 e 23/09/2021. VI Simpósio de Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (Online). Universidade Federal de São Carlos, Araras – SP. (Prêmio de melhor trabalho na modalidade e-pôster na área de Bioprocessos)

Carolina Sangalli Dardani; Giovana da Costa Oliveira; Whallans Raphael Couto Machado; Vanildo Luiz Del Bianchi. Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using cassava wastewater as substrate. 12 a 14/12/2021. XIV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) (Online) – Campinas – SP.

Giovana da Costa Oliveira; Carolina Sangalli Dardani; Vanildo Luiz Del Bianchi. Quantificação de carotenoides obtidos por leveduras isoladas do parque ecológico de Jaú, São Paulo – Brasil. 03 a 05/11/2021. XXXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (Online) – São José do Rio Preto – SP.

Giovana da Costa Oliveira; Carolina Sangalli Dardani; Whallans Raphael Couto Machado; Vanildo Luiz Del Bianchi. Potencial de leveduras produtoras de carotenoides. 12 a 14/12/2021. XIV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) (Online) – Campinas – SP.

Apresentação de seminários, palestras, conferências, mini-cursos

Palestra: Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais. SEMEAR 2021. Centro Universitário do Norte Paulista (UNORP), São José do Rio Preto – SP. 30/08/2021. 1h e 30 min.

Co-orientação de aluno de Iniciação Científica

Giovana da Costa Oliveira. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Curso de Bacharelado em Química. Bolsista CNPq. Projeto: Prospecção de leveduras produtoras de carotenoides e produção em meio de cultivo alternativo otimizado.

Giovana da Costa Oliveira. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Curso de Bacharelado em Química. Bolsista CNPq. Projeto: Escalonamento da produção de carotenoides microbianos e extração por métodos alternativos.

Outras atividades

Curso “Docência no ensino superior: fundamentos e práticas pedagógicas” (Online) oferecido pelo Instituto de Educação e Pesquisa em Práticas Pedagógicas – IEP³ (UNESP). Carga horária de 30 horas.

Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior - PAADES (B) – Disciplina Bioengenharia (Curso: Graduação em Engenharia de Alimentos), de responsabilidade do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Câmpus de São José do Rio Preto, no período de 30/08/2021 a 27/01/2022, com carga horária de 54 horas em atividades de apoio à docência e 6h em atividades de docência. Docente responsável: Vanildo Luiz Del Bianchi.

Participação na primeira edição do projeto “Orientadores acadêmicos pós-graduandos na graduação”, realizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG) em parceria com a Pró-Reitoria de Graduação (PROGRAD) – Realização de orientação acadêmica na disciplina Bioengenharia, de responsabilidade do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Câmpus de São José do Rio Preto, com carga horária de 64 horas. Docente responsável: Vanildo Luiz Del Bianchi.