UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

JÚLIO GABRIEL OLIVEIRA DE LIMA

CAROTENOIDES POR CULTIVO SUBMERSO DE *Rhodotorula glutinis* CCT-2186: ESTRATÉGIAS DE INCREMENTO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÕES EM PRODUTOS COSMÉTICOS E ALIMENTÍCIOS

Araraquara, SP
2024

JÚLIO GABRIEL OLIVEIRA DE LIMA

CAROTENOIDES POR CULTIVO SUBMERSO DE *Rhodotorula glutinis* CCT-2186: ESTRATÉGIAS DE INCREMENTO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÕES EM PRODUTOS COSMÉTICOS E ALIMENTÍCIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, área de pesquisa em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Araraquara, SP

2024

Lima, Júlio Gabriel Oliveira de.
L732c Carotenoides por cultivo submerso de R*hodotorula glutinis* cct-2186: estratégias de incremento da produção e aplicações em produtos cosméticos e alimentícios / Júlio Gabriel Oliveira de Lima – Araraquara, 2024.
99 f. : il.

Orientador(a): Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biotecnologia.

1 Carotenoides microbianos. 2. Produtos biotecnológicos. 3. Bioativos. 4. Biossíntese. I. Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos. orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CAROTENOIDES POR CULTIVO SUBMERSO DE Rhodotorula glutinis CCT-2186: ESTRATÉGIAS DE INCREMENTO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÕES EM PRODUTOS COSMÉTICOS E ALIMENTÍCIOS.

AUTOR: JÚLIO GABRIEL OLIVEIRA DE LIMA

ORIENTADORA: VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participaçao Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Unesp

Profa. Dra. GLAUCIANE DANUSA COELHO (Participaçao Virtual)
Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participaçao Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 30 de julho de 2024

Ao pai criador de tudo,
À minha mãe, meus avós e meus irmãos,
E às pessoas que estiveram ao meu lado nessa jornada,
***DEDICO*.**

“Continue a Nadar”
Dory

Agradecimentos

É difícil lembrar de todos que de algum modo, direta ou indiretamente, fizeram parte deste ciclo de muito aprendizado, superação e felicidade. Assim, aos que eu não lembrar de citar, sintam-se agradecidos.

Primeiramente, agradeço a **Deus** por estar comigo em todos os momentos e por permitir vivenciar tamanha experiência. Aos **amigos espirituais** pelas boas energias e proteção. Minha gratidão a todos.

À minha mãe, **Vera Lucia Oliveira de Lima**, principal responsável por esta grande conquista, sempre serei grato por tudo que me proporcionou. Tenho certeza de que não existem palavras suficientes para descrever o quanto sou feliz por tê-la em minha vida. Amo-te e amarei-te infinitamente por toda a eternidade, em qualquer lugar que eu estiver.

Aos meus avós, **Odete** e **Joaquin**, meus irmãos, **Laura** e **James**, e toda a minha família, por todos os conselhos, incentivo e apoio incondicional, sou imensamente grato por vocês.

À minha orientadora de TCC, Profª. Dra. Glauciane, mais que uma professora – uma amiga, obrigado pelos seus conselhos, ajudas, ensinamentos e por sempre estar presente quando necessário. Sempre serei grato por tudo. Você é um exemplo de ser humano, profissional e pessoa.

Agradeço imensamente aos técnicos do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Adriana, Ana, Flavio, Ivan, e Matheus, por toda a assistência, dedicação e profissionalismo demonstrados ao longo desta jornada. Sua expertise e prontidão em ajudar foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Cada um de vocês contribuiu de maneira significativa, proporcionando um ambiente de aprendizado enriquecedor e colaborativo. Sou profundamente grato por todo o suporte e orientação que recebi.

Aos meus amigos Isadora e José, que estiveram comigo em diversos momentos, obrigado por escutarem todas as minhas reclamações e desabafos.

Aos meus amigos de São José do Egito, em especial a professora Loana, Mayara, Leticia, Gustavo, Brenda e Fellype, obrigado pelos momentos de desabafo, carinho, sinceridade e risadas. Cada um de vocês me ensinou algo muito importante.

Aos meus queridos amigos de jogos, Andreza, Diego e Ariadne, minha gratidão sincera por estarem sempre presentes, escutando pacientemente minhas

reclamações e desabafos. Vocês não são apenas companheiros de diversão, mas também um apoio constante em momentos de dificuldade. Obrigado pelas conversas, risadas e por serem uma parte essencial da minha vida. A amizade de vocês é inestimável e eu sou profundamente grato por cada momento compartilhado.

Aos amigos que o Laboratório de Microbiologia me deu, Cicero, Antenor, Isac, André e Virginia. Obrigado por todos os momentos, pela aprendizagem, amizade, sinceridade e pelas boas risadas.

Aos meus queridos amigos do Departamento de Bioprocessos, Caio, Ariane, Heitor, Pedro Garcia, Fernanda de Oliveira, Flavio, Laura, Gabi Paiva, Débora, Matheus, Stephanie, Fernanda de Almeida, Milena, Enzo, Guilherme e Almiro, meu profundo agradecimento por toda a amizade, apoio e colaboração ao longo desta jornada. Cada um de vocês contribuiu de forma única e especial, tornando esta experiência ainda mais enriquecedora e memorável. Obrigado pelas conversas, risadas, trocas de conhecimento e pelo companheirismo em todos os momentos. Sou extremamente grato por ter compartilhado este caminho com vocês.

Um agradecimento especial ao Caio, à Laura e ao Davi, por me acolherem em sua casa com tanto carinho e amizade. Vocês me fizeram sentir parte da família, proporcionando um ambiente acolhedor e cheio de afeto. Sou imensamente grato por toda a hospitalidade, pelas conversas, risadas e momentos compartilhados. A generosidade e a amizade de vocês foram fundamentais para mim e eu sempre carregarei essa gratidão no coração. Obrigado por tudo!

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao grupo de pesquisa *Bioppul*, em especial à professora Dra. Valéria, por sua orientação e amizade ao longo dessa jornada. Sua dedicação e apoio foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também aos meus colegas de grupo, Heitor, Ariane Beatriz, Eduarda Haddad, Eloisa, Enzo, Caio, Fernanda de Oliveira, Flavio, Gabriela Pimentel, Juliana, Leticia, Lucas, Julia, Maria Eduarda (Cake), Milena, Natalia Castanho, Nathalia Vieira, Ana Campos e Leonardo Rotta. Cada um de vocês contribuiu significativamente com sua expertise, colaboração e companheirismo. Sou imensamente grato pelas discussões produtivas, pelo aprendizado compartilhado e por todos os momentos de camaradagem. Obrigado por tornarem esta experiência enriquecedora e memorável.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos os membros da banca avaliadora pelas valiosas contribuições e observações ao longo do meu trabalho. Na banca de qualificação, sou profundamente grato ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, à Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos e à Profa. Dra. Kelly Johana Dussan Medina, cujas orientações foram fundamentais para o aprimoramento do meu projeto. Durante a defesa, a presença e as considerações da Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma, do Prof. Dr. Marlus Chorilli e da Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho foram igualmente cruciais e enriquecedoras. Agradeço imensamente a todos pela dedicação e pelo comprometimento em proporcionar uma avaliação detalhada e construtiva.

Por fim, gostaria de expressar meus agradecimentos às agências de fomento que tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial, agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro concedido por meio do projeto de pesquisa número 2021/06686-8 e da minha bolsa de Mestrado (Processo número 2022/10809-0). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A contribuição de ambas as instituições foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa, permitindo o avanço do conhecimento científico na área.

Resumo

Os carotenoides são colorantes naturais responsáveis pelas cores vibrantes, amarelo, laranja e vermelho em uma variedade de alimentos, principalmente, frutas e vegetais. Porém, esses compostos podem também ser produzidos por vias biotecnológicas pelos microrganismos. Algumas classes de carotenoides desempenham diversas funções na saúde humana devido à sua atividade antioxidante e à capacidade de atuarem como precursores da vitamina A, como é o caso do β-caroteno. Por conseguinte, os carotenoides são utilizados não apenas como colorantes naturais, mas também como aditivos nutricionais na indústria alimentícia. No entanto, obter esses compostos de fontes naturais com alto rendimento e pureza representa um desafio significativo, resultando em altos custos de produção. Dessa maneira, ferramentas estatísticas, como Modelos Polinomiais (MP) derivados de regressões múltiplas, podem auxiliar no aprimoramento desse processo, apesar dos desafios apresentados por sistemas não lineares. Assim, este estudo teve como objetivo incrementar a produção de carotenoides, com destaque para a torularodina, por cultivo submerso da levedura *Rhodotorula glutinis* CCT-2186, utilizando planejamentos experimentais. Para tanto, foi empregado delineamentos Plackett-Burman, e como primeiro resultado de interesse, a asparagina foi substituída do meio de cultivo por extrato de levedura. Posteriormente, através de estudos avaliando fontes de nitrogênio, o extrato de levedura foi substituído por extrato de malte pois o último levou a maior produção das moléculas de interesse. Além disso, a introdução do surfactante Tween 80 no meio de cultivo e a extensão do tempo de cultivo de 72 para 96 h aumentaram 377,68% a produção de torularodina, atingindo 2,097 mg/mL na melhor condição como segue (% m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052) e NH_4NO_3 (0,4), extrato de malte (0,793) com pH 5,0/96 h/30 °C. Adicionalmente, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes, Tween 80 e extrato de malte, considerando a produção da torularodina como variável resposta. Os resultados preditos pelo modelo foram confrontados com preditos por Redes Neurais Artificiais (RNA), os quais indicaram a eficácia das previsões realizadas pela RNA quando comparadas aos valores experimentais. Isso ressalta o potencial das RNA quando os modelos polinomiais não atingem os resultados esperados. Posteriormente, em biorreator tipo tanque agitado obteve-se uma produção de torularodina 26,75% superior a melhor produção em agitador orbital. Além disso, os carotenoides presentes no extrato bruto foram isolados com níveis de pureza de 83,15% 80,63% e 81,88% para torularodina, toruleno e β-caroteno, respectivamente. Ademais, foi observado que o extrato era comporto por 57,39% de torularodina, 18,16% de toruleno e 24,45% de β-caroteno. Por fim, foi demonstrada a viabilidade de utilizar o extrato contendo carotenoides como colorante alimentício em gelatina comestível e como componente cosmético em sabonete líquido. Esses resultados demonstram que os estresses nutricionais, físicos e mecânicos aumentaram a produção de carotenoides por *R. glutinis*. Ademais, foi possível utilizar o extrato bruto em produtos cosméticos e alimentícios.

Palavras-chave: Carotenoides microbianos. Produtos biotecnológicos. Bioativos. Biossíntese.

Abstract

Carotenoids are natural pigments responsible for the vibrant colors, yellow, orange, and red in a variety of foods, primarily fruits and vegetables. However, these compounds can also be produced through biotechnology by microorganisms. Some classes of carotenoids play various roles in human health due to their antioxidant activity and their ability to act as precursors of vitamin A, such as β-carotene. Consequently, carotenoids are used not only as natural colorants but also as nutritional additives in the food industry. However, obtaining these compounds from natural sources with high yield and purity represents a significant challenge, resulting in high production costs. Thus, statistical tools, like Polynomial Models (PM) derived from multiple regressions, can assist in improving this process, despite the challenges posed by nonlinear systems. Therefore, this study aimed to increase the production of carotenoids, especially torularhodin, by submerged cultivation of the yeast *Rhodotorula glutinis* CCT-2186, using experimental design. To this end, Plackett-Burman designs were employed, and as a first result of interest, asparagine was replaced in the culture medium with yeast extract. Subsequently, through studies on nitrogen sources, yeast extract was replaced with malt extract as the latter led to higher production of the molecules of interest. Additionally, the introduction of the surfactant Tween 80 in the culture medium and the extension of the cultivation time from 72 to 96 h increased torularhodin production by 377.68%, reaching 2.097 mg/mL in the best-condition as follows (% w/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0.052), $MgSO_4.7H_2O$ (0.052), and NH_4NO_3 (0.4), malt extract (0.793) with pH 5.0/96 h/30 °C. Furthermore, a Central Composite Rotational Design (CCRD) was performed with two independent variables, Tween 80 and malt extract, considering torularhodin production as the response variable. The results predicted by the model were compared with those predicted by Artificial Neural Networks (ANN). The comparison indicated the effectiveness of the predictions made by ANN when compared to experimental values. This highlights the potential of ANN when polynomial models do not achieve the expected results. Subsequently, in a stirred tank bioreactor the torularhodin production was 26.75% higher than the best condition obtained in orbital shaker. Additionally, the carotenoids present in the crude extract were isolated with purity levels of 83.15%, 80.63%, and 81.88% for torularhodin, torulene, and β-carotene, respectively. Furthermore, it was observed that the extract was composed of 57.39% torularhodin, 18.16% torulene, and 24.45% β-carotene. Finally, the feasibility of using the extract containing carotenoids as a food colorant in edible gelatin and as a component in cosmetic liquid soap was demonstrated. These results show that nutritional, physical, and mechanical stresses increased carotenoid production by *R. glutinis*. Moreover, it was possible to use the crude extract in cosmetic and food products.

Keywords: Microbial carotenoids. Biotechnological products. Bioactive compounds. Biosynthesis.

Lista de figuras

Figura 1. Estruturas de carotenos e xantofilas.....20

Figura 2. Estrutura da torularodina.....22

Figura 3. Rota metabólica para síntese de carotenoides.....25

Figura 4. Fluxograma de estudos para o incremento da produção do carotenoide de interesse.....30

Figura 5. Curva de crescimento microbiano da levedura *R. glutinis* CCT-2186 em meio de cultura YM durante 72 h de cultivo. A) Cultivo com 10% do volume útil do frasco tipo Erlenmeyer e B) Cultivo com 20% do volume útil do frasco tipo Erlenmeyer. Os testes foram realizados em triplicata e as barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.....43

Figura 6. Influência da densidade ótica (0,1UA_{600nm}; 0,2UA_{600nm}; 0,3UA_{600nm}) inicial na multiplicação celular da *R. glutinis* CCT-2186 em meio YM cultivados em frasco tipo Erlenmeyer com volume útil de 10% com 48 h de cultivo. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (α=0,05).....44

Figura 7. Gráfico de Pareto para o primeiro planejamento Plackett-Burman. A linha no gráfico representa uma linha de referência; qualquer fator que se estenda além dessa linha tem efeito significativo com valor de $p < 0,05$. Os fatores avaliados incluem ureia, extrato de levedura, peptona bacteriológica, $(NH_4)_2SO_4$ e o pH do meio sob a resposta variável torularodina.....49

Figura 8. Gráfico de Pareto para o segundo Plackett-Burman. A linha vermelha no gráfico representa uma linha de referência; qualquer fator que se estenda além dessa linha tem um efeito significativo com um valor de $p < 0,05$. Os fatores avaliados incluem extrato de levedura, KH_2PO_4, $CuSO_4$, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, H_2O_2, NH_4NO_3 e glicose.....52

Figura 9. Influência da agitação (150 rpm, 170 rpm, 200 rpm e 250 rpm) e volume de meio de cultura (10% e 20% do volume útil em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL) na produção de torularodina (▯) e biomassa (●) por *R. glutinis* CCT-2186, o cultivo foi realizado por 72 h. Os testes foram realizados em triplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão e as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (α=0,05).....54

Figura 10. Efeito da presença de extrato de malte e extrato de levedura como fonte de nitrogênio no meio de cultura para produzir carotenoides, especificamente torularodina (▯) e biomassa (●) de *R. glutinis* CCT-2186 após 72 horas de cultivo. A) Extrato de malte (10 g/L); B) Extrato de levedura (10 g/L); C) Extrato de levedura (10 g/L) e extrato de malte (10 g/L) e pH inicial de 5. Os testes foram realizados em

triplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão.....56

Figura 11. Adição de surfactantes (Tween 80 e Triton X-100) como componente do meio de cultura no cultivo de *R. glutinis* CCT-2186 para produção de torularodina (▯) e biomassa (●). Os testes foram realizados em triplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão.....57

Figura 12. Adição de aminoácidos (leucina, glutamato, valina e fenilalanina) e ácidos orgânicos (ácido palmítico e ácido linoleico) na cultura de *R. glutinis* CCT-2186 para produzir torularodina (▯) e biomassa (●). Os testes foram realizados em triplicata e as barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão, a linha em verde representa a condição padrão (sem a presença dos aminoácidos e ácidos orgânicos) da produção de torularodina.....58

Figura 13. Influência da incidência da luz (branca, verde, vermelha, azul e no escuro) no cultivo de *R. glutinis* CCT-2186 em agitador rotativo a 170 rpm para produção torularodina (▯) e biomassa (●). O experimento foi realizado em quadruplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão e as médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (α=0,05).....60

Figura 14. Gráfico de Pareto para o Delineamento Composto Central Rotacional. A linha no gráfico representa uma linha de referência; qualquer fator que se estenda para além desta linha tem um efeito significativo com um valor de $p < 0,05$.....62

Figura 15. A) Gráfico de superfície de resposta e B) gráfico de contorno para o estudo da produção de torularodina por *R. glutinis* CCT-2186 em agitador orbital, cultivado durante 72 horas a 170 rpm e na ausência de luz.....63

Figura 16. Representação da regressão linear dos ajustes dos modelos de análise DCCR A): função log-sigmoide (logsig) e B) função tangente sigmoide (tansig) obtida por método de simulação de redes neurais artificiais no software MATLAB.....65

Figura 17. Cinética de crescimento e produção de torularodina por *R. glutinis* CCT-2186 durante 144 h de cultivo em agitador orbital a 30°C/170 rpm. A) Avaliação da produção de carotenoides e alterações de pH. B) Avaliação do açúcar consumo e da produção de biomassa. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.....69

Figura 18. Apresentação esquemática da condição experimental utilizada e da produção correspondente de torularodina obtidos por meio do cultivo submerso de *R. glutinis*.....70

Figura 19. Perfil lipídico do extrato rico com carotenoides obtidos a partir da biomassa de *R. glutinis* CCT-2186 quando cultivada (A) com Tween 80 e (B) sem Tween 80....71

Figura 20. cultivo de *R. glutinis.* A) sem controle; e B) e com controle de pH. Cultivo realizado durante 144 horas de cultivo em biorreator tanque agitado a 30°C/1 *vvm*/300 rpm. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.....73

Figura 21. Cultivo de *R. glutinis* em biorreator tipo tanque agitado com diferentes taxas de agitação e aeração realizado durante 144 h. A e B) 300 rpm e 1*vvm*, C e D) 500 rpm e 1*vvm*, E e F) 700 rpm e 1*vvm*. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.....74

Figura 22. Cultivo de *R. glutinis* em biorreator tipo tanque agitado com diferentes taxas de agitação e aeração realizado durante 144 h. A e B) 300 rpm e 1,5 *vvm*, C e D) 500 rpm e 1,5 *vvm*, E e F) 700 rpm e 1,5 *vvm*. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.....76

Figura 23. A) Torularodina, B) toruleno e C) β-caroteno obtidos do extrato rico em carotenoides da biomassa da levedura *R. glutinis.*.....78

Figura 24. Aplicação de carotenoides como corantes em gelatina comestível. A) Foto da suspensão aquosa do extrato de carotenoides (6 mg/mL). Espectro de absorção da suspensão aquosa de extrato de carotenoides (3 mg/mL, controle) e carotenoides em gelatina (3 mg/mL de carotenoides e 24 mg/mL de gelatina) após diferentes tratamentos térmicos e B) 0 dias, C) 1 dia, D) 4 dias, E) 10 dias e F) 24 dias a 4 °C. Os resultados são a média de uma triplicata após a remoção do branco (água ou gelatina). G) Fotos de carotenoides em gelatina (3 mg/mL de carotenoides e 24 mg/mL de gelatina) após diferentes tratamentos térmicos e 10 dias a 4 °C. A cor da borda das fotos indica a amostra de acordo com a legenda da figura.....79

Figura 25. Formulação dos sabonetes líquidos: Sabonete de controle (sem adição de extratos de carotenoides) e sabonetes de carotenoides (com adição do extrato de carotenoides).....80

Figura 26. Extrato rico em carotenoides obtidos por cultivo submerso de *R. glutinis* empregado como aditivo em base de sabote líquido transparente.....81

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fatores e níveis dos fatores usados no primeiro planejamento experimental Plackett-Burman.....32

Tabela 2. Variáveis e níveis dos fatores usados no segundo planejamento experimental Plackett-Burman.....33

Tabela 3. Variáveis independentes (Fatores) e níveis de fatores usados no Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais.....35

Tabela 4. Produção de carotenoides, biomassa e pH final em cada ensaio do primeiro planejamento Plackett-Burman para o cultivo de *R. glutinis* CCT-2186 após 72 h de cultivo. Os testes foram realizados em duplicata.....46

Tabela 5. Produção de carotenoides, biomassa e pH final correspondentes a cada ensaio para o segundo planejamento Plackett-Burman cultivando *R. glutinis* CCT-2186 após 72 h de cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata.....51

Tabela 6. Produção de carotenoides, biomassa e pH final correspondente a cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com pontos axiais para o cultivo de *R. glutinis* em agitador rotativo durante 72 h de cultivo a 30 °C e 170 rpm.....61

Tabela 7. Análise comparativa dos algoritmos de ativação numa rede neuronal artificial (RNA) com funções variadas e contagens de neurónios da camada intermédia.....64

Tabela 8. Pontos de otimização para a produção de torularodina frente aos fatores extrato de malte (g/L) e Tween 80 (%v/v) derivados da resposta da superfície e da rede neuronal, juntamente com as respostas previstas.....66

Tabela 9. Coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio (k_La).....77

Tabela 10. Mudança quantitativa de cor para o sabonete líquido aditivado com o colorante produzidos por *R. glutinis*.....82

Tabela 11. Mudança qualitativa de cor para o sabonete líquido aditivado com o colorante produzidos por *R. glutinis*. Imagens obtidas mediante o software *NIX color sensor.*.....82

Lista de abreviaturas e siglas

% m/v	Percentagem massa-volume
% v/v	Percentagem volume -volume
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônio
°C	Grau Celsius
ACAT2	Acetil-CoA acetiltransferase 2
C*	Croma
C/N	Relação carbono/nitrogênio
$CuSO_4$	Sulfato de cobre
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO	Densidades ópticas
FPP	Farnesil pirofosfato
g	Grama
g	Força g
g/L	Grama por litro
g/L	Grama por litro
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
H°	Ângulo de matiz
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPP	Isopentenil pirofosfato
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
k_La	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
L	Litro
L*	Luminosidade
M	Molar
MDD	Mevalonato difosfato descarboxilase
MEP	Metil-D-eritritol-4-fosfato
mg/mL	Miligrama por mililitro
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnésio
MK	Mevalonato quinase
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MP	Modelos Polinomiais
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MVA	Via do mevalonato
MVP	Mevalonato 5-fosfato

MVPP	Mevalonato-5-difosfato
nftool	Neural Network Fitting Tool
NH_4NO_3	Nitrato de amônio
nm	Nanômetro
nm	Nanômetro
O_2	Oxigénio
OD	Oxigênio Dissolvido
PB	Plackett-Burman
pH	Potencial hidrogeniônico
PMK	Fosfomevalonato quinase
PSY	Fitoeno sintase
R	Coeficiente de correlação de Pearson
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Redes Neurais Artificias
rpm	Rotações por minuto
SSE	Soma dos erros quadráticos
TLC	Cromatografia de Camada Fina
traingd	Algoritmo Gradient Descent
trainlm	Algoritmo Levemberg-Marquardt
UA	Unidades de Absorbância
vvm	Volume de ar aspergido (em culturas aeróbicas) por unidade de volume do meio de cultura por minuto
YM	Extrato de malte-Peptona Bacteriológica-Extrato de levedura-Dextrose
YPD	Extrato de levedura - Peptona Bacteriológica e Dextrose-Agar
µL	Microlitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO 18

2. REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1. Carotenoides 20

2.2. Biossíntese de carotenoides 23

2.3. Fatores que influenciam na biossíntese de carotenoides por leveduras 25

2.4. Ferramentas de otimização de bioprocesso 27

3. OBJETIVOS 29

3.1. Objetivos geral 29

3.2. Objetivos específicos 29

4. METODOLOGIA 30

4.1. Materiais 30

4.2. Microrganismo 30

4.3. Reativação do isolado, padronização do inóculo e preparação do inóculo 31

4.4. Cultivo para produção de carotenoides 31

4.5. Planejamentos experimentais Plackett-Burman 32

4.6. Avaliação do estresse físico e nutricional na produção de carotenoides 33

4.7. Estudo de ferramentas de otimização da produção de carotenoides 34

4.7.1. Delineamento composto central rotacional com pontos axiais 34

4.7.2. Modelo obtido pelo treinamento da rede neural artificial 35

4.8. Cinética da produção de carotenoides em agitador orbital 36

4.9. Estudo de k_La 36

4.10. Produção de carotenoides em biorreator tipo tanque agitado 37

4.11. Extração e determinação da concentração de carotenoides 38

4.12. Métodos analíticos 38

4.13. Perfil de ácidos graxos livres (FFA) do extrato 39

4.14. Aplicação de carotenoides como corantes para gelatina 39

4.15. Aplicação de carotenoides como corantes em sabonete líquido 40

4.16. Isolamento dos carotenoides do extrato bruto 41

4.17. Análise Estatística 41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

5.1. Padronização do inóculo 42

5.2. Avaliação dos nutrientes no meio de cultura empregando planejamento experimental do tipo Plackett-Burman 44
5.2.1. Primeiro planejamento experimental 44
5.2.2. Segundo planejamento experimental 50
5.3. Avaliação do estresse físico e nutricional na produção de torularodina 53
5.4. Comparativo entre ferramentas de incremento da produção 60
5.4.1. Delineamento Composto central Rotacional (DCCR) 60
5.4.2. Rede neural artificial 64
5.4.3. Obtenção dos pontos de otimização e validação das respostas preditas tanto modelo polinomial quanto pelas redes neuronais artificiais 66
5.4.4. Validação experimental dos pontos de otimização 67
5.5. Cinética de produção de carotenoides 67
5.6. Perfil de ácidos graxos livres 70
5.7. Produção de carotenoides em biorreator tipo tanque agitado de bancada 72
5.8. Isolamento dos carotenoides produzidos por *R. glutinis* 78
5.9. Aplicação de carotenoides como corantes para gelatina 78
5.10. Aplicação de carotenoides como colorantes para sabonete líquido 80
6. CONCLUSÃO 83
REFERÊNCIAS 84
ANEXOS 93

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides artificiais, produzidos por síntese química, são amplamente usados na indústria para melhorar a aparência dos produtos. No entanto, alguns colorantes artificiais geram debates sobre seus impactos na saúde humana (Mussagy *et al*., 2019) pois estão associados a reações alérgicas e outros problemas de saúde (Silva de Rossi *et al*., 2021; Mendonça; Cavalcanti; Martins, 2021). Em resposta a essa problemática e associado ao aumento da demanda por produtos alimentícios sem aditivos artificiais (Maoka, 2020), o interesse por carotenoides naturais tem crescido (Mussagy *et al*., 2023).

Carotenoides, como astaxantina e cantaxantina, são importantes na alimentação devido às suas propriedades antioxidantes (Kirti *et al*., 2014; Manikandan, Felix, Prabu, 2020) e podem ser obtidos a partir de plantas, algas e outros organismos (Torpee *et al*., 2022; Maoka, 2020; Kanzy *et al*., 2015; Rodriguez-Concepcion *et al*., 2018; Ram *et al*., 2020; Zoz *et al*., 2014). A estrutura dessas moléculas pode ser alterada para que possam assumir propriedades químicas e biológicas diversas, o que tem estimula a produção (Mezzomo, Ferreira, 2016). Apesar dos desafios da pandemia da COVID-19, acredita-se que o mercado global de carotenoides deve crescer e atingir US$ 2,7 bilhões até 2027 (Ashokkumar *et al*., 2023; BCC Research, 2022).

Além de atuarem como colorantes, carotenoides podem apresentar atividade biológica e características de interesse para a saúde humana. O β-caroteno, por exemplo, é precursor da vitamina A, e sua ingestão pode acarretar benefício a saúde (Valduga *et al*., 2009). A obtenção de carotenoides por fontes vegetais é desafiadora, levando à exploração de rotas biotecnológicas (Dubock, 2019; Lin, Xu, 2020). A produção biotecnológica, como o uso de levedura vermelha oleaginosa, pode aumentar o rendimento de carotenoides e permitir a produção simultânea de vários compostos de interesse comercial, tais como lipídeos e ácidos graxos poliinsaturados (Silva *et al*., 2023; Valduga *et al*., 2009).

A produção biotecnológica de carotenoides está ganhando destaque por ser mais econômica e eficiente (Jaswir et al., 2011). Dentre os carotenoides produzidos por via biotecnológica, a torularodina é um carotenoide com propriedades antioxidantes, que tem demonstrado benefícios à saúde, incluindo a prevenção da obesidade e proteção do fígado (Li *et al*., 2022; Liu *et al*., 2019; Liu *et a*l., 2023). Apesar

disso, sua produção em larga escala ainda é limitada principalmente devido à baixa produção quando comparado a outros carotenoides (Kot *et al*., 2018).

Diversos gêneros de fungos tais como *Rhodosporidium*, *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces* são usados na produção de carotenoides (Sperstad *et al*., 2006; Herz et al., 2007; Moliné *et al*., 2010; Du *et al*., 2015; Cardoso *et al.,* 2016; Dimitrova *et al*., 2013). No bioprocesso de obtenção dessas moléculas, fatores como a relação carbono e nitrogênio e a temperatura influenciam nesse processo (Igreja *et al.,* 2021; Zhang; Zhang; Tan, 2014).

Otimizar processos biotecnológicos implica na realização da quantidade de experimentos para avaliar os efeitos de diversos fatores, uma forma de reduzir o número de experimentos é a utilização de ferramenta de planejamento experimental como a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e as Redes Neurais Artificiais (RNA) (Tolborg *et al*., 2020; Veloso *et al*., 2023), que ajudam a prever e melhorar o rendimento dos processos, apesar dos desafios únicos em processos biológicos (Liyanaarachchi *et al*., 2020; Sommer, Paxson, 2010). A MSR é eficaz para modelar sistemas biológicos e avaliar modos de operação do processo, enquanto as RNA podem otimizar o desempenho do processo (Dos Reis *et al*., 2023). Diante disso, este trabalho visou incrementar a produção de carotenoides, com destaque para a torularodina pela levedura *Rhodotorula glutinis* CCT-2186*,* explorando estresses nutricionais e mecânicos, e demonstrar potencial aplicação do extrato rico em carotenoides como colorante em alimentos e cosméticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

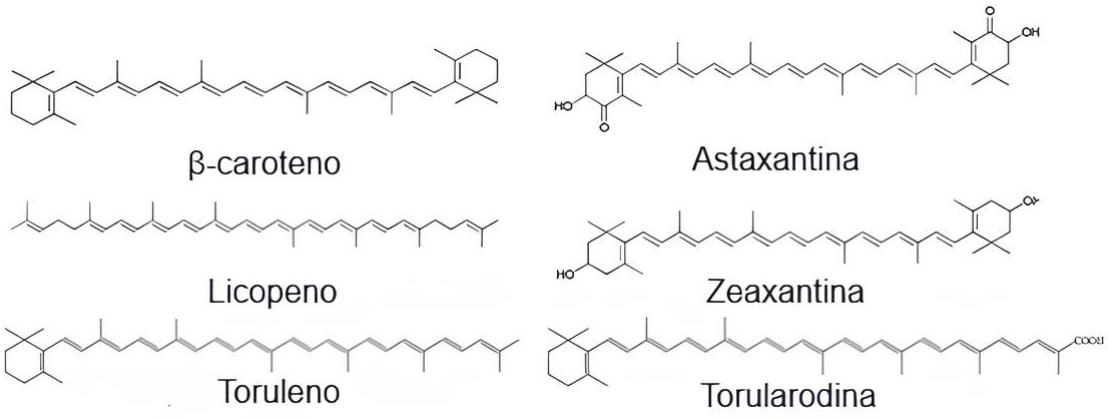
2.1. Carotenoides

Os carotenoides podem ser sintetizados por plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos e são moléculas naturais que englobam as cores laranja, amarela e vermelha, (Nour *et al*., 2018; Sundararajan e Ramasamy, 2024; Toma *et al.,* 2023).

Estruturalmente, essas moléculas podem ser classificadas de acordo com a presença, ou não, de oxigênio em sua cadeia isoprenóide. Os carotenos, como o licopeno, o β-caroteno e o toruleno, são os carotenoides hidrocarbonados; enquanto as xantofilas, como a zeaxantina, a luteína e a torularodina, apresentam o oxigênio na sua estrutura química (Das *et al*., 2007). Ambos carotenos e xantofilas são carotenoides lipossolúveis, caracterizados por uma estrutura isoprênica com ligações duplas conjugadas (Rapoport *et al*., 2021) que caracterizam o grupamento cromóforo, estrutura responsável pela absorção da luz, dessas moléculas (Mapelli-Brahm *et al*., 2020).

O grupo dos carotenoides é estruturalmente diverso, sobretudo devido à possibilidade de modificações por meio de reações, tais como hidrogenação, oxidação, rearranjo, isomerização, entre outras; o que promove diferenças nas características físico-químicas, funcionalidade e estabilidade de cada uma dessas moléculas (Mendes-Silva *et al*., 2020). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos principais carotenos e xantofilas.

Figura 1. Estruturas de carotenos e xantofilas.



Adaptada de Mapelli-Brahm *et al*., (2020) e de Zeng *et al*., (2023)

Por serem colorantes de origem natural, as indústrias visualizam os carotenoides como alternativa ecológica para reduzir os impactos de colorantes sintéticos, tanto no meio ambiente, quanto para a saúde dos seres humanos. Após os testes exigidos pelas Agências Regulatórias, esses compostos podem ser aplicados em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos devido às propriedades colorantes, aditivas e flavorizantes, bem como imunomoduladoras, anticancerígenas, antimicrobianas, antiobesidades e, sobretudo, antioxidantes dos carotenoides (Sundararajan e Ramasamy, 2024).

Radicais livres podem causar estresse oxidativo em biomoléculas e danos celulares, causando não apenas o envelhecimento, mas também o surgimento de doenças crônicas (Jaswir *et al*., 2011). Carotenoides como o α-caroteno, a β-criptoxantina e, sobretudo, o β-caroteno, são precursores da vitamina A e atuam como antioxidantes, por isso os carotenoides são explorados pela indústria não apenas para fins de coloração, mas também como agentes de conservação (Sundararajan e Ramasamy, 2024). Além do β-caroteno, o licopeno, astaxantina e torularodina também apresentam esta atividade antioxidantes (Mendes-Silva *et al*., 2020).

Cerca de 50% da ingestão dietética de vitamina A provém de carotenoides, encontrados em abundância em frutas, vegetais e grãos. Carotenoides atuam como precursores da vitamina A, passando por processos metabólicos no corpo e apresentando uma ampla gama de características terapêuticas. Pesquisas recentes mostraram que o consumo de alimentos ricos em carotenoides pode reduzir significativamente a suscetibilidade a condições oculares específicas (Park *et al*., 2020; Saini *et al*., 2020). Níveis insuficientes de carotenoides podem levar a complicações oculares, como secura, amolecimento da córnea e úlceras, podendo resultar em perda permanente da visão e outras doenças relacionadas (Bernstein *et al*., 2016; Evans; Lawrenson, 2017). A ingestão de alimentos ricos em carotenoides ou suplementos dietéticos é essencial para a prevenção de várias doenças crônicas causadas por radicais livres, como câncer (Ndayishimiye; Chun, 2017), diabetes (Sluijs *et al*., 2015) e doenças cardiovasculares (Voutilainen *et al*., 2006).

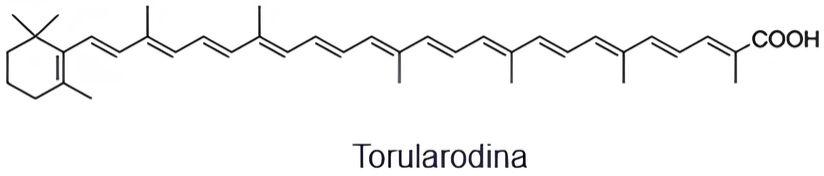
No organismo, a prevenção do estresse oxidativo pode ser associada à inibição de mediadores pró-inflamatórios reduzindo o microambiente que favorece os processos de inflamação. Sendo assim, os carotenoides, como a astaxantina e a luteína, podem atuar como anti-inflamatórios. Essa modulação do sistema imune e

das células também pode conferir aos carotenoides a atividade anticancerígena (Sundararajan e Ramasamy, 2024).

Ademais, a ação antiobesidade se dá a partir da atuação de carotenoides, como a astaxantina e torularodina, na família de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs), que, ativadas, evitam a deflagração da obesidade, da hiperlipidemia e da diabetes no organismo. Neste caso, carotenoides são usados para a regulação dessas proteínas, causando a redução de peso em indivíduos obesos (Jaswir *et al*., 2011).

A torularodina ($C_{40}H_{52}O_2$, 564.84 g/mol), demostrada na Figura 2, é uma xantofila marcada por sua longa cadeia carbônica com duplas conjugadas, apresentando um grupo carboxílico (Zeng *et al*., 2023). Tal carotenoide é uma molécula intracelular encontrada apenas em leveduras, tais como *Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces* sp., e *Sporidiobolus* sp. (Zeng *et al*., 2023; Kot *et al*., 2018).

Figura 2. Estrutura da torularodina



Torularodina

Adaptada de Zeng *et al*., (2023)

Assim como os outros carotenoides, a torularodina também pode ser utilizada como aditivo alimentar inclusive como colorante em cosméticos e em produtos farmacêuticos devido a cor avermelhada (Zoz *et al*., 2015). A capacidade antioxidante da torularodina, produzida pela levedura *Rhodotorula glutinis* destaca-se já que tem a propriedade de sequestrar radicais livres com mais eficiência, se comparado com outros carotenoides como o β-caroteno (Sakaki *et al*., 2002).

Além disso, a torularodina apresenta altas propriedades antimicrobianas, podendo ter seu uso explorado como um antibiótico natural, principalmente contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Kot *et al*., 2018). Propriedades antitumorais também devem ser levadas em consideração, já que a torularodina mostrou resultados promissores na prevenção de alguns cânceres, especialmente o de próstata (Du *et al*., 2016). Assim, os carotenoides, possuem propriedades terapêuticas

que os tornam promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos (Li *et al*., 2024; Zhang *et al.,* 2024b).

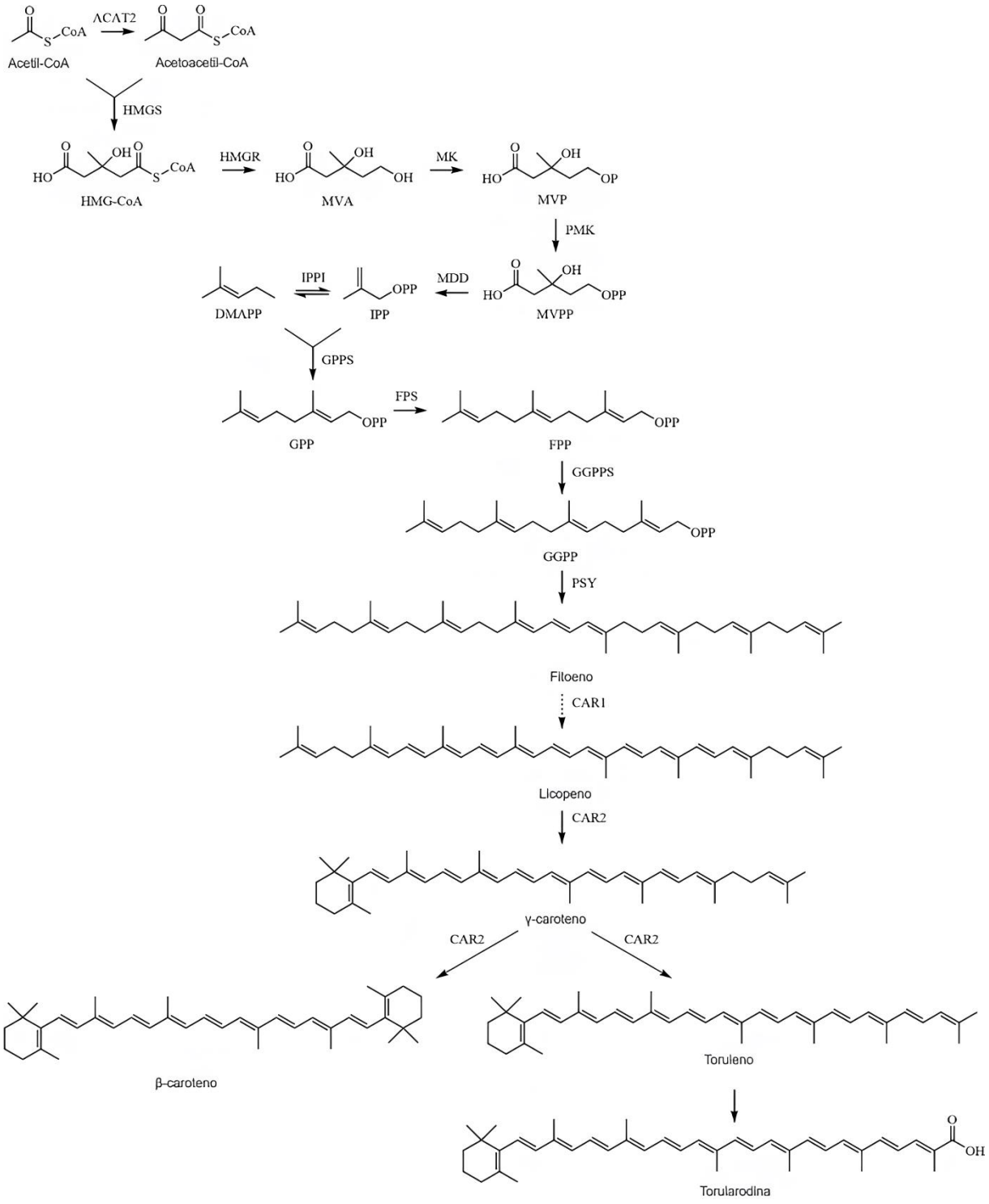
2.2. Biossíntese de carotenoides

Carotenoides, inclusive os que possui 40 carbonos em sua fórmula molecular, como o β-caroteno e torularodina, são derivados do Isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que são precursores comuns de C5 na biossíntese de carotenoides e outros terpenoides. Em organismos vivos, essas duas substâncias são principalmente derivadas da via do mevalonato (MVA) ou da via do metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (Chen *et al*., 2023; Uçar *et al.*, 2024; Vranová *et al*., 2013). A via MEP é predominante em bactérias Gram-negativas e nos plastídeos de algas verdes, utilizando piruvato e gliceraldeído-3-fosfato como precursores. A via MVA, geralmente ativa no citoplasma de mamíferos, eucariotos, archaea e cocos Gram-positivos, e inicia-se com acetil-CoA através do intermediário MVA (Diner *et al*., 2018; Kuzuyama, 2002; Ye *et al*., 2008). Em células de plantas superiores, ambas as vias MVA e MEP estão presentes, localizadas no citoplasma e nos plastídeos, respectivamente (Vranová *et al*., 2013).

Em *R. glutinis*, os precursores de carotenoides de C5 e IPP, são biossintetizados pela via MVA, em que o substrato inicial acetil-CoA é sequencialmente catalisado por acetil-CoA acetiltransferase 2 (ACAT2), 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintase (HMGS), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), mevalonato quinase (MK), fosfomevalonato quinase (PMK) e mevalonato difosfato descarboxilase (MDD), gerando intermediários como acetoacetil-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), MVA, mevalonato 5-fosfato (MVP) e mevalonato-5-difosfato (MVPP) (Miziorko, 2011) (Figura 3). DMAPP, isomerizado a partir de IPP pela IPP isomerase (IPPI), é sucessivamente condensado com três moléculas de IPP para formar geranil pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) e geranilgeranil pirofosfato (GGPP). A reação inicial para a produção de fitoeno, o primeiro caroteno da via, é a condensação de duas moléculas de GGPP catalisada pela fitoeno sintase (PSY). A conversão subsequente para licopeno envolve quatro etapas com a participação da fitoeno desidrogenase (CAR1). As extremidades do licopeno podem ser ciclizadas pelo licopeno ciclase (CAR2), resultando respectivamente em γ-caroteno com um anel β-ionona e β-caroteno com dois anéis β-ionona. O toruleno, que possui 13 ligações

duplas, é derivado do γ-caroteno por desidrogenação catalisada por CAR2 (Pham e*t al*., 2021; Sandmann, 1994) (Figura 3). Após isso, o toruleno pode ser convertido em torularodina pela introdução de grupos oxigênio, mas o gene ou enzima responsável por esta etapa ainda é desconhecido. Por outo lado, o licopeno pode ser convertido em β-caroteno pela licopeno ciclase, a via de síntese antes do β-caroteno é linear e basicamente a mesma em diferentes microrganismos; no entanto, a transição do β-caroteno em outros metabolitos como a astaxantina é diferente para cada espécie (Zhou *et al*., 2024). A *R. glutinis* não possui enzimas para conversão de β-caroteno em astaxantina. O β-caroteno é formado por dois anéis de β-ionona conectados por uma cadeia de polieno contendo nove ligações duplas conjugadas (Ochoa-Viñals *et al*., 2024).

Figura 3. Rota metabólica para síntese de carotenoides.



Fonte: Xie *et al*., (2024)

2.3. Fatores que influenciam na biossíntese de carotenoides por leveduras

A produção de carotenoides, como metabólitos secundários é uma resposta de proteção ao estresse ambiental adverso (Zhao *et al*., 2021). Sob a influência de fatores

externos, como luz, alto teor de sal e metais pesados, os microrganismos acumulam carotenoides e outras biomoléculas para mitigar os danos celulares (Xie *et al*., 2024).

Em leveduras vermelhas, especialmente *R. glutinis*, a produção de carotenoides pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a baixa relação carbono nitrogênio (C/N), haja visto que uma relação C/N alta resulta em uma maior produção de lipídios em vez de carotenoides (Xie *et al*., 2024).

Na biossíntese de carotenoides por leveduras, os substratos mais frequentemente mencionados como fontes de carbono são a sacarose e a glicose. Entretanto os estresse nutricional provocados por resíduos nutricionais como obtidos do mercado de vegetais, melaço de cana-de-açúcar e licor de milho vem sendo classificadas como substratos promissores para o cultivo de leveduras vermelha (Ochoa-Viñals *et al*., 2024).

Fatores físicos, como luz e temperatura também foram mencionados na literatura como elementos moduladores da biossíntese (Igreja *et al.,* 2021; Zhang, zhang, tan; 2014). A temperatura de incubação é o principal fator na produção, haja visto que baixas temperaturas geralmente não favorecem o crescimento celular nem a produção de carotenoides. Em contrapartida, temperaturas elevadas podem desnaturar as enzimas essenciais para a carotenogênese e impedir o crescimento celular, assim, as faixas de temperatura ideais para a carotenogênese diferem daquelas para o crescimento celular (Igreja *et al.,* 2021). A luz também exerce um impacto na produção de carotenoides, na literatura há uma teoria de duas fases para a fotoindução na síntese de carotenoides. A primeira fase está relacionada ao efeito estimulante da luz sobre o crescimento microbiano. A segunda fase envolve o acúmulo de carotenoides na célula, associado ao aumento da atividade da enzima carotenogênica. Os carotenoides funcionam como antioxidantes, protegendo as células contra o efeito danoso da luz e de outros fatores de estres ambiental. Sob exposição à luz, a *Rhodotorula* intensifica a produção de carotenoides, considerado um mecanismo de resposta fotoprotetora (Igreja *et al*., 2021; Gong; Zhang; Tan, 2020).

Além disso, fatores mecânicos, como agitação e aeração, também podem afetar a biossíntese de carotenoides (Ribeiro *et al*., 2023). Haja visto que a taxa de agitação afeta o crescimento celular e a produção de carotenoides, aumentando a transferência de oxigênio e outros nutrientes para as células microbianas aeróbicas,

o que estimula enzimas como fiteno dessaturase, β-caroteno hidrolase e licopeno ciclase. Uma alta taxa de aeração pode elevar o crescimento específico da levedura e a produção total de carotenoides, pois cria um gradiente de concentração, crucial para a eficiência do cultivo, já que a difusão aumentada facilita a absorção de nutrientes pelas células de levedura, além de remover gases e outros subprodutos durante o cultivo (Borba *et al.*, 2018; Ribeiro *et al*., 2023).

2.4. Ferramentas de otimização de bioprocesso

Para a maioria dos processos multivariáveis, como os sistemas bioquímicos, em que diversos fatores potencialmente influentes estão envolvidos, nem sempre é evidente identificar quais são os mais importantes. Portanto, é necessário realizar uma triagem inicial antes de proceder à otimização (Kalil; Maugeri; Rodrigues, 2000). Uma ferramenta eficaz para a triagem inicial, que possibilita a determinação da influência de vários fatores com um número reduzido de testes é a metodologia de delineamento de experimentos (DoE) do tipo Plackett-Burman. Além disso, meios de otimização como delineamento composto central rotacional são amplamente utilizado para otimizar processos (Rodrigues, 2005).

A otimização por meio de delineamento fatorial e análise de superfície de resposta é uma prática comum na biotecnologia. Diversos pesquisadores utilizaram essa técnica, especialmente para otimizar as condições de cultura (De Oliveira *et al.,* 2019) determinar os valores ideais para parâmetros de processamento como pH, temperatura e aeração (Zhang *et al*., 2024a), e taxa de alimentação (Espinel-Ríos et al., 2024), entre outros.

As relações matemáticas entre as variáveis de entrada e saída de um sistema podem ser avaliadas mediante planejamento experimental estatístico, também conhecido como projeto fatorial ou DoE (Mandenius; Brundin, 2008).

A aplicação de DoE, especialmente a metodologia de superfície de resposta permite a modelagem matemática de processos, inclusive biotecnológicos. Entre as técnicas mais destacadas estão a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e as Redes Neurais Artificiais (RNA). Essas abordagens são fundamentais para a previsão do crescimento e do acúmulo de carotenoides em sistemas de cultivo de fungos (Tolborg *et al*., 2020; Veloso *et al*., 2023). Essas técnicas estatísticas são altamente eficazes para otimizar diversos parâmetros, identificar relações entre fatores e

determinar a melhor combinação de parâmetros, além de prever respostas (Rabbani *et al.*, 2024).

A RSM tem ganhado relevância crescente na otimização da produção de biomoléculas, oferecendo uma estrutura sistemática para investigar e modelar os efeitos de múltiplas variáveis independentes. No entanto, é essencial reconhecer que a modelagem e o controle de processos biológicos apresentam desafios únicos, que derivam da natureza intrinsecamente não linear e não determinística dos sistemas biológicos (Liyanaarachchi *et al*., 2020; Sommer, Paxson, 2010).

Nesse contexto, as RNA emergem como ferramentas eficazes para a estimativa das variáveis do processo biológico. Por meio da modelagem do sistema, as RNA permitem a avaliação das variáveis do processo, aproveitando sua capacidade de generalização. Elas demonstram um potencial significativo para prever as variáveis de saída de um bioprocesso e, adicionalmente, podem fornecer pontos de ajuste para otimizar o desempenho do processo (Dos Reis *et al*., 2023).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos geral

Aprimorar a produção de carotenoides, com destaque para a torularodina, em cultivo submerso pela levedura *R. glutinis* CCT-2186, utilizando planejamentos experimentais, e demonstrar potencial aplicação do extrato rico em carotenoides como colorante em alimentos e cosméticos.

3.2. Objetivos específicos

I. Estudar a influência da quantidade de meio de cultura e densidade ótica no inoculo de *R. glutinis* em agitador orbital;

II. Avaliar o impacto de diferentes fontes de nitrogênio como alternativas à asparagina no meio de cultura para produção de torularodina por meio do cultivo submerso de *R. glutinis* em agitador orbital;

III. Implementar planejamentos experimentais para potencializar a produção de torularodina em agitador rotativo;

IV. Investigar o efeito da luz em diferentes comprimentos de onda visíveis (vermelho, verde, azul e branco) na biossíntese de torularodina por *R. glutinis* em agitador rotativo;

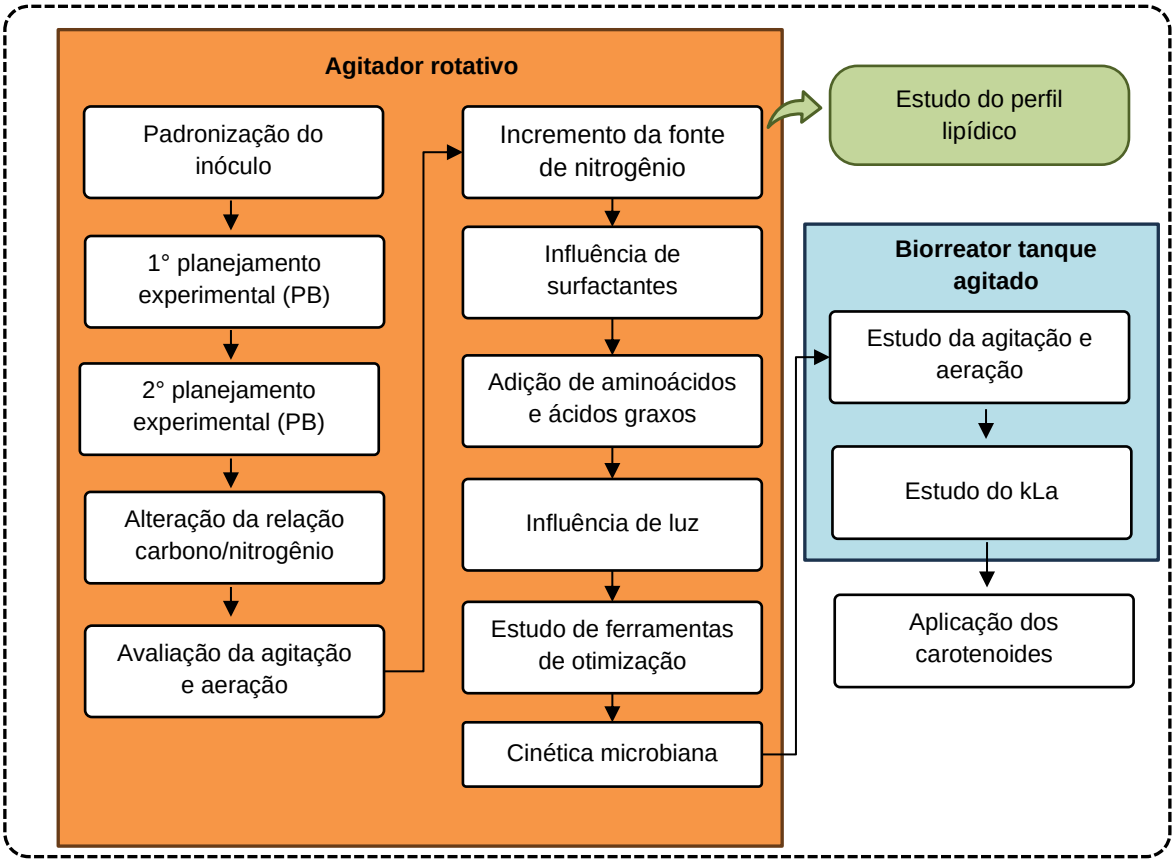
V. Avaliar a produção de carotenoides em cultivo submerso de *R. glutinis* em biorreator tipo tanque agitado de 4 L;

VI. Investigar a viabilidade da aplicação do extrato bruto obtido no processo de produção em formulações de alimentos e cosméticos, avaliando suas propriedades e potenciais benefícios para esses produtos.

4. METODOLOGIA

Os experimentos realizados no presente estudo seguiram a ordem descrita no fluxograma apresentado na Figura 4.

Figura 4. Fluxograma de estudos para o incremento da produção do carotenoide de interesse.



4.1. Materiais

A dextrose (glicose) foi obtida da Dinâmica (São Paulo, Brasil). Peptona bacteriológica, extrato de malte e extrato de levedura foram obtidos da Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil). O Polisorbato 80 (Tween 80) foi adquirido na Neon (Suzano, SP, Brasil). Todos os outros reagentes foram de grau analítico e adquiridos da Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil). A base de sabonete líquido e a gelatina foram adquiridos no comercio local da cidade de Araraquara – SP.

4.2. Microrganismo

A levedura utilizada no desenvolvimento desse trabalho foi a *R. glutinis* CCT-2186, originalmente isolada de folhas de caqui e obtida da coleção de culturas da Fundação André Tosello, localizada em Campinas, São Paulo, Brasil.

4.3. Reativação do isolado, padronização do inóculo e preparação do inóculo

A levedura foi reativada em meio Extrato de levedura - Peptona Bacteriológica e Dextrose-Agar (YPD), com as seguintes concentrações em água deionizada (% m/v): peptona bacteriológica (2), extrato de levedura (1), dextrose (2) e ágar bacteriológico (1,5). O processo de reativação ocorreu de modo estacionário durante 48 h a 30 °C em estufa bacteriológica.

Para a padronização do inóculo, um estudo foi conduzido avaliando-se o efeito de valores iniciais de 0,1, 0,2 e 0,3 Unidades de Absorbância (UA_{600nm}) e de volume de 10% e 20% de inóculo em relação ao volume total do frasco tipo Erlenmeyer ao longo de 72 h a 30 °C com rotação de 170 rpm. A avaliação do perfil de crescimento microbiano da levedura em meio Extrato de malte-Peptona Bacteriológica-Extrato de levedura-Dextrose (YM) foi realizada pela determinação da DO nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 h, o estudo foi realizado em triplicata.

Posteriormente, o inóculo foi preparado usando o meio YM com as seguintes concentrações em água deionizada (% m/v): peptona bacteriológica (0,5), extrato de levedura (0,3), extrato de malte (0,3) e glicose (1). O inóculo foi preparado em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio YM por 48 h a 30°C a170 rpm em agitador orbital (Tecnal, modelo TE-421, Piracicaba, SP, Brasil). O processo de inoculação envolveu a transferência de 5 mL de uma solução de *R. glutinis* com DO inicial de 0,1 UA_{600nm} para 50 mL de meio YM.

4.4. Cultivo para produção de carotenoides

Inicialmente, a produção de carotenoides foi realizada usando meio de cultura conforme descrito por Mussagy *et al*. (2021). O meio foi composto pelos seguintes componentes em água deionizada (% m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3 (0,4) e asparagina (1), com pH inicial de 5,0. O cultivo foi realizado empregando 50 mL desse meio de cultivo em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, os quais foram inoculados com 5 mL do inóculo, o cultivo para produção iniciou com 1,00 ± 0,02 UA_{600nm}. Em seguida, os frascos tipo Erlenmeyer foram incubados durante 72 h a 30 °C e 170 rpm em um agitador orbital (Tecnal, modelo TE-421, Piracicaba, SP, Brasil). É importante ressaltar que todos os meios de cultura foram submetidos à autoclavagem a 121°C por 20 min sob 1 atmosfera de pressão.

4.5. Planejamentos experimentais Plackett-Burman

Um primeiro planejamento experimental de Plackett-Burman (PB) com 12 ensaios (PB12) foi utilizado para avaliar a influência do pH inicial e de várias fontes de nitrogênio na produção de torularodina, a fim de substituir a asparagina no meio de cultura. As fontes de nitrogênio examinadas incluíram extrato de levedura, peptona bacteriológica, ureia e sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), cada um em diferentes concentrações de acordo com o delineamento experimental. A Tabela 1 apresenta os níveis dos fatores do primeiro delineamento PB. As variáveis resposta (dependentes) do Planejamento foram a produção de torularodina e as análises adicionais foram pH final, biomassa (g/L), consumo de açúcar (%) e produção de β-caroteno. O experimento foi realizado em duplicata.

Tabela 1. Fatores e níveis dos fatores usados no primeiro planejamento experimental Plackett-Burman.

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Extrato de levedura (% m/v)	0,0	0,5	1,0
Peptona bacteriológica (% m/v)	0,0	0,5	1,0
Ureia (% m/v)	0,0	0,5	1,0
$(NH_4)_2SO_4$ (% m/v)	0,0	0,1	0,2
pH inicial	3,0	4,0	5,0

Um segundo delineamento do tipo PB com 12 ensaios (PB12) foi realizado para avaliar a importância de cada componente no meio de cultura padrão na produção de carotenoides. Além dos componentes do meio padrão, foram investigados os efeitos dos agentes indutores de estresse, incluindo 0,5 mM de $CuSO_4$ e 0,5 mM de H_2O_2 (Irazusta *et al*., 2013) e KCl. Os níveis e fatores desse segundo delineamento de PB são apresentados na Tabela 2. Para esse planejamento experimental, o pH inicial foi 5.

Tabela 2. Variáveis e níveis dos fatores usados no segundo planejamento experimental Plackett-Burman.

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Dextrose (% m/v)	0,500	1,000	1,500
KH_2PO_4 (% m/v)	0,000	0,026	0,052
$MgSO_4.7H_20$ (% m/v)	0,000	0,026	0,052
KCl (% m/v)	0,000	0,026	0,052
NH_4NO_3 (% m/v)	0,000	0,400	0,800
$CuSO_4$ (mM)	0,000	0,375	0,750
H_2O_2 (mM)	0,000	0,375	0,750
Extrato de levedura (% m/v)	0,500	1,000	1,500

Os dados experimentais dos projetos do tipo PB foram analisados com o auxílio do software Statistica® versão 12. Os efeitos das variáveis dependentes e a variável resposta foi a torularodina.

4.6. Avaliação do estresse físico e nutricional na produção de carotenoides

Após os planejamentos experimentais foram realizados experimentos em série para avaliar as melhores condições de cultivo individualmente, salientando que nessa seção todos os experimentos foram realizados em triplicata, como segue:

Influência da agitação e volume de meio de cultura na produção de carotenoides: Em agitador orbital foi avaliado o impacto da velocidade de agitação orbital, variando esse parâmetro em 150 rpm, 170 rpm, 200 rpm e 250 rpm. Avaliou-se também o efeito da ocupação de 10% e 20% do volume útil do frasco tipo Erlenmeyer pelo meio de cultura.

Avaliação da adição de extrato de malte ao meio de cultura: O impacto da introdução de extrato de malte na concentração de 1% (m/v) foi investigado através da substituição do extrato de levedura (que também estava na concentração de 1 % m/v) pelo extrato de malte, bem como a combinação de ambos, no meio modificado. Nesse estudo além da produção de carotenoides foram avaliados a biomassa e o pH final.

Adição de aminoácidos e ácidos graxos ao meio de cultura na produção de carotenoides: Sob as condições mais favoráveis observadas nos estudos anteriores ((% m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3 (0,4) e extrato de malte (1), com pH inicial de 5,0), foi estudado a adição individual dos aminoácidos

glutamato monossódico, leucina, fenilalanina e/ou valina na concentração de 1% (m/v) e ácidos graxos (ácido linoleico e ácido palmítico) na concentração de 1% (v/v) ao meio de cultura.

Adição de surfactantes como componente do meio de cultura: A adição individual dos surfactantes Tween 80 e Triton X-100, ambos na concentração de 1% (v/v), no meio composto por (%m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3 (0,4) e extrato de malte (1), com pH de 5,0, foi investigada para avaliar seus efeitos na produção de carotenoides. Essa seleção foi baseada na importância desses surfactantes na alteração das propriedades do sistema estudado e em seu potencial para influenciar a produção dos compostos-alvo. A condição com Tween 80 e sem surfactante (controle) foi usada para estudar o perfil de ácidos graxos.

Influência da luz: Foi avaliada a influência de cinco cores de luz LED (Refletor 100w RGB, TOP LIGHT), incluindo branco, verde, vermelho, azul com 1510 w de potência e um grupo de controle sem exposição à luz. A intensidade da luz que incide sobre os frascos tipo Erlenmeyer foi medida diariamente com luxímetro digital (LCD Digital Lux Meter, MT-30).

4.7. Estudo de ferramentas de otimização da produção de carotenoides

Os estudos de otimização foram realizados com intuito de promover a maior conversão de γ-caroteno em torularodina. Por isso, nesses experimentos a variável resposta principal dos planejamentos foi a concentração de torularodina, porém, também se calculou a concentração de β-caroteno.

4.7.1. Delineamento composto central rotacional com pontos axiais

Para criar um modelo e atingir com eficácia os pontos de otimização desejados, que maximizassem a produção de torularodina foi empregada a metodologia Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Essa abordagem sistemática oferece uma estrutura eficaz para explorar e otimizar as principais variáveis independentes do planejamento. A Tabela 3 mostra os níveis e fatores do DCCR, fornecendo uma visão geral clara das condições experimentais testadas. Os componentes da Tabela 3 são aqueles que foram adicionados ao meio de cultura em água destilada (% m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3.

Tabela 3. Variáveis independentes (Fatores) e níveis de fatores usados no Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais.

Fatores	Níveis				
	Ponto axial (-1,41)	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)	Ponto axial (+1,41)
Extrato de Malte (%m/v)	0,793	1,000	1,500	2,000	2,207
Tween 80 (%v/v)	0,290	0,500	1,000	1,500	1,071

Os dados experimentais foram analisados, e os parâmetros do modelo de regressão linear foram ajustados usando o Statistica®. A eficácia do modelo polinomial foi quantificada pelo coeficiente de determinação, R^2, enquanto o teste F e o valor *p* foram usados para determinar a significância estatística do modelo, especialmente em relação aos efeitos primários e de interação relacionados aos níveis do projeto experimental.

4.7.2. Modelo obtido pelo treinamento da rede neural artificial

Para aprimorar o treinamento do modelo foram utilizadas simulações de redes neurais artificiais (RNA) empregando a "Neural Network Fitting Tool" (nftool) no ambiente do software MATLAB®.

Para refinar o processo de treinamento das redes neurais feedforward foi comparada a eficácia dos algoritmos Levemberg-Marquardt (trainlm) e Gradient Descent (traingd), com o objetivo de minimizar a soma dos erros quadráticos (SSE), descrita pela Equação 1.

$$\mathrm{SSE} = \Sigma\,(Y_{Calc} - Y_{exp})^2 \qquad \textbf{(1)}$$

Durante todo o procedimento de ajuste foram exploradas várias configurações, incluindo ajustes no número de neurônios na camada intermediária, variando de 2 a 5. Além disso, também foram experimentadas duas funções de ativação, como Logsig (Equação 2) e Tansig (Equação 3).

$$\log sig(N) = \frac{1}{1+\exp(-\mathrm{N})} \qquad \textbf{(2)}$$

$$\tan sig(N) = \frac{2}{1+\exp(-2*\mathrm{N})} - 1 \qquad \textbf{(3)}$$

Considerando as restrições impostas pelos dados de entrada limitados, optou-se por utilizar 100% dos dados disponíveis para treinar o modelo, enquanto o ponto de otimização foi validado por meios experimentais.

Para avaliar o desempenho da rede neural foi determinado o alinhamento ideal entre o modelo e os dados experimentais, baseando-se em uma análise dos valores do coeficiente de correlação de Pearson (R).

4.8. Cinética da produção de carotenoides em agitador orbital

A cinética foi conduzida nas melhores condições determinadas nos ensaios realizados anteriormente, como segue: agitação a 170 rpm, ausência de luz e a seguinte composição do meio de cultura em água destilada (% m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3 (0,4), extrato de malte (0,793) e Tween 80 (1,71% v/v) e pH inicial de 5,0. A cinética foi monitorada durante período de 144 h, com Frascos tipo Erlenmeyers sendo retirados a cada 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9. Estudo de k_La

O estudo do k_La foi conduzida com água deionizada, utilizando o método dinâmico conforme descrito por Bareither *et al*., (2013) em biorreator tipo tanque agitado Minifors II (INFORS, Nova Jersey/EUA) com capacidade operacional de 4 L contendo impelidores compostos por duas turbinas tipo Rushton com seis lâminas planas, submersas no líquido e dispostas a uma distância de 14 cm uma da outra. A concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) foi medida empregando sensor polarográfico com tempo de resposta inferior a 60 segundos a 25 °C, conforme especificado pelo fabricante (Oxyferm FDA 120, Hamilton, Suíça). O sensor de OD foi posicionado na parte inferior do reator e teve sua resposta registrada a cada segundo. A calibração do sensor seguiu as instruções do fabricante, com dois pontos de referência: 100% de nitrogênio (ausência/0% de oxigênio) e 100% de oxigênio (saturação O_2). Antes de iniciar o método dinâmico, o reator foi saturado com O_2 e, após a saturação, o fluxo de nitrogênio foi iniciado. A interrupção do fluxo de nitrogênio ocorreu quando a leitura de OD ficou abaixo de 5%. Os experimentos foram realizados a 30°C, variando a agitação entre 100, 150, 200, 250 e 300 rpm, aeração entre 1,0 e 1,5 volume de ar por volume de meio por minuto (*vvm)*. O experimento foi encerrado quando o OD% ultrapassou 95%. O valor de k_La foi calculado de acordo com a Equação 4.

$$\ln(OD\%, sat - OD\%) = -k_La * t + A \qquad \textbf{(4)}$$

Em que: OD%,sat é o oxigênio dissolvido saturado; t é o tempo, A é um coeficiente; kLa é a inclinação de ln(ODT%,sat – OD%) x tempo usando a regressão linear de OD% (Cerri *et al*., 2016).

4.10. Produção de carotenoides em biorreator tipo tanque agitado

Foram conduzidos experimentos em biorreator tipo tanque agitado Minifors II (INFORS, Nova Jersey/EUA) com capacidade operacional de 4 L contendo impelidores compostos por duas turbinas tipo Rushton com seis lâminas planas, submersas no líquido e dispostas a uma distância de 14 cm uma da outra. A supressão da formação de espuma foi alcançada com a aplicação de agente antiespumante à base de simeticona 30 % (m/v) com padrão USP (DOWN CORNING®). O sistema de controle permitiu a monitorização em tempo real de variáveis do processo, incluindo fluxo de gases, nível de oxigênio dissolvido em relação à saturação do ar, pH, temperatura e velocidade de rotação. A temperatura foi mantida constante a 30 °C por meio de uma jaqueta de aquecimento no recipiente do reator e de um banho termostático (FL601 Chiller, JULABO, Brasil) conectado ao condensador. Uma sonda eletroquímica de oxigênio dissolvido (Oxyferm FDA 120, Hamilton, Suíça), calibrada na solução de cultura após esterilização, em 0 % (com fluxo de nitrogênio) e em 100 % quando saturada de oxigênio do ar, possibilitou o controle dos níveis de oxigênio dissolvido no meio, expressos em percentagem de saturação.

O cultivo em biorreator consistiu em três fases: pré-inóculo, inóculo e crescimento. O pré-inoculo foi realizada em placa de Petri com meio Extrato de levedura - Peptona Bacteriológica e Dextrose-Agar (YPD+ágar) sob as mesmas condições mencionadas na seção 4.3. Um total de 3,6 L de meio de crescimento foi adicionado ao recipiente do biorreator, esterilizado a 121°C por 30 min e 1 atm e inoculados com 400 mL do inóculo com DO de 10 UA_{600nm}. O volume do inoculo correspondeu a 10% (v/v) do meio de crescimento contido no biorreator. Todos os experimentos foram conduzidos utilizando o meio otimizado (Dextrose (10 g/L), KH_2PO_4 (0,52 g/L), $MgSO_4.7H_20$ (0,52 g/L), NH_4NO_3 (4 g/L), extrato de malte (7,93 g/L) e Tween 80 (1,71 % v/v)).

Inicialmente foi avaliado a variação do pH ao longo do cultivo operado com agitação de 300 rpm e aeração de 1 *vvm*. Em seguida, foram realizados estudos sobre a influência da aeração de 1 *vvm* e 1,5 *vvm* em diferentes velocidades de agitação

(300, 500 e 700 rpm) por 144 h sem controle de pH durante o processo. Amostras foram coletadas a cada 24 h durante os cultivos para avaliar a biomassa e medir a produção de carotenoides e a concentração de açúcar.

4.11. Extração e determinação da concentração de carotenoides

Após o período de incubação, o meio fermentado foi centrifugado a 10.400 x *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi preservado para posterior quantificação do pH e do açúcar residual, enquanto os pellets, ricos em carotenoides, foram cuidadosamente coletados e armazenados em freezer.

Os pellets de biomassa ricos em carotenoides foram lavados três vezes com solução tampão fosfato pH 7 (0,2 M) e foram congelados por 12 h, descongelados, secos em estufa de circulação a 35 °C por 24 h e macerados por 2 min usando um almofariz e pistilo.

Para extrair os carotenoides, 0,5 g de esferas de vidro com 2 mm de diâmetro foram adicionados a 0,25 g de células secas. Adicionadas de 10 mL de acetona e agitada em vórtice por 30 s. a suspensão foi centrifugada a 10.400 x *g* por 5 min a 4°C. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente coletado. Esse processo de adição de acetona foi repetido mais quatro vezes. Após a extração, a acetona foi evaporada e o extrato resultante foi solubilizado em 2 mL de etanol.

4.12. Métodos analíticos

Quantificação de carotenoides: Os carotenoides foram quantificados medindo-se seus espectros de absorbância em leitor de placas multimodo EnSpire da PerkinElmer a 450 nm para β-caroteno e 480 nm para torularodina, utilizou-se a equação da reta criado com o padrão (o padrões do β-caroteno e da torularodina foram obtido mediante o isolamento dos carotenoides no do extrato bruto, a pureza foi determinada mediante comparação do RMN da amostra e do apresentado na literatura) a fim de converter a UA em concentração (mg/mL).

Não foi possível fazer uma curva de calibração para o toruleno pois a quantidade isolada foi significativamente inferior em relação aos demais, indicando que há menos toruleno na amostra, diante disso, só foi quantificado o β-caroteno e a torularodina.

Quantificação de açúcares: A quantificação de açúcares redutores seguiu o método de Miller (1959) modificado. Nesse procedimento, 100 µL do sobrenadante foram

combinados com 100 µL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) em microtubos Eppendorf de 2 mL. A mistura foi então fervida por 5 min, seguida pela adição de 1 mL de água ultrapura. A absorbância foi medida a 540 nm. Esses experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação da massa de células secas: A concentração de biomassa foi determinada indiretamente pelo estabelecimento de uma curva de correlação entre a densidade óptica e a biomassa seca.

4.13. Perfil de ácidos graxos livres (FFA) do extrato

As amostras foram previamente metiladas em condições alcalinas e ácidas sequenciais (ISO 12966-2, 2017). Os AGLs foram quantificados/analisados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Shimadzu GC-2010 equipado com um autoinjetor (AOC-20i), uma coluna capilar de sílica fundida (SH-Stabilwax-DA, 30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme) e um detector de ionização de chama. O programa de temperatura foi o seguinte: 60-210 °C a 20 °C/min, 210 °C por 7 min, 210-250 a 20 °C/min e 250 °C por 4 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C. As amostras foram diluídas em hexano. O volume da amostra foi de 1 µL e a injeção foi realizada no modo dividido (proporção de 1:100). O N_2 foi usado como gás de arraste a uma pressão de 56 kPa. Para determinar a composição qualitativa, os tempos de retenção foram comparados com os dos padrões de ácidos graxos (mistura FAMES, variando de C4 a C25), conforme conduzido por De Souza Correia Cozentino *et al.* (2022).

4.14. Aplicação de carotenoides como corantes para gelatina

O extrato de carotenoides obtido na seção "*Extração e análise de carotenoides*" foi rotaevaporado e em seguida suspenso em água (6 mg/mL) e misturado 1:1 com água (controle) ou gelatina incolor e sem sabor Dr. Oetker adquirida em mercado local (48 mg/mL). A gelatina foi dissolvida em água e mantida a 40 °C por 20 min para formar uma solução homogênea antes da incorporação da suspensão de carotenoides. A amostra controle (carotenoides em água) foi mantida a 25 °C por 15 min. As amostras de carotenoides em gelatina foram mantidas a 40 °C por 5 min e a 50, 60, 80 e 100 °C por 5 e 15 min e conservadas a 4 °C por 1, 4, 10 e 24 dias, quando os espectros de absorbância das amostras foram avaliados no leitor de placas multimodo EnSpire da Perkin Elmer. Antes de cada leitura, as amostras foram

mantidas por 30 min a 25 °C para estabilização das temperaturas. Os resultados são a média de triplicatas, descontando-se o branco (água ou gelatina).

4.15. Aplicação de carotenoides como corantes em sabonete líquido

Para a preparação do sabão líquido (componentes Anexos 2) enriquecido com carotenoides utilizou-se o extrato obtido na etapa de "*Extração e análise de carotenoides*" na concentração final foi de 2 mg/mL (extrato de carotenoides/base de sabão líquido), obtida após agitação por 5 min. O pH e o volume de espuma foram determinados conforme descrito por Risla *et al*. (2021). O pH foi medido dissolvendo 0,5 g da amostra homogeneizada em 45 mL de água destilada, e a leitura foi realizada com medidor de pH digital à temperatura ambiente. Para a medição do volume de espuma, 5 g do sabonete foram dissolvidos em 100 mL de água dura em um béquer limpo. Após homogeneização por 60 s em baixa velocidade, a mistura foi transferida para uma proveta graduada de 500 mL, sendo o volume de espuma diretamente obtido pela leitura da escala calibrada. Adicionalmente, foram realizadas análises de densidade e viscosidade.

Para avaliar o efeito antioxidante, a capacidade de eliminação de radicais livres foi determinada utilizando a solução metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) conforme metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2023). Foi realizado um estudo simulando a presença do sabonete líquido em um banheiro em dois tipos de frascos, âmbar e transparente.

As características da cor foram determinadas pelas coordenadas de cor L*, a* e b* foram realizadas utilizando um colorímetro (Narich, CR-5), empregando o sistema de cores CIELAB (Clydesdale, 1991). O parâmetro L* reflete a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco). Valores positivos e negativos em a* indicam tons de vermelho e verde, respectivamente, enquanto valores positivos e negativos em b* indicam tonalidades de amarelo e azul, respectivamente. O croma expressa a saturação ou pureza da cor. Esses dados foram então empregados para calcular os valores de croma (C*) e ângulo de matiz (H°). As coordenadas de cor do sistema CIELAB L*C*h são derivadas matematicamente dos valores de croma (C*) e ângulo de tonalidade (H°), utilizando as Equações 5 e 6, respectivamente. O site NIX color sensor (https://www.nixsensor.com/free-color-converter/) foi utilizado para converter sistemas de cores CIELAB em aspectos visuais.

$$C* = \sqrt{a*^2 + b*^2} \quad \textbf{(5)}$$

$$H° = \arctan\left(\frac{b*}{a*}\right) \quad \textbf{(6)}$$

4.16. Isolamento dos carotenoides do extrato bruto

Inicialmente, o extrato bruto foi analisado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) analítica, conforme a metodologia descrita por Mussagy *et al*. (2021), para confirmar a presença dos três carotenoides no extrato, nomeadamente, β-caroteno, toruleno e torularodina. A fase móvel utilizada foi constituída por Metanol/Acetonitrila/Diclorometano (60:10:30, v/v/v) a 30 °C, com um fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a Shimadzu® Shim-pack C18, e a eluição foi do tipo isocrática.

Após a confirmação dos picos dos carotenoides no HPLC analítico (Shimadzu - LC 20AD), o método foi adaptado para HPLC preparativo (Shimadzu® Kyoto, Janpan). Utilizou-se a mesma fase móvel empregada anteriormente e as frações contendo os carotenoides foram coletadas. Esta adaptação permitiu a separação e purificação dos carotenoides do extrato bruto, facilitando a obtenção de amostras mais concentradas e puras para análises subsequentes.

As frações coletadas foram então submetidas a análises por ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros obtidos foram comparados com os descritos na literatura para cada um dos carotenoides. A partir dessas comparações, foi possível determinar o nível de pureza de cada fração, assegurando a identificação precisa e a quantificação dos carotenoides presentes no extrato obtido de *R. glutinis*.

4.17. Análise Estatística

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados foram expressos como média aritmética acompanhada dos respectivos desvios padrão. O nível de significância adotado para todas as análises estatísticas foi de α = 0,05, o que resultou em um intervalo de confiança de 95%. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas utilizando o teste de *Tukey*, com um nível de significância de 0,05, utilizando o software Statistica® 12. Assim, as conclusões tiradas da análise estatística dos dados experimentais são consideradas confiáveis e robustas.

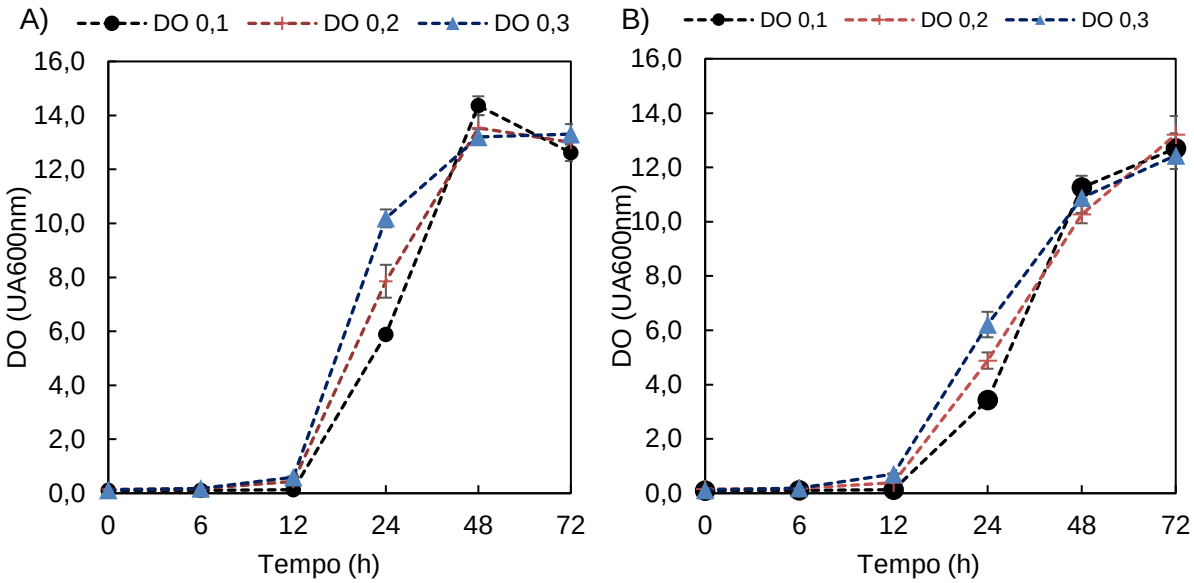
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização do inóculo

Para a produção de biocompostos por microrganismo e estabelecer um bioprocesso que seja reprodutível é essencial estabelecer um protocolo robusto para a preparação do inóculo. O inóculo consiste em uma suspensão de microrganismos com concentração apropriada, necessária para conduzir o cultivo de um determinado volume de meio de cultura de forma eficiente. Para obter um inóculo com alta capacidade produtiva, é crucial proporcionar condições ideais para a propagação do microrganismo desejado, desde sua manutenção até a fase de propagação propriamente dita. Estudos demonstram que uma maior proliferação celular em um cultivo para a obtenção de biomassa é alcançada quando células na fase logarítmica de crescimento são utilizadas como inóculo no fermentador, em comparação com aquelas em estado de autólise (Schmidell *et al*., 2001).

Assim no desenvolvimento deste trabalho foi realizada uma análise do crescimento microbiano ao longo de 72 h, variando a DO inicial em três níveis (0,1; 0,2 e 0,3 UA_{600nm}), variando a ocupação do volume útil em 10% e 20% do frasco tipo Erlenmeyer, conforme ilustrado na Figura 5. Essa abordagem permitiu uma compreensão abrangente da dinâmica de crescimento da levedura, fornecendo *insights* importantes para a padronização do inóculo. Os dados obtidos dessas análises foram cruciais para garantir condições ideais de crescimento e replicabilidade dos experimentos subsequentes.

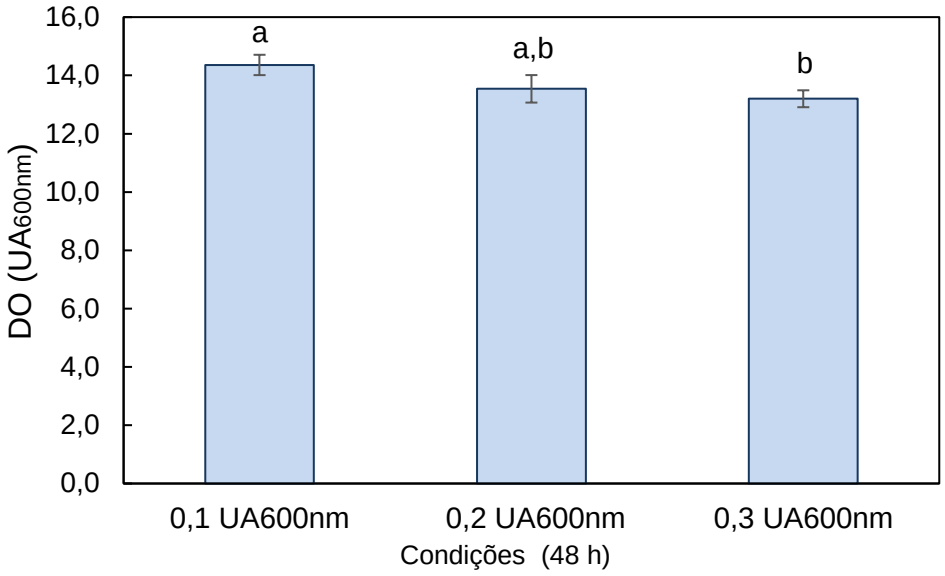
Figura 5. Curva de crescimento microbiano da levedura *R. glutinis* CCT-2186 em meio de cultura YM durante 72 h de cultivo. A) Cultivo com 10% do volume útil do frasco tipo Erlenmeyer e B) Cultivo com 20% do volume útil do frasco tipo Erlenmeyer. Os testes foram realizados em triplicata e as barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.



O crescimento do microrganismo (Figura 5) revelou uma notável diferença de desempenho em termos de multiplicação celular entre os cultivos realizados contendo 10% e 20% de volume útil do frasco tipo Erlenmeyer. Observou-se que o crescimento foi superior nas condições com 10% de volume quando comparado a 20% de volume, atingindo a máxima produção de células após 48 h de cultivo, sendo 27,60%; 31,83% e 21,50% para a DO de 0,1; 0,2 e 0,3 UA_{600nm} respectivamente. Esta rápida multiplicação foi seguida por uma curva que sugere o início do período de morte celular, indicando que a fase de crescimento logarítmico estava se encerrando. Por outro lado, nos frascos com 20% de volume, a máxima produção de células ocorreu após 72 h de bioprocesso, sugerindo prolongamento da fase logarítmica.

Ao empregar o teste de *Tukey* para analisar os pontos de máxima densidade celular, os resultados revelaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Especificamente, os tratamentos com 10% de volume útil e uma DO de 0,1 UA_{600nm} após 48 h de cultivo, e aqueles com 10% de volume útil e DO de 0,3 UA_{600nm} após 48 h de cultivo, apresentaram médias distintas entre si. No entanto, ao comparar o cultivo com DO de 0,1 UA_{600nm} ou 0,2 UA_{600nm}, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, como é possível observar na Figura 6.

Figura 6. Influência da densidade ótica (0,1UA_{600nm}; 0,2UA_{600nm}; 0,3UA_{600nm}) inicial na multiplicação celular da *R. glutinis* CCT-2186 em meio YM cultivados em frasco tipo Erlenmeyer com volume útil de 10% com 48 h de cultivo. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (α=0,05).



5.2. Avaliação dos nutrientes no meio de cultura empregando planejamento experimental do tipo Plackett-Burman

5.2.1. Primeiro planejamento experimental

A produção de metabólitos microbianos é um processo complexo influenciado por diversos fatores, entre eles, a composição do meio de cultura, que engloba elementos como carbono, nitrogênio e fontes minerais, além do pH e da temperatura (De Oliveira *et al*., 2019). Não é diferente quando se trata da levedura *R. glutinis* CCT-2186, cuja produção de metabólitos secundários é fortemente influenciada pela disponibilidade de nutrientes, como fontes de nitrogênio e carbono, além do pH do meio de cultura. Esses elementos desempenham papel fundamental na regulação da carotenogénese microbiana (Ramel *et al*., 2012). O primeiro desenho experimental do tipo PB teve como objetivo avaliar diferentes fontes de nitrogênio a fim de obter um rendimento maior do que o controle, que continha asparagina como fonte de nitrogênio em sua composição. Um dos objetivos desse experimento era substituir esse aminoácido reduzindo o custo do meio de cultura.

De acordo com os resultados observados por Mussagy *et al.* (2021), a *R. glutinis* exibe a capacidade de sintetizar carotenoides, resultando em uma coloração laranja quando cultivada em determinadas condições. Entre os carotenoides gerados em

meio líquido, destacam-se o β-caroteno e a torularodina. A produção desses pigmentos mediante um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, que incluiu a avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e diferentes níveis iniciais de pH está apresentada na Tabela 4. Nesse DoE, a variável resposta principal foi a produção de torularodina, haja visto que, a ingestão de torularodina está intimamente relacionada com a melhoria do comprometimento cognitivo, da neuro inflamação, da dislipidemia, da doença renal crônica, bem como da lesão hepática (Mussagy *et al*., 2023), e outros parâmetros, tais como pH final, biomassa, consumo de glicose e a relação torularodina/β-caroteno foram avaliados.

Tabela 4. Produção de carotenoides, biomassa e pH final em cada ensaio do primeiro planejamento Plackett-Burman para o cultivo de *R. glutinis* CCT-2186 após 72 h de cultivo. Os testes foram realizados em duplicata.

Ensaios	Variáveis independentes					Variável dependente	Análises adicionais				
	Extrato de levedura (%m/v)	Peptona bacteriológica (%m/v)	Ureia (%m/v)	$(NH_4)_2SO_4$ (%m/v)	pH inicial	Torularodina (mg/mL)	pH final	Biomassa (g/L)	Consumo de glicose (%)	β-caroteno (mg/mL)	T/β*
1	1,0 (+1)	0,0 (-1)	1,0 (+1)	0,0 (-1)	3 (-1)	0,303±0,030	9,18±0,03	1,386±0,040	99,79	0,326±0,030	0,93
2	1,0 (+1)	1,0 (+1)	0,0 (-1)	0,2 (+1)	3 (-1)	0,509±0,060	7,61±0,23	5,440±1,980	100,00	0,487±0,070	1,04
3	0,0 (-1)	1,0 (+1)	1,0 (+1)	0,0 (-1)	5 (+1)	0,322±0,010	9,18±0,03	1,700±0,020	99,74	0,347±0,010	0,93
4	1,0 (+1)	0,0 (-1)	1,0 (+1)	0,2 (+1)	3 (-1)	0,293±0,010	9,05±0,10	1,740±0,120	99,46	0,305±0,020	0,96
5	1,0 (+1)	1,0 (+1)	0,0 (-1)	0,2 (+1)	5 (+1)	0,552±0,090	8,05±0,15	7,660±0,200	99,05	0,595±0,020	0,93
6	1,0(+1)	1,0 (+1)	1,0 (+1)	0,0 (-1)	5 (+1)	0,273±0,010	9,07±0,16	2,620±0,460	99,45	0,285±0,010	0,96
7	0,0 (-1)	1,0 (+1)	1,0 (+1)	0,2 (+1)	3 (-1)	0,264±0,030	9,04±0,08	1,280±0,560	99,68	0,291±0,030	0,91
8	0,0 (-1)	0,0 (-1)	1,0 (+1)	0,2 (+1)	5 (+1)	0,311±0,030	9,11±0,09	0,820±0,260	99,72	0,331±0,030	0,94
9	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,2 (+1)	5 (+1)	0,434±0,000	2,71±0,18	3,600±0,360	100,00	0,464±0,000	0,94
10	1,0(+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5 (+1)	0,587±0,060	8,00±0,42	8,580±1,640	99,80	0,620±0,080	0,95
11	0,0 (-1)	1,0 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	3 (-1)	0,347±0,030	6,66±0,00	6,100±0,140	100,00	0,370±0,030	0,94
12	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	3 (-1)	0,467±0,050	2,59±0,07	3,800±0,160	100,00	0,524±0,040	0,89
13 (C)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	0,261	8,95	3,440	99,65	0,279	0,94
14 (C)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	0,266	8,91	3,620	99,65	0,279	0,95
15 (C)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	0,259	8,92	3,540	99,70	0,278	0,93
16 (C)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	0,262	9,00	3,200	99,68	0,280	0,94
CP	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,439±0,000	8,45±0,04	5,980±0,320	99,97	0,473±0,000	0,93

C - Pontos centrais; CP - Condição padrão ((%m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3 (0,4) e asparagina (1), com pH inicial de 5,0); * - Razão de carotenoides torularodina/β-caroteno.

Mediante o primeiro planejamento PB, somente dois ensaios (9 e 12) apresentaram pH final inferior em comparação com o pH inicial. A produção de torularodina, o ensaio 10 (dextrose (10 g/L), KH_2PO_4 (0,52 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0,52 g/L), NH_4NO_3 (4 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e pH inicial de 5) destacou-se dos demais com produção de torularodina de 0,587±0,06 mg/mL e a relação torularodina/β-caroteno de 0,95 (tal relação evidencia que se a relação foi superior a 1 a quantidade de torularodina produzido é superior a de β-caroteno) Nesses experimentos, 99,80% da glicose foi consumida. Bhosale e Gadre (2001) também observaram que o extrato de levedura é um fator significativo no aumento da produção de carotenoides. Esses autores obtiveram produção de carotenoides totais de 14 mg/L, com teor de β-caroteno de 70%, usando apenas melaço de cana-de-açúcar com a levedura *R. glutinis*. No entanto, a adição de extrato de levedura aumentou a produção para 42,6 mg/L (3,4 mg/g) de carotenoides, com 79% de β-caroteno.

A síntese de carotenoides envolve um processo complexo. Inicialmente, o isopreno, precursor dos carotenoides, é derivado do substrato de carbono. Em seguida, os carotenoides são gerados a partir desse precursor, com várias enzimas desempenhando papéis cruciais na catalisação de reações distintas, influenciando a diversidade da produção de carotenoides (Hernandez-Almanza *et al*., 2014, Kot *et al*., 2016, Kot *et al*., 2018, Ma *et al*., 2015).

A enzima fitossintase facilita a condensação de duas moléculas de GGPP, resultando em fiteno, composto por 40 átomos de carbono. O fiteno é então convertido pela fito-desnaturase em neurosporeno, que pode prosseguir para a síntese de licopeno ou β-zeacaroteno. A ciclização do licopeno ou a desidrogenação do β-zeacaroteno leva à formação de γ-caroteno, que, por sua vez, sofre ciclização para produzir β-caroteno. Alternativamente, o γ-caroteno pode ser convertido em toruleno por meio da fitoeno dessaturase. Por fim, o toruleno pode sofrer reações de hidroxilação e oxigenação para produzir torularodina (Hernandez-Almanza *et al*., 2014, Kot *et al*., 2016, Kot *et al*., 2018, Ma *et al*., 2015). Portanto, uma relação entre torularodina/β-caroteno é viável para compreender a transformação do γ-caroteno, especialmente considerando que o foco do trabalho é aumentar a produção de torularodina, que tem alto poder antioxidante O toruleno também é produzido e está presente no extrato de carotenoides, porém em quantidade ínfima, essa quantidade

baixa é dado devido hidroxilação e oxidação do tolueno para a síntese da torularodina (Zhao *et al*., 2024) assim foi quantificado apenas o β-caroteno e a torularodina.

De forma semelhante, Banzatto, Freita e Mutton (2013), durante a produção de carotenoides usando a levedura *Rhodotorula rubra* em vários meios, incluindo caldo cana-de-açúcar, melaço e xarope de cana-de-açúcar, e avaliando a suplementação do meio com ureia e nitrofos KL (Quimatec Produtos Químicos Ltda), observaram que a ureia foi o suplemento mais adequado em todos os meios, resultando em aumento na massa seca e na produção de carotenoides. No entanto, nas condições específicas avaliadas no presente estudo com *R. glutinis*, a ureia não se mostrou um contribuinte significativo para a produção do metabólito desejado, em outras palavras, a produção do metabólito de interesse foi menor na presença de ureia.

Da Silva *et al*. (2020) investigaram o impacto da temperatura e do pH na produção de carotenoides e lipídios no hidrolisado de bagaço de sisal por *Rhodotorula mucilaginosa*. Suas descobertas revelaram que o uso de sulfato de amônio teve efeito prejudicial na produção de biomassa. Os autores propuseram que, "*como a síntese de carotenoides é favorecida pela limitação de nutrientes, geralmente o nitrogênio, o aumento dos níveis de sulfato de amônio pode ter dificultado a síntese"*. Essa teoria pode explicar o efeito não significativo do sulfato de amônio no presente estudo.

Além dos fatores nutricionais, o pH também foi identificado como um importante influenciador na produção de carotenoides. Zhao *et al.* (2019), em seu estudo com o objetivo de otimizar os parâmetros nutricionais e ambientais para a produção de carotenoides, identificaram as condições ideais para o cultivo da levedura *Rhodotorula* sp. RY1801: temperatura de 28 °C, pH de 5,0, fonte de carbono de 10 g/L de glicose e 10 g/L de extrato de levedura. Essa abordagem resultou em concentração máxima de 987 µg/L de carotenoides totais. Outro estudo conduzido por Latha *et al*. (2005) em *R. glutinis* DER-PDY constatou que o pH ideal para a produção de carotenoides era pH 5,5 nas condições que eles exploraram. Notavelmente, no estudo atual, o teste com a maior produção foi com pH inicial de 5.

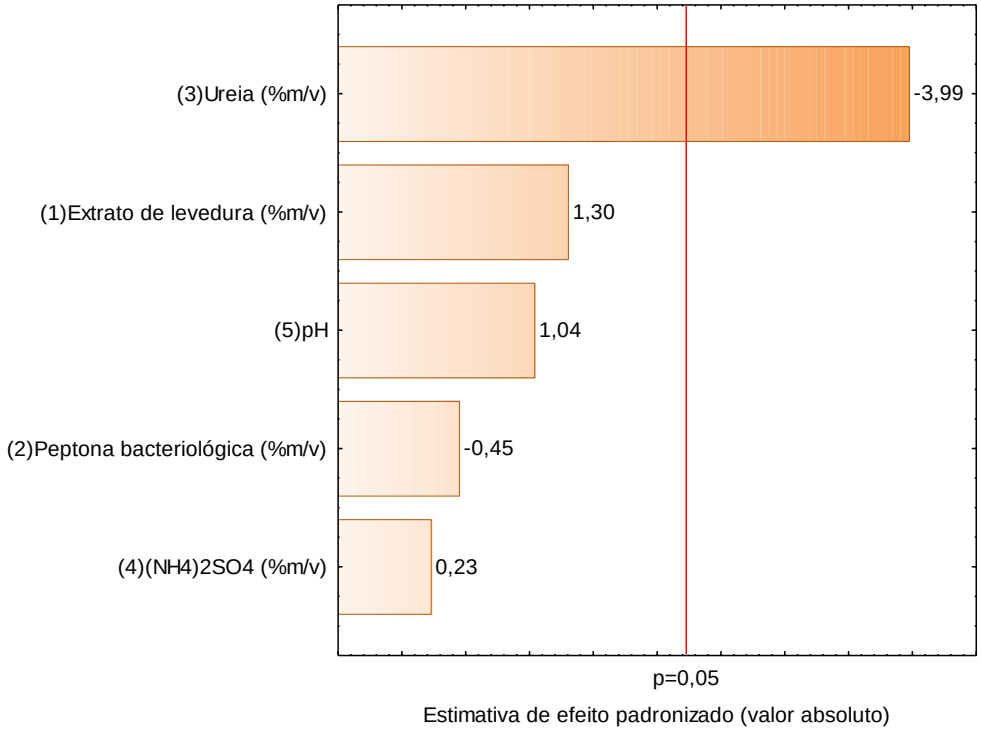
Embora os carotenoides sejam produzidos de forma intracelularmente, não parece haver uma correlação direta entre a concentração de biomassa e a produção desses compostos. Um exemplo intrigante é encontrado no ensaio 8, em que apenas 2,05 g/L de biomassa resultaram em produção maior de torularodina do que os experimentos envolvendo pontos centrais (13, 14 e 15), que tiveram 3,44 g/L de

biomassa. Esta observação está alinhada com as descobertas de Kim *et al*. (2011), que investigaram o cultivo da levedura *Rhodotorula aurantiaca* K-505. Eles alcançaram a produção específica máxima de carotenoides de 4,68 mg/g, o que coincidiu com valor elevado de biomassa (14,2 g/L).

Apesar das variações na produção de carotenoides entre os experimentos, a razão β-caroteno/torularodina variou entre 0,89 e 1,04 para o primeiro planejamento experimental do tipo PB, conforme mostrado na Tabela 4. O experimento 2 se destacou com razão de 1,04.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 7) fica evidente que, entre as variáveis independentes examinadas no PB inicial, o aumento da concentração de ureia apresentou um efeito significativamente negativo sobre a produção de torularodina. No entanto, curiosamente, ela apresentou efeito negativo (p<0,05), o que implica que o nível mais baixo estudado (0 g/L) pode, contra intuitivamente, promover aumento na produção de carotenoides.

Figura 7. Gráfico de Pareto para o primeiro planejamento Plackett-Burman. A linha no gráfico representa uma linha de referência; qualquer fator que se estenda além dessa linha tem efeito significativo com valor de $p < 0,05$. Os fatores avaliados incluem ureia, extrato de levedura, peptona bacteriológica, $(NH_4)_2SO_4$ e o pH do meio sob a resposta variável torularodina.



A peptona bacteriológica também não apresentou significância, com um sinal negativo indicando que a exclusão dessa fonte poderia melhorar a produção de carotenoides.

Os dois principais fatores que favoreceram a produção foram o pH (no nível máximo de 5) e o extrato de levedura, sem efeito significativo. Vale a pena observar que, sob certas condições experimentais, a produção de carotenoides superou o padrão alcançado com a asparagina, o que ressalta a vantagem do estudo realizado.

Embora o extrato de levedura não tenha apresentado significância estatística, é digno de nota que o ensaio conduzido exclusivamente com extrato de levedura em pH inicial de 5 (Ensaio 10) produziu a maior produção entre todas as condições examinadas. Além disso, a produção de torularodina nesse ensaio superou o grupo de controle (CP), que consistia em uma cultura com as mesmas condições do ensaio 10 alterando somente o extrato de levedura pela asparagina, resultando em produção de torularodina de apenas 0,439 mg/mL.

5.2.2. Segundo planejamento experimental

A complexidade do meio de cultura pode afetar positiva ou negativamente a produção do metabólito desejado. Para investigar o papel dos nutrientes nesse processo, foi realizado um segundo planejamento experimental PB, com o objetivo de avaliar sua essencialidade para a produção de carotenoides por *R. glutinis*. Assim como no primeiro desenho experimental, a variável resposta principal foi a produção de torularodina, mas outros parâmetros também foram avaliados, especificamente pH final, biomassa, consumo de glicose e a relação torularodina/β-caroteno. Os resultados desse segundo projeto de PB são apresentados na Tabela 5, que detalha a produção de carotenoides, o rendimento de biomassa e o pH final para cada teste envolvendo o cultivo de *R. glutinis*.

Tabela 5. Produção de carotenoides, biomassa e pH final correspondentes a cada ensaio para o segundo planejamento Plackett-Burman cultivando *R. glutinis* CCT-2186 após 72 h de cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Ensaios	Variáveis independentes								Variável dependente	Análises adicionais			
	Dextrose (% m/v)	KH_2PO_4 (%m/v)	$MgSO_4.7H_2O$ (%m/v)	KCl (%m/v)	NH_4NO_3 (%m/v)	$CuSO_4$ (mM)	H_2O_2 (mM)	Extrato de levedura (%) (m/v)	Torularodina (mg/mL)	pH final	Biomassa (g/L)	β-caroteno (mg/mL)	T/β*
1	1,5 (+1)	0,000 (-1)	0,052 (+1)	0,000 (-1)	0,0 (-1)	0,00 (-1)	0,75 (+1)	1,5 (+1)	0,403±0,030	8,40±0,05	13,06±0,22	0,427±0,030	0,95
2	1,5 (+1)	0,052 (+1)	0,000 (-1)	0,052 (+1)	0,0 (-1)	0,00 (-1)	0,00 (-1)	1,5 (+1)	0,409±0,000	8,34±0,01	14,02±0,16	0,430±0,010	0,95
3	0,5 (-1)	0,052 (+1)	0,052 (+1)	0,000 (-1)	0,8 (+1)	0,00 (-1)	0,00 (-1)	0,5 (-1)	0,246±0,010	8,06±0,03	5,64±0,10	0,261±0,010	0,94
4	1,5 (+1)	0,000 (-1)	0,052 (+1)	0,052 (+1)	0,0 (-1)	0,75 (+1)	0,00 (-1)	0,5 (-1)	0,401±0,040	7,45±0,10	11,84±0,22	0,467±0,050	0,86
5	1,5 (+1)	0,052 (+1)	0,000 (-1)	0,052 (+1)	0,8 (+1)	0,00 (-1)	0,75 (+1)	0,5 (-1)	0,313±0,020	6,23±0,04	10,32±0,14	0,333±0,010	0,94
6	1,5 (+1)	0,052 (+1)	0,052 (+1)	0,000 (-1)	0,8 (+1)	0,75 (+1)	0,00 (-1)	1,5 (+1)	0,384±0,010	8,23±0,10	11,38±0,10	0,402±0,010	0,95
7	0,5 (-1)	0,052 (+1)	0,052 (+1)	0,052 (+1)	0,0 (-1)	0,75 (+1)	0,75 (+1)	0,5 (-1)	0,253±0,010	8,12±0,07	5,20±0,18	0,258±0,010	0,98
8	0,5 (-1)	0,000 (-1)	0,052 (+1)	0,052 (+1)	0,8 (+1)	0,00 (-1)	0,75 (+1)	1,5 (+1)	0,473±0,020	8,79±0,04	5,58±0,00	0,465±0,050	1,02
9	0,5 (-1)	0,000 (-1)	0,000 (-1)	0,052 (+1)	0,8 (+1)	0,75 (+1)	0,00 (-1)	1,5 (+1)	0,453±0,060	8,80±0,01	6,04±0,10	0,438±0,050	1,03
10	1,5 (+1)	0,000 (-1)	0,000 (-1)	0,000 (-1)	0,8 (+1)	0,75 (+1)	0,75 (+1)	0,5 (-1)	0,329±0,000	7,97±0,06	6,36±0,20	0,363±0,020	0,91
11	0,5 (-1)	0,052 (+1)	0,000 (-1)	0,000 (-1)	0,0 (-1)	0,75 (+1)	0,75 (+1)	1,5 (+1)	0,502±0,030	8,84±0,08	7,36±0,10	0,478±0,030	1,05
12	0,5 (-1)	0,000 (-1)	0,000 (-1)	0,000 (-1)	0,0 (-1)	0,00 (-1)	0,00 (-1)	0,5 (-1)	0,291±0,010	8,49±0,08	5,30±0,06	0,307±0,010	0,95
13 (C)	1,0 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,4 (0)	0,375 (0)	0,375 (0)	1,0 (0)	0,391	8,43	9,42	0,397	0,98
14 (C)	1,0 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,4 (0)	0,375 (0)	0,375 (0)	1,0 (0)	0,392	8,44	9,40	0,380	1,03
15 (C)	1,0 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,4 (0)	0,375 (0)	0,375 (0)	1,0 (0)	0,410	8,41	9,45	0,419	0,98
16 (C)	1,0 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,026 (0)	0,4 (0)	0,375 (0)	0,375 (0)	1,0 (0)	0,374	8,46	9,70	0,394	0,95

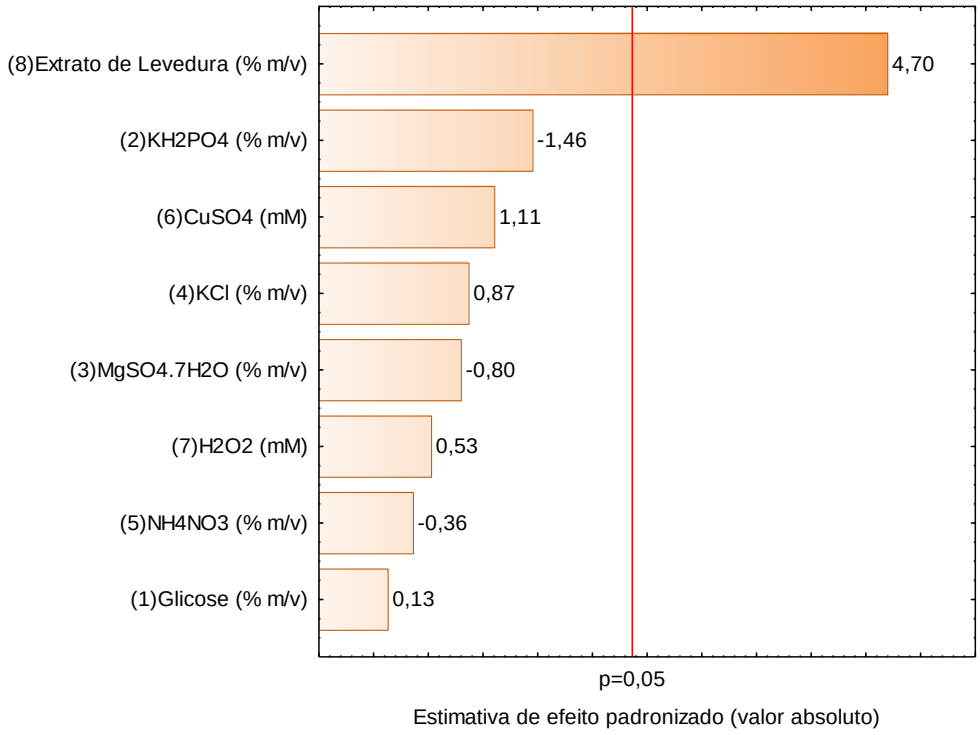
C - Pontos centrais; * - Razão de carotenoides torularodina/β-caroteno.

Mediante a Tabela 5 é possível observar que para todos os ensaios, o consumo de glicose foi superior a 99,50%. Além disso, independentemente de ter sido adicionada a quantidade mínima ou máxima desse nutriente, o pH permaneceu consistentemente acima de 8.

Ademais, nesse experimento, é possível que a glicose esteja sendo utilizada em vias metabólicas não relacionadas à produção biotecnológica de carotenoides. Em todos os testes realizados, o consumo de glicose permaneceu em aproximadamente 100%, mas houve variações significativas na produção de biomassa.

Os impactos das variáveis independentes no experimento Plackett-Burman (PB) são exibidos visualmente na Figura 8, representados pelo gráfico de Pareto. No contexto da produção de torularodina, o extrato de levedura apresentou-se como a única variável estatisticamente significativa ao nível de confiança notável de mais de 95%.

Figura 8. Gráfico de Pareto para o segundo Plackett-Burman. A linha vermelha no gráfico representa uma linha de referência; qualquer fator que se estenda além dessa linha tem um efeito significativo com um valor de $p < 0,05$. Os fatores avaliados incluem extrato de levedura, KH_2PO_4, $CuSO_4$, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, H_2O_2, NH_4NO_3 e glicose.



A produção de carotenoides e lipídios por leveduras depende do conteúdo nutricional, do pH e da temperatura, com efeito claro observado entre a suplementação com fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico e a produção de carotenoides (β-caroteno, torularodina e toruleno) e lipídios por *R. glutinis* CCT-2186 (Mussagy *et al*., 2021). Também foi relatado que estressores oxidativos, como $CuSO_4$ e H_2O_2, influenciam a produção de carotenoides (Irazusta *et al*., 2013).

Em seu estudo de 2012, Maldonade *et al.* empregaram métodos estatísticos para otimizar a produção de carotenoides utilizando a cepa *Rhodotorula mucilaginosa* isolada do ecossistema brasileiro. Suas descobertas destacaram o extrato de levedura como a principal variável para aumentar a produção de carotenoides. No entanto, o $MgSO_4.7H_2O$ e o KH_2PO_4 apresentaram efeitos adversos, o que se alinha com as observações dos dados obtidos no presente estudo.

Ao investigar a relação entre a produção de torularodina e o estresse oxidativo em *R. mucilaginosa*, Irazusta *et al.* (2013), relataram que um meio sintético contendo indutores de estresse oxidativo, como $CuSO_4$ (5,3 mg/L) ou H_2O_2 (5,2 mg/L), aumentou a produção de torularodina em comparação com o grupo sem esses aditivos. É interessante notar que esse fenômeno não foi reproduzido no presente estudo, possivelmente devido às variações específicas da cepa nas respostas microbianas a estressores idênticos.

Notavelmente, o KCl apresentou efeito positivo sobre a produção, sem efeito significativo sobre a biossíntese do carotenoide alvo. Isso sugere que o KCl pode não ser propício à produção de xantofila, um padrão consistente com estudos focados na produção de zeaxantina usando cepas de *Flavobacterium* (Vila *et al*., 2020).

Como a produção do metabólito de interesse foi inferior que a melhor condição do experimento anterior, decidiu-se voltar às condições iniciais (Ensaio 10 do primeiro PB) para os estudos subsequentes.

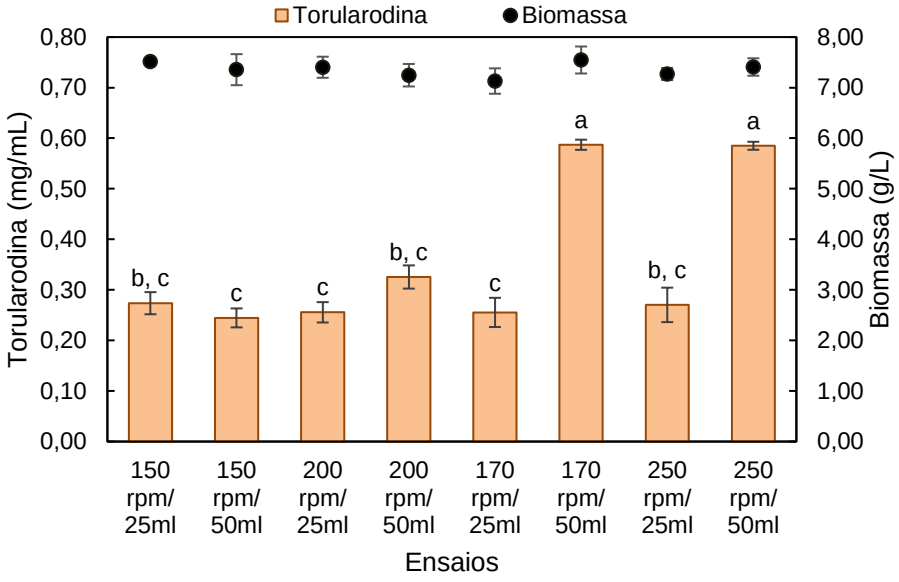
5.3. Avaliação do estresse físico e nutricional na produção de torularodina

O volume de meio de cultura usado na produção em agitador rotativo está diretamente associado à aeração dos microrganismos, conforme demonstrado no experimento a seguir. Essa condição, juntamente com a agitação, são fatores que podem favorecer a oxigenação do microrganismo ou acarretar um estresse que afeta significativamente o rendimento de vários microrganismos aeróbicos tanto para o seu

crescimento quanto para a produção de metabólitos. Portanto, como a *R. glutinis* é uma levedura aeróbica, esses parâmetros foram avaliados no contexto da produção de carotenoides.

Os cultivos para avaliar o volume de meio de cultura e agitação mostraram que o emprego de 20% do volume útil do frasco tipo Erlenmeyer, juntamente com velocidade de agitação de 170 rpm, tem influência positiva na produção de carotenoides, especialmente a torularodina. Essa combinação proporcionou condições ideais para a troca efetiva de gases e maximizou a superfície de contato entre microrganismo e o meio de cultura gerando um amento tanto da produção de carotenoides, especificamente torularodina e de biomassa, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Influência da agitação (150 rpm, 170 rpm, 200 rpm e 250 rpm) e volume de meio de cultura (10% e 20% do volume útil em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL) na produção de torularodina (▫) e biomassa (●) por *R. glutinis* CCT-2186, o cultivo foi realizado por 72 h. Os testes foram realizados em triplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão e as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (α=0,05).



Em estudo sobre o aumento da produção de carotenoides em *R. glutinis* usando farinha hidrolisada de resíduos de feijão mungo, Tinoi *et al.* (2005) observaram que baixas taxas de agitação (100 a 150 rpm) prejudicaram o crescimento celular devido à redução da nutrição, enquanto altas taxas de agitação (>250 rpm) levariam à ruptura celular. No entanto, no estudo atual, a baixa agitação não teve impacto na redução da biomassa. Essa discrepância pode ser decorrente do fato de que a

biomassa depende não apenas da agitação, mas também da disponibilidade de fontes nutricionais de fácil absorção.

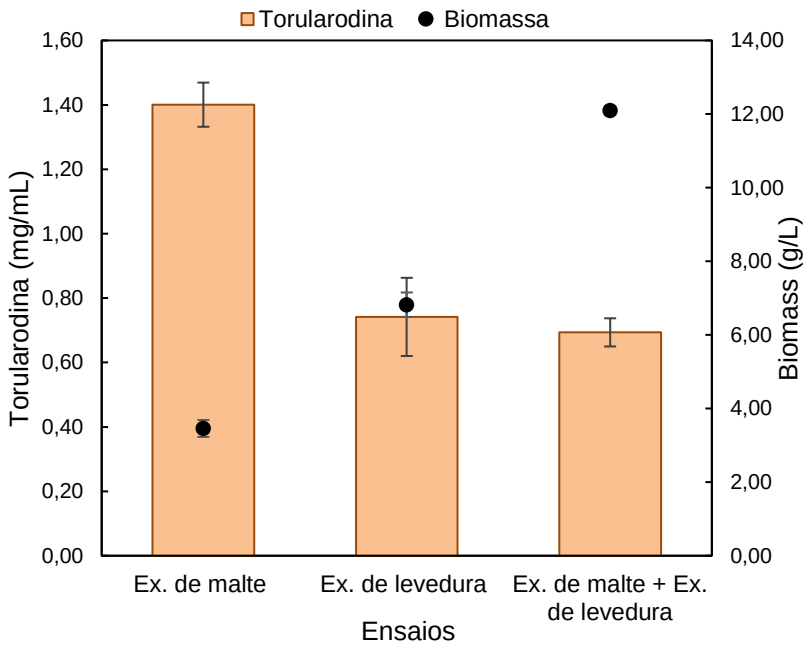
Em estudo realizado por Rodríguez *et al.* (2023), que otimizaram a produção de carotenoides em *Rhodotorula mucilaginosa* usando resíduos agroindustriais econômicos de alcachofra como substrato, os melhores resultados foram obtidos com pH 5, 120 rpm e 30 °C por 72 h. Da mesma forma, Sharma e Ghoshal (2020), em sua pesquisa de otimização de carotenoides com *R. mucilaginosa* (MTCC-1403), identificaram 119,6 rpm como a velocidade de agitação ideal para seu estudo. Na presente pesquisa, a menor agitação (150 rpm) não favoreceu a produção do metabólito de interesse, em contrapartida 170 rpm e 250 rpm favorecessem a produção, e não apresentaram diferenças estatisticamente significativa mediante o teste de *Tukey*. Portanto, foi selecionado 170 rpm para aumentar a vida útil do equipamento e reduzir os custos de produção. Outro ponto bastante importante é que ao utilizar 10% do volume útil aconteceu pequena inibição da produção. Portanto, a condição: 170 rpm e 20% volume útil foi a condição selecionada para os próximos experimentos.

Liu *et al.* (2006) demonstraram a função essencial do suprimento de oxigênio por meio da agitação na produção de carotenoides em cultivo submerso de *Phaffia rhodozyma*. No entanto, é importante observar que a agitação não pode ser considerada isoladamente quando se pretende otimizar a produção do metabólito alvo. O valor ideal de agitação depende inerentemente do microrganismo específico que está sendo estudado. Vale ressaltar que este é um estudo para agitador orbital; quando avaliado em um biorreator, o processo de aeração muda, e a agitação deve ser analisada em conjunto com a taxa de aeração.

Em relação as fontes de nitrogênio, o impacto significativo do extrato de malte na produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 foi relatado por Machado *et al.* (2019). No presente estudo, observou-se aumento substancial de 88,85% na produção de carotenoides quando o extrato de malte substituiu o extrato de levedura, conforme mostrado na Figura 10. Entretanto, quando o extrato de malte foi combinado com o extrato de levedura, a produção de carotenoides foi inibida. Essa inibição pode ser atribuída à saturação do meio de cultura com nitrogênio, levando a uma relação C/N alterada. Haja visto que existe excesso de N, a levedura não precisou fazer esforço, ou seja, não precisou produzir outros metabólitos para se manter ativa.

Os microrganismos responsáveis pela síntese de carotenoides normalmente requerem apenas um mínimo de nitrogênio para seu crescimento, o que lhes permite utilizar o excesso de carbono no meio de cultura para a síntese de pigmentos, conforme sugerido por Spier *et al*. (2015). Isso foi observado neste experimento, pois a relação carbono/nitrogênio (C/N) do meio de extrato de malte foi de 53,76, enquanto a relação C/N do meio de extrato de levedura foi de 30,41. A Tabela A1 do anexo mostra a concentrações de carbono e nitrogênio no extrato de malte e extrato de levedura empregados no presente trabalho.

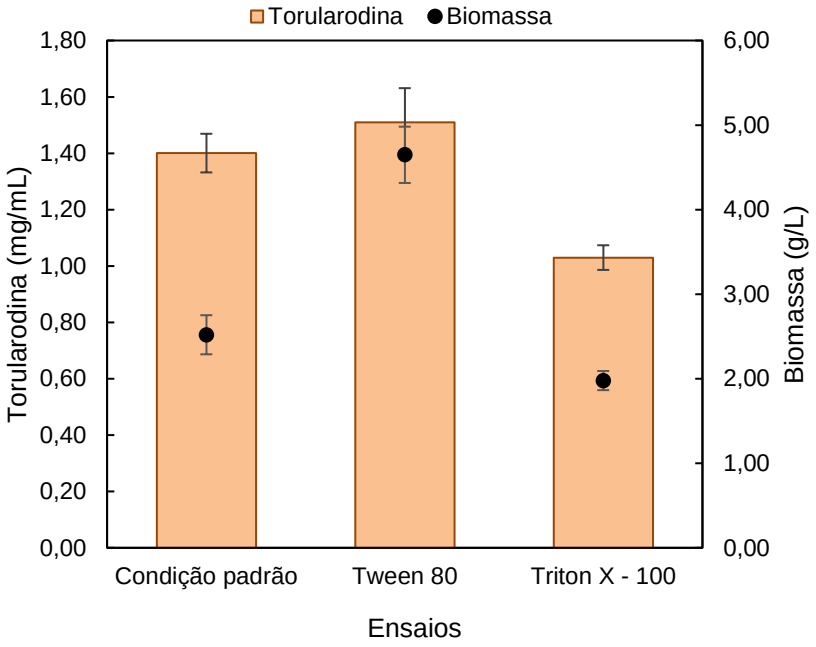
Figura 10. Efeito da presença de extrato de malte e extrato de levedura como fonte de nitrogênio no meio de cultura para produzir carotenoides, especificamente torularodina (▫) e biomassa (●) de *R. glutinis* CCT-2186 após 72 horas de cultivo. A) Extrato de malte (10 g/L); B) Extrato de levedura (10 g/L); C) Extrato de levedura (10 g/L) e extrato de malte (10 g/L) e pH inicial de 5. Os testes foram realizados em triplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão.



Os surfactantes, juntamente com outros compostos químicos, podem aumentar a permeabilidade das membranas celulares, influenciando assim a secreção de metabólitos pelas células (Rakicka *et al*., 2016). Além disso, o enfraquecimento das paredes celulares dos microrganismos pode facilitar a entrada de nutrientes e ter impacto positivo na produção de metabólitos intracelulares. Consequentemente, o efeito da adição de dois surfactantes, Tween 80 e Triton-X100 na concentração de 1% (v/v), foi avaliado em relação a produção de torularodina por *R. glutinis*. Entre os surfactantes investigados, o Tween 80 mostrou-se o mais promissor (Figura 11). Tal

surfactante influenciou no aumentou a produção de torularodina de 1,40 mg/ml para 1,51 mg/mL, representando aumento aproximado de 7,86%.

Figura 11. Adição de surfactantes (Tween 80 e Triton X-100) como componente do meio de cultura no cultivo de *R. glutinis* CCT-2186 para produção de torularodina (▫) e biomassa (●). Os testes foram realizados em triplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão.



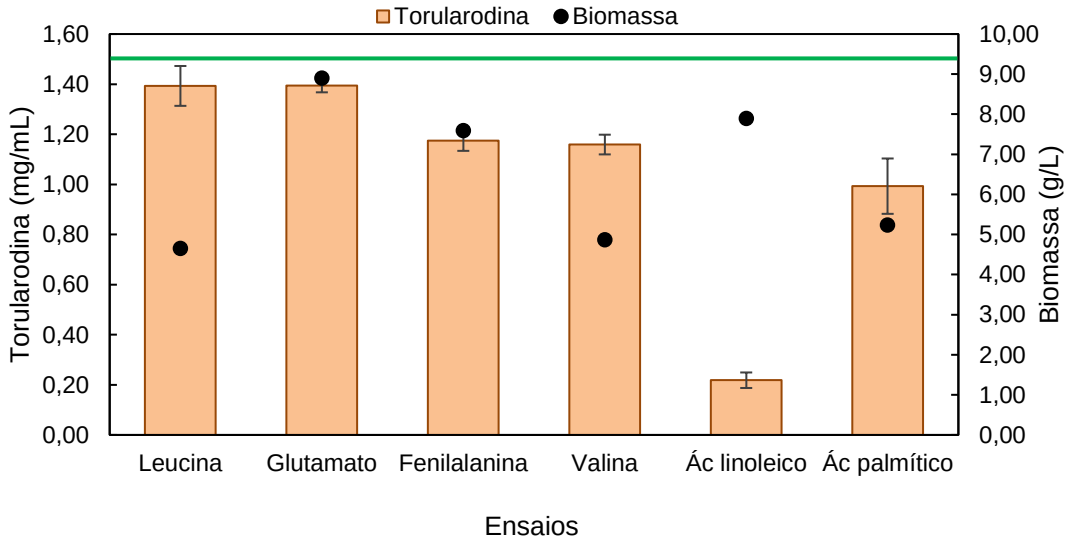
Em pesquisa sobre o cultivo de *Rhodotorula glutinis* mutante 32, Bhosale e Gadre (2001) observaram, por meio de um delineamento fatorial que a glicose e a treonina (um aminoácido) tiveram impacto mais significativo na carotenogénese em comparação com o extrato de levedura. Essa descoberta sugeriu que a presença de aminoácidos promove a produção de carotenoides.

A influência positiva dos aminoácidos no meio de cultura também foi observada no estudo conduzido por Mussagy *et al.* (2019), usando *R. glutinis* CCT-2186. No entanto, sob as condições nutricionais estabelecidas até o momento, surgiu uma tendência contrária. Conforme ilustrado na Figura 12, a produção de carotenoides diminuiu na presença dos aminoácidos avaliados em comparação com a condição padrão. Especificamente, as reduções foram de 7,75% para leucina, 7,62% para glutamato, 22,18% para fenilalanina e 23,24% para valina.

Esse declínio tanto na produção de carotenoides quanto no crescimento microbiano na presença dos aminoácidos leucina, glutamato, fenilalanina e valina pode ser devido a uma alteração da rota metabólica do microrganismo pois a presença de aminoácidos altera diretamente o metabolismo celular, a expressão genética e a

regulação enzimática. Além disso, a presença de aminoácidos, pode alterar a relação C/N e principalmente a via de biossíntese de aminoácidos.

Figura 12. Adição de aminoácidos (leucina, glutamato, valina e fenilalanina) e ácidos orgânicos (ácido palmítico e ácido linoleico) na cultura de *R. glutinis* CCT-2186 para produzir torularodina (▯) e biomassa (●). Os testes foram realizados em triplicata e as barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão, a linha em verde representa a condição padrão (sem a presença dos aminoácidos e ácidos orgânicos) da produção de torularodina.



Yen *et al.* (2019) realizaram estudo no qual incorporaram 25 g/L de óleo de palma em um meio contendo 60 g/L de glicerol bruto, 20 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L de KH_2PO_4, 0,5 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g/L de $CaCl_2$, 0,1 g/L de NaCl e 1 g/L de Tween 80. Os resultados revelaram aumento significativo de 71% na biomassa em comparação com o lote de controle. Além disso, essa suplementação com óleo de palma levou a um acúmulo maior de lipídios totais e β-caroteno. Notavelmente, a adição de ácidos orgânicos inibiu a produção do metabólito de interesse por *R. glutinis* sob as condições experimentais avaliadas, conforme demonstrado na Figura 12. Especificamente, a inclusão de ácido palmítico reduziu aproximadamente 31,56% a produção de torularodina.

Em estudo realizado por Vasilievna Besarab *et al.* (2018), os pesquisadores enriqueceram o meio de fermentação da cerveja com óleo de girassol, conhecido por seu alto teor de ácido linoleico, para cultivar leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula*. Esse estudo revelou que esse nutriente afetou positivamente a produção de carotenoides totais, com o ácido málico emergindo como um fator notável. Como o óleo de girassol é rico em ácido linoleico, fizemos a inserção dele no meio de cultivo com *R. glutinis* e foi observado perfil contraria ao retratado por Vasilievna Besarab *et*

al. (2018). Essa divergência pode ser atribuída à possibilidade de a levedura ter utilizado outros compostos presentes no óleo que não foram encontrados no ácido linoleico puro.

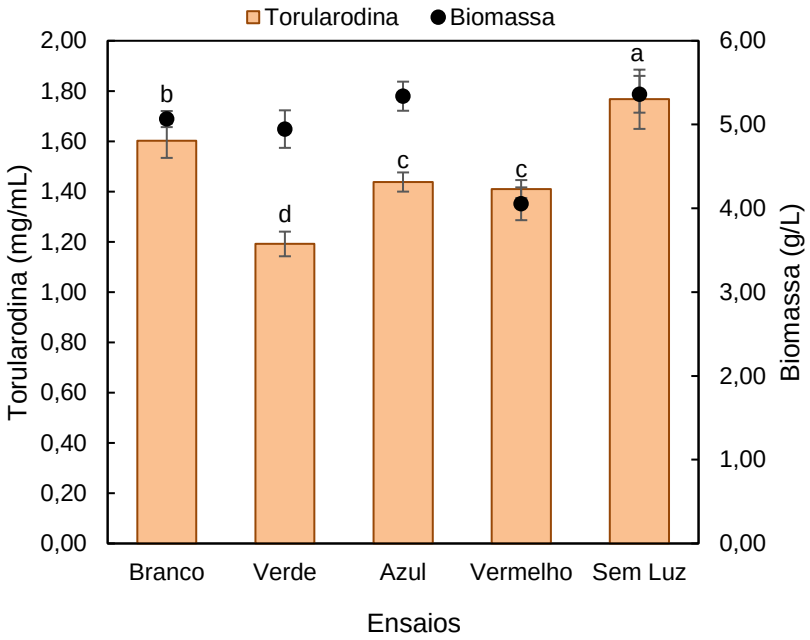
Dando sequência aos estudos de parâmetros que afetam a produção de carotenoides. A luz desempenha um papel fundamental no crescimento autotrófico em microrganismos fotossintetizantes, como as algas (Maltsev *et al*., 2021). Curiosamente, a influência da luz estende-se para além dos organismos fotossintetizantes e foi também observada em microrganismos não fotossintéticos, como a levedura *Rhodosporodium toruloides*. A luz estimula a produção de carotenoides nesta levedura, embora não pareça ter impacto na produção de lipídios totais (Pham *et al*., 2020). Em *Phaffia rhodozyma*, os carotenoides são produzidos intracelularmente, e a hipótese é que sua produção pode ser amplificada em situações de estresse celular como uma forma de proteção contra várias adversidades ambientais para a sobrevivência celular, como espécies reativas geradas pela luz (Tropea *et al*., 2013).

Em estudo realizado por Kong *et al.* (2019), concluiu-se que a irradiação pode provocar alterações no crescimento celular e nos metabolitos em fungos pigmentados. Isto sugere a presença de um mecanismo fotoinduzido em *R. mucilaginosa*, que poderia ser aproveitado para regular a biossíntese e a produção de componentes valiosos.

Além disso, Gong, Zhang e Tan (2020), em sua busca para aumentar simultaneamente a lipogênese e a biossíntese de β-caroteno em *Rhodotorula glutinis* usando acetato de sódio como única fonte de carbono, descobriram que a exposição à luz poderia servir como um método eficaz para melhorar a produção de lipídios e β-caroteno.

Allahkarami *et al.* (2021) observaram um comportamento semelhante com *R. mucilaginosa*-M22, pois eles obtiveram o maior rendimento de carotenoides quando a cultura foi exposta à luz branca. No presente estudo, quando foi feita uma comparação quantitativa, as células cultivadas sob luz LED branca não demonstraram maior produção de carotenoides, especialmente de torularodina, em comparação com o cultivo sob diferentes cores de luz (Figura 13). Além disso, o estudo indicou que a cor da luz incidente pode influenciar a quantia de biomassa produzida, bem como no montante de carotenoides.

Figura 13. Influência da incidência da luz (branca, verde, vermelha, azul e no escuro) no cultivo de *R. glutinis* CCT-2186 em agitador rotativo a 170 rpm para produção torularodina (▫) e biomassa (●). O experimento foi realizado em quadruplicata. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão e as médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (α=0,05).



5.4. Comparativo entre ferramentas de incremento da produção

5.4.1. Delineamento Composto central Rotacional (DCCR)

Como observado em experimentos anteriores, tanto o extrato de malte quanto o Tween 80 na ausência de luz, demonstraram ser fatores que exercem influência positiva na produção do carotenoide de interesse. Com base nessa constatação, foi conduzido um delineamento composto central rotacional para estabelecer um modelo polinomial capaz de identificar os pontos de máxima produção de torularodina. Esse método pode melhorar a compreensão e otimizar os parâmetros envolvidos na produção do carotenoide, visando assim maximizar seu rendimento. É importante ressaltar que essa metodologia permite uma análise abrangente dos efeitos das variáveis independentes sobre o resultado desejado, facilitando assim a identificação das condições ideais para otimizar o processo em questão.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a variável resposta (Torularodina (mg/mL)) e análises adicionais (pH final, biomassa (g/L), consumo de açúcar (%) e β-caroteno (mg/mL)) em cada um dos ensaios realizados de acordo com a matriz do planejamento. Os valores das variáveis resposta produção de torularodina variaram com base nas combinações de variáveis independentes (extrato de malte e

Tween 80) durante os cultivos. Entre esses ensaios, o ensaio 3 destacou-se em termos de produção de carotenoides, apesar de não ter o maior consumo de açúcar. É importante notar que em todos os ensaios o meio de cultura tinha pH ácido no final do cultivo, possivelmente devido à formação de ácidos orgânicos durante o desenvolvimento do microrganismo como o ácido mevalônico, que é precursor da carotenogénese (Mussagy, de Oliveira, *et al*., 2023). Provavelmente, isso ocorre porque a biossíntese da torularodina na levedura começa com a conversão da fonte de carbono em piruvato durante a glicólise. Posteriormente, o piruvato transforma-se em acetil-CoA, catalisado pelo complexo piruvato desidrogenase, iniciando assim a primeira reação (Goodwin *et al*., 1993)

Tabela 6. Produção de carotenoides, biomassa e pH final correspondente a cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com pontos axiais para o cultivo de *R. glutinis* em agitador rotativo durante 72 h de cultivo a 30 °C e 170 rpm.

Ensaios	Variáveis independentes		Variável dependente	Análises adicionais				
	Extrato de malte (g/L)	Tween 80 (%v/v)	Torularodina (mg/mL)	pH final	Biomassa (g/L)	Açucar consumido (%)	β-caroteno (mg/mL)	T/β*
1	10 (-1)	0,5 (-1)	1,270±0,020	2,56±0,01	4,50±0,54	76,97	1,670±0,020	0,76
2	20 (+1)	0,5 (-1)	1,520±0,000	2,97±0,01	5,58±1,00	60,78	1,900±0,010	0,80
3	10 (-1)	1,5 (+1)	1,710±0,010	2,75±0,01	5,48±0,10	73,22	2,090±0,090	0,82
4	20 (+1)	1,5 (+1)	1,360±0,060	3,09±0,03	6,70±0,04	62,49	1,800±0,020	0,77
5	7,9 (-1.41)	1,0 (0)	1,510±0,010	2,63±0,05	4,76±0,52	81,16	1,890±0,030	0,80
6	22,1 (+1.41)	1,0 (0)	1,500±0,030	3,07±0,03	6,66±0,06	60,48	1,900±0,010	0,79
7	15 (0)	0,3 (-1.41)	1,330±0,020	2,77±0,01	4,44±0,48	65,26	1,660±0,010	0,80
8	15 (0)	1,7 (+1.41)	1,490±0,020	2,87±0,01	6,06±0,58	65,38	1,900±0,020	0,78
9 (C)	15 (0)	1,0 (0)	1,540	2,87	5,34	68,99	1,95	0,79
10 (C)	15 (0)	1,0 (0)	1,520	2,81	5,33	68,90	1,88	0,81
11 (C)	15 (0)	1,0 (0)	1,530	2,82	4,73	67,44	1,86	0,82
12 (C)	15 (0)	1,0 (0)	1,530	2,79	5,09	69,44	1,87	0,82
13 (C)	15 (0)	1,0 (0)	1,540	2,75	5,31	69,38	1,88	0,82

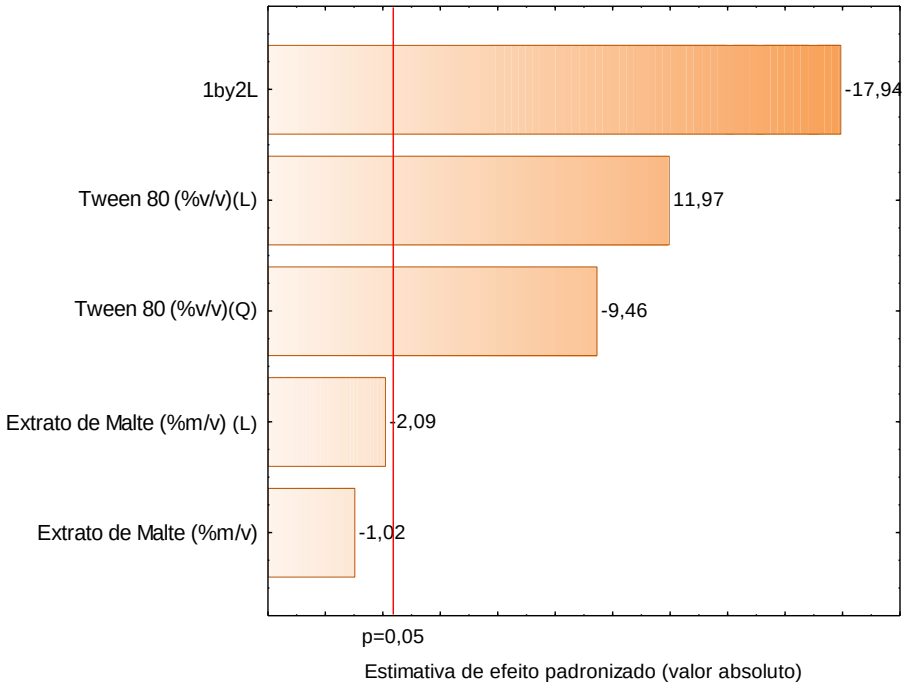
C - Pontos centrais; * - Razão de carotenoides torularodina/β-caroteno.

O gráfico de Pareto (Figura 14), revela percepções dignas de nota com relação ao impacto das variáveis independentes e suas interações na concentração de torularodina obtida no fim do bioprocesso. Notavelmente, o termo linear (L) associado ao Tween 80 demonstrou efeito positivo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). Em contrapartida, o termo quadrático do Tween 80 exerceu uma influência significativa, embora negativa ($p \leq 0,05$), sobre a concentração de torularodina total na biomassa celular e no caldo de fermentação. Além disso, é fundamental destacar o efeito negativo significativo ($p \leq 0,05$) resultante da interação entre os termos lineares do extrato de malte e do Tween 80. Por outro lado, os efeitos dos termos lineares e

quadráticos relacionados à concentração de glicose foram considerados não significativos (p > 0,05) em todas as variáveis de resposta. Da mesma forma, os termos linear e quadrático da concentração do extrato de malte não produziram efeitos significativos (p > 0,05).

Esta análise fornece uma compreensão abrangente dos fatores que afetam a concentração de torularodina, com especial atenção para a influência positiva do Tween 80, o impacto negativo da interação entre o extrato de malte e o Tween 80 e o efeito negligenciável da concentração de extrato de malte na variável resposta. Assim, o sinal positivo do Tween 80 indica que concentrações mais altas poderiam ajudar o processo, enquanto o sinal negativo do extrato de malte indica que uma concentração mais baixa desse composto poderia melhorar a produção. O fato mais importante é que há uma interação entre essas variáveis e, juntas, elas desempenham papel significativo na produção de carotenoides por *R. glutinis*.

Figura 14. Gráfico de Pareto para o Delineamento Composto Central Rotacional. A linha no gráfico representa uma linha de referência; qualquer fator que se estenda para além desta linha tem um efeito significativo com um valor de p < 0,05.



A partir dos resultados obtidos foi desenvolvido um modelo polinomial (MP) de segunda ordem para prever a máxima concentração de torularodina produzida com base nas variáveis independentes extrato de malte e Tween 80. Este modelo é tipicamente representado pela Equação 7.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} {X_i}^2 + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \qquad \textbf{(7)}$$

Em que, Y representa a variável resposta, enquanto Xi e Xj representam as variáveis independentes, com k denotando o número de variáveis estudadas (neste caso, k = 2). Na análise de regressão, os coeficientes são representados da seguinte forma: β0 para intercessão, βi para os termos lineares, βii para os termos quadráticos e βij para os termos de interação.

A Equação 8 expressa o modelo de regressão obtido a partir dos dados experimentais para a máxima concentração de torularodina.

$$Z = 0{,}31 + 0{,}06*x - 0{,}0002*x^2 + 1{,}5*y - 0{,}24*y^2 - 0{,}0592*x*y + 0 \quad \textbf{(8)}$$

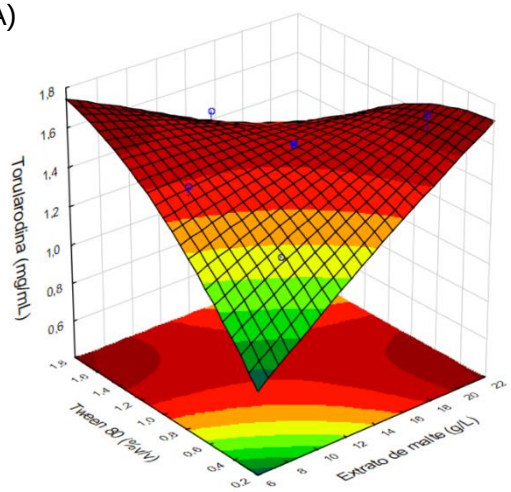
Em que Z corresponde a Torularodina (mg/mL), x a concentração de extrato de malte e y ao Tween 80.

A precisão do modelo pode ser inferida a partir do coeficiente de determinação (R^2). De acordo com os dados apresentados, o coeficiente de regressão para o modelo gerado é de 0,9876, equivalente a 98,76%, e o coeficiente de correlação de Pearson associado ao coeficiente de determinação é de aproximadamente 0,9938. Este fato sugere que apenas 1,24% não são explicadas pelo modelo. Diante de R^2 é possível evidenciar que o modelo gerado é uma representação fiável dos resultados obtidos.

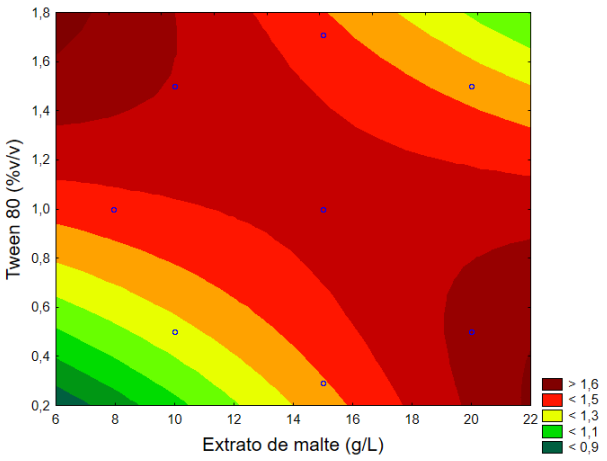
Utilizando o modelo desenvolvido, foi gerado os gráficos de superfície de resposta e de contorno para produzir torularodina (Figura 15). Estas representações gráficas revelam aumento da produção de torularodina à medida que a concentração de Tween 80 aumenta e o extrato de malte chega na proporção mínima estudada.

Figura 15. A) Gráfico de superfície de resposta e B) gráfico de contorno para o estudo da produção de torularodina por *R. glutinis* CCT-2186 em agitador orbital, cultivado durante 72 horas a 170 rpm e na ausência de luz.

A)



B)



5.4.2. Rede neural artificial

Com o objetivo de avaliar a estratégia mais eficaz para o ajuste fino de uma rede neural com capacidades preditivas excepcionais para a produção de carotenoides, especialmente a torularodina. As variáveis de entrada abrangeram as concentrações de extrato de malte e Tween 80. Durante a construção das redes neurais artificiais, diversas arquiteturas foram examinadas para obter um modelo otimizado. Isso envolveu a variação do número de neurônios na camada intermediária, a experimentação de duas funções de transferência dentro desses neurônios e a análise dos resultados da Soma de Erros Quadrados (SSE) e do coeficiente de correlação de Pearson (R) de dois algoritmos de aprendizado distintos: o algoritmo de retropropagação Gradient-Descent (GD) e o algoritmo Levenberg-Marquardt (LM). Simulações subsequentes foram executadas, incorporando as modificações detalhadas na Tabela 7, e os resultados subsequentes, juntamente com comparações relevantes, são apresentados.

Tabela 7. Análise comparativa dos algoritmos de ativação numa rede neuronal artificial (RNA) com funções variadas e contagens de neurónios da camada intermédia.

Algoritmos de aprendizagem	Função de ativação	Número de neurónios	R	SSE*
Levenberg–Marquardt	Logsig	2	0,93244	0,0412
		3	0,98862	0,0071
		4	0,98862	0,0071
		5	0,98862	0,0071
	Tansig	2	0,64491	0,1840
		3	0,98862	0,0071
		4	0,98862	0,0071
		5	0,98862	0,0071
Gradient Descent	Logsig	2	0,64460	0,2090
		3	0,68156	0,1770
		4	0,64657	0,1850
		5	0,72257	0,1630
	Tansig	2	0,73060	0,1480
		3	0,96212	0,0253
		4	0,95537	0,0276
		5	0,89518	0,0667

*SSE - Erro Quadrático Total.

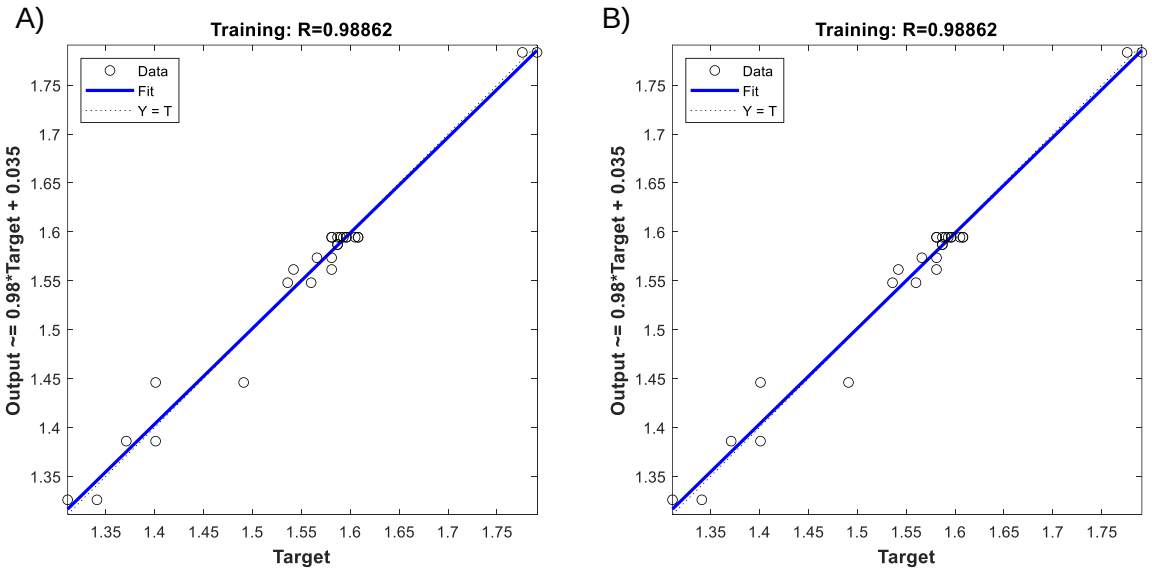
Ao analisar o impacto dos algoritmos de treino Gradient Descent (GD) e Levenberg-Marquardt (LM), observou-se que o algoritmo LM se revela o método mais eficaz para otimizar os pesos das conexões entre neurônios. Isso é comprovado pela maior eficiência no processo de treinamento da rede neural, conforme indicado por

índice de correlação (R) mais alto e erro quadrático médio (SSE) mais baixo em comparação com os resultados obtidos com o algoritmo Gradient Descent (Tabela 7).

Da mesma forma, ao analisar o desempenho da camada intermédia em termos da sua contribuição ideal para a minimização da função objetivo, não houve disparidade significativa em relação ao R e ao SSE entre a função log-sigmoide (logsig) e a função sigmoide hiperbólica (tansig) para um determinado número de neurónios (3, 4 e 5). No entanto, com apenas 2 neurônios na camada intermédia, a função logsig revelou-se mais adequada para este modelo do que a função tansig. Essa preferência decorre da capacidade aprimorada da função log-sigmoide de ajustar os pontos de saída de forma mais eficiente aos dados experimentais, resultando em uma minimização mais eficaz dos erros.

Embora não tenha havido diferença em R quando se comparou o número de neurónios na camada intermédia foram escolhidos 3 neurônios para mitigar o risco de sobreajuste. A complexidade do modelo pode ser um fator que contribui para o sobre ajuste (Bejani; Ghatee, 2021). Vale salientar que o sobreajuste representa um desafio, uma vez que o modelo pode perder a sua capacidade de generalização para novos dados que não foram encontrados durante o treino. Os ajustes das redes neurais artificiais dos desenhos e do modelo de análise geral são mostrados na Figura 16.

Figura 16. Representação da regressão linear dos ajustes dos modelos de análise DCCR A): função log-sigmoide (logsig) e B) função tangente sigmoide (tansig) obtida por método de simulação de redes neurais artificiais no software MATLAB.



5.4.3. Obtenção dos pontos de otimização e validação das respostas preditas tanto modelo polinomial quanto pelas redes neuronais artificiais

Considerando a correlação de Pearson, o modelo polinomial apresentou o melhor ajuste aos resultados (0,9938) experimentais em comparação com a RNA, mas ambos os modelos têm um bom ajuste (0,98862) aos resultados experimentais e podem ser usados para a otimização da composição média.

Comparando as projeções do ponto ótimo obtidas a partir do modelo polinomial e apresentadas na Tabela 8, com as das redes neuronais artificiais, verificou-se concordância na previsão das variáveis de entrada para o modelo DCCR e para a rede neuronal com o ativador Tansig. Vale ressaltar que as respostas também são semelhantes. Por outro lado, o ativador Logsig resultou no ligeiro desvio no valor previsto para o Tween 80 e destacou-se como aquele que produziu maior produção de torularodina. Esta discrepância pode ser atribuída ao fato de as redes neuronais artificiais (RNA) serem constituídas por funções de ativação que variam abruptamente de zero a um, facilitando a previsão de regiões onde uma variável de entrada específica tem uma influência significativa. Em contraste, um modelo polinomial (MP) tem curvas mais suaves, o que torna mais difícil prever regiões onde uma determinada variável tem maior impacto.

Tabela 8. Pontos de otimização para a produção de torularodina frente aos fatores extrato de malte (g/L) e Tween 80 (%v/v) derivados da resposta da superfície e da rede neuronal, juntamente com as respostas previstas.

		MP	**RNA (Logsig)**	**RNA (Tansig)**
Fatores	Extrato de malte (g/L)	7,93	7,93	7,93
	Tween 80 (% v/v)	1,71	1,65	1,71
Prever a resposta para a produção de torularodina (mg/mL)		Intervalo de 1,74 a 1,86	1,89	1,74

As vantagens associadas à utilização de Redes Neuronais Artificiais (RNA) em relação aos Modelos Preditivos (MP) vão além de uma maior precisão de previsão pois abrangem também uma maior capacidade de captar subtilezas nas condições iniciais que influenciam diretamente os resultados da produção. Ao contrário dos modelos lineares, as RNAs possuem a capacidade de compreender e ajustar-se às intrincadas variações no metabolismo dos microrganismos ao longo do processo de produção, levando a previsões mais precisas dos rendimentos finais da produção. Além disso, a versatilidade das RNAs permite a sua aplicação na previsão e otimização de um conjunto diversificado de bioprocessos, como a produção de

colorantes, conferindo assim uma vantagem significativa no planeamento e execução destes procedimentos (Sewsynker-SukaI; Faloye; Kana, 2017).

5.4.4. Validação experimental dos pontos de otimização

O modelo gerado pela superfície de resposta e pela RNA, usando a função Tansig, indica que as condições ideais de cultivo para produzir carotenoides envolvem o emprego de 7,93 g/L de extrato de malte e 1,71% (v/v) de Tween 80 adicionados ao meio de cultivo já composto por Dextrose (10 g/L), KH_2PO_4 (0,52 g/L), $MgSO_4$.7H20 (0,52 g/L), NH_4NO_3 (4 g/L). Além disso, essa função prevê que as variáveis de resposta para o cultivo sob essas condições especificadas variariam de 1,74 mg/mL a 1,86 mg/mL, com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados obtidos durante o experimento de validação experimental, conduzidos em quadruplicata (1,76 mg/mL de torularodina), validam a confiabilidade do modelo na previsão da produção de compostos bioativos por meio de cultivo submerso de *R. glutinis* CCT-2186 em meio sintético.

O uso das condições previstas pelo modelo que empregou a função Logsig não produziu os resultados esperados, resultando em 1,18 mg/mL de torularodina, indicando uma discrepância entre as previsões do modelo e a realidade. Isso ressalta a necessidade de estratégias de controle flexíveis e adaptáveis para garantir desempenho de controle confiável baseado em modelos, capaz de acomodar a variabilidade biológica e a incerteza (Jabarivelisdeh *et al*., 2020). Essa disparidade sugere que mesmo pequenas variações nos componentes do meio de cultura podem levar a mudanças significativas no comportamento do microrganismo (Lima *et al*., 2023). Nesse contexto, o Tween 80 surge como um nutriente potencialmente influente.

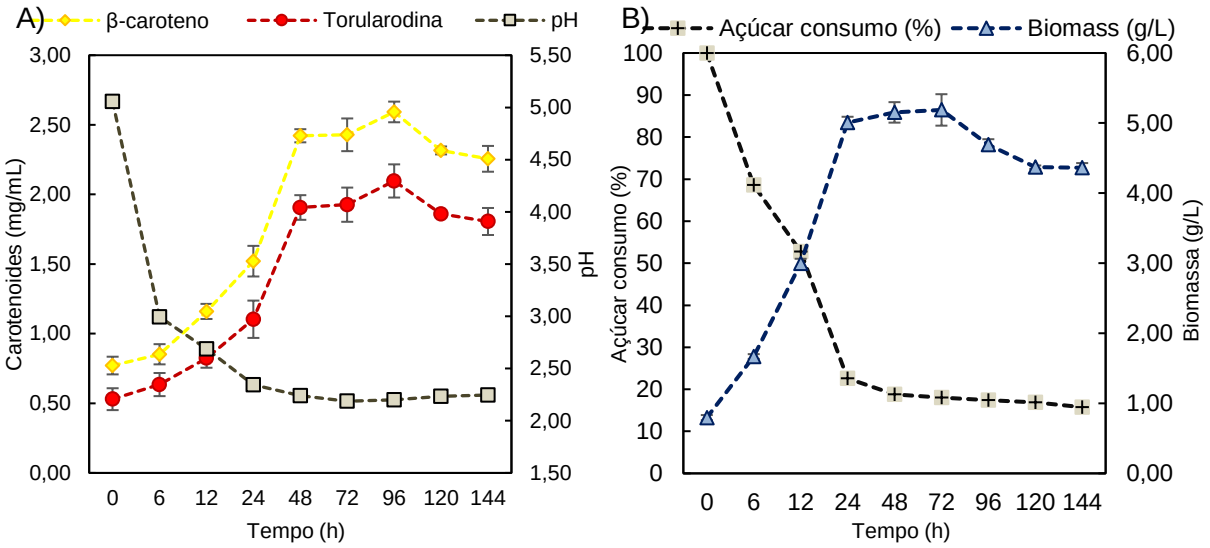
5.5. Cinética de produção de carotenoides

Na cinética de crescimento e produção de carotenoides por *R. glutinis*, além do açúcar consumido foi estudada empregando o meio de cultura otimizado, composto por (% m/v): dextrose (1), KH_2PO_4 (0,052), $MgSO_4.7H_2O$ (0,052), NH_4NO_3 (0,4), extrato de malte (0,793) e Tween 80 (1,71% v/v) e pH inicial de 5,0 A produção máxima de biomassa de 5,19 g/L foi obtida após 48 h de cultivo, conforme ilustrado na Figura 17. Nas primeiras 24 h de cultivo, a levedura já havia utilizado 77,40% da fonte de carbono disponível, e esse consumo aumentou para 84,25% após 144 h.

Em estudo relacionado realizado por Tkáčová, Klempová e Čertík (2018), em que o foco foi investigar a lipogênese e a formação de pigmentos carotenoides por *R. glutinis* em meios com diferentes relações C/N. Eles observaram que relações C/N mais baixas foram mais eficazes para maximizar a produção de carotenoides. Isto porque a depleção de glicose estava diretamente ligada ao aumento substancial na produção de pigmentos carotenoides. Esta relação entre o consumo de glicose e a produção de metabólitos também foi observada no presente estudo. No nosso estudo, embora a açúcar não tenha sido totalmente esgotada, o ponto em que o consumo se manteve relativamente constante coincidiu com o período de produção máxima de carotenoides.

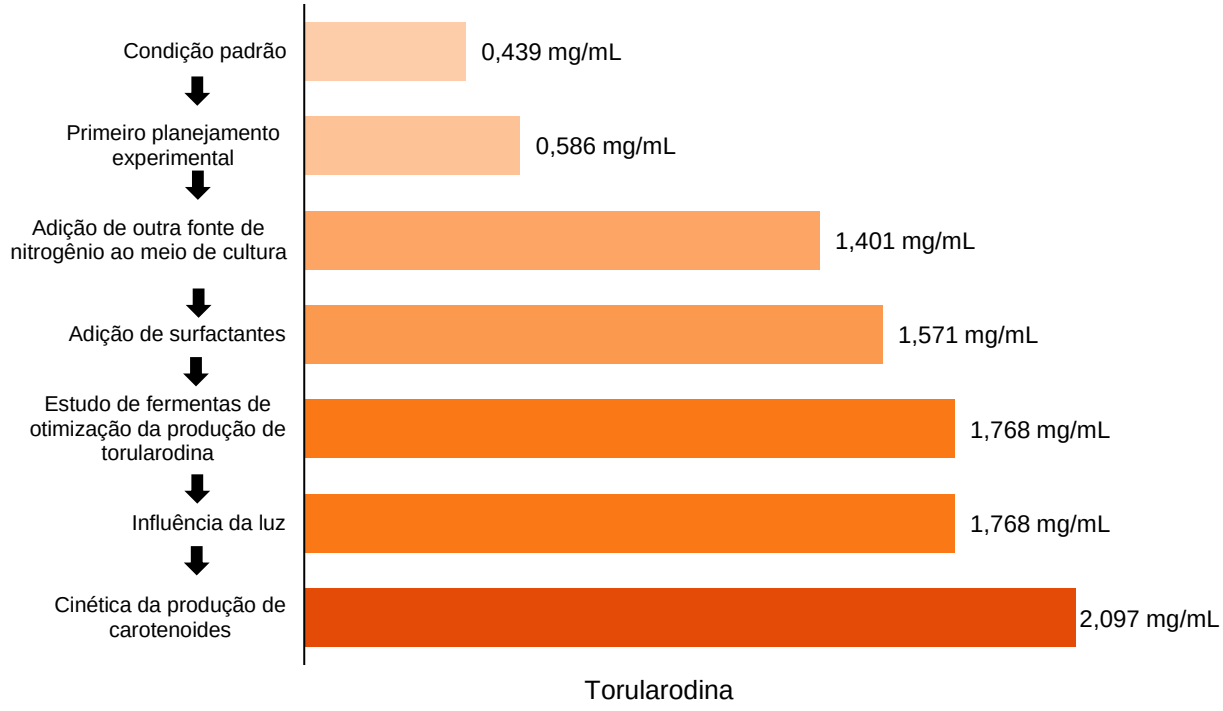
O pH do meio diminuiu significativa durante as primeiras 24 h de cultivo, caindo de 5,06 para 2,34. Como citado anteriormente, pode-se inferir que a formação de ácidos orgânicos, como o ácido mevalônico, pode ter sido responsável por estimular a via MVA, que por sua vez intensifica a produção de carotenoides (Hernandez-Almanza *et al*., 2014; Kot *et al*., 2016; Ma *et al*., 2015). Esta suposição ganha respaldo ao comparar os primeiros experimentos do tipo PB, nos quais o pH final da maioria das tentativas era alcalino (acima de 8), resultando numa produção de aproximadamente 0,57 mg/mL de torularodina. Além disso, estudos anteriores, como o de Ananda e Vadlani (2011), já indicaram que o aumento do ácido mevalônico tem efeito positivo na produção de carotenoides por leveduras vermelhas. Assim, é plausível sugerir que a acidificação do meio durante o cultivo é um fator que influencia significativamente a produção de carotenoides.

Figura 17. Cinética de crescimento e produção de torularodina por *R. glutinis* CCT-2186 durante 144 h de cultivo em agitador orbital a 30°C/170 rpm. A) Avaliação da produção de carotenoides e alterações de pH. B) Avaliação do açúcar consumo e da produção de biomassa. As barras com limite superior e inferior representam o desvio padrão. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.



A Figura 18 apresenta o resumo da ampliação na produção de torularodina conforme os experimentos conduzidos neste trabalho. Houve um incremento na torularodina de cerca de 4,78 vezes (377,45%), evidenciando a relevância de estudar estresse físico e nutrientes como uma ferramenta crucial para potencializar a produção de compostos biológicos.

Figura 18. Apresentação esquemática da condição experimental utilizada e da produção correspondente de torularodina obtidos por meio do cultivo submerso de *R. glutinis*.



5.6. Perfil de ácidos graxos livres

O óleo microbiano é amplamente reconhecido como uma matéria-prima altamente promissora para produtos químicos sustentáveis, uma vez que tem muitas aplicações potenciais nos setores alimentício e químico. Além disso, as leveduras oleaginosas e seus ácidos graxos têm recebido cada vez mais atenção nos últimos anos, assemelhando-se muito ao perfil dos óleos vegetais convencionais comumente usados em aplicações industriais (Xue *et al*., 2018).

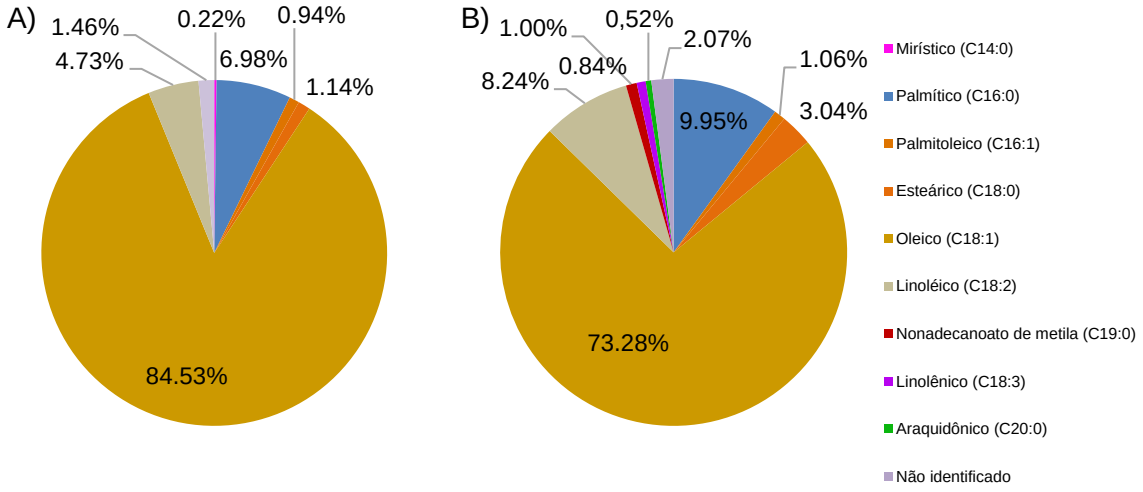
Em um estudo realizado por Llamas *et al.* (2020) que avaliaram cinco leveduras oleaginosas diferentes quanto à sua capacidade de se desenvolver e produzir lipídios usando ácidos graxos voláteis gerados a partir da fermentação anaeróbica de biomassa de microalgas como sua única fonte de carbono e energia, observou-se que os ácidos oleico, palmítico e linoleico constituíam os ácidos graxos predominantes. Esses três ácidos representaram coletivamente mais de 70% do total de lipídios encontrados na composição da levedura, refletindo o perfil de ácidos graxos comumente encontrado em óleos vegetais comuns.

Sob condições específicas de cultivo, certas cepas de levedura podem acumular vários tipos de lipídios, inclusive lipídios neutros. Quando submetida às

condições adequadas, a *R. glutinis* R4 demonstrou a capacidade de gerar lipídios semelhantes a óleos vegetais, apresentando notável teor de 61% de ácido oleico, o que destaca seu potencial para a síntese de biodiesel (Maza *et al*. 2020).

Esse estudo destaca como as diversas condições de cultivo podem afetar significativamente o tipo e o teor de lipídios produzidos, conforme ilustrado na Figura 19, salientando que, a produção dos lipídeos pode ser direcionada baseada na necessidade do consumidor. Observou-se que a cepa de levedura *R. glutinis* sintetizou predominantemente ácido oleico (mais de 70%), seguido por palmítico (mais de 7%) e linoleico (mais de 4%).

Figura 19. Perfil lipídico do extrato rico com carotenoides obtidos a partir da biomassa de *R. glutinis* CCT-2186 quando cultivada (a) com Tween 80 e (b) sem Tween 80.



Atualmente, o ácido oleico, presente no azeite de oliva e nos óleos vegetais, tem ganhado destaque, uma vez que esse ácido graxo monoinsaturado é comumente consumido nas dietas (Tutunchi *et al*., 2020). Estudos recentes mostram que as dietas enriquecidas com ácido oleico podem contribuir para a prevenção da obesidade (Tutunchi *et al*., 2020). Além disso, a ingestão desse ácido contribui para a redução da inflamação intestinal e do crescimento tumoral (Salimonti *et al*., 2020).

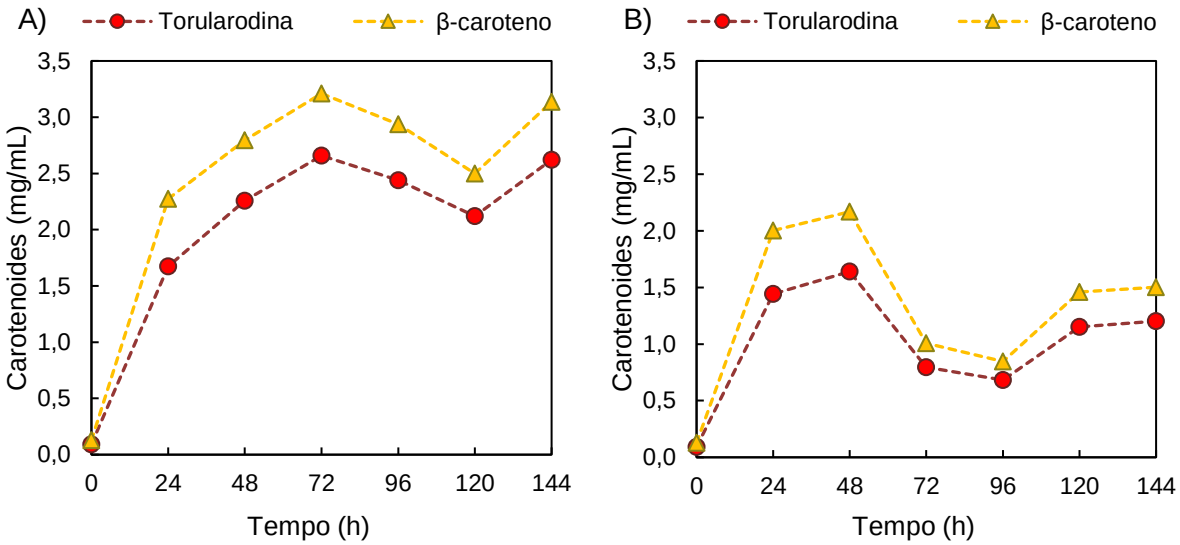
Ademais, de acordo com Salimonti *et al*. (2020), os óleos com alto teor de ácido oleico e baixos níveis de ácidos linoleico são considerados benéficos para a saúde (Salimonti *et al*., 2020). Portanto, a composição de ácidos graxos do óleo obtido no presente trabalho é bastante interessante para melhorar a saúde.

5.7. Produção de carotenoides em biorreator tipo tanque agitado de bancada

A pesquisa sobre as várias condições de produção de carotenoides microbianos em biorreatores tem elucidado os principais parâmetros que influenciam os processos, dependendo do tipo de microrganismo, do meio de cultivo e da configuração do biorreator. Com o objetivo de melhorar a produtividade do processo, a produção de carotenoides naturais por *R. glutinis*, foi investigada mudando a escala de agitador rotativo para biorreator tipo tanque agitado de bancada (4 L) e foi avaliada a relação da agitação e aeração no bioprocesso.

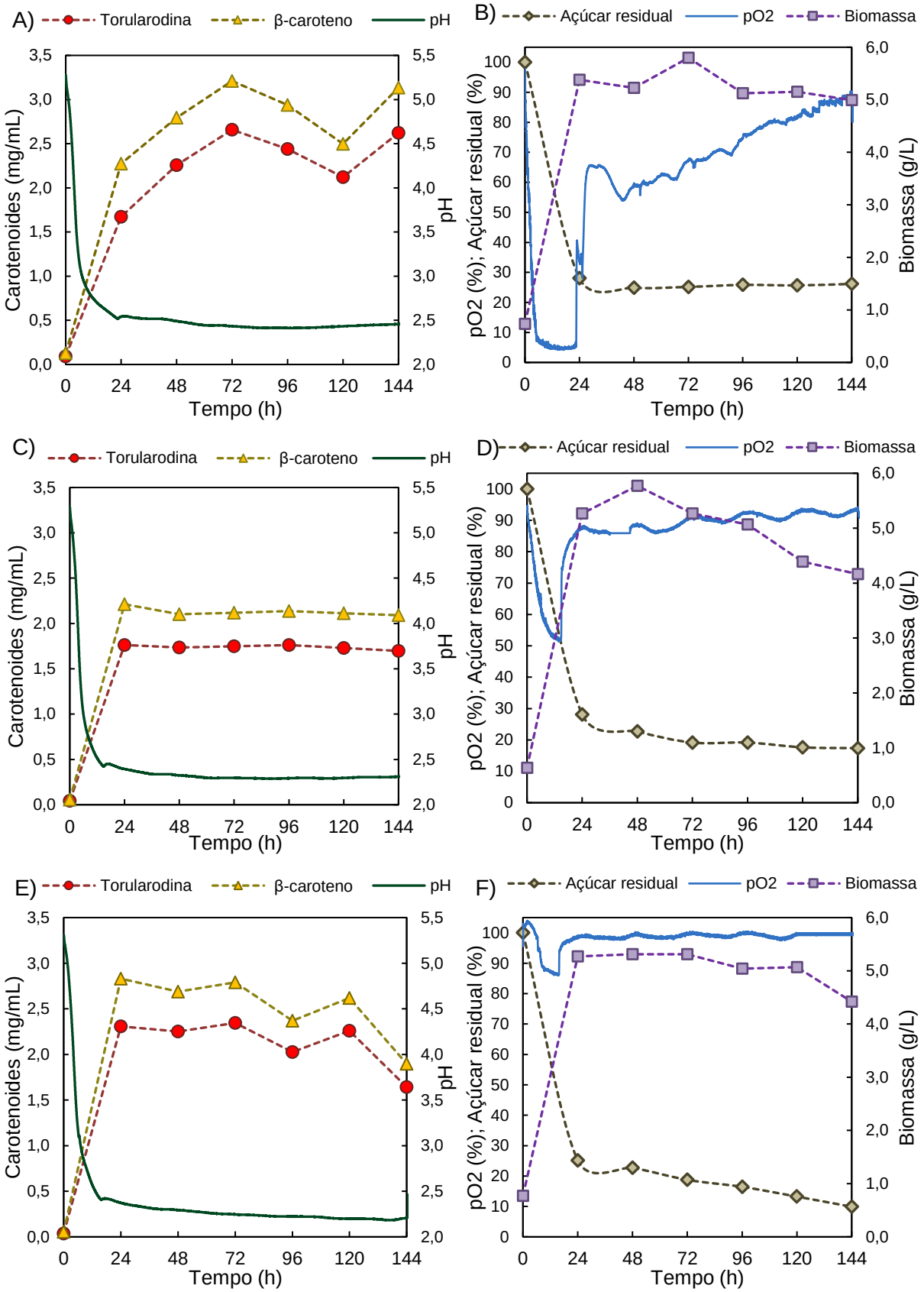
Como observado na seção 5.2, o pH é um fator importante para a produção dos carotenoides pois o pH ideal pode influenciar na catálise de diferentes enzimas e no crescimento celular (Jiang *et al*., 2023) pela levedura supracitada nesse estudo. Diante disso, inicialmente foram fixados os parâmetros: agitação, aeração e temperatura em 300 rpm, 1*vvm* e 30°C, respectivamente, com a finalidade de avaliar cultivos em pH fixo em 5,0 e sem controle de pH. Como é possível observar na Figura 20 na condição com o controle do pH (Figura 20.B), houve menor produção de carotenoides e o pico de produção de carotenoides ocorreu após 48 h de bioprocesso, seguido de uma queda e um novo pico após 120 h, porém, mesmo no maior pico, observa-se menor produção de torularodina quando comparado com a condição sem controle de pH (Figura 20.A). O ajuste do pH em 5 durante todo o processo pode afetar várias etapas da via metabólica envolvida na síntese de carotenoides, incluindo a disponibilidade de precursores, atividade enzimática e estabilidade dos carotenoides, justificando a menor produção de carotenoides nessa condição (Figura 20.B). Acredita-se também que o ajuste contínuo do pH para 5 dificulta majoritariamente a síntese de carotenoides devido a alteração da via do mevalonato.

Figura 20. Cultivo de *R. glutinis.* A) sem controle; e B) e com controle de pH. Cultivo realizado durante 144 horas de cultivo em biorreator tanque agitado a 30°C/1 *vvm*/300 rpm. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.



Após observar que o controle de pH durante todo o bioprocesso inibe a produção de carotenoides foi estudado o efeito conjunto das agitações e aeração no bioprocesso em questão. A Figura 21 apresenta a demonstração do impacto da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de biomassa e carotenoides.

Figura 21. Cultivo de *R. glutinis* em biorreator tipo tanque agitado com diferentes taxas de agitação e aeração realizado durante 144 h. A e B) 300 rpm e 1*vvm*, C e D) 500 rpm e 1*vvm*, E e F) 700 rpm e 1*vvm*. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.

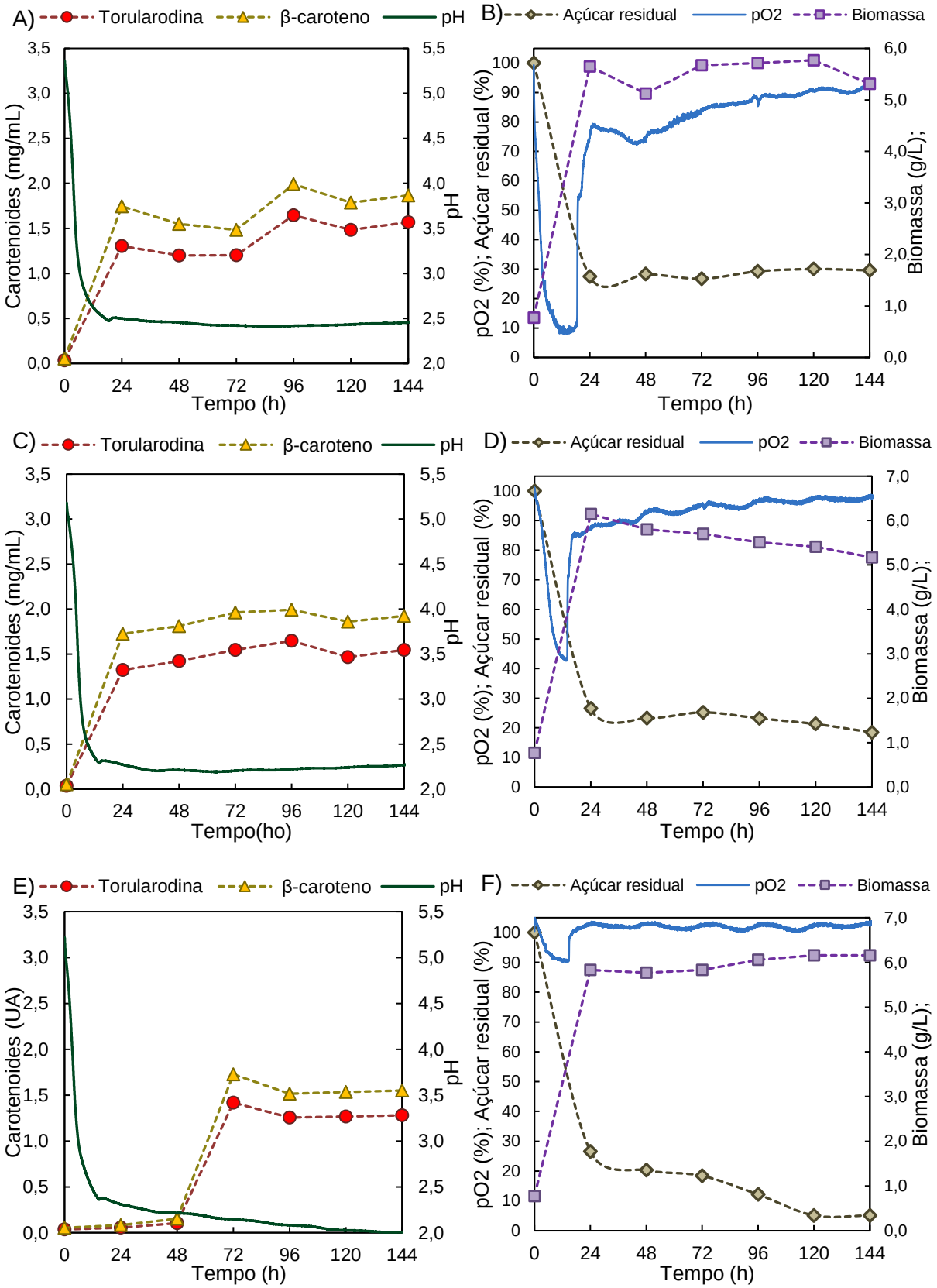


Na Figura 21, é possível observar que ao longo de 144 h, o aumento da taxa de agitação de 300 para 700 rpm reduziu a produção de carotenoides e biomassa. A concentração máxima de biomassa atingiu cerca de 6 g/L, em 72 h para 300 rpm e em 48 h para 500 rpm, conforme indicado nas Figuras 21 (B e D). Além disso, observa-se uma relação inversamente proporcional entre o aumento da agitação e o oxigênio dissolvido, o que influencia diretamente na produção de carotenoides, como evidenciado nas Figuras 21 (B, D e F). A combinação de 300 rpm e 1 *vvm* se destacou em relação às demais configurações na produção de carotenoides. Esses resultados corroboram com as descobertas de Mussagy *et al*. (2021), que demonstraram melhorias significativas na produção de β-caroteno, torularodina e toruleno ao aumentar a taxa de agitação de 150 rpm para 350 rpm e introduzir uma segunda fonte de aeração com 1 *vvm* de ar no processo de cultivo de *R. glutinis*. Os níveis desses carotenoides aumentaram de forma notável, passando de 220,93 para 297,84 µg/mL para β-caroteno, de 252,01 para 286,06 µg/mL para torularodina e de 28,20 para 37,35 µg/mL para toruleno.

A eficiência na transferência de oxigênio é impulsionada pela agitação, desempenhando um papel central nesse processo. Uma abordagem particularmente eficaz é a utilização de impulsores de fluxo radial, como as turbinas Rushton, que otimizam a circulação do fluido no biorreator ao modificar seu padrão de fluxo. Essa modificação facilita a dispersão das bolhas de ar, resultando em uma mistura mais homogênea e aumentando a eficiência geral do sistema (Ribeiro *et al.,* 2023). Vale ressaltar a produção de carotenoides por certos microrganismos como a *R. toruloides* aeróbica é influenciada não apenas pela velocidade de agitação, mas também pelo nível de oxigênio dissolvido (Ribeiro *et al.,* 2023). Assim, o estudo da relação aeração e agitação torna-se fundamental a fim de incrementar a produção de carotenoides.

Em relação ao comportamento do pO2, uma tendência semelhante foi observada quando o valor de *vvm* foi aumentado, ou seja, quando a rotação passou de 300 para 700 rpm, houve diminuição no percentual de oxigênio dissolvido, conforme demonstrado na Figura 22. Além disso, a relação sinérgica entre agitação e aeração neste estudo evidenciou que níveis mais baixos de agitação e aeração foram fundamentais para o aumento dos carotenoides, como pode ser observado ao comparar as Figuras 21 e 22.

Figura 22. Cultivo de *R. glutinis* em biorreator tipo tanque agitado com diferentes taxas de agitação e aeração realizado durante 144 h. A e B) 300 rpm e 1,5 *vvm*, C e D) 500 rpm e 1,5 *vvm*, E e F) 700 rpm e 1,5 *vvm*. As linhas pontilhadas destacam a tendência da curva.



Para todos os ensaios realizados, ficou evidente que a queda do pO_2 teve influência significativa na produção de biomassa. Além disso, observou-se que em todos os cultivos em biorreator, o pH final foi inferior ao pH inicial, o que corrobora com a hipótese de formação de ácidos orgânicos durante o cultivo citada anteriormente. Um ponto notável foi observado no cultivo com condições de 700 rpm e 1,5 *vvm* (Figura 22F), o qual se diferenciou dos demais em relação ao consumo de açúcar. Este cultivo específico também produziu mais biomassa do que os demais, evidenciando que o consumo da fonte de carbono tem papel crucial na produção de biomassa.

Para correlacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) com o crescimento do microrganismo e a produção de carotenoides, o k_La foi calculado para o meio de cultivo denominado k_La referência, que consiste em água destilada sem a presença do microrganismo, sob diversas condições de oxigenação e frequência de rotação. Assim, para obter dados quantitativos sobre a capacidade de transferência de oxigênio dentro do vaso de fermentação para o impelidor (turbina Rushton) no início do cultivo, o k_La fornece informações importantes.

O aumento da oxigenação resultou em um aumento do k_La conforme demostrado na Tabela 9. Esse comportamento indica que a maior disponibilidade de oxigênio no meio promove uma transferência mais eficiente desse gás, refletindo-se nos valores elevados de k_La.

Tabela 9. Coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio (k_La)

Condição	**k_La (1/s)**	**EP* (1/s)**	β-caroteno (mg/mL) a 72 h	Torularodina (mg/mL) a 72 h
300 rpm/1,0 *vvm*	0,0082	0,0001	3,201	2,658
300 rpm/1,5 *vvm*	0,0103	0,0001	1,484	1,202
500 rpm/1,0 *vvm*	0,0142	0,0004	2,118	1,748
500 rpm/1,5 *vvm*	0,0164	0,0003	1,963	1,548

*Erro propagado

Quando comparado os valores de k_La com os gráficos das Figuras 21 e 22 e a Tabela 9 é possível observar que o aumento da transferência do gás prejudicou a produção de torularodina por *R. glutinis.* Esta condição ótima encontrada no presente estudp se aproxima da observada por Mussagy *et al.,* (2021), a qual obtiveram um aumento significativo na produção de β-caroteno (de 220,93 para 297,84 µg/mL), torularodina (de 252,01 para 286,06 µg/mL) e toruleno (de 28,20 para 37,35 µg/mL)

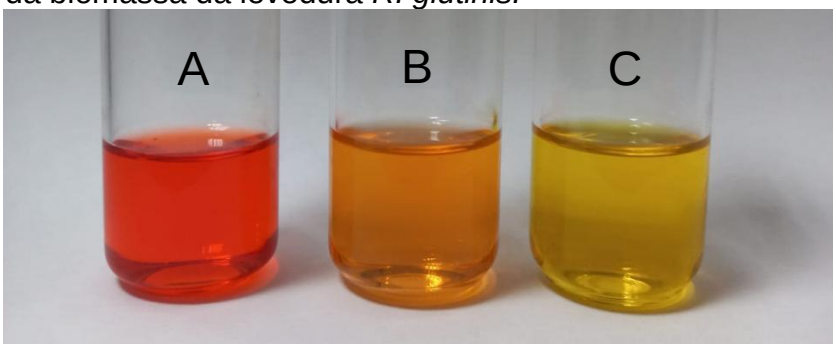
quando elevou a taxa de agitação (de 150 rpm para 350 rpm) e adicionar uma fonte de aeração (1 vvm de ar) no cultivo de *R. glutinis*.

Diante do exposto na Tabela 9, o uso de turbinas tipo Rushton são ideias para a produção de carotenoides em biorreator de bancada, pois quando comparada com outras turminhas como por exemplo a orelha de elefanta, a transferência de massa é menor, pois como observado por Buffo *et al.,* (2016) a configuração dos impelidores do tipo orelha de elefante demonstrou uma maior eficiência na transferência de massa, aproximadamente 68%, em comparação com as turbinas Rushton. Alem disso, esse tipo de turbina por ser um impulsor de fluxo radial facilita a dispersão das bolhas de ar e melhora a eficiência da mistura (Ribeiro *et al.*, 2023)

5.8. Isolamento dos carotenoides produzidos por *R. glutinis*

A partir do HPLC preparativo foi possível separar os três carotenoides (Figura 23) presentes no extrato obtido da biomassa da *R. glutinis*. Os estudos de RMN (Anexo 3) e a comparação com a predição das moléculas indicaram que a pureza da fração de torularodina era de 83,15%, a do β-caroteno de 81,88% e a do toruleno de 80,63%. Alem disso, o extrato era comporto por 57,39% de torularodina, 18,16% de toruleno e 24,45% de β-caroteno.

Figura 23. A) Torularodina, B) toruleno e C) β-caroteno obtidos do extrato rico em carotenoides da biomassa da levedura *R. glutinis.*

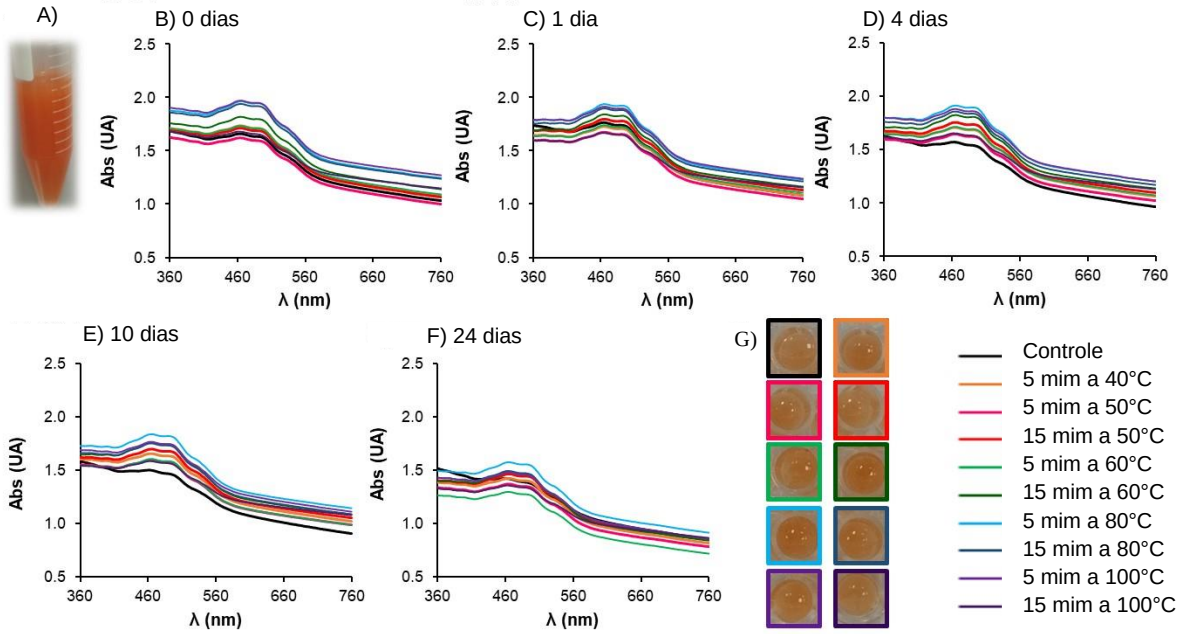


5.9. Aplicação de carotenoides como corantes para gelatina

Para verificar o potencial de aplicação do extrato de carotenoides como corantes alimentícios, avaliamos seu uso em gelatinas comestíveis. Considerando a preparação usual de gelatinas, avaliamos a manutenção da absorbância dos carotenoides na gelatina após 5 e 15 min em altas temperaturas (50 a 100 °C) e após

a preservação a 4 °C (temperatura de geladeira) por até 24 dias. Os resultados são apresentados na Figura 24.

Figura 24. Aplicação de carotenoides como corantes em gelatina comestível. A) Foto da suspensão aquosa do extrato de carotenoides (6 mg/mL). Espectro de absorção da suspensão aquosa de extrato de carotenoides (3 mg/mL, controle) e carotenoides em gelatina (3 mg/mL de carotenoides e 24 mg/mL de gelatina) após diferentes tratamentos térmicos e B) 0 dias, C) 1 dia, D) 4 dias, E) 10 dias e F) 24 dias a 4 °C. Os resultados são a média de uma triplicata após a remoção do branco (água ou gelatina). G) Fotos de carotenoides em gelatina (3 mg/mL de carotenoides e 24 mg/mL de gelatina) após diferentes tratamentos térmicos e 10 dias a 4 °C. A cor da borda das fotos indica a amostra de acordo com a legenda da figura.



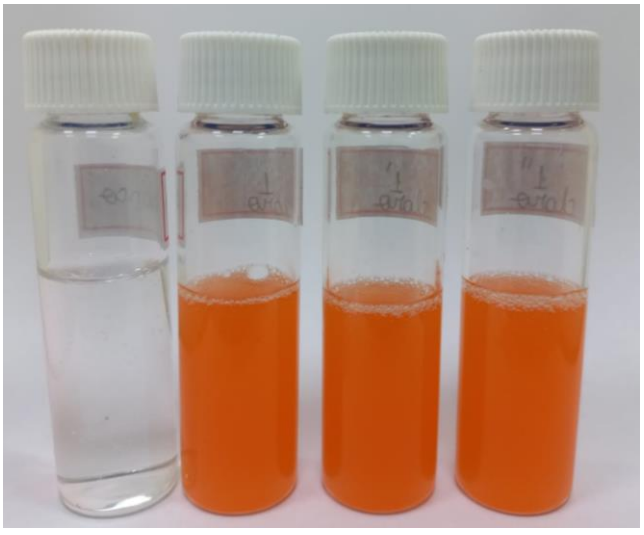
Apesar da baixa solubilidade geral dos carotenoides em água, 6 mg/mL do extrato em H_2O resultaram em uma mistura visualmente homogênea de cor laranja intensa, como visto na Figura 24.A. Quanto aos tratamentos térmicos dos carotenoides em gelatina, a Figura 24.B mostra que eles não suprimiram nem alteraram o perfil da absorbância das biomoléculas quando comparados ao controle em água a 25 °C. Por outro lado, 15 min a 60 °C e 5 e 15 min a 80 e 100 °C (temperaturas mais altas) aumentaram ligeiramente a absorbância. Esse fenômeno provavelmente se deve ao fato de as temperaturas mais altas aumentarem a solubilidade da suspensão do carotenoide na água e na gelatina, aumentando sua absorbância. Além disso, os carotenoides não foram degradados após 10 dias na gelatina como pode ser observado a partir da manutenção da absorbância no dia 0 (1,7 UA_{460nm} e 2,0 UA_{500nm}) e no dia 10 (1,7 UA_{460nm} e 1,9 UA_{500nm})., conforme

apresentado nas Figuras 24.B, 24.C, 24.D e 24.E. No entanto, houve ligeira diminuição na absorbância após 24 dias (picos com absorbância entre 1,3 UA_{460nm} e 1,6 UA_{500nm}, cerca de 20% de diminuição em relação a 0 dias) na Figura 24.F. Além disso, a Figura 24.G mostra que a gelatina tinha uma cor laranja homogênea e intensa para todos os tratamentos, mesmo após 10 dias a 4 °C. Considerando a recomendação usual de armazenar a gelatina por 7 a 10 dias na geladeira, esse resultado confirma a viabilidade de aplicar o extrato de carotenoides como corante alimentar para gelatinas comestíveis.

5.10. Aplicação de carotenoides como colorantes para sabonete líquido

Para evidenciar as propriedades antioxidantes e sua capacidade de agregar cor em substâncias do extrato rico em carotenoides derivado da *R. glutinis*, este extrato foi introduzido como um aditivo na fabricação de sabonete líquido com base transparente. Vale salientar que o sabonete de carotenoides foi formulado com a inclusão direta do extrato final de carotenoides como aditivo, sem passar por nenhum procedimento adicional de refinamento ou purificação (Figura 25).

Figura 25. Formulação dos sabonetes líquidos: Sabonete de controle (sem adição de extratos de carotenoides) e sabonetes de carotenoides (com adição do extrato de carotenoides).



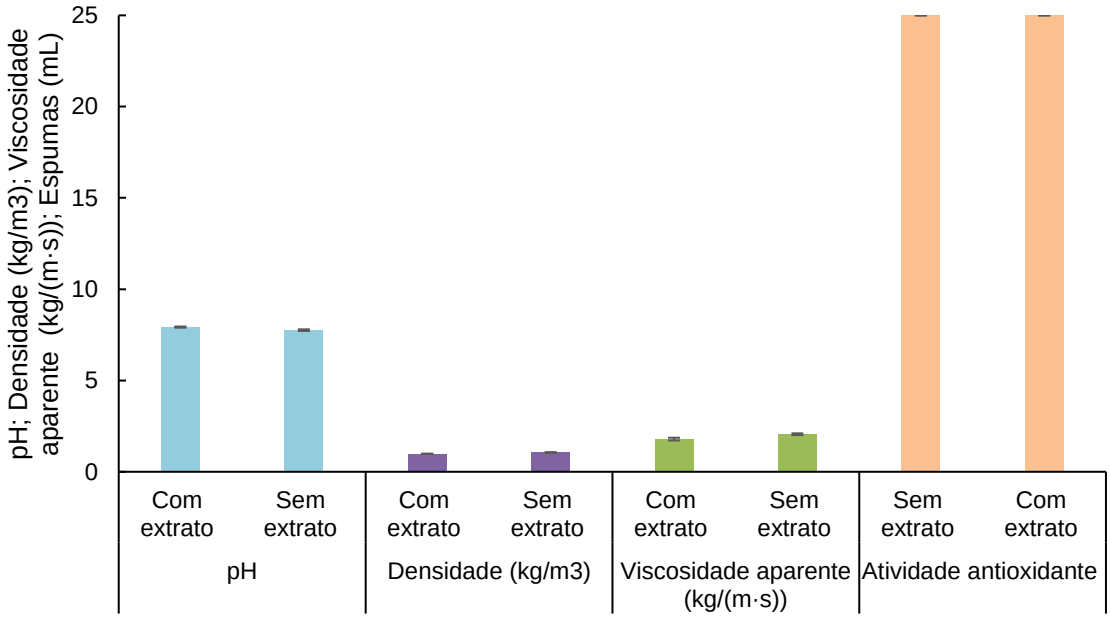
Uma análise comparativa entre duas formulações de sabonete revelou que aquele contendo carotenoides apresenta uma atividade antioxidante superior, aproximadamente 1,3 vezes maior que o sabonete de referência. A inclusão de extratos de carotenoides na composição do sabonete aumentou de 5,5% na atividade

antioxidante. A capacidade de doação de hidrogênio dos carotenoides, como a torularodina foi evidenciada pelas suas atividades na eliminação de DPPH. É importante ressaltar que a concentração do extrato rico em carotenoides está diretamente relacionada à sua capacidade antioxidante; assim, concentrações mais baixas resultam em menor atividade antioxidante quando aplicadas, conforme constatado neste estudo.

Ribeiro *et al.* (2023) observaram que o extrato produzido pelo microrganismo *Rhodotorula toruloides* pode ser incorporado com sucesso na formulação de sabonete em barra, resultando em um incremento na atividade antioxidante, corroborando os achados do presente estudo. Portanto, a inclusão de extratos de carotenoides como aditivos em produtos cosméticos, incluindo sabonetes, mostra-se uma estratégia promissora para reforçar a proteção dos consumidores contra os danos causados pelos radicais livres na pele.

Quando comparado o pH, densidade, viscosidade aparente e volume de espuma, não houve diferença, como representado na Figura 26. Indicando que o corante apenas incrementou a cor.

Figura 26. Extrato rico em carotenoides obtidos por cultivo submerso de *R. glutinis* empregado como aditivo em base de sabote líquido transparente.



Com o passar do tempo foi observada uma degradação na cor do sabonete líquido, contudo, notou-se que a coloração do produto armazenado em frasco transparente permaneceu mais intensa do que aquele guardado em frasco âmbar.

Essa disparidade pode ser atribuída ao fato de que o extrato utilizado na formulação do sabonete continha mais de um carotenoide. A exposição à luz pode ter desempenhado um papel crucial nesse fenômeno, influenciando na conversão de um carotenoide em outro através da quebra de ligações químicas. Essa transformação pode ter impactado diretamente na durabilidade e na intensidade da cor. As coordenadas de cor do sistema CIE L*C*h estão apresentadas na Tabela 10, enquanto a degradação visual da cor foi analisada utilizando o site Nix Sensor, conforme mostrado na Tabela 11. Vale ressaltar que as cores estão dispostas de forma próxima com o intuito de facilitar a visualização da degradação ao longo do tempo.

Tabela 10. Mudança quantitativa de cor para o sabonete líquido aditivado com o colorante produzidos por *R. glutinis*.

Tempo (h)	**Armazenamento**			
	Frascos Transparente		**Frascos tipo âmbar**	
	Croma (C*)	Ângulo de matriz (H°)	Croma (C*)	Ângulo de matriz (H°)
0	19,48	50,16	19,48	50,16
120	19,09	53,03	18,19	54,04
336	17,00	55,67	16,91	57,48
720	14,16	64,88	12,83	67,55
2160	11,18	69,68	11,61	70,16

Tabela 11. Mudança qualitativa de cor para o sabonete líquido aditivado com o colorante produzidos por *R. glutinis*. Imagens obtidas mediante o software *NIX color sensor.*

Tempo (h)	**Armazenamento**	
	Frascos Transparente	**Frascos tipo âmbar**
0		
120		
366		
720		
2160		

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi explorado o impacto de vários fatores de estresse, como componentes nutricionais, exposição à luz e velocidade de agitação sobre o cultivo da levedura *R. glutinis* CCT-2186 em agitador rotativo. O extrato de malte aumenta significativamente a produção de carotenoides, em especial a torularodina. Consequentemente, foi possível substituir a asparagina no meio de cultura. Além disso, a adição de Tween 80 associado a extensão do tempo de cultivo para 96 h aumentaram 377,68% na produção de torularodina em agitador orbital.

O estudo destaca o impacto significativo das condições de cultivo no aumento da produção de carotenoides e demonstra a eficácia das técnicas de redes neurais artificiais na previsão da produção. Especificamente, a previsão da rede neural para a produção de torularodina se aproximou dos valores experimentais, demonstrando sua funcionalidade. Comparando a MP e a RNA, os resultados foram próximos, mostrando que ambas as técnicas foram usadas para otimizar a composição do meio de cultura.

Em relação ao emprego do biorreator, os resultados da agitação a 300 rpm e da aeração a 1 *vvm* demonstraram um impacto significativo na produção de carotenoides, especialmente a torularodina. Esses parâmetros de estresse se mostraram cruciais para otimizar a síntese desses compostos desejados. Além disso, a composição dos lipídios produtivos no meio de cultura pode ser alterada com variações de nutrientes. Por fim, foi demonstrada a viabilidade de utilizar o extrato de carotenoide como colorante alimentar em gelatina comestível, como aditivo para cosméticos em sabonete líquido.

Diante do exposto, conclui-se que a produção de torularodina pode ser significativamente incrementada em comparação à produção de toruleno e de β-caroteno. Os resultados obtidos ao longo do trabalho demonstram que, mediante a otimizações específicas nos processos e condições de cultivo, é possível aumentar a eficiência de produção da levedura e consequentemente a quantidade de torularodina produzida. Portanto, o potencial de incremento na produção de torularodina é uma realidade, apresentando-se como uma alternativa viável e promissora.

REFERÊNCIAS

ALLAHKARAMI, S. *et al.* Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of *in vitro* carotenoid production. **Biotechnology Reports**, v. 32, p. e00687, 2021.

ANANDA, N.; VADLANI, P. V. Substrates Influence Stimulatory Effect of Mevalonic Acid on Carotenoid Production in Red Yeasts. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 310–314, 2011.

ASHOKKUMAR, V. *et al.* Technological advances in the production of carotenoids and their applications– A critical review. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128215, 2023.

BANZATTO, D.; FREITA, L. A. DE; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 14–18, 2013.

BAREITHER, R. *et al*. Automated disposable small scale reactor for high throughput bioprocess development: A proof of concept study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 12, p. 3126–3138, 2013.

BCC RESEARCH, 2022. Global Carotenoids Market Size, Share & Growth Analysis Report. Recuperado 25 de fevereiro de 2024, de https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html

BEJANI, M. M.; GHATEE, M. A systematic review on overfitting control in shallow and deep neural networks. **Artificial Intelligence Review**, v. 54, n. 8, p. 6391–6438, 2021.

BERNSTEIN, P. S*. et al.* Lutein, zeaxanthin, and *meso*-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 50, p. 34–66, 1 jan. 2016.

BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 12–16, 2001.

BORBA, C. M. *et al*. CAROTENOID PRODUCTION BY *Sporidiobolus pararoseus* IN AGROINDUSTRIAL MEDIUM: OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS IN SHAKE FLASKS AND SCALE-UP IN A STIRRED TANK FERMENTER. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, p. 509–520, jun. 2018.

BUFFO, M. M. *et al*. Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 130–139, out. 2016.

CARDOSO, L. A. C. *et al.* Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 374–379, 2016.

CERRI, M. O. *et al.* A new approach for kLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 12, p. 3061–3069, 2016.

CHEN, H.-Y*. et al.* Progress in biological activities and biosynthesis of edible fungi terpenoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 25, p. 7288–7310, 3 out. 2023.

CLYDESDALE, F. M. Color Perception and Food Quality. **Journal of Food Quality**, v. 14, n. 1, p. 61–74, 1991.

DA SILVA, J. *et al.* Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, p. 101847, 2020.

DAS, A. *et al.* An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic tools. **Applied Microbiology Biotechnology**, 77, p. 505-512, 2007.

DE OLIVEIRA, F. *et al.* Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6529–6541, 2019.

DE SOUZA CORREIA COZENTINO, I. *et al.* Development of a potentially functional chocolate spread containing probiotics and structured triglycerides. **LWT**, v. 154, p. 112746, 2022.

DIMITROVA, S. *et al.* Production of Metabolites with Antioxidant and Emulsifying Properties by Antarctic Strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL_1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 301–311, 2013.

DINER, B. A. *et al*. Synthesis of Heterologous Mevalonic Acid Pathway Enzymes in *Clostridium ljungdahlii* for the Conversion of Fructose and of Syngas to Mevalonate and Isoprene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 1, p. e01723-17, jan. 2018.

DOS REIS, B. D. *et al.* Assessment of artificial neural networks to predict red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 1, p. 147–156, 2023.

DU, C. *et al*. The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 469, 4, 22, p. 1146-1152, 2016.

DU, C. *et al.* Torularhodin, isolated from *Sporidiobolus pararoseus*, inhibits human prostate cancer LNCaP and PC-3 cell growth through Bcl-2/Bax mediated apoptosis and AR down-regulation. **RSC Advances**, v. 5, n. 129, p. 106387–106395, 2015.

DUBOCK, A. Golden Rice: To Combat Vitamin A Deficiency for Public Health. *In*: QUEIROZ ZEPKA, Leila; VERA DE ROSSO, Veridiana; JACOB-LOPES, Eduardo (org.). **Vitamin A**. IntechOpen, 2019. Disponível em: https://www.intechopen.com/books/vitamin-a/golden-rice-to-combat-vitamin-a-deficiency-for-public-health. Acesso em: 25 fev. 2024.

ESPINEL-RÍOS, S. *et al*. Toward a modeling, optimization, and predictive control framework for fed-batch metabolic cybergenetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 121, n. 1, p. 366–379, 2024.

EVANS, J. R.; LAWRENSON, J. G. Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2017.

GONG, G.; ZHANG, X; TAN, T. Simultaneously enhanced intracellular lipogenesis and β-carotene biosynthesis of *Rhodotorula glutinis* by light exposure with sodium acetate as the substrate. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 122274, 2020.

GOODWIN, T.W. [29] Biosynthesis of carotenoids: An overview. *In*: METHODS IN ENZYMOLOGY, **Elsevier**, 1993. v. 214, p. 330–340.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. *et al. Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, v. 5, p. 64–72, 2014.

HERZ, S. *et al.* Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). **Phytochemistry**, v. 68, n. 20, p. 2503–2511, 2007.

IGREJA, W. S. *et al.* Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], v. 22, n. 16, p. 8819, 2021.

IRAZUSTA, V. *et al.* Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 803–809, 2013.

JABARIVELISDEH, B. *et al.* Adaptive predictive control of bioprocesses with constraint-based modeling and estimation. **Computers & Chemical Engineering**, v. 135, p. 106744, 2020.

JASWIR, I.; NOVIENDRI, D.; HASRINI, R. F.; OCTAVIANTI, F. Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5, p. 7119-7131, 2011.

JIANG, W.*et al.* Co-production of lipids and carotenoids by *Rhodosporidium toruloides* from cane molasses using temperature and pH shifting strategies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 17, n. 4, p. 873–883, 2023.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 539–550, 1 jan. 2000.

KANZY, H. *et al.* Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p. 456–469, 2015.

KIM, S. G.; Chu, K. H.; Kim, E. Y. Determination of optimum fermentation conditions for carotenoid production by *Rhodotorula aurantiaca* K-505. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 216–220, 2011.

KIRTI, K. *et al.* Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. **Advances in Biology**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

KONG, W. *et al.* Light irradiation can regulate the growth characteristics and metabolites compositions of *Rhodotorula mucilaginosa*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 5509–5517, 2019.

KOT, A. M. *et al. Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6103–6117, 2016.

KOT, A. M. *et al.* Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 49, 2018.

KUZUYAMA, T. Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for the Biosynthesis of Isoprene Units. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 8, p. 1619–1627, 1 jan. 2002.

LATHA, B.V *et al.* Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. **Indian J. Biotechnol**., v. 4, n. 353–357, 2005.

LI, X. *et al.* Torularhodin Alleviates Hepatic Dyslipidemia and Inflammations in High-Fat Diet-Induced Obese Mice via PPARα Signaling Pathway. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6398, 2022.

LI, Y. *et al.* The Application of Natural Carotenoids in Multiple Fields and Their Encapsulation Technology: A Review. **Molecules**, v. 29, n. 5, p. 967, jan. 2024.

LIMA, C. A. *et al.* Process development and techno-economic analysis of co-production of colorants and enzymes valuing agro-industrial citrus waste. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 35, p. 101204, 2023.

LIN, L.; XU, J. Fungal Pigments and Their Roles Associated with Human Health. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 280, 2020.

LIU, C. *et al.* Torularhodin Ameliorates Oxidative Activity in Vitro and d-Galactose-Induced Liver Injury via the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 36, p. 10059–10068, 2019.

LIU, C. *et al.* Torularhodin-Loaded Bilosomes Ameliorate Lipid Accumulation and Amino Acid Metabolism in Hypercholesterolemic Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 7, p. 3250–3260, 2023.

LIU, Y-S; WU, J-Y; HO, K-P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 331–335, 2006.

LIYANAARACHCHI, V. C.*et al.* Investigation of the Effect of Organic and Inorganic Carbon on Biomass Production and Astaxanthin Accumulation of the Microalga *Haematococcus pluvialis* Using Artificial Neural Network. *In*: 2020 IEEE 17TH INDIA COUNCIL INTERNATIONAL CONFERENCE (INDICON), 2020, New Delhi, India. **2020 IEEE 17th India Council International Conference (INDICON)**. New Delhi, India: IEEE, 2020. p. 1–6.

LLAMAS, M. *et al.* Screening of oleaginous yeasts for lipid production using volatile fatty acids as substrate. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, p. 105553, 2020.

MA, T.; DENG, Z.; LIU, T. Microbial production strategies and applications of lycopene and other terpenoids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 15, 2015.

MACHADO, W.R. C. *et al.* Evaluation of the process conditions for the production of microbial carotenoids by the recently isolated *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. e2018267, 2019.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A.R. P. Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 109–115, 2012.

MALTSEV, Y. *et al.* Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 1060, 2021.

MANDENIUS, C.-F.; BRUNDIN, A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 6, p. 1191–1203, 2008.

MANIKANDAN, K.; FELIX, N.; PRABU, E. A review on the application and effect of carotenoids with respect to canthaxanthin in the culture of fishes and crustaceans. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 8, n. 5, p. 128–133, 2020.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural Medicines**, v. 74, n. 1, p. 1–16, 2020.

MAPELLI-BRAHM, P*. et al.* The impact of fermentations processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: an overview. **Trends in Food Science & Technology**, 99, 389-401, 2020.

MAZA, D. D. *et al.* Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 310, p. 21–31, 2020.

MENDES-SILVA, T. D. C. *et al.* Biotechnological potential of carotenoids produced by extremophilic microorganisms and application prospects for the cosmetics industry. **Advances in Microbiology**, 10, 397-410, 2020.

MENDONÇA, E. R.; CAVALCANTI, L. N.; MARTINS, P. L. G. Corantes na Indústria de Alimentos. 2021.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. e3164312, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIZIORKO, H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 505, n. 2, p. 131–143, jan. 2011.

MOLINÉ, M. *et al.* Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1145–1151, 2010.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Microbial torularhodin – a comprehensive review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 540–558, 2023.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Protic Ionic Liquids as Cell-Disrupting Agents for the Recovery of Intracellular Carotenoids from Yeast *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 16765–16776, 2019.

MUSSAGY, C. U.; DE OLIVEIRA, F.ERNANDA; SANTOS-EBINUMA, V. C. Natural Colorants from Fungi. *In*: **HANDBOOK OF NATURAL COLORANTS**. [*S. l.*]: John Wiley & Sons, 2023. p. 391-415.

MUSSAGY, C. U.; RIBEIRO, H. F.; PEREIRA, J. F. B. *Rhodotorula* sp. as a cell factory for production of valuable biomolecules. **Advances in Applied Microbiology**. [*S. l.*]: Academic Press, 2023.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. **Biochemical Engineering Journal**, v. 165, p. 107827, 2021.

NDAYISHIMIYE, J.; CHUN, B. S. Optimization of carotenoids and antioxidant activity of oils obtained from a co-extraction of citrus (Yuzu ichandrin) by-products using supercritical carbon dioxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 106, p. 1–7, 1 nov. 2017.

NOUR, V. *et al* Effect of carotenoids, extracted from dry tomato waste, on the stability and characteristics of various vegetable oils. **Grasas y Aceites**, v. 69, n. 1, p. e238–e238, 2018.

OCHOA-VIÑALS, N*. et al.* Current Advances in Carotenoid Production by *Rhodotorula sp*. **Fermentation**, v. 10, n. 4, p. 190, abr. 2024.

PARK, H.-A. *et al*. Anti-Apoptotic Effects of Carotenoids in Neurodegeneration. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 15, p. 3453, 29 jul. 2020. .

PHAM, K. D.*et al.* Effect of light on carotenoid and lipid production in the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 84, n. 7, p. 1501–1512, 2020.

RABBANI, V*. et al.* Improvement and prediction of the extraction parameters of lupeol and stigmasterol metabolites of *Melia azedarach* with response surface methodology. **BMC Biotechnology**, v. 24, p. 39, 7 jun. 2024.

RAKICKA, M. *et al*. Enhanced production of erythritol and mannitol by Yarrowia lipolytica in media containing surfactants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 417–423, 2016.

RAM, S. *et al*. Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: a review of its applications, opportunities and challenges. **Journal of Functional Foods**, 67, 103867, 2020.

RAMEL, F. *et al.* Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1267–1278, 2012.

RAPOPORT, A. *et al*. Carotenoids and some other pigments from fungi and yeasts. **Metabolites**, 11, 92, 2021.

RIBEIRO, R. M. M. G. P. *et al.* Synergistic Effects of Stirring and Aeration Rate on Carotenoid Production in Yeast *Rhodotorula toruloides* CCT 7815 Envisioning Their Application as Soap Additives. **Fermentation**, v. 9, n. 9, p. 828, 2023.

RISLA, K. R. *et al.* FORMULATION OF A NATURAL LIQUID SOAP ENRICHED WITH CAROTENOIDS FROM PALMYRAH FRUIT PULP AND ROCK SALT. *In*: 2021. University of Vavuniya, 2021.

RODRÍGUEZ, N. A. T. *et al.* Optimization of Total Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* from Artichoke Agroindustrial Waste Using Response Surface Methodology. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 79, n. 2, p. 111–121, 2023.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. *et al.* A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 62–93, 2018.

RODRIGUES, M. I. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. [s.l.] Casa do Pão Editora, 2005.

SAINI, R. K. *et al*. Protective effects of lycopene in cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases: An update on epidemiological and mechanistic perspectives. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104730, maio 2020.

SAKAKI, H. *et al.* Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 93, 3, p. 338-340, 2002.

SALIMONTI, A. *et al.* Association Study of the 5′UTR Intron of the FAD2-2 Gene With Oleic and Linoleic Acid Content in Olea europaea L. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, n. 1, p. 7–24, jul. 1994.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia industrial - vol. 2: engenharia bioquímica**: Editora Blucher, 2001.

SEWSYNKER-SUKAI, Y.; FALOYE, F.; KANA, E. B. G.. Artificial neural networks: an efficient tool for modelling and optimization of biofuel production (a mini review). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 2, p. 221–235, 2017.

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, p. e00407, 2020.

SILVA DE ROSSI, P. H. *et al.* UTILIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE CORANTES NATURAIS EM ALIMENTOS: uma revisão. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, n. 11, p. e211941, 2021.

SILVA, P. G. P. *et al.* Sustainable approach to recover β-carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* grown in a stirred-tank bioreactor under the influence of magnetic fields. **Bioresource Technology**, v. 390, p. 129906, 2023.

SLUIJS, I*. et al*. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 25, n. 4, p. 376–381, 1 abr. 2015.

SOMMER, R.; PAXSON, V. Outside the Closed World: On Using Machine Learning for Network Intrusion Detection. In: 2010 IEEE SYMPOSIUM ON SECURITY AND PRIVACY, 2010, Oakland, CA, USA. **2010 IEEE Symposium on Security and Privacy**. Oakland, CA, USA: IEEE, 2010. p. 305–316. Disponível em: http://ieeexplore.ieee.org/document/5504793/. Acesso em: 25 fev. 2024.

SPERSTAD, S. *et al.* Torularhodin and torulene are the major contributors to the carotenoid pool of marine *Rhodosporidium babjevae* (Golubev). **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 269-273, 2006.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of Raw Glycerol Generated from the Synthesis of Biodiesel by Different Oleaginous Yeasts: Lipid Content and Fatty Acid Profile of Biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 415–422, 2015.

SUNDARARAJAN, P.; RAMASAMY, S. P. Current perspectives on industrial application of microbial carotenoid as an alternative to synthetic pigments. Sustainable **Chemistry and Pharmacy**, 37, 101353, 2024.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2551–2557, 2005.

TKÁČOVÁ, J.; KLEMPOVÁ, T.; ČERTÍK, M. Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in β-carotene producing *Rhodotorula glutinis*. **Chemical Papers**, v. 72, n. 5, p. 1193–1203, 2018.

TOLBORG, G.*et al.* Unique processes yielding pure azaphilones in T*alaromyces atroroseus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 603–613, 2020.

Toma, M. A. *et al*. Fungal pigments: carotenoids, riboflavin, and polyketides with diverse applications. **Journal of Fungi**, 9, 454, 2023.

TORPEE, S. *et al.* Culture optimization to enhance carotenoid production of a selected purple nonsulfur bacterium and its activity against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2422–2436, 2022.

TROPEA, A. *et al.* Does the light influence astaxanthin production in Xanthophyllomyces dendrorhous?. **Natural Product Research**, v. 27, n. 7, p. 648–654, 2013.

TUTUNCHI, H.; OSTADRAHIMI, A.; SAGHAFI-ASL, M. The Effects of Diets Enriched in Monounsaturated Oleic Acid on the Management and Prevention of Obesity: a Systematic Review of Human Intervention Studies. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 11, n. 4, p. 864–877, 2020.

UÇAR, R. A. *et al*. A comparison of metabolic engineering strategies applied in Yarrowia lipolytica for β-carotene production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 29, n. 1, p. 69–83, 1 fev. 2024.

VALDUGA, E. *et al.* Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. **Química Nova**, [*s. l.*], v. 32, p. 2429–2436, 2009.

VASILIEVNA BESARAB, N. *et al.* BIOSYNTHETIC PRODUCTION OF CAROTENOIDS USING YEAST STRAINS OF GENUS *Rhodotorula* ON THE CHEAP BEER WORT SUBSTRATE. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 7, n. 4, p. 383–386, 2018.

VELOSO, I. I. K. *et al.* Thermal Analysis of Conventional and Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation at Different Temperatures. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 4, p. 2093–2104, 2023.

VILA, E. *et al.* Biotechnological production of zeaxanthin by an Antarctic *Flavobacterium*: Evaluation of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 319, p. 54–60, 2020.

VOUTILAINEN, S. *et al*. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1265–1271, jun. 2006.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 665–700, 29 abr. 2013.

XIE, Z.-T. *et al*. Research progress on carotenoid production by Rhodosporidium toruloides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 7, 3 jan. 2024.

XUE, SI-JIA *et al.* Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 1049–1060, 2018.

YE, Z.-W.; JIANG, J.-G.; WU, G.-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 352–360, 1 jul. 2008.

YEN, H-W; PALANISAMY, G; SU, G-C. THE Influences of Supplemental Vegetable Oils on the Growth and β-carotene Accumulation of Oleaginous Yeast-Rhodotorula glutinis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 24, n. 3, p. 522–528, 2019.

ZENG, Y.; WANG, R.; LIANG, J.; ZHANG, H.; YI, J.; LIU, Z. Strategies for recovery, purification and quantifications of torularhodin produced by *Rhodotorula mucilaginosa* using different carbon sources. **Fermentation**, 9, 846, 2023.

ZHANG, Y. *et al.* Utilization of Biopolymer-Based Lutein Emulsion as an Effective Delivery System to Improve Lutein Bioavailability in Neonatal Rats. **Nutrients**, v. 16, n. 3, p. 422, 31 jan. 2024.

ZHANG, Y. *et al*. Screening, Identification, and Fermentation Condition Optimization of a High-Yield 3-Methylthiopropanol Yeast and Its Aroma-Producing Characteristics. **Foods**, v. 13, n. 3, p. 418, 27 jan. 2024.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 157, p. 149–153, 2014.

ZHAO, Y. *et al*. Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom *Cordyceps militaris* by abiotic stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109808, 1 ago. 2021.

ZHAO, Y. *et al.* Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* sp. from Marine Environment and Optimization for Carotenoid Production. **Marine Drugs**, v. 17, n. 3, p. 161, 2019.

ZHAO, S. *et al*. Research advancements in the maintenance mechanism of *Sporidiobolus pararoseus* enhancing the quality of soy sauce during fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 417, p. 110690, 2 jun. 2024.

ZHOU, D. *et al*. The bioproduction of astaxanthin: A comprehensive review on the microbial synthesis and downstream extraction. **Biotechnology Advances**, v. 74, p. 108392, 1 set. 2024.

ZOZ, L. *et al.* Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 278–288, 2014.

ANEXOS

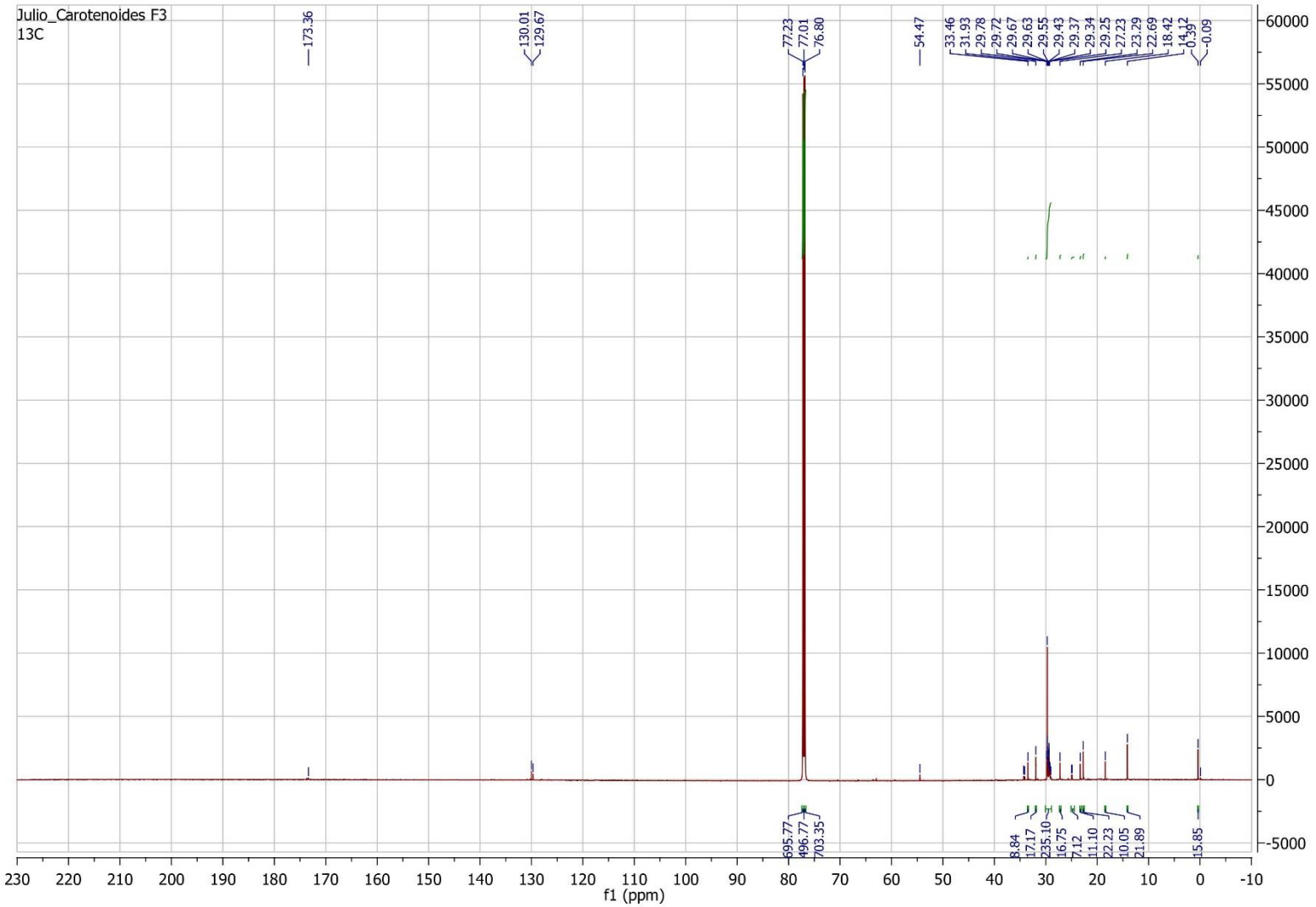
A1. Análise centesimal do extrato de levedura e do extrato de malte.

Amostras	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
Extrato de levedura R1	38,66	6,39	10,60
Extrato de levedura R2	35,58	6,34	10,52
Extrato de malte R1	40,82	6,57	1,52
Extrato de malte R1	40,88	6,56	1,26

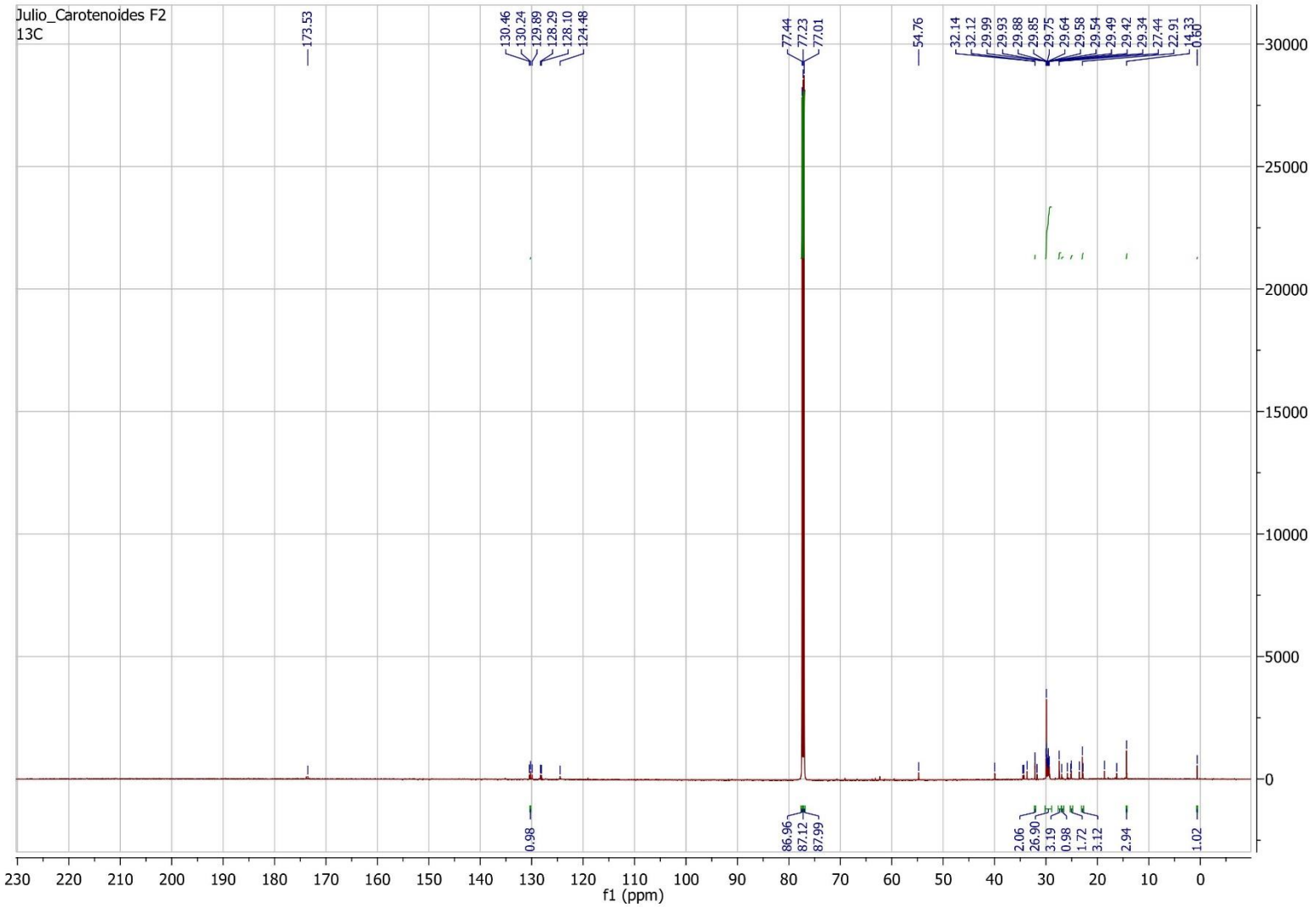
A2. Composição do sabonete líquido

COMPOSIÇÃO: Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropyl Betaine, Cocamide DEA, Citric Acid, Methylparaben, Propylparaben, Sodium Chloride, Aqua, propylene Glycol, Peg 150 distearate.

A3. A. Os espectros de RMN de ^{13}C para β-caroteno



A3. B. Os espectros de RMN de ^{13}C para toruleno



A3. C. Os espectros de RMN de ^{13}C para torularodina

