

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular

Nathalie Almeida Lopes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da FURG, como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof^a Dr^a Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Orientadora

Rio Grande, RS
2014

L864r	<p>Lopes, Nathalie Almeida. Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular / Nathalie Almeida Lopes. – 2014. 96 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert.</p> <p>1. Engenharia e Ciência de alimentos 2. Ruptura celular. 3. Levedura. 4. Carotenoides. I. Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros. II. Título.</p> <p>CDU 664</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dedico este trabalho aos meus pais, Eraldo e Rosane, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar o meu caminho e me manter forte para seguir em frente.

Aos meus pais, pois sem eles não chegaria até aqui. Sem palavras para agradecer, amo vocês.

Ao meu irmão Gabriel, por ser mais que um irmão, por ser amigo e companheiro fiel. Obrigada por todas as caronas na rodoviária, por me chamar as 5:30 h da manhã e levar lanches na parada do ônibus.

Ao Michel, pelo incentivo, compreensão, companheirismo e amor. Obrigada por tornar as cansativas idas e vindas de Rio Grande, mais agradáveis. Com certeza tu foste a maior e melhor surpresa que a Furg me deu.

Ao professor Cláudio Dias Timm, que me acompanha desde os meus primeiros passos na graduação, até os dias de hoje. Agradeço por despertar em mim o gosto pela pesquisa e pela vida acadêmica. Obrigada pela confiança e amizade e por fazer parte da minha formação profissional.

A minha orientadora Janaína Burkert, pela oportunidade de trabalho e pela orientação.

Ao professor André Burkert por disponibilizar o laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia e ao LTA por disponibilizar equipamentos.

A Elisane, por ser essa incansável professora. Este trabalho só foi realizado graças a tua ajuda. Obrigada pela paciência e por me ensinar as mínimas coisas.

A Renata, que me acolheu desde o início das minhas atividades na Furg. Agradeço pela ajuda nos trabalhos, em FT, pelo chimarrão que me mantinha acordada, pelas caronas e pelos bons momentos.

Ao Francisco, por ser sempre prestativo e me ajudar várias vezes ao longo do trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Rafael, Carolina e Eduardo, meus companheiros de trabalho e de muitas risadas. Agradeço pela dedicação e responsabilidade.

As minhas colegas de laboratório, Franciela, Vanessa, Dani e Michele, pelo auxílio, convivência e pelos momentos de descontração.

A todos os meus colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Espero ter novamente a sorte de encontrar pessoas tão especiais nesta nova etapa da minha vida.

Ao CNPq e Capes, pelo apoio financeiro.

Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.

Aristóteles

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
RESUMO GERAL	13
GENERAL ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO II.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Estrutura dos carotenoides	19
3.2 Importância e aplicações dos carotenoides	20
3.3 Carotenoides microbianos	21
3.4 Recuperação de carotenoides	22
3.4.1 Parede celular	22
3.4.2 Métodos de ruptura celular em escala laboratorial	23
3.4.2.1 Abrasivos	23
3.4.2.2 Ondas ultrassônicas	24
3.4.2.3 Homogeneização sob alta pressão	26
3.4.2.4 Liofilização	27
3.4.2.5 Químicos.....	27
3.4.2.6 Enzimas líticas.....	29
3.4.2.7 Extração com fluido supercrítico.....	31
CAPÍTULO III	33
ARTIGO 1.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37

2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Micro-organismo	38
2.2 Preparo do inoculo	38
2.3 Cultivo em frascos agitados	39
2.4 Tratamento da biomassa	39
2.4.1 Secagem da biomassa por liofilização	39
2.5 Técnicas de ruptura celular	39
2.5.1 Técnicas químicas de ruptura celular	40
2.5.1.1 Ácido clorídrico, acético e lático	40
2.5.1.2 Dimetilsulfóxido (DMSO)	40
2.5.2 Técnicas mecânicas de ruptura celular	40
2.5.2.1 Abrasão com pérolas de vidro	40
2.5.2.2 Banho ultrassônico	40
2.5.2.3 Maceração com terra diatomácea	40
2.5.2.4 Imersão em nitrogênio líquido	40
2.5.2.5 Ruptor ultrassônico	41
2.5.3 Técnica enzimática de ruptura celular	41
2.5.3.1 Enzima lítica	41
2.5.3.2 Recuperação de carotenoides utilizando lise enzimática	41
2.6 Métodos analíticos	41
2.6.1 Determinação de pH	41
2.6.2 Determinação de açúcares totais	42
2.6.3 Determinação da concentração de biomassa	42
2.6.4 Extração e determinação dos carotenoides totais	42
2.7 Caracterização enzimática do preparado comercial	43
2.7.1 Atividade enzimática de β -1,3-glucanase	43
2.7.2 Atividade enzimática de protease	43
2.8 Visualização por microscopia	43
2.9 Análise estatística	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Cultivos submersos para a produção de carotenoides	44
3.2 Técnicas químicas de ruptura celular	45
3.3 Técnicas mecânicas de ruptura celular	46
3.4 Técnica enzimática de ruptura celular	49
3.4.1 Avaliação da ruptura celular de <i>S. parvoseus</i>	50
3.5 Recuperação de carotenoides utilizando métodos combinados	52

3.6 Utilização de liofilização na secagem da biomassa	54
4 CONCLUSÃO.....	55
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ARTIGO 2.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1 Bioprodução de carotenoides.....	65
2.2 Secagem da biomassa por liofilização	66
2.3 Técnicas de ruptura celular	66
2.3.1 Técnicas químicas de ruptura celular	66
2.3.2 Técnicas mecânicas de ruptura celular	66
2.3.2.1 Ondas ultrassônicas	66
2.3.2.2 Métodos abrasivos	67
2.3.2.3 Imersão em nitrogênio líquido.....	67
2.3.3 Técnica enzimática de ruptura celular	67
2.4 Métodos analíticos	68
2.4.1 Determinação de pH	68
2.4.2 Determinação de açúcares totais.....	68
2.4.3 Determinação da concentração de biomassa	68
2.4.4 Extração e determinação dos carotenoides	68
2.5 Caracterização enzimática do preparado comercial.....	69
2.5.1 Atividade enzimática de β -1,3-glucanase e de protease	69
2.6 Visualização por microscopia	70
2.7 Análise estatística.....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1 Cultivos submersos para a produção de carotenoides	70
3.2 Técnicas químicas de ruptura celular.....	71
3.3 Técnicas mecânicas de ruptura celular	73

3.4 Técnica enzimática de ruptura celular	75
3.4.1 Avaliação da ruptura celular de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> utilizando DCCR	76
3.5 Recuperação de carotenoides utilizando métodos combinados.....	81
3.6 Utilização de liofilização na secagem da biomassa	82
4 CONCLUSÃO.....	83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CAPÍTULO IV.....	89
CONCLUSÃO GERAL	90
CAPÍTULO V	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** – Concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando diferentes técnicas químicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.45
- Tabela 2** – Concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e extratibilidade (%) de carotenoides utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.47
- Tabela 3** – Matriz do DCCR 2³ em níveis codificados e reais (entre parênteses) em termos de concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e concentração volumétrica ($\mu\text{g/L}$) de carotenoides utilizando a técnica enzimática para a ruptura celular na biomassa seca não submetida ao processo de congelamento.50
- Tabela 4** – Efeito principal das variáveis estudadas pelo DCCR 2³ sobre a concentração específica e volumétrica de carotenoides.51
- Tabela 5** – Concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando a combinação das técnicas de ultrassom, pérolas de vidro e lise enzimática, na biomassa não congelada.53

ARTIGO 2

- Tabela 1** – Médias \pm desvios padrões da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e da extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando diferentes técnicas químicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.71
- Tabela 2** – Extratibilidade (%) e concentração específica ($\mu\text{g/g}$) de carotenoides utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.73
- Tabela 3** – Delineamento composto central rotacional 2³ (valores reais e codificados) para concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e concentração volumétrica ($\mu\text{g/L}$) de carotenoides utilizando a técnica enzimática para a ruptura celular na biomassa seca não submetida ao processo de congelamento.76
- Tabela 4** – Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção específica de carotenoides e concentração volumétrica de carotenoides.77
- Tabela 5** – Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2³78
- Tabela 6** – Respostas da validação do modelo matemático.80
- Tabela 7** – Concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando a combinação das técnicas de ultrassom e lise enzimática, na biomassa não congelada. ...81

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura química de alguns carotenoides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).	19
Figura 2 – Ruptura celular por abrasivos.	24
Figura 3 – Ruptura celular por ondas ultrassônicas.....	25
Figura 4 – Sistema de homogeneização sob alta pressão.	26
Figura 5 – Lise enzimática da célula de levedura.....	30
Figura 6 – Esquema do processo de extração com fluido pressurizado.	31

ARTIGO 1

Figura 1 – Cinética para produção de carotenoides totais de <i>S. pararoseus</i> em frascos agitados, meio YM, a 25 °C e 180 rpm.	45
Figura 2 – Células de levedura <i>S. pararoseus</i> sem nenhum método de ruptura (a) e células após a ruptura com banho ultrassônico (b).	49
Figura 3 – Médias \pm desvios padrões (n=3) da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) dos carotenoides empregando a liofilização e a secagem convencional, utilizando biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. LC= Liofilização utilizando biomassa congelada, LNC= Liofilização utilizando biomassa não congelada, SCC= Secagem convencional utilizando biomassa congelada e SCNC= secagem convencional utilizando biomassa não congelada.	55

ARTIGO 2

Figura 1 – Produção de carotenoides em frascos agitados com agitação de 180 rpm a 25 °C.	71
Figura 2 – Células de levedura <i>R. mucilaginosa</i> sem nenhum método de ruptura (a) e células após a ruptura com banho ultrassônico (b).	75
Figura 3 – Gráficos de curva de contorno para a concentração específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) em função da temperatura e do pH (a) e em função da temperatura e da concentração de enzima (b).	79
Figura 4 – Gráficos de curva de contorno para a concentração volumétrica de carotenoides ($\mu\text{g/L}$) em função da temperatura e do pH (a) e em função da temperatura e da concentração de enzima (b).	79
Figura 5 – Médias \pm desvios padrões da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) dos carotenoides empregando a liofilização e a secagem convencional, utilizando biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. LC= Liofilização utilizando biomassa congelada, LNC= Liofilização utilizando biomassa não congelada, SCC= Secagem convencional utilizando biomassa congelada, SCNC= Secagem convencional utilizando biomassa não congelada.	83

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi utilizar diferentes técnicas químicas (dimetilsulfóxido, ácido clorídrico, acético e láctico), técnicas mecânicas (banho ultrassônico, abrasão com pérolas de vidro, maceração com terra diatomácea, ruptor ultrassônico e imersão em nitrogênio líquido) e técnica enzimática (preparado enzimático comercial Glucanex®) para a recuperação de carotenoides a partir da ruptura da parede celular das leveduras *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de amostras ambientais. Para isso a obtenção de biomassa foi realizada através de cultivos submersos no meio YM, a 25 °C, 180 rpm por 168 h. Para a ruptura celular, a operação de congelamento da biomassa (-18°C por 48 h) foi estudada. Os métodos de secagem convencional por ar forçado (35°C/48h) e liofilização (-80°C/48h, em ultrafreezer, seguido de liofilizador até alcançar 2% de umidade da amostra) também foram avaliados. Nas técnicas químicas aplicadas, o dimetilsulfóxido apresentou os melhores resultados para as duas leveduras, porém o seu uso é limitado devido a sua toxicidade. Para *S. pararoseus*, os maiores valores encontrados foram para o ácido clorídrico, seguido do acético e do láctico, sendo detectada diferença entre eles quando aplicado o congelamento. Com *R. mucilaginosa*, os maiores valores foram encontrados para os ácidos acético e láctico, seguido do ácido clorídrico, no qual o congelamento da biomassa também não influenciou a recuperação dos carotenoides. Dentre as técnicas mecânicas estudadas, para a levedura *S. pararoseus*, o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro apresentaram os resultados mais promissores comparados ao DMSO (84,79±2,34 e 76,87±2,06 µg/g respectivamente), onde o processo de congelamento da biomassa não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides quando utilizada estas técnicas. Com *Rhodotorula mucilaginosa*, o banho ultrassônico propiciou a recuperação da maior concentração específica de carotenoides (193,5±25,8 µg/g), sendo que o processo de congelamento também não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides. Através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2³ foi possível avaliar que a levedura *S. pararoseus* não demonstrou nenhum efeito sob as variáveis pH, temperatura e concentração de enzima. Assim, a melhor condição de trabalho escolhida foi pH 7,4, 30 °C e concentração de enzima de 1,0 g/gcs, onde apresentou a concentração específica de 42,6 µg/g e volumétrica de 308 µg/L de carotenoides. Para *R. mucilaginosa*, a condição ótima foi definida como 1,0 g/gcs, pH 5,0 e temperatura de 30 °C, onde foi encontrado 115,1±8,1 µg/g e 470,1±38,8 µg/L para a concentração específica e volumétrica de carotenoides, respectivamente. A utilização de técnicas combinadas empregando banho ultrassônico e lise enzimática não proporcionou melhorias nos resultados para ambas as leveduras. A liofilização provocou um ganho de 20% e 13,7% na concentração específica dos carotenoides das leveduras *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, respectivamente, onde o congelamento da biomassa não influenciou significativamente (p<0,05) a recuperação de carotenoides provenientes das duas leveduras, podendo ser eliminada do processo. Assim, para *S. pararoseus* o banho ultrassônico e as pérolas de vidro apresentaram os melhores resultados na recuperação de carotenoides, e para *R. mucilaginosa* o melhor resultado foi alcançado com o banho ultrassônico.

Palavras chave: ruptura celular, levedura, carotenoides

GENERAL ABSTRACT

This work aimed to use different chemical (dimethylsulfoxide, hydrochloric acid, acetic acid and lactic), mechanical (ultrasonic bath, abrasion with glass beads, maceration with diatomaceous clay, ultrasonic hammer and immersion in liquid nitrogen) and enzymatic (commercial enzymatic preparation Glucanex®) techniques to brake the cell wall of *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa* yeast isolated from environmental samples. For this, the biomass obtaining was performed through submerged cultivations in YM mean, at 25 °C, 180 rpm per 168 h. To the cell disruption, the biomass frozen operation (-18°C per 48 h) was studied. The conventional drying methods by forced air (35°C/48h) and lyophilization (-80°C/48h, in an ultra-freezer, followed by lyophilizer until it reaches 2% of the sample moisture) were also evaluated. On the applied chemical techniques, the dimethylsulfoxide has presented the best results in both yeast, however, its use is limited due to its toxicity. In *S. pararoseus*, hydrochloric acid has presented the highest values, followed by acetic and lactic, being a difference detected among them when the frozen was applied. With *R. mucilaginosa* the highest values were found in acetic and lactic acids, followed by hydrochloric acid, where the presence of biomass frozen hasn't also influenced the carotenoids recovering. Among the mechanical techniques studied, to *S. pararoseus* yeast, the ultrasonic bath with glass beads has presented the most promising results compared to DMSO (84.8±2.3 and 76.9±2.1 µg/g respectively), where the biomass frozen process hasn't positively influenced on the extractability and on the carotenoids specific concentration when these techniques were used. With *Rhodotorula mucilaginosa*, the ultrasonic bath has presented the highest of carotenoids specific concentration (193.5±25.8 µg/g), where the frozen process hasn't also positively influenced on the extractability percentage and on the carotenoids specific concentration. Through the Central Composite Rotatable Design (CCRD) 2³ it was possible to evaluate that *S. pararoseus* yeast hasn't shown any effect under the pH, temperature and enzyme concentration variables, thus, the best work condition chosen was pH 7.4, 30 °C and enzyme concentration of 1.0 g/gdc, where it has presented the specific concentration of 42.6 µg/g and volumetric of 308 µg/L of carotenoids. To *R. mucilaginosa*, the best condition was defined as 1.0 g/gdc, pH 5.0 and temperature of 30 °C, where was found 115.1±8.1 µg/g e 470.1±38.8 µg/L to the specific concentration and carotenoids volumetric respectively. The use of the combined techniques applying ultrasonic bath and enzymatic lysis hasn't brought improvements in the results of both yeasts. The lyophilization has provoked a gain of 20% and 13.7% on the carotenoids specific concentration of *S. pararoseus* and *R. mucilaginosa*, respectively, where the biomass frozen hasn't significantly influenced (p<0,05) the carotenoids from both yeasts recovering, what could be eliminated on the process. Thus, for *S. pararoseus* the ultrasonic bath and the glass beads have presented the best results on the carotenoids recovering and for *R. mucilaginosa* the best result was reached with the ultrasonic bath.

Key words: cell disruption, yeast, carotenoids

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho de muitos alimentos, tais como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes, como salmão e truta, e também crustáceos (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008), sendo, portanto, distribuídos de forma abundante na natureza, contendo mais de 600 compostos diferentes identificados (FRASER; BRAMLEY, 2004).

Além do extenso uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, são considerados também substâncias bioativas, sendo utilizados devido a sua atividade pró-vitamínica A e as propriedades antioxidantes as quais proporcionam efeitos benéficos à saúde, dentre eles a diminuição do risco de doenças degenerativas e fortalecimento do sistema imunológico, promovendo a redução de doenças como o câncer, degeneração macular, catarata e doenças cardiovasculares (BOLHASSANI, KHAVARI; BATHAIE, 2014; JOMOVA; VALKO, 2013; WOLAK; PARAN, 2013). Com isso, aumenta a preocupação em utilizar produtos que contenham atividade antioxidante, que possuem moléculas capazes de diminuir ou prevenir a oxidação de outras (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

A crescente demanda gerada pelas indústrias e a procura dos consumidores por produtos naturais acarretou o aumento da pesquisa sobre a bioprodução de carotenoides. A principal razão no interesse em utilizar micro-organismos para produzir compostos que podem, caso contrário, ser isolados a partir de plantas e animais ou sintetizados é a simplicidade da produção por manipulação ambiental e genética. O Brasil possui um ecossistema diversificado que pode fornecer micro-organismos com potencial biotecnológico para a produção de carotenoides (ZENI et al., 2011).

Leveduras silvestres produtoras de carotenoides foram isoladas por Otero (2011), provenientes das regiões dos Ecossistemas do Escudo Sul-Rio-Grandense e Litoral Médio no estado do Rio Grande do Sul, onde três foram selecionadas e identificadas como *Sporidiobolus pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, que se destacaram na produção destes pigmentos. A produção de carotenoides como luteína, β -criptoxantina e β -caroteno foi observada para as leveduras *S. pararoseus* e *P. fermentans*, enquanto *R. mucilaginosa* apresentou a produção da luteína, sendo as três leveduras cultivadas no meio extrato de malte e levedura (YM). Além disso, estes micro-organismos foram capazes de se desenvolver em meios contendo substratos alternativos como água de maceração de milho, glicerol bruto e melaço de cana-de-açúcar, apresentando comportamentos distintos em relação

à produção de carotenoides e biomassa. Fato promissor dada a abundância destes resíduos na agroindústria nacional.

A produção de carotenoides pelas leveduras ocorre intracelularmente, onde a rigidez da parede celular limita a extratibilidade deste pigmento. Com isso, se faz necessário o uso de técnicas de ruptura celular para a liberação dos compostos produzidos (MICHELON et al., 2012). A parede celular das leveduras em geral é composta por polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas interligadas, formando uma estrutura complexa. A camada mais externa é constituída de polissacarídeo contendo manose sobrepondo uma camada de glucana insolúvel, e a camada interna seria responsável pela resistência mecânica da parede celular, o que torna muitas vezes o processo comercial de recuperação de material orgânico inviável (KLIS et al., 2002).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na liberação de compostos intracelulares, incluindo métodos mecânicos (abrasão com pérolas de vidro, banho ultrassônico), métodos químicos (ácido clorídrico, acético e láctico), métodos enzimáticos (β -1,3 glucanase) e a combinação deles. A eficácia do método aplicado depende do tipo de micro-organismo. Os métodos mecânicos não são específicos, porém a sua eficiência é mais elevada e possui uma aplicação mais ampla em comparação com os outros métodos (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002).

Apesar da importância da ruptura celular para recuperar os carotenoides, trabalhos envolvendo este aspecto ainda são escassos na literatura. Portanto, tornam-se necessários estudos de diferentes métodos de ruptura celular para recuperação dos pigmentos e posterior extração, principalmente quando se busca uma ampliação de escala laboratorial para industrial utilizando as leveduras silvestres *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar diferentes técnicas de ruptura da parede celular das leveduras *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* para recuperação de carotenoides.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar dentre as técnicas mecânicas, químicas e enzimática, a mais eficiente, verificando a influência do processo térmico de congelamento da biomassa;
- Avaliar a combinação de técnicas de ruptura celular para recuperação dos carotenoides;
- Selecionar dentre os métodos de ruptura utilizados, qual é mais promissor no processo de recuperação de carotenoides para cada levedura estudada;
- Comparar a secagem convencional da biomassa produzida com a secagem pelo processo de liofilização.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

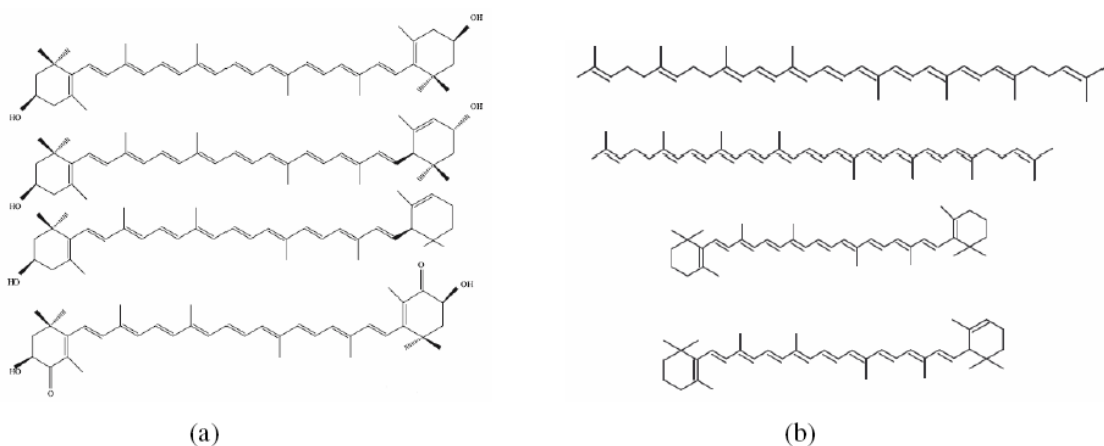
Este item apresenta informações sobre as características dos carotenoides como: estrutura, importância, aplicações, micro-organismos produtores, recuperação e extração, bem como métodos utilizados para ruptura celular de carotenoides.

3.1 Estrutura dos carotenoides

Os carotenoides possuem estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos. Sua estrutura molecular é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. O sistema de duplas ligações conjugadas confere habilidade de absorver luz na região do visível, sendo necessárias aproximadamente sete ligações duplas conjugadas para que o carotenoide apresente coloração. O mesmo sistema também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (OLIVIER; PALOU, 2000).

A maioria dos carotenoides são sintetizados por micro-organismos fotossintéticos e por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos, sendo classificados em carotenos e xantofilas. Os carotenos se caracterizam por serem hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula e as xantofilas são derivados oxigenados de carotenos, como apresentado na figura 1 (BOTELLA-PAVÍA; RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2006).

Figura 1 – Estrutura química de alguns carotenoides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).



3.2 Importância e aplicações dos carotenoides

Carotenoides são pigmentos naturais que atraem a atenção de físicos, químicos e biólogos, devido à suas múltiplas funções na natureza. São reconhecidos pela sua ampla aplicação, sendo utilizado como corante de alimentos e precursores de vitamina A. Possuem propriedades antioxidantes e atuam na inibição de doenças onde os radicais livres são agentes desencadeantes, devido a sua capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e reagir com radicais livres. Dentre as atividades biológicas importantes, destacam-se a inibição de doenças degenerativas, além de promover o fortalecimento do sistema imunológico (JOMOVA; VALKO, 2013).

A importância da produção de carotenoides naturais a partir de micro-organismos em relação aos isolados de plantas e animais ou sintetizados quimicamente é devido à facilidade de aumentar a produção pelas condições de cultivo e manipulação genética. Além disso, nos últimos anos houve um aumento na procura por aditivos alimentares naturais e de alta qualidade. A produção e o perfil dos carotenoides obtidos são variáveis dependendo do micro-organismo, meio de cultura e condições operacionais como temperatura, pH, agitação, taxa de aeração e luminosidade, sendo a produção obtida em pequeno intervalo de tempo, não estando sujeita às condições ambientais (ECHAVARRI-ERASUN; JOHNSON, 2002; ZENI, 2009).

Os carotenoides são utilizados tanto na indústria de alimentos, quanto na indústria de ração animal, sendo empregado principalmente como corante, com o objetivo de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Além disso, os carotenoides têm sido adicionados aos alimentos devido a suas atividades biológicas, com o intuito de enriquecê-los nutricional e tecnologicamente (SANCHÉZ-CONTRERAS et al., 2000).

Podem ser utilizados em formulações comerciais através de extratos naturais ou corantes sintéticos idênticos aos naturais, sendo amplamente utilizados para conferir ou intensificar a cor em sucos de frutas, pastas alimentícias, bebidas, doces, margarinas, queijos, salsichas e outros. Ainda, indiretamente, através da dieta, servem para intensificar a cor de alimentos, como por exemplo, da gema do ovo, da pele do frango, da musculatura de salmonídeos e do exoesqueleto de crustáceos (MEZZOMO, 2012; TATSCH, 2008).

3.3 Carotenoides microbianos

Os carotenoides podem ser biossintetizados por micro-organismos fotossintetizantes, como algas e cianobactérias, e por micro-organismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (JOHNSON; SCHROEDER, 1995).

A capacidade da multiplicação de leveduras em meio com alto teor de açúcar faz com que estes micro-organismos sejam industrialmente interessantes. São micro-organismos predominantemente unicelulares, possuindo reprodução vegetativa por brotamento ou fissão. Leveduras tais como *Sporidiobolus pararoseus* (CABRAL et al., 2011), *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU; EREN, 2005), *Phaffia rhodozyma* (FONSECA et al., 2011; MICHELON et al., 2012), *Rhodotorula glutinis* (PARK, KIM; CHU, 2007), *Sporobolomyces ruberrimus* (FERRAZ et al., 2012), *Rhodospiridium babjevae* JI-1 (KIM et al., 2012), *Rhodotorula graminis*-125, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula minuta* (MALDONADE, RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2008) vem sendo estudadas com a finalidade de maximização e otimização da produção de carotenoides.

Neste contexto, as leveduras destacam-se pelo seu uso como fonte proteica e capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar. Os tipos de carotenoides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (TATSCH, 2008).

Otero (2011) isolou cepas de leveduras silvestres produtoras de carotenoides na região do Escudo Sul-Rio-Grandense e Litoral Médio no estado do Rio Grande do Sul, onde três leveduras se destacaram, sendo selecionadas e identificadas como *Pichia fermentans*, *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo as duas últimas utilizadas no presente trabalho. Ambas as leveduras foram cultivadas por 168 h, 180 rpm a 25 °C. Dentre estas, *S. pararoseus* apresentou a maior produção específica de carotenoides de 123,6 µg/g e produção volumétrica de 905 µg/L, em meio YM, sendo identificados a produção da luteína, β-criptoxantina e β-caroteno. Para *R. mucilaginosa*, os valores máximos encontrados para a produção específica de carotenoides foi de 28,1 µg/g e produção volumétrica foi de 310 µg/L, também cultivado em meio YM, onde foi identificada a produção de luteína.

Cipolatti (2012) aprofundou os estudos com as leveduras *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, realizando cultivos submersos a 25 °C, 180 rpm, por 168 h, avaliando a produção de carotenoides a partir de meios contendo água de maceração de milho e glicerol (M1), e água de maceração de milho e melão (M2), comparando com o meio convencional (YM). *S. pararoseus* se destacou nos meios alternativos, apresentando 634,5 e 830,3 µg/L e

87,3 e 68,1 µg/L para M1 e M2, respectivamente. Ainda se destacou em relação à produção de β-caroteno, com 89,2 e 94,4% dos carotenoides identificados no M1 e M2, respectivamente. Apresentando elevados valores de biomassa, com 7,3; 9,8 e 12,2 g/L para M1, YM e M2, respectivamente. O carotenoide β-caroteno foi produzido em maior quantidade pela *R. mucilaginosa* em meio YM (4430 µg/L). Nos meios alternativos, esta levedura também foi capaz de sintetizar β-caroteno, 820 e 750 µg/L para M1 e M2, respectivamente.

Machado (2013) realizou a otimização da produção de carotenoides pela levedura *S. pararoseus* e a influência de pré-tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais utilizando como coprodutos água de maceração de milho, glicerol bruto e melaço de cana de açúcar, sendo os cultivos conduzidos a 25 °C, 180 rpm, por 168 h. Na otimização do meio agroindustrial formulado com melaço de cana de açúcar (40 g/L) e água de maceração de milho (6,5 g/L), obteve-se valores máximos para produção de carotenoides de 520,94 µg/L (73,19 µg/g) com 7,82 g/L de biomassa, 180 rpm, em 168 h de cultivo, com pH inicial de 6,0. No meio de cultivo otimizado com melaço e água de maceração de milho o pré tratamento com ácido sulfúrico foi positivo promovendo um incremento na produção de carotenoides 936,35 µg/L (79,63 µg/g), proporcionando um ganho de aproximadamente 44% na produção volumétrica e 16% na específica comparado ao meio sem tratamento, além de um crescimento celular 34,69% superior. Porém, os pré tratamentos no meio otimizado com glicerol bruto e água de maceração de milho não foram eficientes.

3.4 Recuperação de carotenoides

A bioprodução industrial de carotenoides vem se expandindo comercialmente, porém as operações de extração e recuperação do produto contribuem para o aumento dos custos do processo de produção. Assim, inúmeros trabalhos estão sendo realizados visando estudar a recuperação eficiente dos carotenoides intracelulares, contribuindo para a redução dos custos de *downstream* (TATSCH, 2008).

3.4.1 Parede celular

A parede celular é uma camada relativamente rígida presente nas células de vegetais e micro-organismos como bactérias, algas e fungos. Sua estrutura é complexa, composta de polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas interligados (MAGNELLI, CIPOLLO; ROBBINS, 2005).

A parede celular das leveduras corresponde de 15 a 25% do peso seco celular, sendo constituída de uma camada mais externa de polissacarídeo contendo manose ou manoproteínas sobrepondo uma camada de glucana insolúvel (LIPKE; OVALLE, 1998). A camada interna de glucana insolúvel é responsável pela resistência mecânica da parede celular, sendo seu principal componente estrutural, e a camada externa é responsável por eventos de reconhecimento célula-célula, além de limitar o acesso de agentes líticos às porções mais internas da parede celular e à membrana celular (KLIS et al., 2002).

A partir de uma suspensão de células de leveduras, se torna possível isolar produtos de interesse. Para isso a biomassa deve ser previamente processada com um tratamento adequado a fim de promover a ruptura celular. Este tratamento é determinado em primeira instância pela localização celular do composto de interesse, dependendo se é um composto intracelular ou um composto excretado de forma espontânea ou induzida pela célula (WAGNER, RAMBLA; LEGARRETA, 2008).

Desta maneira, o conhecimento da estrutura da parede celular se torna importante na seleção de metodologias para o processo de ruptura. As técnicas disponíveis para liberação de produtos intracelulares incluem processos mecânicos e não mecânicos. Estes métodos podem ser realizados de forma separada ou combinados, podendo melhorar a eficiência da ruptura (THAMMAKITTI et al., 2004).

3.4.2 Métodos de ruptura celular

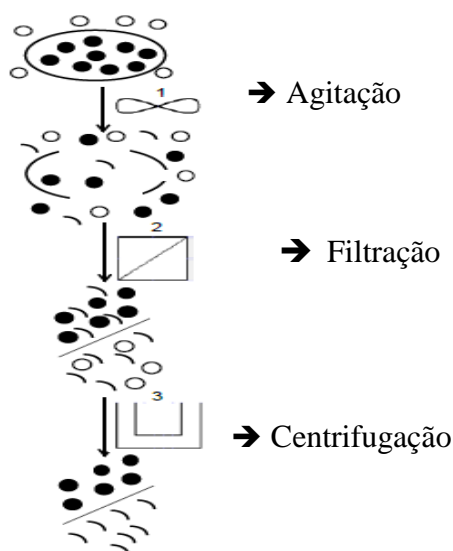
3.4.2.1 Abrasivos

O moinho de esferas, originalmente utilizado na indústria das tintas, foi adaptado com sucesso para a desagregação de células tanto em laboratório quanto na indústria para romper células de vários tipos de micro-organismos por sua simplicidade (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002).

O esquema desse equipamento (Bead Mill) consiste em um agitador rotativo que é preenchido com pérolas de vidros e cultura celular. O rompimento celular se dá pela combinação da colisão, agitação e moagem dos grânulos (figura 2). A eficiência da ruptura depende do tamanho e da composição das pérolas, velocidade do agitador e do tempo de residência (MIDDELBERG, 1995; LEE, LEWIS; ASHMAN, 2012). Para leveduras e bactérias, diâmetros maiores e menores que 0,5 mm, respectivamente, são considerados ótimos (MEDEIROS et al., 2008).

Michelson et al. (2012) empregaram pérolas de vidro para a ruptura da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*, utilizando para o cultivo o meio YM, a 25 °C, 180 rpm, por 168 h, onde encontraram $75,4 \pm 2,9$ µg/g utilizando biomassa congelada a -18 °C por 48 h e $70,5 \pm 8,1$ µg/g utilizando biomassa que não sofreu processo de congelamento. A mesma levedura foi utilizada por Fonseca et al. (2011), nas condições operacionais de 25 °C, 150 rpm, por 168 h, onde foi encontrado $305,3 \pm 27,7$ µg/g, empregando como tratamento prévio da biomassa o processo de secagem e congelamento.

Figura 2 – Ruptura celular por abrasivos.
 FONTE: LEMES, ÁLVARES; KALIL (2013).



Medeiros et al. (2012) estudaram o processo de ruptura celular, baseado no uso de pérolas de vidro para extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, onde verificaram que a utilização de uma carga de 1,10 g de pérolas de vidro por mL de suspensão celular, com diâmetro entre 0,95-1,05 mm, proporcionou as melhores condições de extração por abrasão em agitador tipo vórtex, por um período de 30 min.

3.4.2.2 Ondas ultrassônicas

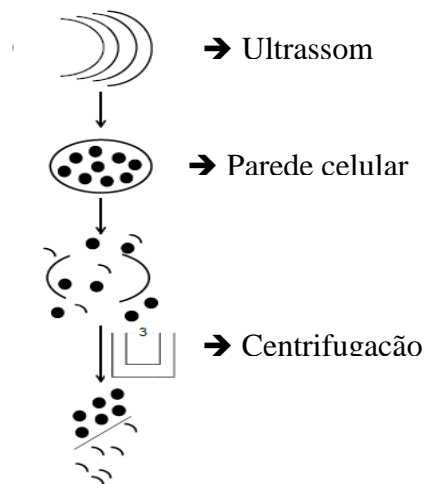
A sonicação é um dos métodos mais amplamente utilizados em laboratório para a ruptura celular. Em princípio, os dispositivos ultrassônicos podem ser ampliados e operados de forma contínua, sendo muito utilizados na indústria química, no entanto não são usados para a ruptura de micro-organismos em escala industrial. Este fato pode ser atribuído ao

excessivo aquecimento localizado, onde a maior parte da energia acústica é absorvida pela suspensão e convertida em calor (HARRISON, 1991).

As vibrações ultrassônicas com frequência superior a 18 kHz podem ser utilizadas para romper as células. As células podem ser submetidas a vibrações ultrassônicas através da introdução de um emissor em uma suspensão de células, promovendo a ruptura (figura 3). A vibração ultrassônica pode ser emitida de forma contínua ou através de impulsos curtos. (SAVE, PANDIT; JOSHI, 1994).

O mecanismo de ruptura celular está associado com o fenômeno de cavitação. As forças cisalhantes produzidas por turbilhonamento, quando as bolhas são maiores que as células, promovem o movimento das células de forma violenta até que ocorra o rompimento. Quando as bolhas são menores que as células, elas são capazes de gerar estresse cisalhante disruptivo (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002).

Figura 3 – Ruptura celular por ondas ultrassônicas.
 FONTE: LEMES, ÁLVARES; KALIL (2013).



O uso de ondas ultrassônicas para rompimento celular foi estudado por Fonseca et al. (2011), que verificaram a eficiência dele para rompimento da parede da levedura *P. rhodozyma*, cultivada em meio YM, a 25 °C, 150 rpm, por 168 h, encontrando uma concentração específica de astaxantina de $2198,4 \pm 523,7 \mu\text{g/g}$.

Gerde et al. (2012) utilizaram o método de extração através de ondas ultrassônicas para a obtenção de lipídeos presentes no interior da célula de microalgas autotróficas e heterotróficas, verificando que a extração de lipídeos aumentou com o aumento do tempo e da

energia dissipada. Porém, as condições operacionais devem ser controladas, pois pode ocorrer a formação de radicais livres que prejudicam a qualidade do óleo obtido.

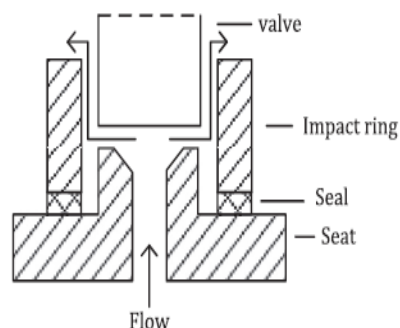
Gu et al. (2008), quando compararam os tratamentos de ultrassom, moagem e adição de HCl 3 mol/L, o efeito da temperatura (283,15 a 343,15 K), da razão soluto: solvente (10 a 130, v/m) e do tempo (10 a 130 min) no rendimento de extração de carotenoides de *R. sphaeroides*. A adição de HCl foi o método mais efetivo para a extração dos carotenoides. Na otimização da extração, os melhores resultados foram encontrados quando se utilizou a temperatura de 303,15 K, razão de soluto/solvente de 40 e a extração dos carotenoides no tempo de 40 min.

3.4.2.3 Homogeneização sob alta pressão

Utilizado em escala industrial, os homogeneizadores de alta pressão consistem em um sistema de bombas de deslocamento que forçam a suspensão de células, sob alta pressão (normalmente até 150 MPa, podendo chegar a 400 MPa), através de um orifício que liga uma câmara com a pressão atmosférica. Pela súbita descompressão, as células se rompem (figura 4) (LEE, LEWIS; ASHMAN, 2012; TREVAN et al., 1990).

Uma série de teorias têm sido propostas sobre o exato mecanismo de ruptura que ocorre em sistemas de homogeneização sob alta pressão. Alguns destes mecanismos são: choque de células sobre as superfícies, turbulência e cisalhamento sob alta pressão, e a diminuição repentina da pressão e a subsequente liberação de bolhas de gás que explodem no interior das células (CLARKE et al., 2010; MIDDELBERG, 1995; TREVAN et al., 1990).

Figura 4 – Sistema de homogeneização sob alta pressão.
FONTE: LEE, LEWIS; ASHMAN (2012).



Halim et al. (2012) relataram a homogeneização de 200 mL de uma suspensão de *Chlorococcum sp* através do uso de homogeneização sob alta pressão a 2,5 kW, 85 MPa por 6

min, obtendo uma eficiência de ruptura de 80%, medida através da contagem de células, sendo a energia requerida equivalente a 529 MJ/kg de biomassa.

3.4.2.4 Liofilização

O congelamento tem a vantagem de tornar as paredes das células mais porosas pela formação de cristais de gelo dentro das células e aumentar a extração de produtos intracelulares. Numa escala maior, o processo de liofilização é utilizado para preservar alimentos tais como o leite em pó ou o café instantâneo (LEE, LEWIS; ASHMAN, 2012).

A desidratação por liofilização é um processo onde primeiramente se congela as amostras, em seguida submetendo-as a baixa pressão (cerca 1 kPa) e temperatura de -40 °C, na qual ocorre o processo de sublimação, onde a água é retirada sem que se passe pelo estado líquido. No entanto, a fim de romper as células, as amostras são congeladas lentamente de modo a formar cristais de gelo intracelulares maiores (CAÑAVATE; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2001).

Santo et al. (2012) compararam a secagem por liofilização e a secagem por atomização para a produção de biomassa da *Rubrivivax gelatinosus*, com relação aos parâmetros de rendimento, produtividade e recuperação, e em relação as características do produto, como cor, composição centesimal e oxicarotenóides. As técnicas não diferiram quanto ao rendimento, enquanto que a maior recuperação e a maior umidade foram obtidas pela liofilização. Além disso, a biomassa liofilizada apresentou coloração mais vermelha, mais escura e de cor menos saturada.

Machado (2013) comparou a influência da operação de secagem convencional (35°C por 48 h) com a secagem por liofilização da biomassa da levedura *S. pararoseus*, onde relatou que o método de secagem por liofilização apresenta maior recuperação de carotenoides, quando comparado com o método de secagem convencional em estufa, apresentando um ganho de aproximadamente 20%.

Harnkarnsujarit; Charoenrein (2011) avaliaram a influencia do colapso estrutural na estabilidade de β -caroteno em mangas liofilizadas. A taxa de degradação de β -caroteno diminuiu quando utilizada temperatura acima do ponto de fusão, demonstrando que o processo de liofilização apresenta benefícios, pois contribui para a diminuição da degradação de compostos sensíveis ao oxigênio, como os carotenoides.

3.4.2.5 Químicos

A parede externa de um micro-organismo pode ser permeabilizada por uma grande variedade de compostos químicos, que diferem na seletividade e eficiência para diferentes espécies microbianas. A permeabilização química pode ser realizada por antibióticos, agentes quelantes, detergentes, solventes ou por hidróxidos e hipocloritos (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002), sendo utilizada para o rompimento celular tanto em escala laboratorial, quanto industrial.

As rupturas químicas mais utilizadas são as que empregam o DMSO ou o tolueno, ambos alteram a composição das membranas, aumentando a sua permeabilidade. As substâncias tensoativas como os detergentes são também altamente eficientes para esses propósitos (WAGNER, RAMBLA; LEGARRETA, 2008).

Segundo Mezzomo (2012), para a extração e recuperação de carotenoides, seja a partir de biomassa de micro-organismos produtores ou diretamente a partir de matrizes vegetais que contêm estas substâncias, podem ser utilizados como solventes óleos vegetais, solventes orgânicos ou fluidos supercríticos.

Os solventes orgânicos servem para romper muitos tipos de células e podem ser qualificados como um meio tradicional de ataque. Não é empregado para ruptura em escala industrial por diversas razões, entre elas o alto custo e a toxicidade (TREVAN et al., 1990). Porém, alguns solventes orgânicos são permitidos para uso nas indústrias de alimentos, como acetona, álcool benzílico, acetato de etila, hexano, isopropanol, metanol, metil-etil-cetona e etanol, sendo que o uso e suas concentrações dependem do tipo de alimento onde os mesmos serão empregados (FOOD AND DRUG REGULATION, 2005).

Monks et al. (2012) estudaram diferentes técnicas de ruptura e extração de carotenoides produzidos pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636, utilizando diferentes solventes químicos, entre eles: DMSO, diclorometano, etanol, acetato de etila e acetona. Os resultados demonstraram que a utilização da combinação de solventes promove um efeito sinérgico sobre a recuperação de carotenoides, onde a máxima concentração de carotenoides totais (2,875 g/L) foi obtido no tratamento com CO₂ supercrítico (300 bar/120 min) seguido da utilização de DMSO para romper a célula e, posteriormente, a extração com uma solução de acetona/metanol (7:3, v/v).

Ni et al. (2008) verificaram a otimização de um processo para a extração de astaxantina a partir de *Phaffia rhodozyma*, onde utilizaram os ácidos clorídrico, acético e láctico para a ruptura celular. Através de um planejamento fatorial fracionário encontraram um modelo que corresponde à condição ótima de concentração de ácido láctico de 5,55 mol/L, 20,25 mL de etanol por grama de levedura seca, a 30 °C, por 3 min. Nesta condição foram

encontrados os valores de 1295 $\mu\text{g/g}$ de astaxantina e 1516 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides totais. O método de ruptura com ácidos foi considerado viável e prático para uso industrial, sendo altamente eficiente na extração e possuindo baixa toxicidade.

Valduga (2005) testou 11 diferentes métodos de ruptura celular e extração com solventes, onde constatou que a utilização combinada de nitrogênio líquido e dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular, e extração com mistura de acetona e metanol (7:3), resultou na maior recuperação de carotenoides da levedura *S. salmonicolor*, cultivada em meio YM. Park et al. (2007) testaram cinco solventes para a ruptura de células de *R. glutinis*, onde observaram que a mistura do solvente DMSO, éter de petróleo e acetona mostrou-se eficiente, gerando máxima extração quando comparada aos solventes individuais.

3.4.2.6 Enzimas líticas

Enzimas líticas são enzimas envolvidas na lise da parede celular de leveduras e fungos, podendo ser utilizadas para a obtenção de diferentes produtos intracelulares (FLEURI; SATO, 2010). Sua utilização se dá em nível laboratorial, podendo ser facilmente escalonada ao nível industrial.

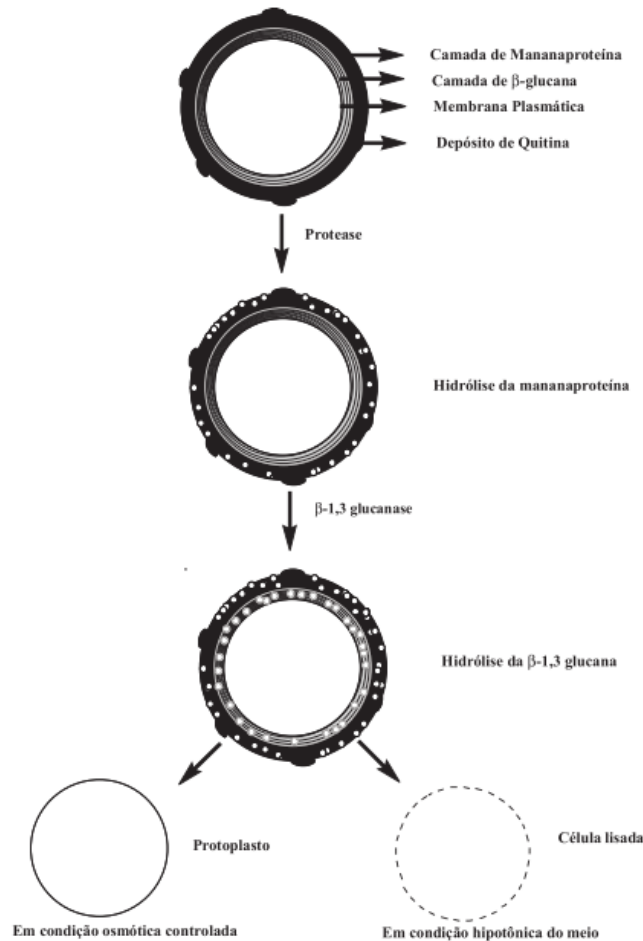
As enzimas envolvidas na lise da parede celular de leveduras são as β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases. Essas enzimas agem sinergicamente na lise da parede celular, mas somente duas são essenciais para o rompimento da célula: a protease lítica específica, que degrada a camada externa de mananaproteína e a β -1,3 glucanase lítica, que degrada a camada interna de glucana. A eficácia da lise depende de fatores como o estágio de crescimento celular, o gênero e a espécie da levedura (FLEURI; SATO, 2005).

A lise enzimática das células de leveduras acontece em passos progressivos, dependendo do sinergismo entre a protease e a β -1,3 glucanase. A protease ataca a camada externa de mananaproteína, permitindo o acesso da β -1,3 glucanase à camada de β -glucana implicando no rompimento celular por diferença de pressão osmótica (FLEURI; SATO, 2005) como mostra a figura 5.

Michelon et al. (2012) estudaram diferentes métodos de ruptura, entre eles a utilização do preparado enzimático comercial Glucanex® (Novozymes SA, Bagsvaerd, Dinamarca) que contém o enzima β -1,3-glucanase obtida a partir do fungo *Trichoderma harzianum*, a fim de determinar a condição ideal para a lise enzimática, onde obteve a condição ótima para a lise das células a 55°C, pH 4,5, após 30 min de reação, com uma atividade inicial de β -1,3-glucanase de 0,6 U/mL, resultando numa atividade lítica relativa de 22,4% e apresentando

101,8±2,9% de extratibilidade e 157,0±4,6 µg/g de concentração específica de carotenoides. O método combinado utilizando biomassa congelada submetida às técnicas de maceração com terra diatomácea e lise enzimática apresentou a maior extratibilidade e concentração específica de carotenoides (122,3% e 190,4 µg/g).

Figura 5 – Lise enzimática da célula de levedura.
Fonte: FLEURI; SATO (2005).



Kaiser et al. (2007) avaliaram um método em pequena escala usando hidrólise enzimática da biomassa para a extração de carotenoides produzidos por *Micrococcus luteus* e *Rhodotorula glutinis*, a fim de facilitar a extração com a mínima degradação possível. Para isso foi utilizado duas combinações de enzimas (lisozima e lipase ou liticase e lipase), seguido de tratamento mecânico da biomassa com ciclos de sonicação e congelamento e tratamento químico com dimetilsulfóxido. Na extração foi empregada uma mistura de metanol e clorofórmio estabilizados com hidroxitoluenobutilado (BTH) e α-tocoferol. Para *Micrococcus luteus*, o uso da enzima lisozima, juntamente com o método de sonicação, apresentaram a melhor extração, já para *Rhodotorula glutinis* o melhor método de extração foi encontrado

utilizando a combinação de liticase seguido de tratamento mecânico da biomassa com ciclos de sonicação e congelamento e tratamento químico com dimetilsulfóxido. O método avaliado se mostrou uma ferramenta sensível na determinação de carotenóides oriundos de micro-organismos.

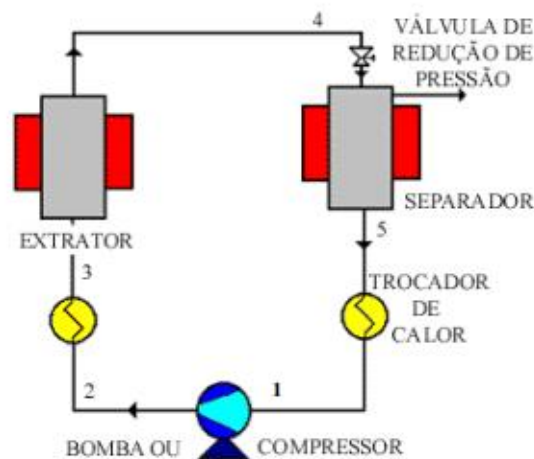
3.4.2.7 Extração com fluido supercrítico

Com o aumento das restrições ao uso de solventes por vezes tóxicos, o aumento no interesse dos consumidores por produtos naturais e o recente desenvolvimento da tecnologia supercrítica, promoveu um crescente empenho na recuperação de substâncias de fontes naturais utilizando o CO₂ supercrítico (SUM; TEMELLI, 2006).

Assim, a tecnologia supercrítica empregando como solvente o dióxido de carbono (CO₂) próximo ao ponto crítico na extração de compostos como carotenóides tem sido considerada uma alternativa pelas indústrias alimentícia e farmacêutica aos métodos tradicionais de extração, podendo ser utilizado com o solvente supercrítico puro, normalmente CO₂ ou com adição de co-solvente (MEIRELES, 2003; MEZZOMO, 2012).

O processo de extração por fluido supercrítico consiste basicamente na etapa de fracionamento e separação, onde a mistura entra em contato com o fluido no extrator. Após a fase de extração, a separação ocorre pela expansão do fluido saturado através de uma válvula de redução de pressão, onde a queda da pressão torna o soluto insolúvel e com possibilidade de separação (figura 6). O material pode ser extraído por um sistema contínuo ou em batelada (HUNG; UNGER, 1994).

Figura 6 – Esquema do processo de extração com fluido pressurizado.
FONTE: PENEDO (2007).



Macías-Sánchez et al. (2007) utilizaram a extração com CO₂ supercrítico em amostras de biomassa seca da cianobactéria *Synechoccus* sp., com o intuito de concentrar carotenoides e clorofila, nas condições de 100 a 500 bar de pressão e 313,15 a 333,15 K. Como resultado, foi encontrada a maior concentração de carotenoides totais a 300 bar e 323,15 K, e a maior relação carotenoides/clorofila foi obtida a 200 bar e 313,15 K (193 µg de carotenoides por µg de clorofila). De acordo com os autores, o CO₂ supercrítico é um solvente adequado para extração de carotenoides devido à baixa polaridade destes componentes, tornando o processo seletivo para carotenoides.

Lim et al. (2002) estudaram a extração supercrítica de astaxantina de *Phaffia rhodozyma*, avaliando diferentes velocidades superficiais de CO₂ (0,27 a 0,54 cm/min), pressão (102 a 500 bar), temperatura (313,15 a 353,15) e uso de etanol como co-solvente (1 a 15% v/v). A maior recuperação de carotenóides (85 %, m/m) e astaxantina (90 %, m/m) utilizando CO₂ puro a 0,54 cm/min foi obtida a 313,15 K e 500 bar.

Krichnavaruk et al. (2008) avaliaram o uso de óleo de soja e azeite de oliva como co-solventes ao CO₂ supercrítico na extração de astaxantina da *Haematococcus pluvialis*. Como resultado, foi encontrado que 25% da astaxantina foi recuperada pelo processo supercrítico, sem a utilização de co-solventes. Ao utilizar o óleo de soja e o azeite de oliva como co-solvente, ocorreu um aumento de 30 e 80%, respectivamente, na eficiência de extração da astaxantina, indicando aumento do poder de extração.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

Utilização de diferentes técnicas na ruptura celular de *Sporidiobolus pararoseus* para recuperação de carotenoides

Utilização de diferentes técnicas na ruptura celular de *Sporidiobolus pararoseus* para recuperação de carotenoides

LOPES, N.A.; BURKERT, J.F.M.

RESUMO

Além de ser um importante atrativo para os consumidores, os carotenoides proporcionam a diversos produtos suas cores naturais, possuindo ações biológicas. Os carotenoides produzidos pelas leveduras estão localizados no interior da célula microbiana, sendo necessário utilizar métodos de ruptura para a liberação do pigmento. O objetivo do trabalho foi estudar diferentes técnicas de ruptura da parede celular da levedura *Sporidiobolus pararoseus* para recuperação de carotenoides no uso em escala laboratorial e industrial. A levedura *S. pararoseus*, isolada de amostras ambientais, foi utilizada para cultivo submerso no meio YM, a 25 °C, 180 rpm por 168 h. A obtenção de biomassa foi realizada pela secagem convencional (35°C/48h) e através da liofilização (-80°C/48h, em ultrafreezer, seguido do processo de liofilização até alcançar 2% de umidade da amostra), sendo submetida ou não ao processo de congelamento (-18°C/48 h). Para a ruptura química utilizou-se dimetilsulfóxido, além dos ácidos clorídrico, acético e láctico (4 mol/L). Dentre os métodos de ruptura mecânicos, foi realizada a ruptura com banho ultrassônico, abrasão com pérolas de vidro, maceração com terra diatomácea, ruptor ultrassônico e imersão em nitrogênio líquido. A ruptura enzimática foi realizada com o preparado enzimático comercial Glucanex®, e estudada através das condições do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2³, onde as variáveis avaliadas foram pH (5,0 a 8,0), temperatura (25 a 50 °C) e concentração de enzima (1,0 a 4,0 g/gcs). A ruptura química com DMSO apresentou os maiores resultados (86,9±5,3 e 87,3±4,4 µg/g para ausência e presença de congelamento na biomassa, respectivamente), sendo utilizada para quantificação de carotenoides microbianos em laboratório, porém a presença de compostos tóxicos no extrato carotenogênico dificulta sua aplicação em escala industrial. Dentre os ácidos utilizados, os maiores valores encontrados foram para o ácido clorídrico (20,2±1,5 µg/g), seguido do acético (13,7±1,7 µg/g) e do láctico (9,5±0,4 µg/g). Os métodos mecânicos merecem destaque, a concentração específica de carotenoides e a extratibilidade foram muito similares aos resultados com o método químico DMSO, empregando as técnicas de abrasão com pérolas de vidro (76,9 µg/g e 88,3%) e banho ultrassônico (84,8 µg/g e 97,3%) não sendo constatadas diferenças significativas entre eles, sendo considerados métodos passíveis de ser escalonados ao nível industrial, com uma diminuição drástica dos resíduos químicos. O uso de técnica combinada de lise enzimática com o banho ultrassônico proporcionou um ganho de 17,1% na recuperação dos carotenoides, porém, este acréscimo não superou os valores encontrados para o banho ultrassônico e as pérolas de vidro. O processo de liofilização provocou um aumento de cerca de 20% na concentração específica dos carotenoides, quando comparado com o processo de secagem convencional. Assim, dentre os métodos estudados, os que apresentam melhores resultados foram o banho ultrassônico e as pérolas de vidro, podendo estes ser utilizados tanto em escala laboratorial, quanto na escala industrial, sendo o extrato obtido livre de resíduos tóxicos.

Palavras chave: ruptura celular, *Sporidiobolus pararoseus*, carotenoides

The use of different techniques on cell disruption of *Sporidiobolus pararoseus* to carotenoids recovering

LOPES, N.A.; BURKERT, J.F.M.

ABSTRACT

Besides of being consumers attractive, carotenoids bring to diverse products their natural colors, having biological actions. The carotenoids produced by yeasts are placed inside the microbial cell, being necessary to use different cell wall disruption techniques to the pigment delivery. The aim of this work was to study the yeast *Sporidiobolus pararoseus* different cell wall breaking techniques to carotenoids recovering in a lab and industrial scale. The *S. pararoseus* yeast, isolated from environmental samples, was used for a submerged cultivation in YM mean, a 25 °C, 180 rpm per 168 h. The biomass obtaining was performed by the conventional drying (35°C/48h) and through lyophilization (-80°C/48h, in ultra-freezer, followed by a lyophilization process until it reaches 2% of the sample moisture), being, or not, a subject of the frozen process (-18°C/48 h). Dimethylsulfoxide was used to the chemical disruption, besides the hydrochloride, acetic and lactic acids (4 mol/L). Among the mechanical disruption methods, a ultrasonic bath, glass beads abrasion, maceration with diatomaceous earth, ultrasonic hammer and immersion in liquid nitrogen were performed. The enzymatic disruption was performed with the commercial enzymatic preparation Glucanex® through Central Composite Rotatable Design (CCRD) 2³, where the studied variables were pH (5.0 to 8.0), temperature (25 to 50 °C) and enzyme concentration (1.0 to 4.0 g/gdc). The chemical disruption with dimethylsulfoxide has presented the highest results for specific concentration (86.9±5.3 and 87.3±4.4 µg/g for absence and presence of biomass frozen, respectively), being used for microbial carotenoids quantification in laboratory, however, the presence of toxic compounds in the carotenogenic extract makes difficult its application in industrial scale. Among the acid used, the highest values were found on the hydrochloride acid (20.2±1.5 µg/g), followed by the acetic (13.7±1.7 µg/g) and lactic (9.5±0.4 µg/g). For the mechanical methods, the highest values carotenoids specific conservation and extractability were reached applying glass beads abrasion techniques (76.9 µg/g and 88.3%) and ultrasonic bath (84.8 µg/g and 97.3%) and significant differences among them weren't found, making these possible methods for industrial application. The enzymatic method has presented specific concentration values of 42.6 µg/g and volumetric concentration of 308 µg/L, despite these results being inferior to the other applied methods, it has the advantage of its extract is free of toxic residues. The use of the combined techniques of enzymatic lysis and ultrasonic bath has brought a gain of 17.1% on the specific concentration and carotenoids extractability, nevertheless, this increasing hasn't overcome the values found on the ultrasonic bath and the glass beads. The lyophilization process has provoked an increasing of 20% on the carotenoids specific concentration. Thus, among the studied methods, the ultrasonic bath and glass beads have presented the best results, making these possible for being used in lab and industrial scale.

Key words: cell desruption, *Sporidiobolus pararoseus*, carotenoids

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides são considerados uma das mais importantes classes de pigmentos (HANNOUFA; HOSSAIN, 2012), sendo responsáveis por cores que vão do amarelo ao vermelho, passando pelo alaranjado (BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006). Além de atuar como corantes, são considerados substâncias bioativas, apresentando efeitos benéficos à saúde, sendo que alguns possuem atividade pró-vitáminica A (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

O aumento da consciência dos consumidores pela saúde se tornou um incentivo na busca por alimentos funcionais, desencadeando o aumento na demanda por carotenoides na indústria alimentar. Apesar da crescente procura pelos pigmentos obtidos de fontes microbianas na indústria alimentar, têxtil, farmacêutica e de cosméticos, estes pigmentos muitas vezes possuem um valor comercial mais elevado do que os obtidos de fonte sintética. Um exemplo disso é o β -caroteno que, produzido por fonte bacteriana, possui o custo de US\$1000/kg, enquanto que o produzido por fonte sintética possui o custo de US\$500/kg. A maior parte dos carotenoides comerciais são derivados da síntese química, no entanto, mesmo sendo mais caro, os carotenoides obtidos de fonte microbiana competem no mercado por possuírem a conotação natural (CABRAL et al., 2011, VENIL, ZAKARIA; AHMAD, 2013).

A produção de carotenoides pelas leveduras ocorre intracelularmente, e a rigidez da parede celular limita a extratibilidade deste pigmento. Com isso, se faz necessário o uso de técnicas de ruptura celular para a liberação dos compostos produzidos. A obtenção de um extrato carotenogênico obtido através de técnicas biotecnológicas representa importantes avanços científicos, permitindo possíveis extensões da escala laboratorial para a industrial (MICHELON et al., 2012). Para isso, técnicas mecânicas, físicas, químicas, enzimáticas, ou a combinação destas técnicas têm sido aplicada para recuperar carotenoides produzidos pelos micro-organismos (MONKS et al., 2013).

Em estudo conduzido por Cabral et al. (2011) foi isolada de amostras ambientais a levedura *Sporidiobolus pararoseus*, onde foi utilizado nitrogênio líquido e dimetilsulfóxido para a ruptura celular, sendo encontrado uma concentração de 856 $\mu\text{g/L}$ de carotenoides. Valduga et al. (2009) testaram métodos de ruptura utilizando diferentes tipos de solventes orgânicos para a levedura *S. salmonicolor*, enquanto Park, Kim; Chu (2007) testaram cinco solventes para a ruptura de células de *R. glutinis*. A técnica de ultrassom e o uso de enzimas

foi utilizado por Monks et al. (2013) para a ruptura da parede celular da *Sporidiobolus salmonicolor* e Medeiros et al. (2008) utilizaram ondas ultrassônicas associadas a pérolas de vidro, para extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081.

A levedura *Sporidiobolus pararoseus* foi isolada de amostras ambientais, a partir de cascas de árvores (OTERO, 2011), apresentando a maior produção de carotenoides específicos de 123,64 $\mu\text{g/g}$ e volumétricos de 905 $\mu\text{g/L}$, em meio YM, sendo identificados a produção da luteína, β -criptoxantina e β -caroteno. Além disso, esta levedura mostrou-se capaz de se desenvolver em meios contendo água de maceração de milho e glicerol (M1), e água de maceração de milho e melão (M2), comparando com o meio convencional (YM), apresentando 634,5 e 830,3 $\mu\text{g/L}$ e 87,3 e 68,1 $\mu\text{g/g}$ para M1 e M2, respectivamente. Destacou-se, ainda, em relação à produção de β -caroteno, com 89,2 e 94,4% dos carotenoides identificados no M1 e M2, respectivamente. Apresentando elevados valores de biomassa, com 7,3; 9,8 e 12,2 g/L para o M1, YM e M2, respectivamente (CIPOLATTI, 2012)

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi estudar diferentes técnicas de ruptura da parede celular da levedura *Sporidiobolus pararoseus* para recuperação de carotenoides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Foi utilizada a levedura *Sporidiobolus pararoseus* isolada de cascas de árvores coletadas na cidade de Caçapava do Sul por Otero (2011). Antes dos experimentos, a levedura foi mantida em ágar inclinado GYMP (p/v) com 2,0% glicose, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO_4 0,2% e ágar 2,0% (COELHO, 2005), sendo armazenada a 4 °C e repicada a cada três meses para a manutenção da levedura.

2.2 Preparo do inóculo

Previamente ao preparo do inóculo, foi realizada a reativação do micro-organismo a partir do repique da levedura *S. pararoseus* no meio YM, composto por 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e adicionados de 0,2 g/L de KNO_3 (PARAJÓ, SANTOS; VÁZQUEZ, 1998) sendo incubados por 48 h a 25 °C. Após foi realizada uma ressuspensão celular em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionada em 9 mL de meio YM, incubando-se nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para a obtenção do inoculo foram utilizados frascos agitados de 500 mL contendo 90 mL de caldo YM modificado, adicionado de 10 mL do cultivo oriundo da reativação, sendo incubado a 150 rpm, 25 °C por 48 h, até a concentração celular atingir 1×10^8 células/mL, contadas através de câmara de Neubauer (SILVA, 2010).

2.3 Cultivo em frascos agitados

A levedura *S. pararoseus* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 225 mL do meio YM, com pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inoculo, sendo as condições operacionais do processo 25 °C, 180 rpm por 168 h (SILVA, 2009). As amostras foram retiradas em intervalos de 24 h até o término do processo (168 h), a fim de acompanhar biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais para avaliação da cinética do processo.

2.4 Tratamento da biomassa

A biomassa de *S. pararoseus* foi recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1745 xg por 10 min) e o sedimento lavado com água destilada. A secagem da biomassa foi realizada a 35 °C por 48 h (FONSECA et al., 2011) em estufa de circulação de ar forçado, sendo maceradas em graal e peneirada (mesh 115) conforme Cipolatti (2012). Parte da biomassa foi submetida ao processo de congelamento a -18 °C por 48 h (MORAES, BURKERT; KALIL, 2010) e a outra parte sem congelar.

2.4.1 Secagem da biomassa por liofilização

A influencia de diferentes métodos de secagem foi estudado para a biomassa de *S. pararoseus*, sendo esta recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1745 xg por 10 min) e o sedimento lavado com água destilada. Para isto, foram comparados os métodos de secagem convencional em estufa de circulação de ar forçado (35 °C/48h) e liofilização (-80 °C/48 h, em ultrafreezer, seguido do processo de liofilização até alcançar 2% de umidade da amostra), através do método adaptado de Martins, Costa; Prentice-Hernández (2009), sendo a biomassa submetida ou não ao processo de congelamento.

2.5 Técnicas de ruptura celular

A extração dos carotenoides obtidos da levedura *S. pararoseus* foi realizada a partir de diferentes métodos de ruptura celular. Em todos os ensaios foi utilizada biomassa seca (35 °C/48 h) submetida ou não ao processo de congelamento (-18 °C/48 h).

2.5.1 Técnicas químicas de ruptura celular

2.5.1.1 Ácido clorídrico, acético e láctico

Foi utilizada 7,5 mL de uma solução de 4 mol/L dos ácidos acético, clorídrico ou láctico. As diferentes soluções foram adicionadas a 0,5 g de biomassa colocados em banho agitado a 35 °C, durante 5 min (NI et al., 2008).

2.5.1.2 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Uma amostra de 0,05 g de biomassa foi homogeneizada em vórtex juntamente com 2 mL de dimetilsulfóxido a 55 °C. A homogeneização foi realizada durante 1 min, sendo a cada intervalo de 15 min homogeneizado novamente em vórtex, até completar 1 h (FONSECA et al., 2011).

2.5.2 Técnicas mecânicas de ruptura celular

2.5.2.1 Abrasão com pérolas de vidro

Esta técnica foi adaptada a partir do procedimento descrito por Medeiros et al. (2008), que consiste em adicionar em um tubo de ensaio 6 mL de acetona e 0,5 g de biomassa acrescidos de 1,1 g/mL de pérolas de vidro ($0,5 < d < 0,59$ mm). A mistura final foi agitada em vórtex durante 10 min.

2.5.2.2 Banho ultrassônico

A técnica consiste em adicionar 6 mL de acetona juntamente com 0,5 g de biomassa submetidos a 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, sendo a água do banho trocada a cada ciclo (MEDEIROS et al., 2008).

2.5.2.3 Maceração com terra diatomácea

A técnica foi realizada a partir da adaptação do método utilizado por Valduga et al. (2009), onde 0,5 g de biomassa foi macerada juntamente com 0,5 g de terra diatomácea, durante 10 min em almofariz com auxílio de um pistilo, sendo posteriormente adicionado 6 mL de acetona.

2.5.2.4 Imersão em nitrogênio líquido

A imersão foi realizada durante 1 min em nitrogênio líquido, em tubos contendo 6 mL de acetona e 0,5 g de biomassa (BORGES, 2006).

2.5.2.5 Ruptor ultrassônico

Tubos contendo 6 mL de acetona e 0,5 g de biomassa foram submetidos à homogeneização ultrassônica, durante 20 min, sob constante refrigeração, com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, utilizando uma micro ponteira de titânio com 40% de potência (LEMES, ÁLVARES; KALIL, 2013).

2.5.3 Técnica enzimática de ruptura celular

2.5.3.1 Enzima lítica

A ruptura da parede celular da levedura *S. pararoseus* foi realizada utilizando o preparado enzimático comercial Glucanex® - Novozymes (BJERKENG et al., 2007) proveniente do fungo *Trichoderma harzianum* contendo as enzimas β -1,3-glucanase, protease, celulase e quitinase.

Para determinar a condição de lise da parede celular foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2³. Os pHs do meio reacional testados foram 5,0 e 5,6 utilizando tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, 6,5 utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L e 7,4 e 8,0 utilizando tampão tris-HCl 0,2 mol/L. As temperaturas da reação enzimática foram 25, 30, 37,5, 45 e 50 °C. As concentrações de enzima utilizada por grama de célula seca foram 1,0, 1,6, 2,5, 3,4 e 4,0. A resposta avaliada foi à concentração específica de carotenoides e a concentração volumétrica ($\mu\text{g/g}$ e $\mu\text{g/L}$), respectivamente.

2.5.3.2 Recuperação de carotenoides utilizando lise enzimática

Para a realização dos ensaios de ruptura celular utilizando o método enzimático, foram pesados 0,05 g de biomassa seca (35 °C/48 h), juntamente com as diferentes concentrações de enzima provenientes do DCCR (tabela 3), com a adição de 4 mL dos respectivos tampões acetato de sódio 0,2 mol/L, tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L e tampão tris-HCl 0,2 mol/L. A mistura final, contendo 4 mL, foi incubada nas diferentes temperaturas oriundas também do planejamento experimental completo, por 48 h e 180 rpm (MONKS et al., 2013). Posteriormente foi realizada a lavagem da biomassa, com adição de 4 mL de água destilada, e a centrifugação (1745 xg por 10 min). Para a extração dos carotenoides foi adicionada 6 mL de acetona, sendo centrifugada nas mesmas condições.

2.6 Métodos analíticos

2.6.1 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um potenciômetro, segundo AOAC (1995).

2.6.2 Determinação de açúcares totais

A concentração de açúcares totais foi determinada através do método DNS (MILLER, 1959).

2.6.3 Determinação da concentração de biomassa

A concentração celular ao longo da produção dos carotenoides foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, através de uma curva padrão de biomassa (KUSDIYANTINI et al., 1998).

2.6.4 Extração e determinação dos carotenoides totais

Após a realização de cada método de ruptura as amostras foram centrifugadas (1745 xg por 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para a extração dos carotenoides.

Para isso foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo no sobrenadante separado. Após a formação de duas fases a fase polar foi coletada e o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na₂SO₄), originando os extratos carotenogênicos (MICHELON et al. 2012).

A determinação da concentração de carotenoides nos extratos foi realizada a 448 nm (CABRAL et al., 2011), utilizando a equação 1 (DAVIES, 1976), sendo expressa em termos de seu carotenoide majoritário (β-caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de 2592).

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \cdot 100 \cdot m_{amostra}} \quad (1)$$

Onde: CT= concentração específica de carotenoides totais (µg/g), A= absorvância, V= volume (mL), $m_{amostra}$ = massa celular seca (g) e $A_{1cm}^{1\%}$ =absortividade específica.

A produção volumétrica (µg/L) foi calculada a partir da conversão de unidades utilizando o resultado de concentração de carotenoides totais (µg/g) e concentração da biomassa (g/L).

A extratibilidade de carotenoides (EC) foi determinada através da relação entre a concentração específica dos carotenoides recuperados (CR) em cada técnica de ruptura celular e a concentração específica de carotenoides totais (CT) determinada pelo método de ruptura celular utilizando DMSO (XIÃO et al., 2009), como mostra a equação 2.

$$EC (\%) = \frac{CR}{CT} * 100 \quad (2)$$

2.7 Caracterização enzimática do preparado comercial

2.7.1 Atividade enzimática de β -1,3-glucanase

Uma alíquota de 250 μ L de solução enzimática e 250 μ L de solução 1% de laminarina obtida da alga *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich - Pais) em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,5, foi incubada a 55 °C por 30 min, sendo a reação interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 min (SAEKI et al., 1994). Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Miller (1959). Como controle foi utilizado água destilada no lugar da solução de laminarina e determinados os açúcares redutores presente na solução.

A determinação da atividade enzimática foi definida como uma unidade de atividade enzimática de β -1,3-glucanase (U), corresponde a liberação de 1 μ mol de glicose por minuto, por mL de solução enzimática (SANTOS, 2006).

2.7.2 Atividade enzimática de protease

A amostra contendo 100 μ L de tampão tris-HCl (100 mmol/L, pH 8,0), 300 μ L de azocaseína 1% (m/v) diluída em tampão tris-HCl (100 mmol/L, pH 8,0) e 100 μ L de enzima diluída foi incubada a 40 °C durante 30 min, sendo a reação paralisada com a adição de 600 μ L de ácido tricloroacético 10% (m/v). Após a mistura foi centrifugada (1745 xg por 20 min), sendo misturados 800 μ L do sobrenadante com 200 μ L de solução 1,8 mol/L de hidróxido de sódio (DAROIT et al., 2009).

A absorvância foi determinada a 420 nm, onde uma unidade de atividade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento de 0,1 unidades de absorvância nas condições do ensaio (DAROIT et al., 2009).

2.8 Visualização por microscopia

A visualização por microscopia óptica da ruptura das células da *S. pararoseus* foi verificada, utilizando corante (combinação de cristal violeta/fucsina) e ampliação de 1000 vezes.

2.9 Análise estatística

Os testes de ruptura celular foram realizados em triplicatas e os resultados submetidos à análise de variância. Quando detectadas diferenças ao nível de significância 5% ($p < 0,05$), foram seguidos por teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

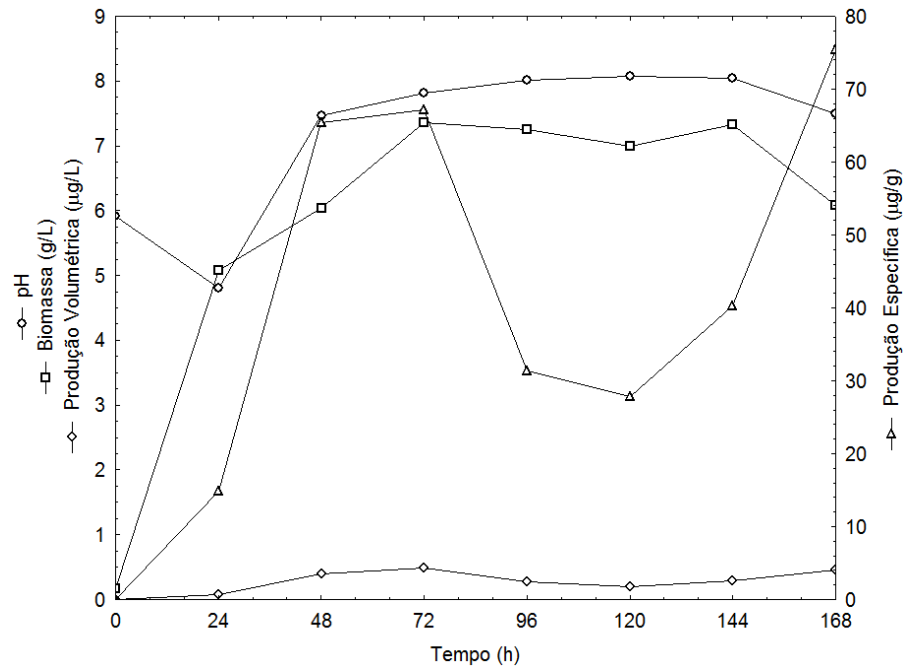
3.1 Cultivos submersos para a produção de carotenoides

A figura 1 apresenta o acompanhamento cinético do crescimento celular, da produção específica e volumétrica de carotenoides e a variação de pH no cultivo de *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados, a 25 °C, 180 rpm, por 168 h.

O máximo crescimento celular (figura 1) ocorreu em 144 h de cultivo alcançando 7,34 g/L, com uma diminuição de 17,3% ao término do processo (6,07 g/L). O pH inicial do meio de produção sofreu influência dos compostos formados e liberados ao longo do cultivo, ocorrendo nas primeiras 24 h um decréscimo (pH 4,8) com posterior incremento até alcançar as 168 h (pH 7,49), devido aos ácidos orgânicos liberados durante o consumo do açúcar presente no meio. Após este período, os compostos liberados foram reassimilados, ocorrendo à formação dos compostos carotenogênicos (CIPOLATTI, 2012; OTERO, 2011; ZENI, 2009). Ao final do cultivo a produção de carotenoides totais resultou em um máximo de 75,4 µg/g e 458,5 µg/L.

Otero (2011) e Cipolatti (2012), quando estudaram a levedura *S. pararoseus*, encontraram uma concentração de 7,32 e 9,8 g/L de biomassa, respectivamente, utilizando o meio YM para o cultivo. Valduga et al. (2013) quando avaliaram o crescimento da *Sporidiobolus pararoseus* em meio composto por glicerol, água de maceração de milho e água de arroz parboilizado, encontraram em torno de 4,0 g/L de biomassa. Machado (2013) ao avaliar a levedura *S. pararoseus* em meio formulado com glicerol bruto (30 g/L) e água de maceração de milho (52,9 g/L) pré tratado com ácido sulfúrico, obteve a produção de 13,0 g/L de biomassa.

Figura 1 – Cinética para produção de carotenoides totais da *S. pararoseus* em frascos agitados, meio YM, a 25 °C e 180 rpm.



3.2 Técnicas químicas de ruptura celular

A tabela 1 apresenta o percentual de extratibilidade e a concentração específica de carotenoides empregando diferentes técnicas químicas de ruptura celular da biomassa submetida ou não ao processo térmico de congelamento.

Tabela 1 – Concentração específica (µg/g) e extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando diferentes técnicas químicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.

Técnica	CEC (µg/g)		EC (%)	
	Congelamento			
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
1	13,7 ± 1,7 ^{bA}	17,0 ± 4,2 ^{aA}	15,8 ± 1,7 ^{bA}	19,6 ± 5,5 ^{aA}
2	20,2 ± 1,5 ^{aA}	18,8 ± 3,3 ^{aA}	23,2 ± 0,4 ^{aA}	21,6 ± 4,8 ^{aA}
3	9,5 ± 0,4 ^{cA}	11,0 ± 1,4 ^{aA}	11,0 ± 0,9 ^{cA}	12,7 ± 2,2 ^{aA}

Médias ± desvios padrões (n=3); 1: Ácido acético; 2: Ácido clorídrico; 3: Ácido lático; CEC: Concentração específica de carotenoides; EC: Extratibilidade de carotenoides; DMSO: (CEC= 86,9±5,3 e 87,3±4,4 µg/g para presença e ausência de congelamento da biomassa, respectivamente; EC= 100% para presença e ausência de congelamento); Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna (p<0,05) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha (p<0,05).

Os maiores valores observados para extratibilidade e concentração específica de carotenoides foram encontrados para a ruptura com o DMSO (tabela 1). Segundo Michelon et al. (2012), quando utilizaram a levedura *Phaffia rhodozyma* para produção de carotenoides, este resultado já era esperado, visto que esta técnica é utilizada para quantificação de carotenoides microbianos em escala laboratorial. No entanto, a presença de compostos tóxicos neste extrato carotenogênico dificulta sua aplicação em escala industrial.

Com relação aos ácidos utilizados os maiores valores foram encontrados para o ácido clorídrico, seguido do acético e do lático. Esse fenômeno provavelmente pode ser explicado pelos valores da intensidade ácida (pKa). Quanto mais intenso é o ácido, maior é a eficiência de perturbação na célula de levedura. O ácido clorídrico apresenta valor de pKa de -7, sendo considerado um ácido forte, o ácido lático e o ácido acético apresentam valores de pKa de 3,83 e 4,74, respectivamente, classificando-se como ácidos fracos (NI et al., 2008). No presente trabalho, com o congelamento foi verificado que a intensidade ácida é proporcional a extratibilidade de carotenoides. Apesar dos valores encontrados serem inferiores ao dimetilsulfóxido, o extrato obtido com a utilização dos ácidos possui baixa toxicidade, podendo ser aplicado em alimentos.

O processo de congelamento não aumentou a recuperação de carotenoides nos métodos de ruptura com o DMSO e com os ácidos aplicados, podendo ser eliminado do processo.

Monks et al. (2013) e Michelon et al. (2011), quando utilizaram *Sporodiobolus salmonicolor* e *Phaffia rhodozyma*, respectivamente, para produção de carotenoides e estudando a ruptura celular com os ácidos acético, clorídrico e lático, observaram comportamento semelhante, apresentando melhores resultados quando utilizado o ácido clorídrico, seguido do ácido acético e lático.

3.3 Técnicas mecânicas de ruptura celular

O percentual de extratibilidade e a concentração específica de carotenoides empregando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular da biomassa seca submetida ou não ao processo térmico de congelamento estão descritos na tabela 2.

Para cada método de ruptura aplicado, foi utilizado um valor diferente de concentração específica de carotenoides obtida pela ruptura com DMSO, com o intuito de estimar os valores de extratibilidade para cada método.

Na tabela 2 que os maiores valores de concentração específica de carotenoides e extratibilidade foram alcançados empregando as técnicas de abrasão com pérolas de vidro

(76,9 µg/g e 88,3%) e banho ultrassônico (84,8 µg/g e 97,3%) não sendo constatadas diferenças significativas entre elas ($p>0,05$). Com relação às técnicas de ruptura celular previamente congelada, a técnica mais promissora foi com a utilização do banho ultrassônico (88,0 µg/g e 77,5%), diferindo-se estatisticamente das demais ($p<0,05$). Tanto as pérolas de vidro, quanto o banho ultrassônico merecem destaque, visto que a concentração específica e a extratibilidade dos carotenoides foram muito semelhantes aos obtidos com o método químico utilizando DMSO, sendo estas técnicas possíveis de serem empregadas ao nível industrial, (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002), reduzindo drasticamente os resíduos químicos gerados durante o processo. Apesar do banho ultrassônico não ser utilizado para a ruptura de micro-organismos em escala industrial, devido ao aquecimento provocado, este não interferiu negativamente na recuperação dos carotenoides.

Tabela 2 – Concentração específica (µg/g) e extratibilidade (%) de carotenoides utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.

Técnica	CEC (µg/g)		EC (%)	
	Congelamento			
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
*1	75,1 ± 1,8 ^{bA}	76,9 ± 2,1 ^{aA}	66,2 ± 3,6 ^{bB}	88,3 ± 6,7 ^{aA}
*2	88,0 ± 3,3 ^{aA}	84,8 ± 2,3 ^{aA}	77,5 ± 3,6 ^{aB}	97,3 ± 6,2 ^{aA}
*3	51,9 ± 2,6 ^{cA}	39,0 ± 5,5 ^{bB}	45,8 ± 4,1 ^{cA}	44,9 ± 7,6 ^{bA}
**4	45,8 ± 2,7 ^{c,dA}	33,1 ± 8,5 ^{b,cA}	55,0 ± 3,3 ^{cA}	39,7 ± 10,2 ^{bA}
**5	43,0 ± 2,3 ^{dA}	24,0 ± 2,4 ^{cB}	55,1 ± 3,7 ^{cA}	33,7 ± 8,1 ^{bB}

Médias ± desvios padrões (n=3); 1: Abrasão com pérolas de vidro; 2: Banho ultrassônico; 3: Homogeneizador ultrassônico; 4: Maceração com terra diatomácea; 5: Imersão em nitrogênio líquido; EC: Extratibilidade de carotenoides; CEC: Concentração específica de carotenoides; *DMSO: CEC= 113,6±4,6 e 87,3±4,4 µg/g e **DMSO: CEC= 78,2±3,3 e 72,7±9,7 µg/g para biomassa congelada e não congelada, respectivamente. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p>0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p>0,05$).

Fonseca et al. (2011) utilizaram diferentes métodos de ruptura, entre eles o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro para a obtenção de astaxantina de *Phaffia rhodozyma*, obtendo atividade específica de 305,3±27,7 µg/g na abrasão com pérolas de vidro

e 2198,4 $\mu\text{g/g}$ com o banho ultrassônico, mostrando-se eficaz na ruptura da parede celular quando utilizado com conjunto com a secagem como pré-tratamento.

Lemes, Álvares; Kalil (2012) estudaram a extração de β -galactosidase obtida intracelularmente a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através do método de ruptura ultrassônica em comparação ao método que utiliza pérolas de vidro. O método de extração empregando o ruitor ultrassônico com frequência de 20 KHz e potência máxima de 150 W, utilizando potencia intermediária (70% de potência), foi eficiente para a extração em escala laboratorial, onde apresentou resultados semelhantes ao método de abrasão com pérolas de vidro.

Os métodos que utilizam o banho e o homogeneizador ultrassônico empregam as ondas ultrassônicas, produzindo o fenômeno de cavitação, sendo capaz de promover a ruptura celular. O tratamento com banho ultrassônico apresentou resultados superiores ao do homogeneizador ultrassônico. Este fato pode ser explicado devido ao tempo, bem como a frequência utilizada em cada método. Para o homogeneizador ultrassônico foi utilizado o tempo de 20 min, com frequência de 20 kHz, enquanto para o banho ultrassônico o tempo total foi de 40 min e frequência de 40 kHz. Assim, a ruptura da parede celular foi mais eficiente com o banho ultrassônico devido ao tempo de exposição e a frequência utilizada serem maiores para este método, proporcionando melhores resultados quando comparado com o homogeneizador ultrassônico.

O congelamento da biomassa provocou um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de carotenoides quando foram utilizadas as técnicas de homogeneizador ultrassônico e nitrogênio líquido (tabela 2), comportamento similar observado para a extratibilidade deste último método de ruptura. No congelamento lento ocorre a formação de cristais de gelo fora da célula, promovendo a ruptura celular (VODA et al., 2012) aumentando assim a liberação de compostos presentes no interior da célula.

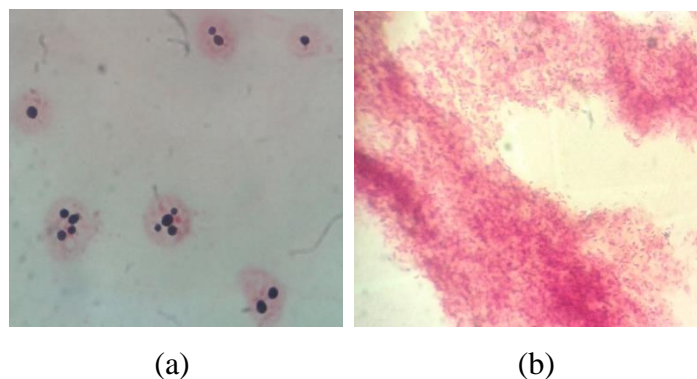
Segundo Voda et al. (2012) o congelamento rápido provoca o crescimento de cristais de gelo no interior da célula, sendo estes de tamanho pequeno, provocando menos danos a parede celular, porém a utilização de nitrogênio líquido para o congelamento rápido provoca a formação de rachaduras na parede celular, aumentando assim os danos na estrutura e, conseqüentemente, aumentando a concentração específica e a extratibilidade dos carotenoides quando utilizada a imersão em nitrogênio líquido com biomassa congelada.

O processo de congelamento da biomassa não influenciou a concentração específica de carotenoides quando aplicadas as técnicas de abrasão com pérolas de vidro e banho ultrassônico, porém, desfavoreceu o percentual de extratibilidade dos carotenoides (tabela 2). Assim, o processo de congelamento da biomassa para estas técnicas pode ser eliminado do processo de recuperação carotenogênica, trazendo benefícios como economia de energia e diminuição do tempo gasto durante a recuperação destes carotenoides.

A formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento provoca lesões na parede celular, resultando em perdas de fluídos citoplasmáticos, reduzindo assim o tamanho das partículas (MICHELON et al. 2012). Com isso, a diminuição da extratibilidade e da concentração específica de carotenoides utilizando a operação prévia de congelamento da biomassa, na ruptura com ultrassom e pérolas de vidro, provavelmente ocorreu porque as células apresentaram um menor volume do que os redemoinhos formados pelas ondas ultrassônicas e pelas pérolas de vidro.

A visualização por microscopia óptica da ruptura das células da *S. pararoseus* foi verificada, utilizando corante (combinação de cristal violeta/fucsina) e ampliação de 1000 vezes. A avaliação microscópica mostrou que a aplicação de banho ultrassônico (Figura 2b) promovia mais ruptura quando comparado com a célula da levedura intacta (Figura 2a).

Figura 2 – Células de levedura *S. pararoseus* sem nenhum método de ruptura (a) e células após a ruptura com banho ultrassônico (b).



3.4 Técnica enzimática de ruptura celular

O preparado enzimático Glucanex® apresentou uma atividade enzimática específica de 0,42 U/mg de proteína para β -1, 3-glucanase e de $2,35 \times 10^5$ U/mg de proteína para protease. Estes resultados confirmam a presença ativa das duas enzimas necessárias para a lise da parede celular da levedura *S. pararoseus*.

3.4.1 Avaliação da ruptura celular de *S. pararoseus*

A tabela 3 apresenta a concentração específica e volumétrica de carotenoides empregando a técnica enzimática de ruptura celular na biomassa seca não submetida ao congelamento, através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2³.

Após a realização do DCCR pode ser verificado que a variação observada nos experimentos foi de 11,2 µg/g e 80,7 µg/L (ensaio 12) a 42,6 µg/g e 308 µg/L (ensaio 6). Apesar dos valores encontrados serem inferiores aos métodos de ruptura mecânicos com pérolas de vidro e banho ultrassônico, este método apresenta a vantagem de ser aplicável ao nível industrial, além de não possuir resíduos tóxicos provenientes do DMSO, podendo ser futuramente otimizado a fim de obter melhores resultados.

Tabela 3 – Matriz do DCCR 2³ em níveis codificados e reais (entre parênteses) em termos de concentração específica (µg/g) e concentração volumétrica (µg/L) de carotenoides utilizando a técnica enzimática para a ruptura celular na biomassa seca não submetida ao processo de congelamento.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Concentração de Enzima (g/gcs)	Carotenoides (µg/g)	Carotenoides (µg/L)
1	-1 (5,6)	-1 (30)	-1 (1,6)	35,4	255,8
2	+1 (7,4)	-1 (30)	-1 (1,6)	33,9	245,0
3	-1 (5,6)	+1 (45)	-1 (1,6)	35,4	255,8
4	+1 (7,4)	+1 (45)	-1 (1,6)	32,9	237,8
5	-1 (5,6)	-1 (30)	+1 (3,4)	39,2	283,0
6	+1 (7,4)	-1 (30)	+1 (3,4)	42,6	308,0
7	-1 (5,6)	+1 (45)	+1 (3,4)	36,7	265,1
8	+1 (7,4)	+1 (45)	+1 (3,4)	25,7	185,7
9	0 (6,5)	0 (37,5)	0 (2,5)	30,1	217,4
10	0 (6,5)	0 (37,5)	0 (2,5)	27,1	195,7
11	-1,68 (5,0)	0 (37,5)	0 (2,5)	20,3	146,7
12	+1,68 (8,0)	0 (37,5)	0 (2,5)	11,2	80,7
13	0 (6,5)	-1,68 (25)	0 (2,5)	32,6	235,6
14	0 (6,5)	+1,68 (50)	0 (2,5)	21,9	157,9
15	0 (6,5)	0 (37,5)	-1,68 (1,0)	20,1	145,1
16	0 (6,5)	0 (37,5)	+1,68 (4,0)	12,2	88,4

*gcs= gramas de célula seca

A tabela 4 apresenta os efeitos das variáveis independentes sobre a concentração específica e volumétrica de carotenoides, na ruptura da parede celular da levedura *S. pararoseus*. Como pode ser observado o incremento das variáveis estudadas do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) não produziu efeito significativo ($p > 0,05$) nas respostas estudadas. Portanto, os níveis selecionados para este planejamento experimental do pH, temperatura e concentração de enzima não influenciaram estatisticamente a recuperação dos carotenoides. Com isso, os resultados encontrados estão distantes da sua condição ótima (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Portanto, o ensaio 6 (tabela 3) foi escolhido como a melhor condição de trabalho, apresentando pH 7,4, temperatura de 30 °C e concentração de enzima de 1,0 g/gcs, por 48 h.

Tabela 4 – Efeito principal das variáveis estudadas pelo DCCR 2³ sobre a concentração específica e volumétrica de carotenoides.

	Carotenoides Específicos (µg/g)				Carotenoides Volumétricos (µg/L)				
	CR	EP	t (3)	p*	CR	EP	t (3)	p*	
Média	33,90	1,80	18,83	<0,01	Média	244,93	13,03	18,79	<0,01
X1(L)	-2,90	4,02	-0,72	0,52	X1(L)	-20,80	29,15	-0,71	0,52
X ₂ (L)	-5,10	4,02	-1,27	0,29	X ₂ (L)	-36,85	29,15	-1,26	0,26
X ₃ (L)	1,65	4,02	0,41	0,71	X ₃ (L)	11,85	29,15	0,41	0,71
X ₁ xX ₂	-3,85	4,02	-0,95	0,41	X ₁ xX ₂	-27,90	29,15	-0,96	0,41
X ₁ xX ₃	-0,90	4,02	-0,22	0,84	X ₁ xX ₂	-6,40	29,15	-0,22	0,84
X ₂ xX ₃	-4,60	4,02	-1,14	0,34	X ₁ xX ₂	-33,25	29,15	-1,14	0,33

* $p \leq 0,10$; X₁: pH; X₂: temperatura; X₃: concentração de enzima por grama de célula seca.

Segundo Fleuri; Sato (2010), diversos produtos intracelulares podem ser obtidos através da lise enzimática. A enzima β -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* apresenta temperatura ótima de atividade a 55 °C em pH 4,5, enquanto a protease produzida pelo mesmo micro-organismo apresenta temperatura ótima de atividade a 40 °C em pH 8,0. Estas enzimas são essenciais para a ruptura da parede celular, onde a protease degrada a camada externa de mananaproteína e a β -1,3 glucanase degrada a camada interna de glucana (FLEURI; SATO, 2005; MARCO et al., 2002). Os maiores valores encontrados no rompimento da parede celular da *S. pararoseus* se aproximam da condição ótima de pH e temperatura encontrada para a enzima protease, indicando que esta enzima atuou

primeiramente na lise celular. A utilização do método enzimático possibilita o uso do extrato obtido em alimentos, além de ser um método com possível escalonamento industrial.

O efeito das variáveis pH inicial, temperatura e agitação foram estudadas na produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, onde através do planejamento experimental 2³, verificaram que a maior produção da enzima β -1,3 glucanase (0,64 U/mL) foi obtida com o pH inicial de 8,5 a 33 °C e 200 rpm e a maior produção da protease (4,25 U/mL) foi verificada com pH inicial de 6,5 a 20 °C e 200 rpm (FLEURI; SATO, 2008).

O uso de enzimas para a ruptura da parede celular de leveduras já foi estudado por Monks et al. (2013) onde encontraram 572,7 μ g/L de carotenoides provenientes da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, utilizando um mix de enzimas composto de β (1,3-1,4)-glucanase, xilanase, celulase, β -glicosidase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, amilase e protease, na concentração de 3,4 g de enzima por grama de célula seca a 35 °C. Michelon et al. (2012) utilizaram o preparado enzimático Glucanex®, encontrando uma concentração de 156,96 \pm 4,55 μ g/g de carotenoides oriundos de *Phaffia rhodozyma*.

3.5 Recuperação de carotenoides utilizando métodos combinados

Com o intuito de melhorar os resultados obtidos para a concentração específica e a extratibilidade dos carotenoides, foi utilizada a combinação de técnicas enzimáticas e mecânicas, com o objetivo de alcançar melhores resultados. Para isso, a ruptura da parede celular da levedura *S. pararoseus* foi realizada utilizando a melhor técnica mecânica seguida da enzimática, bem como a combinação das duas melhores técnicas mecânicas. Os ensaios foram realizados apenas com a biomassa não submetida ao processo de congelamento, pois nas técnicas utilizadas a etapa de congelamento não mostrou influência significativa na concentração específica e na extratibilidade dos carotenoides.

A tabela 5 apresenta a concentração específica e a extratibilidade de carotenoides obtidos em cada técnica separadamente e a sua combinação.

De acordo com a tabela 5, os métodos que apresentaram a maior concentração específica e extratibilidade de carotenoides foram o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro, porém, o uso destes dois métodos combinados não proporcionou melhorias aos resultados, demonstrando um decréscimo de 33,2 e 26,4% na concentração específica e na extratibilidade, respectivamente.

Tabela 5 – Concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando a combinação das técnicas de ultrassom, pérolas de vidro e lise enzimática, na biomassa não congelada.

Técnica	CEC ($\mu\text{g/g}$)	EC (%)
*Banho Ultrassônico	$84,8 \pm 2,3^a$	$97,3 \pm 6,2^a$
*Pérolas de Vidro	$76,9 \pm 2,1^a$	$88,3 \pm 6,7^a$
**Lise Enzimática	$34,4 \pm 9,8^c$	$39,8 \pm 13,1^c$
**Banho Ultrassônico + Pérolas de Vidro	$56,6 \pm 2,0^b$	$65,0 \pm 5,2^b$
**Lise Enzimática + Banho Ultrassônico	$41,1 \pm 4,6^c$	$47,1 \pm 3,7^{b,c}$

*DMSO: CEC= $87,3 \pm 4,4 \mu\text{g/g}$. **DMSO: CEC= $85,3 \pm 3,8 \mu\text{g/g}$. Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$). CEC: Concentração específica de carotenoides; EC: Extratibilidade de carotenoides.

O uso da combinação das técnicas de lise enzimática com o banho ultrassônico proporcionou um ganho de 17,1% na concentração específica e na extratibilidade dos carotenoides, contudo este acréscimo não superou os valores encontrados para o banho ultrassônico e as pérolas de vidro.

A combinação de técnicas já foi utilizada por outros autores, evidenciando melhorias nos resultados. Medeiros et al. (2008) estudaram a extração da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando um sistema de sonicação obtido através do banho ultrassônico, combinado com o processo de abrasão com pérolas de vidro com uma carga de 1,1 g de pérolas de vidro por mL de suspensão celular (diâmetro entre 0,95 – 1,05 mm), por um período de 40 minutos, proporcionando um rendimento do processo de extração de 550,4 U/g, onde o método combinado foi considerado eficiente para a extração.

Michelon et al. (2012), ao combinarem os métodos de maceração com terra diatomácea, juntamente com a lise enzimática, conseguiram um acréscimo de 64,7 e 17,5% de extratibilidade e concentração específica de carotenoides, sobre a maceração com terra diatomácea e a lise enzimática, respectivamente, quando utilizada a levedura *P. rhodozyma*.

Os resultados obtidos empregando as diferentes técnicas combinadas não apresentaram melhorias frente aos métodos utilizados separadamente, na biomassa da levedura *S. pararoseus*. Monks et al. (2013), quando combinaram o uso de bicarbonato de sódio com ultrassom, encontraram $113,96 \pm 6,9 \mu\text{g/L}$ de carotenoides oriundos da levedura

Sporidiobolus salmonicolor, porém resultados superiores foram encontrados com a utilização da técnica de bicarbonato de sódio separadamente ($155.3 \pm 4.8 \mu\text{g/L}$). Estes resultados sugerem que a combinação de técnicas para leveduras do gênero *Sporidiobolus* sp. não são tão eficientes quanto o uso de técnicas utilizadas separadamente.

3.6 Utilização de liofilização na secagem da biomassa

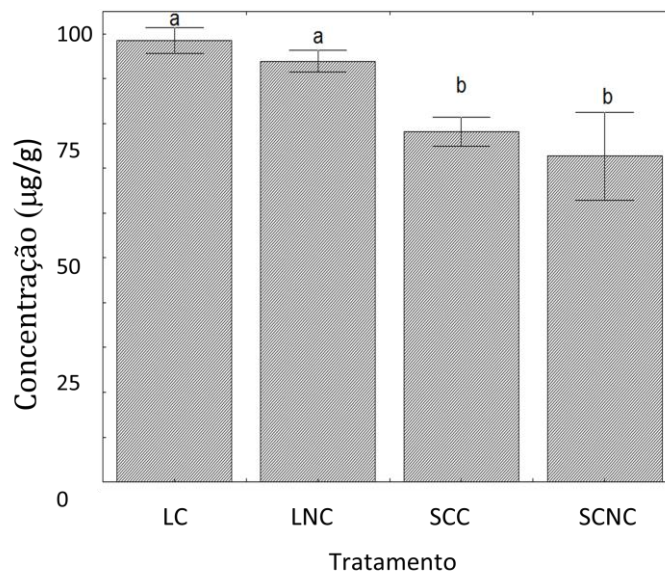
A concentração específica dos carotenoides totais utilizando o processo da liofilização foi de $98,6 \pm 2,9$ e $93,9 \pm 2,4 \mu\text{g/g}$, sem apresentar diferenças significativas ($p > 0,05$), com a biomassa congelada e não congelada, respectivamente. Na secagem convencional, a concentração específica dos carotenoides foi de $78,2 \pm 3,3$ e $72,7 \pm 9,8 \mu\text{g/g}$ utilizando a biomassa congelada e não congelada, respectivamente (figura 3), também não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as mesmas.

O processo de liofilização provocou um aumento de cerca de 20% na concentração específica dos carotenoides, quando comparado com o processo de secagem convencional. Este fato provavelmente pode ser explicado pela passagem direta do estado sólido para o gasoso, ocorrendo mudança de estado físico por sublimação, tornando o produto mais estável devido à diminuição da atividade de água. Portanto, como a operação do congelamento da biomassa não influenciou significativamente a recuperação dos carotenoides nem através da liofilização nem pela operação de secagem por circulação de ar forçada, o congelamento da biomassa pode ser eliminado do processo.

Machado (2013) comparou o método de liofilização com a secagem convencional em estufa de circulação com ar forçado, utilizando a levedura *Sporidiobolus pararoseus* verificando um ganho de aproximadamente 20% na recuperação de carotenoides, sendo estes dados semelhantes ao do presente trabalho.

Harnkarnsujarit; Charoenrein (2011) estudaram a influencia do colapso estrutural na estabilidade de β -caroteno em mangas liofilizadas, verificando que a taxa de degradação de β -caroteno diminuiu quando utilizada temperatura acima do ponto de fusão, mostrando que a liofilização apresenta benefícios, pois diminui a degradação de compostos sensíveis ao oxigênio, como os carotenoides.

Figura 3 – Médias \pm desvios padrões (n=3) da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) dos carotenoides empregando a liofilização e a secagem convencional, utilizando biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. LC= Liofilização utilizando biomassa congelada, LNC= Liofilização utilizando biomassa não congelada, SCC= Secagem convencional utilizando biomassa congelada e SCNC= Secagem convencional utilizando biomassa não congelada.



4 CONCLUSÃO

Dentre as técnicas de ruptura celular estudadas, o DMSO apresentou os melhores resultados ($86,9 \pm 5,3$ e $87,3 \pm 4,4$ $\mu\text{g/g}$ para ausência e presença de congelamento da biomassa, respectivamente; EC= 100% para ausência e presença de congelamento), porém, seu uso é limitado devido à presença de compostos tóxicos no extrato carotenogênico.

O banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro apresentaram resultados promissores ($84,8 \pm 2,3$ e $76,9 \pm 2,1$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente) para a recuperação dos carotenoides. A extratibilidade alcançada com o banho ultrassônico chegou a $97,3 \pm 6,2\%$ sendo muito próximo aos 100% obtidos com o DMSO. Assim, este método se torna uma alternativa interessante, visto que o extrato obtido não possui resíduos tóxicos, sendo de fácil aplicação em escala laboratorial e tornando possível o seu escalonamento para nível industrial.

A liofilização da biomassa provocou aumento de 20% na concentração específica dos carotenoides, quando comparado com o processo de secagem convencional. O processo de congelamento da biomassa não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides, com isso, pode ser eliminado do processo de

recuperação carotenogênica, trazendo ganhos com energia e diminuição do tempo gasto para a análise da recuperação destes compostos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 17 th edition. Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

BJERKENG, B.; PEISKER, M.; SCHWARTZENBERG, K. V.; YTRESTOYL, T.; ASGARD, T. Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. **Aquaculture**, v. 269, p. 476-489, 2007.

BORGES, J. N. **Isolamento e caracterização de polissacarídeos da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma***. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2006.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369-381, 2006.

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

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2012.

COELHO, A.R. **Controle de *Penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina. 2005.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 358-362, 2009.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press. cap. 2, p. 39-165, 1976.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.; Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando β -1,3 glucanase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 471-476, 2010.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

HANNOUFA, A.; HOSSAIN, Z. Regulation of carotenoid accumulation in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 198-202, 2012.

HARNKARNSUJARIT, N.; CHAROENREIN, S. Influence of collapsed structure on stability of β -carotene in freeze-dried mangoes. **Food Research International**, v. 44, p. 3188-3194, 2011.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n.10, p. 929-934, 1998.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p. 7-13, 2012.

MACHADO, W. R. **Otimização da produção de carotenoides por *Sporodiobolus pararoseus* e influência de pré-tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais**. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2013.

MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witch's broom disease. **BMC Biochemistry**, v. 3, p. 1-7, 2002.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MEDEIROS, F.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MICHELON, M. ; MATOS, B. T. ; RAFAEL, R. S.; BURKET, C. A. V. ; BURKET, J. F. M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2012.

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

MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; VLADIMIR, J. O.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenóides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169, 2013.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133-148, 2010.

NI, H.; CHEN, Q.; HE, G.; WU, G.; YANG, Y. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 1, p. 51-59, 2008.

OTERO, D. M. **Bioprospeção de leveduras silvestres produtoras de carotenóides**. 2011. 114 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2011.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides – Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SAEKI, K.; IWATW, J.; YAMAZAKI, S.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 407-412, 1994.

SANTOS, L. F. **Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* 191 e estudo enzimático da lise de leveduras**. 2000. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, 2006.

SILVA, C.M. **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268: valoração da glicerina (derivada da síntese do biodiesel) e da água de parboilização do arroz**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2010.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2009.

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A. H. R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **European Food Research & Technology**, v. 233, p. 159-166, 2013.

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

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Review: Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1065-1079, 2013.

VODA, A.; HOMAN, N.; WITEK, M.; DUIJSTER, A.; VAN DALEN, G.; VAN DER SMAN, R.; NIJSSE, J.; VAN VLIET, L.; VAN AS, H.; VAN DUYNHOVEN, J. The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot. **Food Research International**, v. 49, p. 687-693, 2012.

XIÃO, A.; NI, H.; CAI, H.; LI, L.; SU, W.; YANG, Q. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2029-2034, 2009.

ZENI, J. **Screening de microrganismos produtores de carotenóides e poligalacturonases.** 2009. 128f. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Unipampa, Erechim, 2009.

ARTIGO 2**Recuperação de carotenoides produzidos pela *Rhodotorula mucilaginosa* por diferentes métodos de ruptura**

Recuperação de carotenoides produzidos pela *Rhodotorula mucilaginosa* por diferentes métodos de ruptura

LOPES, N.A.; BURKERT, J.F.M.

RESUMO

A produção de carotenoides obtidos de fontes microbianas tem sido reportada nos últimos anos, devido à crescente preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos. Os carotenoides produzidos naturalmente por processos biotecnológicos localizam-se no interior da célula, tornando necessário encontrar um método eficaz para a extração dos pigmentos carotenogênicos. O objetivo do trabalho foi comparar a eficácia de diferentes técnicas químicas, mecânicas e enzimáticas de rompimento celular para extração de carotenoides, para o uso em escala laboratorial e industrial da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. O micro-organismo isolado de amostras ambientais, foi utilizado para cultivo submerso no meio YM, a 25 °C, 180 rpm por 168 h. A obtenção de biomassa foi realizada pela secagem convencional (35°C/48h) e através da liofilização (-80°C/48h, em ultrafreezer, seguido do processo de liofilização até alcançar 2% de umidade da amostra), sendo submetida ou não ao processo de congelamento (-18°C/48h). Dentre os métodos de ruptura química, foi utilizado dimetilsulfóxido, além dos ácidos clorídrico, acético e lático (4 mol/L). Para as técnicas mecânicas, foram testados os métodos com banho ultrassônico, abrasão com pérolas de vidro, maceração com terra diatomácea, imersão em nitrogênio líquido e ruptor ultrassônico. Através do DCCR 2³, foi realizada a ruptura com a utilização do preparado enzimático comercial Glucanex®, onde as variáveis estudadas foram pH (5,0 a 8,0), temperatura (25 a 50 °C) e concentração de enzima (1,0 a 4,0 g/gcs). Dentre os métodos químicos aplicados, o dimetilsulfóxido apresentou os melhores resultados (297,6±27,7 e 234,1±4,0 µg/g para ausência e presença de congelamento da biomassa, respectivamente), porém seu uso é limitado devido à presença de compostos tóxicos no extrato carotenogênico. Para o método que utiliza o banho ultrassônico, foi alcançando 202,4±21,6 µg/g, onde o processo de congelamento da biomassa não influenciou na recuperação dos carotenoides. Além de proporcionar a maior recuperação de carotenoides, este método apresentou extratibilidade de 77,4±16,1%, sendo próximo aos 100% obtidos com o DMSO. A melhor condição de ruptura enzimática foi obtida utilizando concentração de enzima de 1,0 g/gcs, pH 5,0 e temperatura de 30 °C, alcançando os valores de concentração específica de 115,1±8,1 µg/g e concentração volumétrica de 470,1±38,8 µg/L. O uso da técnica enzimática combinada com o banho ultrassônico não proporcionou melhorias no processo de recuperação de carotenoides. A liofilização provocou um aumento de 13,7% na concentração específica de carotenoides, quando comparado com o processo de secagem convencional. O método de banho ultrassônico apresentou os melhores resultados, merecendo destaque, pois o extrato obtido com este método não possui resíduos tóxicos, além de ser possível o escalonado para nível industrial. Apesar de sua utilização em escala industrial não ser comum, devido ao calor gerado durante o processo, este não interferiu negativamente na recuperação de carotenoides.

Palavras chave: ruptura celular, *Rhodotorula mucilaginosa*, ultrassom

Carotenoids produced by *Rhodotorula mucilaginosa* recovering by different disruption methods

LOPES, N.A.; BURKERT, J.F.M.

ABSTRACT

The carotenoids production from microbial sources has been being reported in the last few years due to the growing preoccupation about the chemical additive use in food. The carotenoids naturally produced by biotechnological process, are placed inside the cell, turning necessary to find an efficient method to extract the carotegenic pigments. The aim of this work was to make a comparison about the effectiveness of different chemical techniques, for use in lab and industrial scale. *Rhodotorula mucilaginosa* yeast, isolated from environmental samples, was used for a submerged cultivation in YM mean, at 25 °C, 180 rpm per 168 h. the biomass obtaining was performed a conventional drying (35°C/48h) and lyophilization (-80°C/48h, in ultra-freezer, followed by the lyophilization process until it reaches 2% of the sample moisture), being or not submitted to the frozen process (-18°C/48h). Among the chemical disruption, it was used dimethylsulfoxide, besides the hydrochloride, acetic and lactic acids (4 mol/L). For the mechanic techniques, methods with ultrasonic bath, glass beads abrasion, maceration with diatomaceous earth, immersion in liquid nitrogen and ultrasonic hammer were tested. Through CCRD 2³, the disruption was performed with the use of the commercial enzymatic preparation Glucanex®, where the variables studied were pH (5.0 to 8.0), temperature (25 to 50 °C) and enzyme concentration (1.0 to 4.0 g/gdc). Among the chemical methods applied, dimethylsulfoxide has presented the best results (297.6±27.7 and 234.1±4.0 µg/g for absence and presence of biomass frozen, respectively), but its use is limited due to the presence of toxic compounds in the carotegenic extract. The highest carotenoids specific concentration was found on the method that uses the ultrasonic bath reaching 202.4±21.6 µg/g, where the biomass frozen process has not influenced on the carotenoids recovering. The best condition of enzymatic disruption was reached using a enzyme concentration of 1.0 g/gdc, pH 5.0 and temperature of 30 °C, reaching specific concentration values of 115.1±8.1 µg/g and volumetric concentration of 470.1±38.8 µg/L. the use of the enzymatic technique combined to the ultrasonic bath hasn't brought improvements on the carotenoids recovering process, the lyophilization has provoked an increasing of 13.7% in the carotenoids specific concentration when compared to the conventional drying process. The ultrasonic bath method has presented the best results and in spite of its use in industrial scale is not common, due to the heat generated during the process, it has not negatively interfered on the carotenoids recovering. The enzymatic method has presented inferior results, however, its industrial use is promising once its extract doesn't present toxic residues and its use can be optimized in the future.

Key words: cell disruption, *Rhodotorula mucilaginosa*, ultrasound

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse por carotenoides tem aumentado devido à crescente procura por estes compostos na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética e de ração animal (VALDUGA et al., 2011).

A bioprodução de carotenoides em escala industrial está expandindo, levando ao desenvolvimento de cultivos microbianos para a sua produção. Com isso, as condições de crescimento dos micro-organismos afetam a quantidade de célula seca produzida, bem como a recuperação dos pigmentos produzidos intracelularmente (LIU; WU, 2007). A procura por produtos naturais elevou a demanda pela bioprodução de carotenoides, que podem ser produzidos naturalmente por bactérias, fungos e leveduras que apresentam coloração. O principal interesse em utilizar micro-organismos na produção de carotenoides, que poderiam ser obtidos a partir de plantas ou de forma sintética, é a simplicidade da produção pela manipulação ambiental e genética (ZENI et al., 2011).

Além da conotação natural, os carotenoides são conhecidos pela sua propriedade antioxidante, e pelos efeitos na saúde, trazendo benefícios em muitas doenças, como câncer e derrames (BOLHASSANI, KHAVARI; BATHAIE, 2014).

Os carotenoides produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* são sintetizados no interior da célula, dificultando a sua utilização como aditivo na indústria alimentar. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para o rompimento da parede celular de leveduras produtoras de carotenoides. Fonseca et al. (2011) estudaram a utilização de abrasão com pérolas de vidro, utilização de ondas ultrassônicas, além de carbonato de sódio e dimetilsulfóxido para ruptura celular da *Phaffia rhodozyma* NRRL - Y17268. Monks et al. (2012) utilizaram CO₂ supercrítico, combinado com o uso de dimetilsulfóxido para romper a parede celular de *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 e o uso de enzimas líticas foi testado por Michelon et al. (2012) para a *Phaffia rhodozyma* e por Monks et al. (2013) para a *Sporidiobolus salmonicolor*. Porém, sua aplicação para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ainda é pouco estudada.

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi isolada de flores obtidas de Encruzilhada do Sul, cidade pertencente ao Escudo Sul Riograndense (OTERO, 2011). Cipolatti (2012) realizou cultivos submersos a 25 °C, 180 rpm, por 168 h, avaliando a produção de carotenoides a partir de meios contendo água de maceração de milho e glicerol (M1), e água de maceração de milho e melão (M2), comparando com o meio convencional (YM). O

carotenoide β -caroteno foi produzido em maior quantidade pela *R. mucilaginosa* em meio YM (4430 $\mu\text{g/L}$). Nos meios alternativos, esta levedura também foi capaz de sintetizar β -caroteno, 820 e 750 $\mu\text{g/L}$ para M1 e M2, respectivamente.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo comparar a eficácia de diferentes técnicas químicas, mecânicas e enzimáticas de rompimento celular para extração de carotenóides produzidos por da levedura *R. mucilaginosa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução de carotenoides

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada de amostras ambientais (OTERO, 2011) a partir de flores obtidas de Encruzilhada do Sul, cidade pertencente ao Escudo Sul-Rio-Grandense, foi utilizada para a produção de carotenoides em cultivo de frascos agitados. A levedura foi mantida em ágar inclinado GYMP (p/v) com 2,0% glicose, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO_4 0,2% e ágar 2,0% (COELHO, 2005), sendo armazenada a 4 °C e repicada a cada três meses para a manutenção da levedura.

A reativação do micro-organismo foi realizada a partir do repique da levedura *R. mucilaginosa* contida no meio YM, composto por 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e adicionados de 0,2 g/L de KNO_3 (PARAJÓ, SANTOS; VÁZQUEZ, 1998), sendo incubado por 48 h a 25 °C. Após foi realizada uma ressuspensão celular em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionada em 9 mL de meio YM, sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. O inóculo foi obtido através de frascos agitados de 500 mL contendo 90 mL de caldo YM, adicionado de 10 mL do cultivo oriundo da reativação, sendo incubado a 150 rpm, 25 °C por 48 h, até a concentração celular atingir 1×10^8 células/mL, contadas através de câmara de Neubauer (SILVA, 2010).

O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 225 mL do meio YM, com pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo, sendo as condições operacionais do processo 25 °C, 180 rpm por 168 h (SILVA, 2009). As amostras foram retiradas em intervalos de 24 h até o término do processo (168 h), a fim de acompanhar biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais. A biomassa de *R. mucilaginosa* foi recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1745 xg por 10 min) e o sedimento lavado com água destilada. A secagem da biomassa foi realizada a 35 °C por 48 h (FONSECA et al., 2011), sendo maceradas em gral e

peneirada (mesh 115) conforme Cipolatti (2012). Parte da biomassa foi submetida ao processo de congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h (MORAES, BURKERT; KALIL, 2010) e a outra parte sem congelar.

2.2 Secagem da biomassa por liofilização

A comparação de diferentes métodos de secagem foi realizada através da utilização de biomassa liofilizada ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}/48\text{ h}$, em ultrafreezer, seguido do processo de liofilização até alcançar 2% de umidade da amostra), através do método adaptado de Martins, Costa; Prentice-Hernández (2009), sendo comparado o método de secagem convencional em estufa de circulação de ar forçado ($35\text{ }^{\circ}\text{C}/48\text{h}$), onde parte da biomassa foi submetida ao processo de congelamento e outra parte sem congelar.

2.3 Técnicas de ruptura celular

Os carotenoides obtidos da levedura *R. mucilaginosa* foram avaliados através de diferentes métodos de ruptura. Para isso, parte da biomassa ($35\text{ }^{\circ}\text{C}/48\text{ h}$) foi submetida ao processo de congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}/48\text{ h}$) e outra parte sem congelar.

2.3.1 Técnicas químicas de ruptura celular

Para a ruptura celular através das técnicas químicas, foram utilizados dimetilsulfóxido e os ácidos acético, clorídrico e láctico. No método que utiliza DMSO, uma amostra de 0,05 g de biomassa foi homogeneizada em vórtex juntamente com 2 mL de dimetilsulfóxido a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. A homogeneização foi realizada durante 1 min, sendo a cada intervalo de 15 min homogeneizado novamente em vórtex, até completar 1 h (FONSECA et al., 2011). Na ruptura realizada com os ácidos clorídrico, acético e láctico, foi utilizada 7,5 mL de uma solução de 4 mol/L dos ácidos, onde as diferentes soluções foram adicionadas com 0,5 g de biomassa colocados em banho agitado a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 5 min (NI et al., 2008).

2.3.2 Técnicas mecânicas de ruptura celular

2.3.2.1 Ondas ultrassônicas

A ruptura celular através de ondas ultrassônicas foi testada por dois métodos, um que utiliza banho ultrassônico e outra que utiliza ruptor ultrassônico. A técnica com banho ultrassônico consiste em adicionar 6 mL de acetona juntamente com 0,5 g de biomassa submetido a 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, sendo a água do banho trocada a cada ciclo (MEDEIROS et al., 2008). Para o ruptor ultrassônico, tubos contendo 6 mL de

acetona e 0,5 g de biomassa foram submetidos a homogeneização ultrassônica, durante 20 min, sob constante refrigeração, com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, utilizando uma micro ponteira de titânio com 40% de potência (LEMES, ÁLVARES; KALIL, 2012).

2.3.2.2 Métodos abrasivos

A ruptura por abrasão foi testada através da utilização de pérolas de vidro e maceração com terra diatomácea. No método que emprega pérolas de vidro foi adicionada uma carga de 1,1 g/mL de pérolas de vidro ($0,5 > d > 0,59$ mm), juntamente com 6 mL de acetona e 0,5 g de biomassa, sendo a mistura final agitada em vórtex durante 10 min (MEDEIROS et al., 2008). A maceração foi realizada com 0,5 g de biomassa juntamente com 0,5 g de terra diatomácea, durante 10 min em almofariz com auxílio de um pistilo, sendo posteriormente adicionado 6 mL de acetona (VALDUGA et al., 2009).

2.3.2.3 Imersão em nitrogênio líquido

Foi realizada a imersão em nitrogênio líquido, durante 1 min, em tubos contendo 6 mL de acetona e 0,5 g de biomassa (BORGES, 2006).

2.3.3 Técnica enzimática de ruptura celular

Os ensaios de ruptura celular foram realizados com o preparado enzimático comercial Glucanex® - Novozymes (BJERKENG et al., 2007) proveniente do fungo *Trichoderma harzianum* contendo as enzimas β -1,3-glucanase, protease, celulase e quitinase. Para a determinação da condição de lise celular, foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2^3 , onde os pHs do meio reacional testados foram 5,0 e 5,6 utilizando tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, 6,5 utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L e 7,4 e 8,0 utilizando tampão tris-HCl 0,2 mol/L. As temperaturas da reação enzimática foram 25, 30, 37,5, 45 e 50 °C. As concentrações de enzima utilizada por grama de célula seca foram 1,0, 1,6, 2,5, 3,4 e 4,0. A resposta avaliada foi a concentração específica e volumétrica ($\mu\text{g/g}$ e $\mu\text{g/L}$), respectivamente, de carotenoides.

Os ensaios de ruptura pelo método enzimático foram realizados com 0,05 g de biomassa seca (35 °C por 48 h), adicionadas de 4 mL dos respectivos tampões acetato de sódio 0,2 mol/L, tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L e tampão tris-HCl 0,2 mol/L e as diferentes concentrações de enzima provenientes do planejamento experimental completo (DCCR) 2^3 (tabela 3). A mistura contendo 4 mL foi incubada nas diferentes temperaturas

provenientes também do DCCR, por 48 h e 180 rpm (MONKS et al., 2013). Em seguida, a biomassa foi lavada com 4 mL de água destilada e centrifugada (1745 xg por 10 min), sendo posteriormente adicionado 6 mL de acetona para a extração dos carotenoides.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um potenciômetro, segundo AOAC (1995).

2.4.2 Determinação de açúcares totais

A concentração de açúcares totais foi determinada através do método DNS (MILLER, 1959).

2.4.3 Determinação da concentração de biomassa

A concentração celular ao longo da bioprodução dos carotenoides foi estimada por leitura da absorvância a 620 nm, através de uma curva padrão de biomassa (KUSDIYANTINI et al., 1998).

2.4.4 Extração e determinação dos carotenoides

Depois de cada procedimento de ruptura, as amostras contendo acetona foram centrifugadas (1745 xg por 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para a extração dos carotenoides. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo, ocorrendo a formação de duas fases, onde somente a fase polar foi coletada e o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na_2SO_4), originando os extratos contendo carotenoides (MICHELON et al., 2012).

Para a determinação da concentração específica de carotenoides totais (CT) foi realizado a leitura dos extratos em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, china) pelo valor médio da máxima absorvância a 448 nm (CABRAL et al., 2011), empregando a equação 1 (DAVIES, 1976), expresso por β -caroteno em éter de petróleo (absortividade específica= 2592). O cálculo da produção volumétrica foi feito a partir da conversão de unidades utilizando o resultado de CT ($\mu\text{g/g}$) e concentração da biomassa (g/L).

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100 \cdot m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Onde:

CT = concentração específica de carotenoides de totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

A = absorvância;

V = volume (mL);

$m_{amostra}$ = massa celular seca (g);

$A_{1cm}^{1\%}$ = absortividade específica.

A extratibilidade de carotenoides (EC) foi determinada a partir da equação 2, que relaciona a concentração específica de carotenoides recuperados (CR) utilizando as diferentes técnicas de ruptura celular e a concentração específica de carotenoides totais (CT) determinada pelo método de ruptura celular utilizando DMSO (XIÃO et al., 2009).

$$EC (\%) = \frac{CR}{CT} * 100 \quad (2)$$

2.5 Caracterização enzimática do preparado comercial

2.5.1 Atividade enzimática da β -1,3-glucanase e da protease

A atividade enzimática da β -1,3-glucanase foi definida como uma unidade de atividade enzimática de β -1,3-glucanase (U), corresponde a liberação de 1 μmol de glicose por minuto, por mL de solução enzimática (SANTOS, 2006). Para isso, uma alíquota de 250 μL de solução 1% de laminarina obtida da alga *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich - País) em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,5 e 250 μL de solução enzimática, foi incubada a 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min, sendo a reação interrompida por aquecimento a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min (SAEKI et al., 1994). A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método de Miller (1959) e como controle, foi utilizada água destilada no lugar da solução de laminarina e determinados os açúcares redutores presente na solução.

Para a atividade enzimática da protease, uma amostra contendo 100 μL de tampão tris-HCl (100 mmol/L, pH 8,0), 300 μL de azocaseína 1% (m/v) diluída em tampão tris-HCl (100 mmol/L, pH 8,0) e 100 μL de enzima diluída foi incubada a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 600 μL de ácido tricloroacético 10% (m/v), após a mistura foi centrifugada (1745xg por 20 min), sendo misturados 800 μL do sobrenadante com 200 μL de solução 1,8 mol/L de hidróxido de sódio. Foi determinada a absorvância a 420 nm e a atividade de protease definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento de 0,1 unidades de absorvância nas condições do ensaio (DAROIT et al., 2009)

2.6 Visualização por microscopia

A visualização por microscopia óptica da ruptura das células da *R. mucilaginosa* foi verificada, utilizando corante com a combinação de cristal violeta/fucsina e ampliação de 1000 vezes.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram obtidos em triplicatas e submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com o intuito de avaliar a existência significativa entre as técnicas aplicadas, ao nível de 95% de confiança.

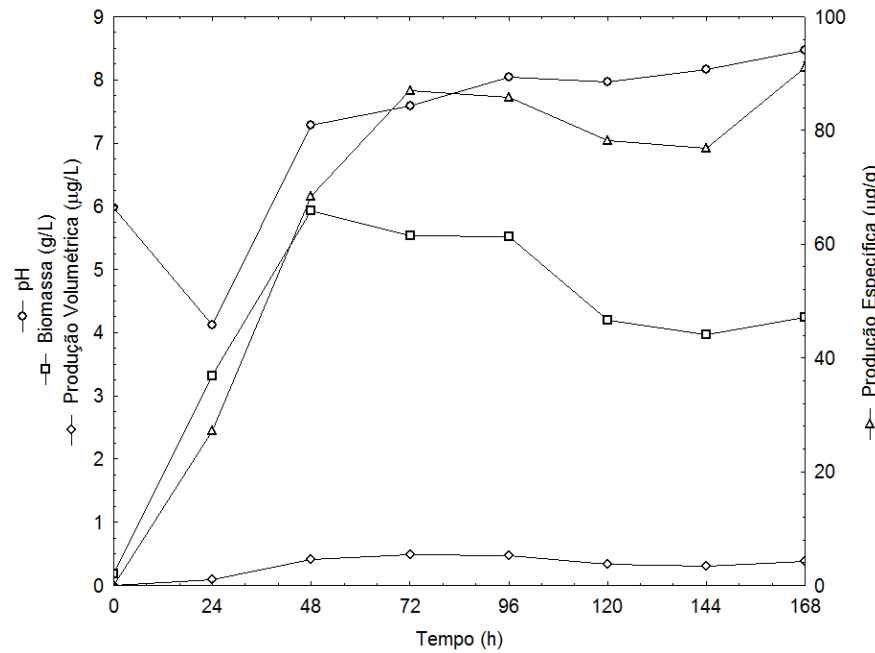
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivos submersos para a produção de carotenoides

O acompanhamento cinético do pH, do crescimento celular e da produção específica e volumétrica de carotenoides no cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* em frascos agitados, a 25 °C, 180 rpm, por 168 h está apresentada na figura 1.

No início do cultivo o pH foi ajustado para 6,0, porém ao longo do processo ocorreu variação do pH devido a influência dos compostos formados e liberados. Nas primeiras 24 h de cultivo ocorreu decréscimo do pH alcançando 4,12, aumentando nas horas seguintes, até alcançar o pH 8,47 no final das 168 h. Este fato pode ser explicado devido aos ácidos orgânicos liberados durante o consumo de açúcar pela levedura, sendo que após este período, os compostos formados são novamente assimilados e ocorre a formação dos compostos carotenogênicos (CIPOLATTI, 2012; OTERO, 2011; ZENI, 2009).

De acordo com a figura 1, após as 168 h de cultivo a produção de biomassa foi de 4,24 g/L, a produção específica de 91,1 µg/g e a produção volumétrica de 386,5 µg/L. A levedura *R. mucilaginosa* foi estudada por Otero (2011) e Cipolatti (2012), que encontraram 11,18 e aproximadamente 11,0 g/L de biomassa, respectivamente, em meio YM. Os valores mais baixos encontrados no presente trabalho podem ser devido a provável injúria celular ocorrida na levedura, proveniente do longo tempo de armazenamento na qual é submetida.

Figura 1 – Produção de carotenoides em frascos agitados com agitação de 180 rpm a 25 °C.

3.2 Técnicas químicas de ruptura celular

A tabela 1 apresenta o percentual de extratibilidade e a concentração específica de carotenoides empregando diferentes técnicas químicas de ruptura celular da biomassa submetida ou não ao processo térmico de congelamento.

Tabela 1 – Médias \pm desvios padrões da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e da extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando diferentes técnicas químicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.

Técnica	CEC ($\mu\text{g/g}$)		EC (%)	
	Congelamento			
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
1	93,2 \pm 8,9 ^{aA}	89,2 \pm 5,8 ^{aA}	31,6 \pm 5,4 ^{aA}	38,1 \pm 2,1 ^{aA}
2	78,4 \pm 7,3 ^{aA}	63,8 \pm 8,5 ^{bA}	26,5 \pm 3,4 ^{aA}	27,3 \pm 3,9 ^{bA}
3	76,9 \pm 8,5 ^{aA}	81,7 \pm 7,3 ^{aA}	25,7 \pm 2,3 ^{aB}	34,9 \pm 2,6 ^{aA}

Médias \pm desvios padrões (n=3); 1: Ácido acético; 2: Ácido clorídrico; 3: Ácido lático; CEC: Concentração específica de carotenoides; EC: Extratibilidade de carotenoides; DMSO: (CEC= 297,6 \pm 27,7 e 234,1 \pm 4,0 $\mu\text{g/g}$ para presença e ausência de congelamento da biomassa, respectivamente; EC= 100% para presença e ausência de congelamento); Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna (p<0,05) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha (p<0,05).

De acordo com a tabela 1, os maiores valores encontrados para a concentração específica e extratibilidade dos carotenoides foram para o DMSO, verificando uma influência significativa ($p < 0,05$) na utilização do congelamento. Segundo Michelin et al. (2012), quando utilizaram a *Phaffia rhodozyma* para produção de carotenoides, este resultado era esperado, visto que esta técnica é considerada padrão para a quantificação de carotenoides em escala laboratorial, porém, limitada para escalonamento devido a sua toxicidade.

Na tabela 1 observa-se que a recuperação dos carotenoides pelos ácidos não sofreu influência significativa ($p > 0,05$) do congelamento, exceto para a EC do ácido láctico, que diminuiu. Assim, a etapa de congelamento pode ser eliminada do processo, visto que não apresentou melhorias na recuperação dos carotenoides.

Com relação à biomassa que não sofreu congelamento, foi detectada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), onde os maiores valores foram encontrados para os ácidos acético e láctico, seguido do ácido clorídrico. Apesar dos valores encontrados serem inferiores ao dimetilsulfóxido, estes ácidos possuem menor toxicidade, podendo ser aplicados em alimentos e utilizados ao nível industrial.

Segundo Ni et al. (2008), esse fenômeno pode estar associado aos valores da intensidade ácida (pKa). Quanto mais intenso é o ácido, maior é a eficiência de perturbação na célula de levedura. Porém, os resultados encontrados diferem para a *R. mucilaginosa*, onde o ácido clorídrico que apresenta valor de pKa -7, mostrou-se menos eficiente na recuperação dos carotenoides. A ação do ácido na parede celular da levedura pode ter sido tão intensa que além de romper a parede, degradou os carotenoides liberados. Assim, ao invés de promover uma maior ruptura da parede celular da *R. mucilaginosa*, o ácido clorídrico interferiu negativamente na recuperação dos pigmentos carotenogênicos. Ni et al. (2008) utilizaram os ácidos clorídrico, acético e láctico no rompimento da parede celular da *Phaffia rhodozyma*, onde verificaram que o ácido láctico apesar de apresentar uma intensidade menor que o ácido clorídrico, mostrou-se mais eficiente na extração de astaxantina, concluindo que o ácido láctico foi eficiente na ruptura da parede celular da levedura, sem degradar os carotenoides produzidos.

Park, Kima; Chu (2007) avaliaram diferentes solventes para a ruptura celular da levedura *Rhodotorula glutinis*, verificando que a combinação dos solventes dimetilsulfóxido, éter de petróleo e acetona aumentou o grau de recuperação dos carotenoides.

3.3 Técnicas mecânicas de ruptura celular

A tabela 2 apresenta o percentual de extratibilidade e a concentração específica de carotenoides empregando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular da biomassa seca submetida ou não ao processo térmico de congelamento.

Tabela 2 – Extratibilidade (%) e concentração específica ($\mu\text{g/g}$) de carotenoides utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.

Técnica	CEC ($\mu\text{g/g}$)		EC (%)	
	Congelamento			
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
*1	144,2 \pm 2,4 ^{bA}	118,9 \pm 4,5 ^{cB}	51,8 \pm 4,2 ^{bA}	47,2 \pm 1,9 ^{bA}
*2	202,4 \pm 21,6 ^{aA}	193,5 \pm 25,8 ^{aA}	72,9 \pm 11,2 ^{aA}	77,4 \pm 16,1 ^{aA}
*3	152,4 \pm 11,7 ^{bA}	127,9 \pm 8,9 ^{b,cB}	54,5 \pm 0,7 ^{bA}	50,9 \pm 6,9 ^{bA}
**4	124,1 \pm 13,9 ^{bB}	159,3 \pm 12,3 ^{a,bA}	57,1 \pm 4,9 ^{a,bA}	70,3 \pm 9,1 ^{a,bA}
***5	139,0 \pm 11,9 ^{bA}	142,7 \pm 6,6 ^{b,cA}	49,2 \pm 4,4 ^{bB}	60,9 \pm 1,7 ^{a,bA}

Médias \pm desvios padrões (n=3); 1: Abrasão com pérolas de vidro; 2: Banho ultrassônico; 3: Homogeneizador ultrassônico; 4: Maceração com terra diatomácea; 5: Imersão em nitrogênio líquido; EC: Extratibilidade de carotenoides; CEC: Concentração específica de carotenoides; *DMSO: CEC= 279,4 \pm 18,6 e 252,5 \pm 17,8 $\mu\text{g/g}$; **DMSO: CEC= 216,9 \pm 10,1 e 228,7 \pm 27,1 $\mu\text{g/g}$; ***DMSO: CEC= 282,6 \pm 1,8 e 234,4 \pm 4,4 $\mu\text{g/g}$, para biomassa congelada e não congelada, respectivamente; Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p>0,05$) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p>0,05$).

O maior valor de concentração específica de carotenoides foi encontrado com o método que utiliza o banho ultrassônico para a ruptura celular da levedura *R. mucilaginosa*, alcançando 202,4 \pm 21,6 $\mu\text{g/g}$ com a biomassa que passou pelo processo de congelamento. Este método deve ser evidenciado, pois os resultados obtidos para a extratibilidade foram de 77,4 \pm 16,1%, sendo próximo aos 100% obtidos com o DMSO. A grande vantagem do banho ultrassônico consiste na eliminação dos resíduos químicos gerados durante o processo de ruptura com o DMSO, produzindo um extrato livre de resíduos tóxicos. A utilização de ondas ultrassônicas para a ruptura de micro-organismos é possível de ser escalonada ao nível industrial, porém, não é utilizada devido ao calor gerado durante o processo (HARRISON,

1991), contudo, este fato não interferiu negativamente nos resultados. Para a biomassa não congelada, os maiores valores foram para o banho ultrassônico ($193,5 \pm 25,8 \mu\text{g/g}$) e a maceração com terra diatomácea ($159,3 \pm 12,3 \mu\text{g/g}$), não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,05$), de acordo com a tabela 2.

Segundo a tabela 2, a extratibilidade dos carotenoides obtida com os métodos de banho ultrassônico ($72,9 \pm 11,2 \mu\text{g/g}$) e terra diatomácea ($57,1 \pm 4,9 \mu\text{g/g}$) apresentaram os melhores resultados, não apresentando diferenças entre si ($p > 0,05$), quando utilizada a biomassa congelada. Além dos métodos de ruptura com banho ultrassônico e terra diatomácea, o método que utiliza nitrogênio líquido também apresentou os maiores valores de extratibilidade, para a biomassa não congelada, obtendo $77,4 \pm 16,1$, $70,3 \pm 9,1$ e $60,9 \pm 1,7 \mu\text{g/g}$ para os métodos de banho ultrassônico, terra diatomácea e nitrogênio líquido, respectivamente.

De acordo com Gerde et al. (2012) quando o ultrassom é aplicado no estado líquido, produz o fenômeno de cavitação na estrutura das células, contribuindo para o rompimento celular. Além disso, a sonicação pode aumentar a permeabilidade da célula, aumentando assim a extração dos componentes. Li et al. (2013) utilizaram ultrassom para extração de carotenoides a partir de cenouras, utilizando óleo de girassol como solvente orgânico, onde os resultados mostraram que a maior produção de β -caroteno foi de $334,75 \text{ mg/L}$ em 20 min de ultrassom.

O processo de congelamento da biomassa aumentou significativamente a concentração específica de carotenoides nos métodos de abrasão com pérolas de vidro e a ruptura com homogeneizador ultrassônico (tabela 2). A extratibilidade dos carotenoides não foi afetada pelo congelamento, com exceção do método que utiliza nitrogênio líquido, onde o processo de congelamento afetou negativamente o percentual de extratibilidade.

O congelamento lento permite o crescimento de cristais de gelo fora da célula, causando danos na estrutura celular e promovendo a ruptura (VODA et al., 2012). O tamanho dos cristais de gelo formados interfere no grau de lesão provocado na membrana celular, assim, os cristais de gelo formados durante o congelamento não foram suficientes para aumentar a ruptura pelos métodos de banho ultrassônico, terra diatomácea e nitrogênio líquido, sendo eficiente somente nos métodos que utilizou pérolas de vidro e o homogeneizador ultrassônico.

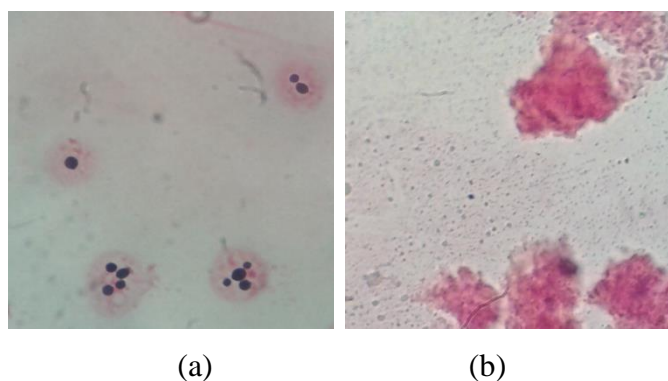
Dentre as técnicas de ruptura mecânica estudadas, o melhor resultado foi obtido quando utilizado o banho ultrassônico, sendo que o processo de congelamento não influenciou na recuperação dos carotenoides. Assim, esta etapa pode ser descartada, acarretando economia com tempo e energia.

A utilização de diferentes métodos de ruptura também foram estudados por Medeiros et al. (2008), que utilizaram a combinação de ondas ultrassônicas (40 min) associadas a pérolas de vidro (1,10 g/mL), proporcionando um rendimento de 550,4 U/g para extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, se mostrando um método eficiente para o uso em escala laboratorial.

Gerde et al. (2012) estudaram a extração de lipídeos no interior da célula de microalgas autotróficas e heterotróficas, onde o método ultrassônico mostrou-se eficiente para os dois tipos de algas estudadas, onde a extração de lipídeos aumentou com o aumento do tempo e da energia dissipada.

Foi verificada a visualização por microscópica óptica da ruptura das células de levedura, utilizando a combinação de corante cristal violeta/fucsina, na ampliação de 1000 vezes. Na microscopia apresentada na figura 2, é possível observar que o método com banho ultrassônico (figura 2b) resultou numa maior ruptura quando comparado com a célula de levedura sem nenhum método aplicado (figura 2a).

Figura 2 – Células de levedura *R. mucilaginosa* sem nenhum método de ruptura (a) e células após a ruptura com banho ultrassônico (b).



3.4 Técnica enzimática de ruptura celular

A atividade enzimática específica do preparado Glucanex® apresentou 0,42 U/mg de proteína para β -1, 3-glucanase e $2,35 \times 10^5$ U/mg de proteína para protease, confirmando assim

a presença ativa das duas enzimas necessárias para a lise da parede celular da levedura *R. mucilaginosa*.

3.4.1 Avaliação da ruptura celular da *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando DCCR

A tabela 3 apresenta a técnica enzimática de ruptura celular na biomassa seca não submetida ao processo de congelamento, através do DCCR 2³.

Tabela 3 – Delineamento composto central rotacional 2³ (valores reais e codificados) para concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e concentração volumétrica ($\mu\text{g/L}$) de carotenoides utilizando a técnica enzimática para a ruptura celular na biomassa seca não submetida ao processo de congelamento.

Ensaio	X1	X2	X3	Y1	Dr ₁	Y2	Dr ₂
1	-1 (5,6)	-1 (30)	-1 (1,6)	114,1	-12,4	514,1	-12,3
2	+1 (7,4)	-1 (30)	-1 (1,6)	101,0	-3,7	455,3	-3,6
3	-1 (5,6)	+1 (45)	-1 (1,6)	97,8	3,7	440,8	3,6
4	+1 (7,4)	+1 (45)	-1 (1,6)	104,8	8,7	472,4	9,3
5	-1 (5,6)	-1 (30)	+1 (3,4)	102,4	-16,9	461,3	-16,8
6	+1 (7,4)	-1 (30)	+1 (3,4)	92,9	-11,9	418,7	-11,9
7	-1 (5,6)	+1 (45)	+1 (3,4)	87,4	-4,5	393,8	-4,5
8	+1 (7,4)	+1 (45)	+1 (3,4)	106,5	6,1	480,0	6,1
9	0 (6,5)	0 (37,5)	0 (2,5)	122,1	0,2	550,0	0,1
10	0 (6,5)	0 (37,5)	0 (2,5)	119,8	-1,8	539,8	-1,7
11	-1,68 (5,0)	0 (37,5)	0 (2,5)	137,9	10,9	621,3	11,0
12	+1,68 (8,0)	0 (37,5)	0 (2,5)	105,7	-4,4	476,5	-4,3
13	0 (6,5)	-1,68 (25)	0 (2,5)	133,0	17,7	599,4	17,8
14	0 (6,5)	+1,68 (50)	0 (2,5)	64,4	-20,2	290,3	-20,4
15	0 (6,5)	0 (37,5)	-1,68 (1,0)	107,5	-0,9	484,2	-1,0
16	0 (6,5)	0 (37,5)	+1,68 (4,0)	117,2	10,0	527,9	9,9

*gcs= gramas de célula seca. X₁= pH; X₂= Temperatura (°C); X₃= Concentração de enzima (g/gcs); Y₁= Concentração específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$); Y₂= Concentração volumétrica de carotenoides ($\mu\text{g/L}$); Dr₁= Desvio relativo (%) para a resposta concentração específica de carotenoides; Dr₂= Desvio relativo (%) para a resposta concentração volumétrica de carotenoides.

Os maiores valores obtidos para a concentração específica e volumétrica foram 137,9 $\mu\text{g/g}$ e 621,3 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, porém os valores variaram desde 87,4 $\mu\text{g/g}$ e 393,8 $\mu\text{g/L}$ até 137,9 $\mu\text{g/g}$ e 621,3 $\mu\text{g/L}$ encontrados nos dezesseis experimentos (tabela 3).

A verificação dos modelos de terceira ordem foi realizada para as variáveis pH, temperatura e concentração de enzima por grama de célula seca, analisando as respostas concentração específica e concentração volumétrica de carotenoides. Os coeficientes de regressão, bem como a análise de variância (ANOVA), estão apresentados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção específica de carotenoides e concentração volumétrica de carotenoides.

	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)				Carotenoides Volumétricos ($\mu\text{g/L}$)				
	CR	EP	t (6)	p^*	CR	EP	t (6)	p^*	
Média	121,89	12,60	9,67	<0,01	Média	549,15	56,82	9,66	<0,01
X1(L)	-3,71	9,69	-0,77	0,48	X1(L)	-16,63	43,65	-0,76	0,48
X ₁ (Q)	-1,92	11,77	-0,33	0,76	X ₁ (Q)	-8,56	53,03	-0,32	0,76
X ₂ (L)	-9,47	9,69	-1,95	0,09	X ₂ (L)	-42,63	43,65	-1,95	0,09
X ₂ (Q)	-10,10	11,77	-1,72	0,14	X ₂ (Q)	-45,42	53,03	-1,71	0,14
X ₃ (L)	-0,89	9,67	-0,18	0,86	X ₃ (L)	-4,06	43,65	-0,19	0,86
X ₃ (Q)	-5,26	11,77	-0,89	0,41	X ₃ (Q)	-23,74	53,03	-0,90	0,41
X ₁ xX ₂	6,09	12,65	0,96	0,37	X ₁ xX ₂	27,40	57,00	0,96	0,37
X ₁ xX ₃	1,96	12,65	0,31	0,77	X ₁ xX ₂	8,85	57,00	0,31	0,77
X ₂ xX ₃	1,39	12,65	0,22	0,83	X ₁ xX ₂	6,25	57,00	0,22	0,83

* $p \leq 0,15$; X₁: pH; X₂: temperatura; X₃: concentração de enzima por grama de célula seca.

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas, pode ser observado na tabela 4 que as variáveis pH e concentração de enzima, bem como a interação entre elas, não resultaram em nenhum efeito significativo. A variável temperatura (L) e (Q) produziu efeito significativo ao nível de 85% de confiança quando passada de 30 °C para 45 °C, diminuindo a concentração específica e volumétrica dos carotenoides em 18,9 e 85,3%, respectivamente. Quando a temperatura foi passada de 25 °C para 50 °C ocorreu diminuição de 16% na concentração específica e 71,8% na concentração volumétrica de carotenoides. Através da tabela 4 pode-se estimar a concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e a concentração volumétrica ($\mu\text{g/L}$) dos carotenoides, em termos de um modelo

quadrático, apresentados na equação 3 e 4. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2³.

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC
Regressão	2004,8	40620,1	2	2	1002,4	20310,05	4,79	4,79
Erro puro	2718,5	55162,4	13	13	209,1	4243,26		
Total	4723,3	95782,5	15	15				

CEC= Concentração específica de carotenoides; CVC= Concentração volumétrica de carotenoides. CEC (R= 0,65; F tabelado= 2,68).

A tabela 5 apresenta o valor de F calculado de 4,79 e pela distribuição de Fisher, o F tabelado ao nível de 85% de confiança é de 2,68. Com isso, o F calculado é cerca de 1,8 vezes maior que o F tabelado e o coeficiente de correlação R= 0,6515.

Dessa forma foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas do delineamento composto rotacional em função das variáveis pH, temperatura e concentração de enzima por grama de célula seca, apresentadas nas equações 3 e 4.

$$\mu\text{g/g} = 113,96 - 9,47 * \text{temperatura} - 7,98 * \text{temperatura}^2 \quad (3)$$

$$\mu\text{g/L} = 513,45 - 42,63 * \text{temperatura} - 35,87 * \text{temperatura}^2 \quad (4)$$

Os resultados do desvio relativo entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, apresentados na tabela 4, variaram de cerca de 1 até 18%, com um caso que chega a quase -20% na menor concentração específica e volumétrica obtida (ensaio 14). Por se tratar de processos que envolvem micro-organismos, este fato pode ocorrer (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Através dos modelos foi possível construir as curvas de contorno (figuras 3 e 4) tornando possível realizar a previsão sobre a temperatura ideal a ser utilizada no rompimento celular da levedura *R. mucilaginosa*.

Com as curvas de contorno apresentadas na figura 3 e 4, se observa que a maior concentração de carotenoides é obtida em qualquer faixa de pH e de concentração de enzima. Para a temperatura os valores devem estar entre 30 e 37,5 °C (nível -1 e 0, respectivamente). Estes resultados indicam que a variação de temperatura é um fator importante, principalmente quando aliada ao uso de enzimas.

Figura 3 – Gráficos de curva de contorno para a concentração específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) em função da temperatura e do pH (a) e em função da temperatura e da concentração de enzima (b).

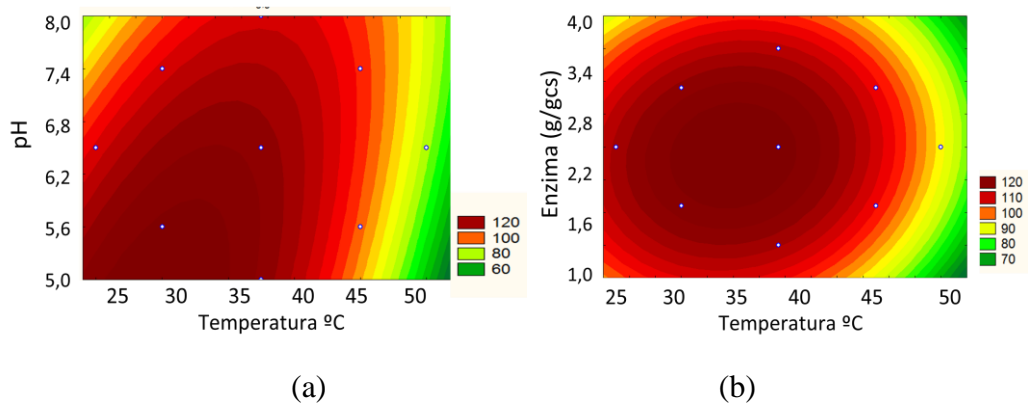
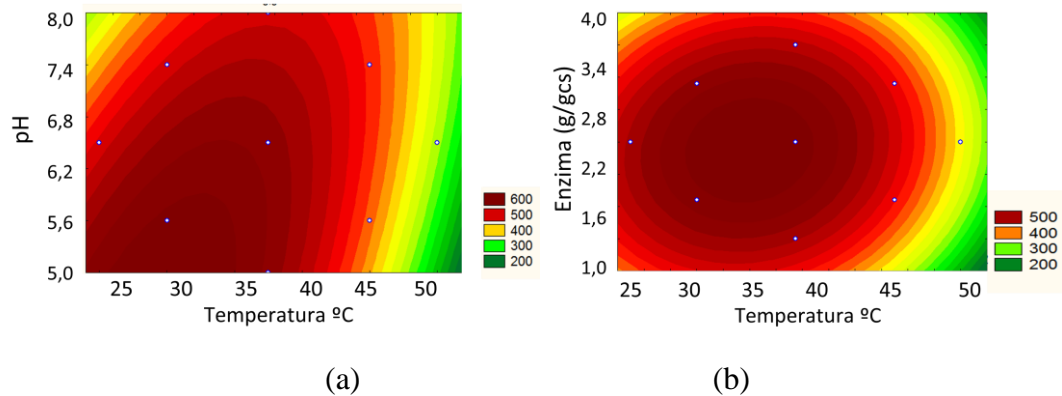


Figura 4 – Gráficos de curva de contorno para a concentração volumétrica de carotenoides ($\mu\text{g/L}$) em função da temperatura e do pH (a) e em função da temperatura e da concentração de enzima (b).



Para a validação do modelo foi realizada duas condições de processo, sendo que as condições de pH e concentração de enzima foram mantidas nos níveis mais baixos (nível -1,68) e a temperatura foi testada a 30 °C (nível -1) e 37,5 °C (nível 0).

Com a condição de temperatura de 30 °C, pH 5,0, concentração de enzima de 1,0 g por grama de célula seca, por 48 h, foi obtido o valor de $115,1 \pm 8,1 \mu\text{g/g}$ e $470,1 \pm 38,8 \mu\text{g/L}$ para a concentração específica e volumétrica de carotenoides, respectivamente. Para a condição de temperatura a 37,5 °C, pH 5,0, concentração de enzima de 1,0 g por grama de célula seca, por

48 h, foi encontrado o valor de $112,4 \pm 11,6$ $\mu\text{g/g}$ de concentração específica e $578,8 \pm 58,9$ $\mu\text{g/L}$ de concentração volumétrica de carotenoides. As duas condições estudadas não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), portanto, para o seguimento do trabalho, foi eleita como a melhor condição o ensaio que utiliza 1,0 g/gcs, pH 5,0 e temperatura de 30 °C, por 48 h. Ainda que os valores encontrados na ruptura enzimática sejam inferiores aos outros métodos aplicados, este método possui a vantagem de ser livre de resíduos tóxicos, podendo ser aplicado em escala industrial.

A tabela 6 apresenta os resultados da validação para as respostas concentração específica e concentração volumétrica de carotenoides.

Tabela 6 – Respostas da validação do modelo matemático.

	Concentração específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$)	Concentração volumétrica de carotenoides ($\mu\text{g/L}$)
Resposta prevista	115,4	520,2
Resposta experimental	115,1	470,1
Desvio do modelo	-0,3	-10,7

*Resultados são médias dos ensaios em triplicata.

Diversas enzimas estão envolvidas na lise da parede celular de leveduras, entre elas β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases. Para que haja o rompimento da parede celular, as enzimas protease lítica específica e β -1,3 glucanase lítica são essenciais, onde a primeira atua na degradação da camada externa de mananaproteína e a segunda degrada a camada interna de glucana (SALAZAR; ASENJO, 2007).

A enzimas produzidas por *Trichoderma harzianum* apresentam temperatura ótima de atividade de 55°C em pH 4,5 para a β -1,3-glucanase (FLEURI; SATO, 2005) e 40 °C em pH 8,0 para a protease (MARCO et al., 2002). Ainda que a lise enzimática ocorra pela ação conjunta entre as duas enzimas, a condição ideal de pH e temperatura ótima para a *Rhodotorula mucilaginosa* se aproximou dos valores ótimos da enzima β -1,3-glucanase.

Segundo Fleuri; Sato (2010) quando estudaram preparações bruta e purificada da β -1,3 glucanase, obtida do micro-organismo *Cellulosimicrobium cellulans* 191, verificaram que a enzima β -1,3 glucanase apresentava a capacidade de atravessar a camada externa de mananaproteína, acessava a camada interna de glucana, sendo capaz de degradar e lisar diversas células de leveduras, como *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S.*

diastaticus NCYC 713, *S. cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500.

A aplicação de β -1,3 glucanase da linhagem de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi testada na lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, onde através do delineamento experimental mostrou-se que as melhores condições de lise pela β -1,3 glucanase foi pH 6,5 e 35 °C (FLEURI; SATO, 2008).

3.5 Recuperação de carotenoides utilizando métodos combinados

Com o objetivo de alcançar melhores resultados para a concentração específica e a extratibilidade dos carotenoides, foi realizada a ruptura da parede celular de *R. mucilaginosa* utilizando a melhor técnica mecânica seguido da lise enzimática validada pelo modelo matemático. Os experimentos foram realizados com a biomassa não submetida ao congelamento, pois nas técnicas utilizadas a etapa de congelamento não mostrou influência significativa na concentração específica e na extratibilidade dos carotenoides.

A tabela 7 apresenta a concentração específica e a extratibilidade de carotenoides obtidos em cada técnica separadamente e a sua combinação.

Tabela 7 – Concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando a combinação das técnicas de ultrassom e lise enzimática, na biomassa não congelada.

Técnica	CEC ($\mu\text{g/g}$)	EC (%)
*Banho Ultrassônico	193,5 \pm 25,8 ^a	77,4 \pm 16,1 ^a
**Lise Enzimática	115,1 \pm 8,1 ^b	42,8 \pm 2,7 ^b
**Lise Enzimática + Banho Ultrassônico	107,4 \pm 11,3 ^b	41,1 \pm 6,2 ^b

*DMSO: CEC= 252,5 \pm 17,8 $\mu\text{g/g}$; **DMSO: CEC= 262,8 \pm 18,5 $\mu\text{g/g}$; Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$). CEC: Concentração específica de carotenoides; EC: Extratibilidade de carotenoides.

O método que utiliza banho ultrassônico apresentou a maior concentração específica e extratibilidade de carotenoides. O seu uso combinado com a lise enzimática não proporcionou melhorias nos resultados, demonstrando um decréscimo de 44,5% na concentração específica e 3,9% na extratibilidade dos carotenoides.

Durante a cavitação ocorre a produção de microbolhas devido às ondas ultrassônicas dissipadas no meio (SUSLICK; FLANNIGAN, 2008). As microbolhas produzidas entram em processo de contração e expansão, tornando-se instáveis e implodindo violentamente,

provocando choque nos materiais circundantes, tais como células (MONTALBO - LOMBOY et al., 2010). Este fenômeno explica os valores encontrados para a ruptura celular quando aplicado o método de banho ultrassônico, separadamente. Quando comparado o método de lise enzimática em combinação com o banho ultrassônico, observa-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$), porém um decréscimo de 6,7% na concentração específica e 3,9% na extratibilidade dos carotenoides foi encontrado, sugerindo que as microbolhas provocadas devido à dissipação das ondas ultrassônicas, pode ter degradado os carotenoides que foram liberados, diminuindo assim a sua recuperação.

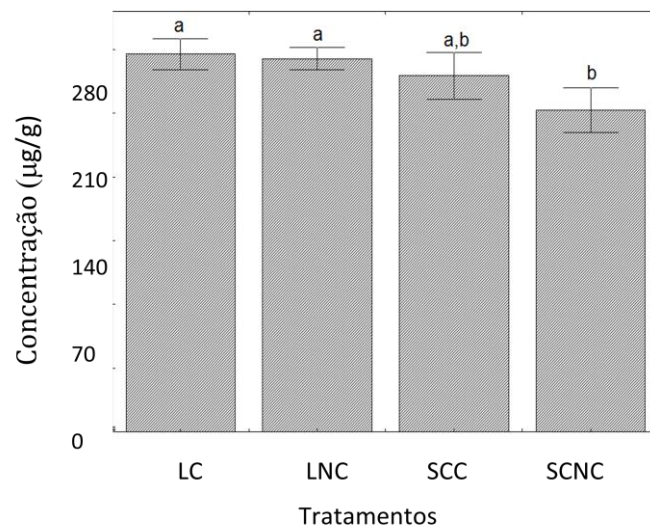
Michelon et al. (2012), ao realizar a ruptura celular da levedura *P. rhodozyma* empregando lise enzimática com preparado enzimático comercial Glucanex[®], observou que o maior valor de concentração específica de carotenoides foi de 163,12 $\mu\text{g/g}$, empregando a lise enzimática em banho ultrassônico na ausência da etapa de congelamento da biomassa, porém este valor não se diferiu estatisticamente do método que aplicou lise enzimática sem ultrassom na presença da etapa de congelamento da biomassa, apresentando o valor de 156,96 $\mu\text{g/g}$. O uso da técnica de bicarbonato de sódio com ultrassom foi utilizado por Monks et al. (2013), onde encontraram $113.96 \pm 6.9 \mu\text{g/L}$ de carotenoides oriundos da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, entretanto, resultados superiores foram encontrados quando realizado o uso separado da técnica de bicarbonato de sódio ($155.30 \pm 4.8 \mu\text{g/L}$), indicando que a combinação destes métodos não foi eficiente para a levedura testada.

3.6 Utilização de liofilização na secagem da biomassa

De acordo com a figura 5, a concentração específica dos carotenoides quando utilizado o método de secagem com a liofilização, foi de $296,5 \pm 12,3$ e $292,8 \pm 8,9 \mu\text{g/g}$ com a biomassa congelada e não congelada, respectivamente. Para a secagem convencional, os valores encontrados foram de $279,4 \pm 18,6$ e $252,5 \pm 17,8 \mu\text{g/g}$ com a biomassa congelada e não congelada, respectivamente.

O uso da liofilização com a biomassa não congelada diferiu estatisticamente do método de secagem convencional utilizando esta mesma biomassa ($p < 0,05$), porém, isto não ocorreu entre os métodos de secagem quando a biomassa sofreu congelamento ($p > 0,05$). O processo de congelamento, nos dois tratamentos utilizados, não afetou a concentração específica dos carotenoides ($p > 0,05$).

Figura 5 – Médias \pm desvios padrões da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) dos carotenoides empregando a liofilização e a secagem convencional, utilizando biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. LC= Liofilização utilizando biomassa congelada, LNC= Liofilização utilizando biomassa não congelada, SCC= Secagem convencional utilizando biomassa congelada e SCNC= Secagem convencional utilizando biomassa não congelada.



Ao comparar os dois tratamentos, sem a utilização do congelamento da biomassa, a liofilização provocou um aumento de 13,7% na concentração específica de carotenoides. O aumento na recuperação dos carotenoides através da liofilização pode ser devido à passagem direta do estado sólido para o gasoso, aumentando a estabilidade do produto devido à baixa atividade de água.

Santo et al. (2013), quando estudaram o uso de atomização e liofilização para a secagem da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, avaliaram que a maior recuperação em gramas de biomassa foi obtida quando utilizado o método de secagem através da liofilização.

4 CONCLUSÃO

Métodos químicos, mecânicos e enzimáticos foram testados no presente trabalho, onde o maior valor de carotenoides recuperados foi obtido com o uso da técnica de banho ultrassônico ($193,5 \pm 25,8 \mu\text{g/g}$), sendo que o processo de congelamento da biomassa não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides. Além de proporcionar a maior recuperação de carotenoides, este método apresentou extratibilidade de $77,4 \pm 16,1\%$, sendo próximo aos 100% obtidos com o DMSO,

merecendo destaque, pois o extrato obtido com este método não possui resíduos tóxicos, além de ser possível o escalonado para nível industrial.

Através do modelo matemático, foi possível chegar à condição de ruptura enzimática, utilizando a concentração de enzima de 1,0 g/gcs, pH 5,0 e temperatura de 30 °C, onde foi encontrado o valor de 115,1±8,1 µg/g e 470,1±38,8 µg/L para a concentração específica e volumétrica de carotenoides, respectivamente. O uso da técnica enzimática combinado com o banho ultrassônico não proporcionou melhorias nos resultados. Apesar dos valores encontrados serem inferiores quando comparado com o método que utiliza banho ultrassônico, o método enzimático não possui resíduos tóxicos e a temperatura não interfere no processo. Além disso, este método pode ser otimizado futuramente, a fim de alcançar melhores resultados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17 th edition. Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

BJERKENG, B.; PEISKER, M.; SCHWARTZENBERG, K. V.; YTRESTOYL, T.; ASGARD, T. Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. **Aquaculture**, v. 269, p. 476-489, 2007.

BOLHASSANI, A.; KHAVARI, A.; BATHAIE, S. Z. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1845, p. 20-30, 2014.

BORGES, J. N. **Isolamento e caracterização de polissacarídeos da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma***. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2006.

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

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2012.

COELHO, A.R. **Controle de *penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina. 2005.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 358-362, 2009.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.** London: Academic Press. cap. 2, p. 39-165, 1976.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras. **Ciência Agrotecnológica**, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.; Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando β -1,3 glucanase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 471-476, 2010.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, A. V.; BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANGA, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

HARRISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advance**, v. 9, p. 217-240, 1991.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n.10, p. 929-934, 1998.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p. 7-13, 2012.

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A. S.; TOMAO, V.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 12-18, 2013.

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

MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witch's broom disease. **BMC Biochemistry**, v. 3, p. 1-7, 2002.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MEDEIROS, F.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MICHELON, M. ; MATOS, B. T. ; RAFAEL, R. S.; BURKET, C. A. V. ; BURKET, J. F. M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2012.

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

MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; VLADIMIR, J. O.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenóides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169, 2013.

MONKS, L.; TIGGAMANN, L.; MAZUTI, M. A.; OLIVEIRA, V. J.; VALDUGA, E. Assessment of carotenoids recovery through cell rupture of *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2353-2359, 2012.

MONTALBO-LOMBOY, M.; KHANAL, S. K.; VAN LEEUWEN, J. H.; RAMAN, D. R.; DUNN JR, L.; GREWELL, D. Ultrasonic pretreatment of corn slurry for saccharification: a comparison of batch and continuous systems. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 939-946, 2010.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133-148, 2010.

NI, H.; CHEN, Q.; HE, G.; WU, G.; YANG, Y. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 1, p. 51-59, 2008.

OTERO, D. M. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 2011. 114 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2011.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 985-994, 2007.

SANTO, E. F. E.; DE LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G. PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science Technology**, v. 33, n. 1, p. 47-51, 2013.

SANTOS, L. F. **Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* 191 e estudo enzimático da lise de leveduras**. 2000. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, 2006.

SILVA, C.M. **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268: valoração da glicerina (derivada da síntese do biodiesel) e da água de parboilização do arroz**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2010.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. 2009. 92f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2009.

SUSLICK, K. S.; FLANNIGAN, D. J. Inside a collapsing bubble: sonoluminescence and the conditions during cavitation. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 59, p. 659-683, 2008.

VALDUGA, E.; SCHWARTZ, C. R. M.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in bioreactor. **European Food Research & Technology**, v. 232, p. 453-462, 2011.

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

VODA, A.; HOMAN, N.; WITEK, M.; DUIJSTER, A.; VAN DALEN, G.; VAN DER SMAN, R.; NIJSSE, J.; VAN VLIET, L.; VAN AS, H.; VAN DUYNHOVEN, J. The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot. **Food Research International**, v. 49, p. 687-693, 2012.

XIÃO, A.; NI, H.; CAI, H.; LI, L.; SU, W.; YANG, Q. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2029-2034, 2009.

ZENI, R.; COLET, J.; CENCE, K.; TIGGEMANN, L.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Screening of microorganisms for production of carotenoids. **Cyta – Journal of Food**, v. 9, n. 2, p. 37-41, 2011.

ZENI, J. **Screening de microrganismos produtores de carotenóides e poligalacturonases**. 2009. 128f. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Unipampa, Erechim, 2009.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

A liofilização da biomassa quando comparado com o processo de secagem convencional proporcionou um ganho de 20% e 13,7% na concentração específica dos carotenoides da levedura *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, respectivamente. O congelamento da biomassa não influenciou significativamente ($p < 0,05$) a recuperação de carotenoides provenientes das duas leveduras, quando utilizado o método de secagem por liofilização e por secagem convencional, podendo ser eliminada do processo.

Dentre as técnicas de ruptura celular estudadas para a levedura *S. pararoseus*, o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro apresentaram os melhores resultados ($84,79 \pm 2,34$ e $76,87 \pm 2,06$ $\mu\text{g/g}$) para recuperação dos carotenoides, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre eles, onde o processo de congelamento da biomassa não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides quando utilizada estas técnicas. Para a levedura *R. mucilaginosa*, o maior valor de carotenoides recuperados foi obtido com o uso do banho ultrassônico ($193,5 \pm 25,8$ $\mu\text{g/g}$), sendo que o processo de congelamento da biomassa também não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides.

Através do DCCR 2³ foi possível chegar à condição de ruptura enzimática, utilizando a concentração de enzima de 1,0 g/gcs, pH 5,0 e temperatura de 30 °C, para a levedura *R. mucilaginosa*, onde foi encontrado o valor de $115,1 \pm 8,1$ $\mu\text{g/g}$ e $470,1 \pm 38,8$ $\mu\text{g/L}$. Para a levedura *S. pararoseus* a melhor condição de trabalho eleita foi pH 7,4, temperatura de 30 °C e concentração de enzima de 1,0 g por grama de célula seca, onde apresentou a concentração específica de $42,6$ $\mu\text{g/g}$ e volumétrica de 308 $\mu\text{g/L}$ de carotenoides. O uso da técnica enzimática combinado com o banho ultrassônico não proporcionou melhorias nos resultados para ambas as leveduras.

Técnicas químicas, mecânicas e enzimáticas podem ser utilizadas no rompimento da parede celular das leveduras *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa* para a obtenção de carotenoides. O banho ultrassônico foi considerado o método mais efetivo na ruptura celular de ambas as leveduras, sendo obtido a maior recuperação de carotenoides com a *R. mucilaginosa*.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985-2991, 2005.

BOLHASSANI, A.; KHAVARI, A.; BATHAIE, S. Z. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1845, p. 20-30, 2014.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369-381, 2006.

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

CANAÑAVATE, J. P.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, v. 193, p. 257-269, 2001.

CLARKE, A.; PRESCOTT, T.; KHAN, A.; OLABI, A. G. Causes of breakage and disruption in a homogeniser. **Applied Energy**, v. 87, p. 3680-3690, 2010.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2012.

ECHAVARRI-ERASUN, C.; JOHNSON, E. A. Fungal carotenoids. **Applied Mycology Biotechnology**, v. 2, p. 45-85, 2002.

FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.; Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando β -1,3 glucanase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 471-476, 2010.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, A. V.; BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

FOOD AND DRUG REGULATION. Disponível em: <http://laws.justice.gc.ca/en/F-27/C.R.C.-c.870/124366.html#rid-12437>, Department of justice, Canada, 2005.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANGA, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie**, v. 41, p. 1082-1088, 2008.

HALIM R.; HARUN R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, n. 1, p. 116-21, 2012.

HARNKARNSUJARIT, N.; CHAROENREIN, S. Influence of collapsed structure on stability of β -carotene in freeze-dried mangoes. **Food Research International**, v. 44, p. 3188-3194, 2011.

HARRISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advance**, v. 9, p. 217-240, 1991.

HUNG, T. V.; UNGER, M. A. Applications of supercritical fluid extraction in Japanese food industry. **Food Australia**, v. 40, n. 5, p. 235-238, 1994.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18374-18379, 1995.

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

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

KIM, J. I.; LEE, N. K.; YEO, I.; RYU, Y. J.; PARK, H. S.; KIM, B. Y.; KIM, H. K.; HAHM, Y. T. Isolation of carotenoid-producing yeast, *Rhodospiridium babjevae* JI-1, and evaluation of cell extract toxicity against rat hepatic cells. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, p. 137-140, 2012.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 239-256, 2002.

KRICHNAVARUK, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; PAVASANT, P. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus* sp. with vegetable oils as co-solvent. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5556-5560, 2008.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89-101, 2012.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p. 7-13, 2012.

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

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Synechococcus* sp. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 323-329, 2007.

MACHADO, W. R. **Otimização da produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* e influência de pré-tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais**. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2013.

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

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, p. 202-212, 2005.

MEDEIROS, F.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**. v. 7, p. 321-330, 2003.

MEZZOMO, N. **Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão**. 2012. 216 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2012.

MICHELON, M.; MATOS, B. T.; RAFAEL, R. S.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2012.

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganism. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 491-551, 1995.

MONKS, L.; TIGGAMANN, L.; MAZUTI, M. A.; OLIVEIRA, V. J.; VALDUGA, E. Assessment of carotenoids recovery through cell rupture of *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2353-2359, 2012.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

NI, H.; CHEN, Q.; HE, G.; WU, G.; YANG, Y. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 1, p. 51-59, 2008.

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

OTERO, D. M. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 2011. 114 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2011.

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

PENEDO, P. L. M.; **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO₂ supercrítico**. 2007. 139 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides – Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.

SANCHÉZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528-534, 2000.

SANTO, E. F. E.; DE LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G. PONSANO. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science Technology**, v. 33, n. 1, p. 47-51, 2013.

SAVE, S.; PANDIT, A.; JOSHI, J. Microbial cell disruption: role of cavitation. **Chemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 67-72, 1994.

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

SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, p. 397-408, 2006.

TATSCH, P.O. **Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, RS, 2008.

THAMMAKITI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; PHAESUWAN, T.; VERDUYN, C. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 21-29, 2004.

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotecnologia: Princípios Biológicos**. Acribia: Zaragoza, 1990.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. 2005. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2005.

WAGNER, J. R.; RAMBLA, M. A. O.; LEGARRETA, I. G. **Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos**. 1ªed. Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, 2008.

WOLAK, T.; PARAN, E. Can carotenoids attenuate vascular aging? **Vascular Pharmacology**, v. 59, p. 63-66, 2013.

ZENI, R.; COLET, J.; CENCE, K.; TIGGEMANN, L.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Screening of microorganisms for production of carotenoids. **Cyta – Journal of Food**, v. 9, n. 2, p. 37-41, 2011.