

**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MICHELLE ANDRIATI SENTANIN**

**OBTENÇÃO E PROPRIEDADES DE TORULENO DA  
LEVEDURA *Rhodotorula glutinis***

**TESE DE DOUTORADO  
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS - UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Delia Rodriguez Amaya**

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Michelle Andriati Sentanin, aprovada pela comissão julgadora em 18/11/2011 e orientada pela Profa. Dra. Delia Rodriguez Amaya.

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Se59o Sentanin, Michelle Andriati  
Obtenção e propriedades de toruleno da levedura  
*Rhodotorula glutinis* / Michelle Andriati Sentanin. –  
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Delia Rodriguez-Amaya.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Carotenóides. 2. *Rhodotorula glutinis*. 3.  
Toruleno. 4. Degradação. 5. Ácido mevalônico. I.  
Rodriguez-Amaya, Delia. II. Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Obtaining and properties of torulene from *Rhodotorula glutinis*  
yeast

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Carotenoids

*Rhodotorula glutinis*

Torulene

Degradation

Mevalonic acid

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Delia Rodriguez-Amaya [Orientador]

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira

Helena Teixeira Godoy

Paulo Roberto Nogueira Carvalho

Roger Wagner

Data da defesa: 18/112011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

# *Banca Examinadora*

---

Dra. Delia B. Rodriguez Amaya  
(Orientadora)

---

Dra. Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira

---

Dra. Helena Teixeira Godoy

---

Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho

---

Dr. Roger Wagner

---

Dra. Cíntia Nanci Kobori (Suplente)

---

Dra. Marisa Padula (Suplente)

---

Dra. Mieko Kimura (Suplente)



*“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

*"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano"*

Isaac Newton



*Aos meus pais, **Nivaldo e Fátima**, pelo amor  
incondicional e por todo apoio e dedicação.*



# *Agradecimentos*

À **Deus**, que me permitiu chegar até aqui e colocou em meu caminho pessoas incríveis, que tornaram essa trajetória tão mais agradável.

Aos meus pais, **Nivaldo e Fátima**, por serem desde sempre meu exemplo de luta, humildade e determinação. Vocês são o meu motivo de querer sempre fazer o melhor possível.

À minha irmã, **Carolina**, por cuidar de mim na pequena estada em Campinas, e pelas valiosas conversas, por compartilhar comigo os melhores e piores momentos durante todos esses anos. E ao meu cunhado **Bruno**, pela divertida companhia nesses quase cinco anos.

À professora **Delia**, pelos ensinamentos, paciência e exemplo de profissionalismo, ética e justiça. Obrigada por despertar em mim tamanha paixão pela educação.

Aos membros da banca, **Dra. Helena** Godoy, **Dra. Mieko** Kimura, **Dra. Marisa** Padula, **Dr. Roger** Wagner, **Dr. Paulo** Carvalho, **Dra. Giovanna** Oliveira e **Dra. Cíntia** Kobori, pelo carinho, disponibilidade, sugestões e correções na redação desta tese.

À minha irmã de coração, **Mariana Vanin** (querido cabeça), por ter se tornado minha família campineira nesses dez anos. Obrigada por toda a ajuda e todos os momentos de riso e choro.

Às minhas melhores amigas **Michelle Esteves** (Mizinha), **Daniela Franco** (Dani Pane), **Giovanna Oliveira** (Giriponga), **Cintia Kabori** (Ci), **Natália Tawata** (Natz), **Aline Bombonatti** (Li) e **Nenis Eiki** (Doidinha), pelo imenso companheirismo, pelo apoio, risadas, horas e horas no laboratório, trapalhadas... Enfim, vocês são a melhor definição da palavra amigo!

Aos queridos amigos **Márcia Martins** (Má), **José Emilson Ferreira** (Zé), **Lísia Huber** (Beia), **Cedenir Quadros** (CD), **Renata Prates** (Rere), **Rosemary Ribani** (Rose), **Fábio Barros** (Ciba), **Camila Dutra** (Camy), **Ana Paula Dionísio** (Xispita), **Juliana Lopes** (Ju) e **Mário Mano** (Manola), pelo carinho e amizade que levarei sempre comigo. Agradeço todos os momentos proporcionados por essa convivência!

Ao amigo e professor **Roger Wagner**, pela parceira no Capítulo 5 e tamanha disposição em contribuir com este trabalho.

À querida amiga **Maybi Silva**, pela imensa ajuda técnica e pelo apoio nas etapas deste trabalho.

Às funcionárias Iramaia **Angélica** Néri-Numa, **Débora** de Assis Subirá e Maria Dolores de Oliveira (**Dora**), pela amizade e disposição em ajudar sempre.

Ao Departamento de Ciência de Alimentos (**DCA**), pela oportunidade de realização desta grande etapa.

E a todos que contribuíram e tornaram possível a realização de um sonho!

*Muito obrigada!*

# Índice Geral

|                                                                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Resumo Geral</b> .....                                                                                          | xvii |
| <b>General Abstract</b> .....                                                                                      | xix  |
| <b>Introdução Geral</b> .....                                                                                      | xxi  |
| <br><i>Capítulo 1: Produção microbiológica de carotenóides – Foco nos últimos 10 anos...</i>                       | 1    |
| Resumo .....                                                                                                       | 3    |
| Abstract .....                                                                                                     | 4    |
| Introdução .....                                                                                                   | 5    |
| Produção biotecnológica de carotenóides .....                                                                      | 7    |
| Produção de carotenóides por bactérias .....                                                                       | 10   |
| Produção de carotenóides por algas .....                                                                           | 13   |
| Produção de carotenóides por fungos .....                                                                          | 16   |
| Considerações finais .....                                                                                         | 24   |
| Referências Bibliográficas .....                                                                                   | 25   |
| <br><i>Capítulo 2: Efeito do ácido mevalônico na produção de carotenóides por Rhodotorula glutinis</i> .....       | 39   |
| Resumo .....                                                                                                       | 41   |
| Abstract .....                                                                                                     | 42   |
| Introdução .....                                                                                                   | 43   |
| Materiais e Métodos .....                                                                                          | 45   |
| Levedura .....                                                                                                     | 45   |
| Curva de crescimento .....                                                                                         | 45   |
| Condições de cultivo .....                                                                                         | 46   |
| Obtenção da biomassa .....                                                                                         | 46   |
| Análise de açúcar residual .....                                                                                   | 47   |
| Extração dos carotenóides .....                                                                                    | 48   |
| Análise qualitativa e quantitativa dos carotenóides .....                                                          | 48   |
| Análise estatística dos dados .....                                                                                | 50   |
| Resultados e Discussão .....                                                                                       | 50   |
| Conclusão .....                                                                                                    | 56   |
| Referências Bibliográficas .....                                                                                   | 57   |
| <br><i>Capítulo 3: Otimização da produção de carotenóides por Rhodotorula glutinis utilizando manipueira</i> ..... | 61   |
| Resumo .....                                                                                                       | 63   |
| Abstract .....                                                                                                     | 64   |
| Introdução .....                                                                                                   | 65   |
| Materiais e Métodos .....                                                                                          | 68   |
| Levedura .....                                                                                                     | 68   |
| Preparo do inoculo e cultivo das leveduras .....                                                                   | 68   |
| Planejamento experimental .....                                                                                    | 70   |
| Obtenção da biomassa .....                                                                                         | 70   |
| Análise dos carotenóides .....                                                                                     | 71   |

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Análise estatística dos dados .....                                                                                       | 71  |
| Resultados e Discussão .....                                                                                              | 72  |
| Otimização por delineamento experimental .....                                                                            | 72  |
| Conclusão .....                                                                                                           | 85  |
| Referências Bibliográficas .....                                                                                          | 86  |
| <br><b>Capítulo 4: Cinética de degradação de toruleno, licopeno e <math>\beta</math>-caroteno em sistema modelo</b> ..... | 89  |
| Resumo .....                                                                                                              | 91  |
| Abstract .....                                                                                                            | 92  |
| Introdução .....                                                                                                          | 93  |
| Material e Métodos.....                                                                                                   | 95  |
| Levedura, condições de cultivo e obtenção de biomassa .....                                                               | 95  |
| Obtenção dos carotenóides .....                                                                                           | 95  |
| Montagem do sistema modelo .....                                                                                          | 95  |
| Quantificação dos carotenóides .....                                                                                      | 97  |
| Análise dos resultados .....                                                                                              | 98  |
| Resultados e Discussão .....                                                                                              | 99  |
| Conclusão .....                                                                                                           | 107 |
| Referências Bibliográficas .....                                                                                          | 108 |
| <br><b>Capítulo 5: Estudo de compostos voláteis provenientes da degradação do toruleno</b> .....                          | 111 |
| Resumo .....                                                                                                              | 113 |
| Abstract .....                                                                                                            | 114 |
| Introdução .....                                                                                                          | 115 |
| Material e Métodos.....                                                                                                   | 118 |
| Obtenção do toruleno .....                                                                                                | 118 |
| Preparação do sistema modelo .....                                                                                        | 118 |
| Captura dos compostos voláteis .....                                                                                      | 119 |
| Condições cromatográficas para CLAE .....                                                                                 | 120 |
| Condições cromatográficas para GC/MS.....                                                                                 | 121 |
| Identificação dos compostos voláteis de degradação .....                                                                  | 122 |
| Resultados e Discussão .....                                                                                              | 122 |
| Conclusão .....                                                                                                           | 129 |
| Referências Bibliográficas .....                                                                                          | 130 |
| <br><b>Conclusões gerais</b> .....                                                                                        | 133 |

# Índice de Tabelas

|                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Capítulo 1</b> .....                                                                                                                                 | 1   |
| Tabela 1. Carotenóides em bactérias, algas, leveduras e fungos .....                                                                                    | 9   |
| <b>Capítulo 2</b> .....                                                                                                                                 | 39  |
| Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de biomassa e teor de açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos ..... | 52  |
| Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i> .....                       | 55  |
| <b>Capítulo 3</b> .....                                                                                                                                 | 61  |
| Tabela 1. Composição físico-química da manipueira .....                                                                                                 | 69  |
| Tabela 2. Variáveis e níveis para DCCR.....                                                                                                             | 72  |
| Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> e respostas obtidas para <i>Rhodotorula glutinis</i> .....                                     | 73  |
| Tabela 4. ANOVA do modelo quadrático .....                                                                                                              | 74  |
| <b>Capítulo 4</b> .....                                                                                                                                 | 89  |
| Tabela 1. Concentrações e porcentagens de perda de carotenóides durante estocagem em sistemas modelos de baixa umidade .....                            | 100 |
| Tabela 2. Parâmetros cinéticos da degradação de carotenóides em sistema modelo de celulose microcristalina, mantidos na luz e no escuro.....            | 104 |
| <b>Capítulo 5</b> .....                                                                                                                                 | 111 |
| Tabela 1. Principais compostos voláteis formados a partir do toruleno .....                                                                             | 125 |
| Tabela 2. Estruturas de alguns dos compostos formados pela clivagem oxidativa do toruleno .....                                                         | 127 |



# Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 1 .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>1</b>  |
| Figura 1. Caminho biossintético de carotenóides em leveduras (Frengova e Beshkova, 2009).....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 18        |
| <b>Capítulo 2 .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>39</b> |
| Figura 1. Curva de crescimento da levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 51        |
| Figura 2. Cromatogramas dos carotenóides de <i>Rhodotorula glutinis</i> obtidos por CLAE, nas condições descritas no texto. (A) cultivo em meio usual YM; (B) cultivo em meio suplementado com 0,25% de ácido mevalônico; (C) cultivo em meio suplementado com 0,50% de ácido mevalônico; (D) cultivo em meio suplementado com 1,0% de ácido mevalônico ..... | 54        |
| <b>Capítulo 3 .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>61</b> |
| Figura 1. Superfícies de resposta para produção de biomassa. a) Temperatura x pH; b) Temperatura x Agitação; c) Agitação x pH.....                                                                                                                                                                                                                            | 76        |
| Figura 2. Superfícies de resposta para produção de Carotenóides Totais (µg/L de meio). a) Temperatura x Agitação; b) Temperatura x pH; c) Agitação x pH.....                                                                                                                                                                                                  | 78        |
| Figura 3. Superfícies de resposta para produção de Toruleno. a) Temperatura x Agitação; b) Temperatura x pH; c) Agitação x pH.....                                                                                                                                                                                                                            | 80        |
| Figura 4. Superfícies de resposta para produção de β-caroteno. a) Temperatura x Agitação; b) Temperatura x pH; c) Agitação x pH.....                                                                                                                                                                                                                          | 81        |
| <b>Capítulo 4 .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>89</b> |
| Figura 1. Esquema da disposição dos saquinhos contendo carotenóide impregnado em celulose microcristalina: Amarelo = β-caroteno; Laranja = licopeno e Rosa = toruleno .....                                                                                                                                                                                   | 97        |
| Figura 2. Progressão da degradação de β-caroteno em sistema modelo de celulose microcristalina mantido no escuro (A e B) e na luz (C e D).                                                                                                                                                                                                                    | 101       |
| Figura 3. Progressão da degradação de toruleno em sistema modelo de celulose microcristalina mantido no escuro (A e B) e na luz (C e D).                                                                                                                                                                                                                      | 102       |
| Figura 4. Progressão da degradação de licopeno em sistema modelo de celulose microcristalina mantido no escuro (A e B) e na luz (C e D).                                                                                                                                                                                                                      | 103       |
| Figura 5. Estrutura dos carotenóides A) Toruleno; B) β-caroteno e C) Licopeno.....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 105       |

|                                                                                                                                                                                                                                    |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Capítulo 5.....</b>                                                                                                                                                                                                             | <b>111</b> |
| Figura 1: Esquema proposto para a obtenção de compostos voláteis provenientes da oxidação de toruleno (Kobori, 2010).....                                                                                                          | 120        |
| Figura 2: Cromatogramas obtidos dos compostos voláteis formados a partir do toruleno. A) em atmosfera de nitrogênio; B) depois de 5 minutos sob fluxo de oxigênio.....                                                             | 123        |
| Figura 3: Cromatogramas sobrepostos dos compostos voláteis obtidos a partir do toruleno em atmosfera de nitrogênio e exposto ao oxigênio. Preto: toruleno em atmosfera de nitrogênio; Rosa: toruleno em atmosfera de oxigênio..... | 123        |
| Figura 4: Possível esquema de clivagem oxidativa do toruleno e formação de alguns dos compostos.....                                                                                                                               | 128        |

# Resumo Geral

Os carotenóides são corantes naturais, alguns dos quais são precursores de vitamina A. Desde a década passada, tem sido atribuído a estes compostos um importante papel na diminuição do risco de várias doenças degenerativas. Com estas funções vitais, a procura por fontes intensificou-se mundialmente. A produção biotecnológica de carotenóides específicos, utilizando bactérias, fungos e leveduras, vem despertando crescente interesse. O presente trabalho teve como objetivos otimizar a extração dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis*, estimular a produção de carotenóides pela adição de ácido mevalônico, substituir o meio de cultivo por substrato de baixo custo e avaliar a estabilidade e degradação de toruleno.

O capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica sobre a biossíntese de carotenóides e a produção biotecnológica desses pigmentos nos últimos dez anos, destacando a produção por bactérias, algas e fungos.

O segundo capítulo visa otimizar a extração dos carotenóides da levedura *Rhodotorula glutinis* e avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de carotenóides. Por ser um precursor chave no caminho biossintético dos carotenóides em leveduras, este composto influenciou de modo significativo a produção dos pigmentos. Apesar da quantidade de biomassa não ter sido afetada, a produção de carotenóides totais aumentou em até 114% e o rendimento de toruleno e de  $\beta$ -caroteno aumentou 157% e 168%, respectivamente.

O Capítulo 3 tem o intuito de baixar o custo de produção de carotenóides pela levedura em estudo, através da substituição do meio de

cultura usual YM por um resíduo da indústria da mandioca, a manipueira, substrato rico em nutrientes. Para otimizar a produção dos pigmentos, realizou-se um planejamento fatorial completo de quatro variáveis, a saber pH, temperatura, agitação e volume de inóculo. A condição que melhor favoreceu o rendimento de carotenóides foi 26°C, 250 rpm de agitação, pH 7,0 e 10% de volume de inóculo. Nessa condição, a produção de carotenóides totais foi de 2068 µg/L de meio de cultura. O tradicional meio YM proporcionou a produção de apenas 899 µg/L de meio de cultura de carotenóides totais.

O quarto capítulo tem por objetivo avaliar a estabilidade do carotenóide toruleno produzido por *Rhodotorula*, em comparação com os carotenóides bem conhecidos licopeno e β-caroteno. Para isso, foram montados sistemas modelos de baixa umidade, utilizando como matriz celulose microcristalina, que ficaram expostos durante 15 dias à luz ou ao abrigo da mesma. O carotenóide que mais sofreu degradação foi o licopeno, seguido de β-caroteno e toruleno.

O Capítulo 5 visa investigar a degradação oxidativa do toruleno e os compostos voláteis produzidos durante esse processo. Para atingir esse objetivo, foram montados sistemas modelo de baixa umidade, com matriz de celulose microcristalina, em frascos de vidro, com injeção de fluxo de oxigênio. Houve a formação de diversos compostos de degradação, dos quais os que mais se destacaram, quantitativamente, foram metacroleína, prenatal, 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno, 6-metil-hept-5-en-2-ona, 2-etil-hexanol, 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno e 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno.

# *General Abstract*

Carotenoids are natural colorants, some of which are precursors of vitamin A. Since the past decade, an important role in reducing the risk of various degenerative diseases was attributed to these compounds. With these vital functions, the search for sources has intensified worldwide. The biotechnological production of specific carotenoids, using bacteria, fungi and yeasts, have attracted increasing interest. This study had the objective of optimizing the extraction of carotenoids from *Rhodotorula glutinis*, stimulating the production of carotenoids with mevalonic acid, substituting the medium with low-cost substrate and evaluating the stability and degradation of torulene.

Chapter 1 presents a review of the biosynthesis of carotenoids and biotechnological production of these pigments in the last ten years, highlighting the production by bacteria, algae and fungi.

The second chapter aims to optimize the extraction of carotenoids from the yeast *Rhodotorula glutinis* and assessing the effect of different concentrations of mevalonic acid on the production of carotenoids. Being a key precursor in the biosynthetic pathway of carotenoids in yeasts, it significantly influenced the production of pigments. Although the amount of biomass was not affected, the production of total carotenoid increased by 114% and the yield of torulene and  $\beta$ -carotene increased by 157% and 168%, respectively.

Chapter 3 is intended to lower the cost of production of carotenoids by the yeast under investigation, by replacing the usual culture medium YM with a sub-product of the cassava industry, the nutrient-rich substrate manipueira. To

optimize the production of pigments, a full factorial design was used with four variables: pH, temperature, agitation and inoculum volume. The condition that favored yield of carotenoids was: 26°C, 250 rpm agitation, pH 7.0 and 10% volume of inoculum. In this condition, the production of carotenoids was 2068 µg/L of culture medium. The traditional YM provided the production of only 899 µg/L of culture medium of carotenoids.

The fourth chapter aims to evaluate the stability of torulene produced by *Rhodotorula*, compared with well-known carotenoids, lycopene and β-carotene. For this purpose, model systems of low moisture were mounted, using microcrystalline cellulose as the matrix, which were kept in the dark or exposed to light for 15 days. The carotenoid that suffered the most degradation was lycopene, followed by β-carotene and torulene.

Chapter 5 investigates the oxidative degradation of torulene and the volatile compounds produced during this process. To achieve this goal, model systems of low moisture were mounted, with microcrystalline cellulose matrix, in glass bottle, with injection of oxygen flow. Several degradation compounds were formed, of which the following compounds stood out quantitatively: methacrolein, prenal, 2,6-dimethyl-hepta-2,4-diene, 6-methyl-hept-5-en-2-one, 2-ethylhexanol, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl-cyclohexene and 3,3-dimethyl-ciclohexilideno acetaldehyde.

# *Introdução Geral*

Em anos recentes, a população mundial adquiriu a visão de que alimentos não são apenas para nutrir, mas oferecem também compostos ou elementos biologicamente ativos, que proporcionam benefícios adicionais à saúde. Nasceu assim o conceito de alimentos funcionais. Entre os compostos funcionais estão os carotenóides.

Carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, responsáveis pela coloração de muitos vegetais e alguns animais. São produzidos também por algas, fungos e bactérias. São, na sua maioria, tetraterpenóides de quarenta carbonos, construídos a partir de unidades isoprenóides de cinco carbonos unidas por ligações tipo “cabeça-cauda”, com exceção da posição central, onde a ligação é do tipo “cauda-cauda”.

A importância destes compostos extrapola seu papel como pigmentos naturais. Eles apresentam funções ou ações biológicas importantes como atividade pró-vitáminica A, fortalecimento do sistema imunológico e decréscimo do risco de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular. A proteção contra tais doenças, oferecida pelos carotenóides, é associada principalmente à sua atividade antioxidante.

Com a inerente capacidade que diferentes microrganismos têm de sintetizar estes compostos, a biossíntese comercial desses pigmentos por organismos apropriados é uma maneira de produzir carotenóides que não são facilmente sintetizados quimicamente ou que apresentam alto custo de produção. As vantagens são as seguintes: 1) os microrganismos têm a

capacidade de utilizar substratos de baixo custo para sua produção; 2) os carotenóides produzidos são considerados substâncias naturais; 3) a produção ocorre em pequeno espaço e não está sujeita às condições ambientais, como o clima; 4) existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenóides de maior importância.

Por outro lado, carotenóides são passíveis de degradação, podendo ocorrer perdas consideráveis por influência de fatores como temperatura, luz, presença de oxigênio, atividade de água, entre outros, sendo de extrema importância o estudo da estabilidade dessas substâncias tão importantes para a saúde humana.

# *Capítulo 1*

*Produção microbiológica de carotenóides:*

*Foco nos últimos 10 anos*



## RESUMO

Carotenóides são corantes naturais que podem ser biossintetizados por plantas, algas, bactérias, fungos e leveduras, que desempenham funções biológicas importantes. Embora o caminho biossintético já tenha sido estabelecido há muito tempo, os mecanismos de regulação ainda não estão totalmente elucidados, portanto, vários trabalhos procuram esclarecê-los. Devido à crescente demanda do mercado por estes compostos, sua produção biotecnológica vem sendo investigada com maior intensidade. Alguns microrganismos, como *Phaffia rhodozyma*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e *Rhodotorula* sp., vêm ganhando destaque pela capacidade de produzir carotenóides em quantidades consideráveis. Devido ao fato de haver a possibilidade de aumentar ou direcionar a produção desses pigmentos por microrganismos, muitos estudos vêm sendo realizados a fim de selecionar linhagens melhoradas, manipular geneticamente as espécies, otimizar as condições de cultivo e testar a produção em substratos de baixo custo, com os objetivos de minimizar os custos, aumentar a produção e obter os pigmentos de interesse.

**Palavras-chave:** Carotenóides, biossíntese, biotecnologia, produção microbiana.

## ABSTRACT

Carotenoids are natural colorants that can be biosynthesized by plants, algae, bacteria, molds and yeasts, which play important biological functions. Although the biosynthetic pathway had been established for a long time, the mechanisms involved in its regulation is not totally elucidated, so many studies are directed to understanding this aspect. Due to increasing market demand for these compounds, their biotechnological production has been increasingly investigated. Some microorganisms, such as *Phaffia rhodozyma*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* and *Rhodotorula* sp., have been gaining attention because of their ability to produce carotenoids in considerable quantities. Due to the fact that there is the possibility of increasing or directing carotenoid production by microorganisms, many studies have been conducted to select improved strains, manipulate species genetically, optimize cultivation conditions, test production in low-cost substrates, aiming to minimize costs, increase production and obtain pigments of interest.

**Key words:** Carotenoids, biosynthesis, biotechnology, microbial production.

## INTRODUÇÃO

Em anos recentes, a população mundial adquiriu a visão de que alimentos não servem apenas para nutrir, mas oferecem também compostos ou elementos biologicamente ativos, que proporcionam benefícios adicionais à saúde. Nasceu assim o conceito de alimentos funcionais. Entre os compostos funcionais estão os carotenóides.

Carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, responsáveis pela coloração de muitos vegetais, alguns animais, algas, fungos e bactérias. São, na sua maioria, tetraterpenóides de quarenta carbonos, construídos a partir de unidades isoprenóides de cinco carbonos unidas por ligações tipo “cabeça-cauda”, com exceção da posição central, onde a ligação é do tipo “cauda-cauda”.

Esta estrutura básica pode ser modificada através de hidrogenação, dehidrogenação, ciclização, migração da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou combinações destes processos, dando origem aos mais de 600 carotenóides naturais já isolados e caracterizados (Britton et. al., 2004).

Além da capacidade corante, os carotenóides possuem também atividades biológicas. Uma das funções destes pigmentos, conhecida de longa data, é a atividade pró-vitáminica A. Dentre os carotenóides já estudados e caracterizados existentes na natureza, há aproximadamente 50 que podem atuar como precursores de vitamina A (Simpson, 1983). Os pró-vitamínicos A são aqueles que possuem pelo menos um anel  $\beta$ -ionona não substituído, ligado a uma cadeia poliênica conjugada de no mínimo 11 carbonos.

Atualmente, outros efeitos benéficos à saúde humana têm sido atribuídos aos carotenóides, pró-vitamínicos ou não, como fortalecimento do sistema imunológico e redução do risco de doenças degenerativas como câncer, degeneração macular, catarata e doenças cardiovasculares (Moeller et. al., 2000; Handelman, 2001; Gerth et. al., 2004; Koh et. al., 2004; Tapiero et. al., 2004; Krinsky e Johnson, 2005; Voutilainen et. al., 2006; Renzi e Johnson, 2008; Nishino et. al., 2009). A proteção contra tais doenças, oferecida pelos carotenóides, é associada à sua atividade antioxidante, através de sua capacidade de seqüestrar o oxigênio singleto e reagir com radicais livres; modulação do metabolismo de carcinógenos; inibição da proliferação celular; aumento da diferenciação celular através de retinóides; estimulação da comunicação intercelular; aumento da resposta imunológica e fotoproteção (Burton, 1989; Krinsky, 1989, 1994; Olson, 1999; Handelman, 2001; Stahl et. al., 2002; Krinsky e Johnson, 2005; Stahl e Sies, 2005).

Com a inerente capacidade que diferentes microrganismos têm de sintetizar carotenóides, a biossíntese comercial desses pigmentos por organismos apropriados é uma maneira de produzir aqueles que não são facilmente sintetizados quimicamente ou que apresentam alto custo de produção (Ausich, 1997). Além disso, plantas com alta produção de carotenóides conseguem atingir aproximadamente 100 µg de pigmento/g de matriz, como tucumã (99 µg de β-caroteno/g), umari (99 µg de β-caroteno/g), capuchinha (136 µg de luteína/g), caruru (112 µg de β-caroteno/g e 119 µg de luteína/g), mentruz (91 µg de β-caroteno/g e 111 µg de luteína/g) e taioba (104 µg de luteína/g) (Rodriguez-Amaya et. al., 2008). Os microrganismos

podem produzir até cerca de 7,0 mg de pigmento/g de massa celular seca (Kerr et. al., 2004).

Considerando que carotenóides produzidos por microrganismos são naturais, a produção biotecnológica destes compostos torna-se bastante atrativa, no ponto de vista industrial.

## **PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE CAROTENÓIDES**

O aumento de evidências científicas de que os carotenóides têm potenciais benefícios à saúde humana e animal leva a um aumento do interesse comercial e da procura por fontes naturais. A demanda comercial para estes compostos tem sido preenchida por extratos naturais e carotenóides sintéticos idênticos aos naturais.

Muitos microrganismos como bactérias (Bhosale & Bernstein, 2004; Chen et. al., 2006), algas (Jeon et. al., 2006; Raja et. al., 2007), fungos (Kuzina e Cerda-Olmedo, 2006; Nanou et. al.; 2007) e leveduras (Somashekar e Joseph, 2000; An et. al., 2001; Bhosale e Gadre, 2001a, 2001b, 2001c; Flores-Cotera et. al., 2001; Davoli e Weber, 2002; Frengova et. al., 2003; Simova et. al., 2004; Buzzini et. al., 2005; Weber et. al., 2005; Hu et. al., 2006; Libkind e van Brook, 2006; Liu e Wu, 2006; Sperstad et. al., 2006; Tinoi et. al., 2006; Zheng et. al, 2006; Ni et. al., 2007) são capazes de produzir carotenóides naturalmente. O reino microbiano oferece uma variedade de carotenóides, com a possibilidade de produção em escala industrial (Tabela 1).

A biossíntese de carotenóides por microrganismos vem sendo investigada ao longo de muitos anos. A produção microbiana de carotenóides em escala comercial, porém, tem sido limitada. Nos últimos anos, contudo, houve um aumento marcante no interesse em produzir carotenóides através de microrganismos.

A produção biotecnológica de carotenóides para a aplicação industrial, através de microrganismos, tem como principais vantagens:

- Os microrganismos têm a capacidade de utilizar substratos de baixo custo para seu crescimento;
- Os carotenóides produzidos são considerados naturais;
- A produção ocorre em pequenos espaços e a exposição às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo é evitada;
- Há a possibilidade de controle das condições de cultivo para induzir à síntese de um carotenóide específico.

**Tabela 1. Carotenóides em bactérias, algas, leveduras e fungos.**

| <b>Espécies</b>                   | <b>Principais carotenóides</b>              |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Cianobactérias</b>             |                                             |
| <i>Anabaena variabilis</i>        | Cantaxantina                                |
| <i>Aphanizomenon flos-aqua</i>    | Cantaxantina                                |
| <i>Nostoc commune</i>             | Cantaxantina                                |
| <i>Nostochopsis lobatus</i>       | -                                           |
| <b>Algas</b>                      |                                             |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>      | Luteína                                     |
| <i>Dictyococcus cinnabarinus</i>  | Cantaxantina                                |
| <i>Dunaliella salina</i>          | $\beta$ -caroteno                           |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i>     | $\beta$ -caroteno                           |
| <i>Haematococcus pluvialis</i>    | Astaxantina                                 |
| <i>Spongiococcum excetricum</i>   | Luteína                                     |
| <b>Fungos e leveduras</b>         |                                             |
| <i>Blakeslea trispora</i>         | $\beta$ -caroteno e licopeno                |
| <i>Dacrymyces deliquescens</i>    | Luteína                                     |
| <i>Phaffia rhodozyma</i>          | Astaxantina e $\beta$ -caroteno             |
| <i>Rhodospiridium sp</i>          | Toruleno e $\beta$ -caroteno                |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>       | Torularrodina, $\beta$ -caroteno e toruleno |
| <i>Rhodotorula graminis</i>       | Toruleno                                    |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Torularrodina, $\beta$ -caroteno e toruleno |
| <i>Rhodotorula rubra</i>          | $\beta$ -caroteno                           |
| <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> | $\beta$ -caroteno                           |

|                                      |                                             |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Sporidiobolus sp</i>              | Torularrodina, $\beta$ -caroteno e toruleno |
| <i>Sporobolomyces roseus</i>         | Torularrodina, $\beta$ -caroteno e toruleno |
| <i>Sporobolomyces ruberrimus</i>     | Torularrodina e $\beta$ -caroteno           |
| <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | astaxantina                                 |

### **Bactérias**

|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| <i>Mycobacterium brevicale</i>       | Cantaxantina |
| <i>Mycobacterium lacticola</i>       | Astaxantina  |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i>       | -            |
| <i>Rhodococcus maris</i>             | Cantaxantina |
| <i>Streptomyces chrestomyceticus</i> | Xantofilas   |

---

Fonte: Valduga et. al. (2009)

### **Produção de carotenóides por bactérias**

A carotenogênese em bactérias fotossintéticas é afetada principalmente por oxigênio e luz. Alguns microrganismos, como *Myxococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Agromyces* e *Sulfolobus* formam carotenóides somente quando as células são iluminadas (Takano et. al., 2005). Em geral, condições anaeróbicas favorecem a formação de derivados menos oxigenados e cetocarotenóides são formados na presença de oxigênio.

Em bactérias não-fotossintéticas a produção de carotenóides é afetada especialmente pela composição do meio de cultivo. Fontes de carbono e nitrogênio (Silva, 2004; Naveena et. al., 2006), presença de sais inorgânicos no meio de cultura (Asker e Ohta, 2002; Kerr et. al., 2004; Fang et. al., 2010; Chen et. al., 2006), adição de agentes químicos (Bhosale e Bernstein, 2004) e

de íons metálicos (Giotto et. al., 2006) influenciam a produção de carotenóides, aumentando ou diminuindo o rendimento dos pigmentos.

Um fator físico que afeta bastante a produção de carotenóides em microrganismos é a temperatura, que traz mudanças em muitas vias biossintéticas, inclusive na biossíntese de carotenóides (Bhosale, 2004). Ela exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na carotenogênese, controlando o nível de carotenóides nos microrganismos (Valduga et. al., 2009). Dependendo da especificidade do microrganismo, diferenças na temperatura podem provocar variações nas proporções dos pigmentos individuais. Em algumas bactérias, o aumento da temperatura provoca mudanças nas características das células, levando à variações no tamanho celular e nos níveis de pigmentos.

*Flavobacterium* sp. tem sido considerada uma das melhores fontes microbianas de zeaxantina, uma vez que este pigmento constitui 95% do total de carotenóides produzidos por essa bactéria marinha. Em função disso, estudos para direcionar e/ou aumentar a produção deste pigmento têm sido realizados. Masetto et. al. (2001) analisaram os parâmetros velocidade de agitação, taxa de aeração e concentração de substrato na produção de zeaxantina. Sob as condições ótimas (600 rpm, 2 vvm e 4,6% de substrato milhocina), obtiveram 11,4 mg/L de carotenóides totais, sendo 9,8 mg/L de zeaxantina. Bhosale et. al. (2004) avaliaram o efeito de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e conseguiram aumentar a produção de zeaxantina em seis vezes (10,7 mg/L) com a adição de 6,02 mM de ácido málico, 6,20 mM de ácido isocítrico e 0,02 mM de  $\alpha$ -cetogluturato ao meio de cultura. Bhosale e Bernstein (2004) aumentaram a produção dos carotenóides

dessa bactéria em 77 vezes através da suplementação do meio de cultivo com sais inorgânicos e uréia.

*Haloferax alexandrinus* é um dos microrganismos mais promissores na produção comercial de cantaxantina. Essa bactéria tem a habilidade de crescer em altas concentrações de NaCl e sofre lise celular facilmente em soluções com baixa concentração iônica. Asker e Ohta (2002) estudaram a produção de cantaxantina por este microrganismo em meios de cultura contendo várias concentrações de cloreto de sódio (10 – 25%), obtendo máxima produção (6,3 mg/L de carotenóides totais e 2,2 mg/L de cantaxantina) em meio contendo 25% de sal.

A bactéria *Brevibacterium linens* é bastante importante industrialmente, uma vez que sua carotenogênese é a responsável por manchas vermelhas características dos queijos Tilsit, Brick, Limburger, Epoissess, Livarot, Munster, Reblochon, Herve e Taleggio. Devido a isso, a biossíntese de carotenóides e a coloração promovida por eles são foco de investigação (Guyomarc'h et. al., 2000; Dufossé e Echanove, 2005). Além de *B. linens*, a bactéria láctica *Lactobacillus plantarum* também tem importância industrial, já que está envolvida em muitas das fermentações em vegetais e é também produtora de carotenóides. Garrido-Fernadéz et. al. (2010) estudaram dezoito linhagens de *L. plantarum* e notaram que a maioria delas produziu quantidades significativas de 4,4'-diaponeusporeno, um carotenóide amarelo de trinta carbonos, e a faixa de produção foi de 1,8 a 54 mg/Kg de célula seca.

*Mycobacterium aurum* é uma bactéria não-patogênica que acumula isononariateno e  $\beta$ -caroteno como principais carotenóides. Keer et. al. (2004) isolaram um mutante dessa bactéria que foi capaz de produzir licopeno como

carotenóide majoritário. A produção foi significativamente aumentada de 1,2 para 7,4 mg/g com a utilização de 85 mM de NaCl no meio de cultura ou pelo cultivo em pH inicial de 6,0 a 6,4. Outras bactérias também são capazes de produzir carotenóides, como *Deinococcus* (Tian e Hua, 2010); *Rhodotermus marinus* (Lutnaes et. al., 2004); *Paracoccus haeundaensis*, que produz principalmente astaxantina (Lee e Kim, 2006); *Rhodobacter sphaeroids* (Gu et. al., 2008); e *Escherichia coli* (Rodríguez-Villalón et. al., 2008).

### **Produção de carotenóides por algas**

Por séculos tirou-se limitada vantagem das microalgas (*Nostoc* na Ásia e *Spirulina* na África e América do Norte), e apenas recentemente se tem visto o aproveitamento do potencial biotecnológico desses microrganismos. Eles são capazes de produzir uma vasta gama de produtos, incluindo aplicações alimentícias, químicas e terapêuticas (Olaizola, 2003).

A composição de carotenóides em algas é bastante influenciada pelas condições ambientais. *Dunaliella* sp. requer alta intensidade de luz para produzir carotenóides. Há relatos de que a variação da intensidade de luz, na presença de estimuladores químicos orgânicos e inorgânicos, desempenham um importante papel no aumento do rendimento de carotenóides nessa alga. Em *Haematococcus pluvialis*, *Muriellopsis* sp. e *Spirulina platensis*, a carotenogênese é estimulada pelo aumento da intensidade luminosa. Na maioria dos casos, a luz promove melhora quantitativa no conteúdo de carotenóides, sem afetar a proporção qualitativamente (Bhosale, 2004).

A temperatura é o principal elemento físico que controla diretamente a taxa de crescimento de *Dunaliella* sp. e *Haematococcus pluvialis*, durante o

ciclo de divisão celular, e desempenha então importante papel na biossíntese de carotenóides, podendo aumentar ou diminuir o rendimento desses pigmentos (Bhosale, 2004)

Outros fatores, não-climáticos, também podem afetar a produção de carotenóides por algas, como a salinidade e a disponibilidade de nutrientes no meio de crescimento (Beihui e Kun, 2001; Domínguez-Bocanera et. al., 2004; Fazeli et. al., 2006; Abe et. al., 2007; Raja et. al., 2007; Rao et. al., 2007).

A microalga verde unicelular de água doce *Haematococcus pluvialis* é uma das melhores fontes microbianas de astaxantina, que é acumulada na transição entre as células vegetativas verdes e os aplanósporos vermelhos, como resultado de condições de estresse. Como este carotenóide tem importância tecnológica, com aplicações nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e de alimentos, sua produção tem sido investigada. Fábregas et. al. (2001) estudaram parâmetros como luminosidade e sistema de cultivo na produção de astaxantina por *H. pluvialis* e verificaram que, sob luminosidade controlada ( $240 \mu\text{mol fóton/m}^2\text{s}$ ), a produção do pigmento permaneceu em torno de 5,8 mg/L por dia em cultura semi-contínua após 12 dias de incubação, passando a 9,6 mg/L por dia após 15 dias de incubação. Domínguez-Bocanera et. al. (2004) avaliaram fatores ambientais como aeração e adição de nutrientes ao meio de cultura. A produção máxima de astaxantina foi 98 mg/g de biomassa em meio BAR sob iluminação contínua ( $345 \mu\text{mol fóton/m}^2\text{s}$ ) e com adição de 1 g/L de acetato de sódio, sem aeração.

*Dunaliella salina* é uma microalga halotolerante e de excelente adaptação ambiental, explorada para a produção de biomassa seca ou extrato

celular, utilizada como alimento medicinal e hoje é reconhecidamente produtora comercial de quantidades massivas de  $\beta$ -caroteno (Raja et. al., 2007). Por esse motivo, pesquisas envolvendo a carotenogênese desse microrganismo vêm sendo realizadas. Prieto et. al. (2011) estudaram a utilização de diferentes sistemas de produção e biorreatores na biossíntese de carotenóides por *D. salina*. A maior produção dos pigmentos (329 mg/L de cultura/mês) foi encontrada com sistema de cultura operando em dois estágios e fotobiorreator tubular fechado. O efeito da salinidade foi investigado por Fazeli et. al. (2006) e a maior quantidade de carotenóides detectada (11,7 mg/L, durante a fase estacionária de crescimento) foi obtida com 0,5 M de NaCl no sistema de cultivo. Raja et. al. (2007) relatou que a salinidade ótima para produção de carotenóides deve ser maior que 27%.

Outros estudos envolvendo a produção de carotenóides por algas também têm sido realizados na última década. Rao et. al. (2007) estudaram a produção de carotenóides por *Botryococcus braunii* em diferentes níveis de salinidade. Abe et. al. (2007) verificaram a produção de uma variedade de carotenóides, entre eles cantaxantina, astaxantina e  $\beta$ -caroteno, por *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. Beihui e Kun (2001) e Yuan et. al. (2002) investigaram a produção de xantofilas por *Chlorococcum* sp. Del Campo et. al. (2000) avaliaram o perfil de carotenóides produzidos por quinze linhagens da microalga *Chlorophycean* e Orosa et. al. (2000) induziram a produção de carotenóides por *Neochloriswimmeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Chlorella zofingiensis* e *Protosiphon botryoides*.

## **Produção de carotenóides por fungos**

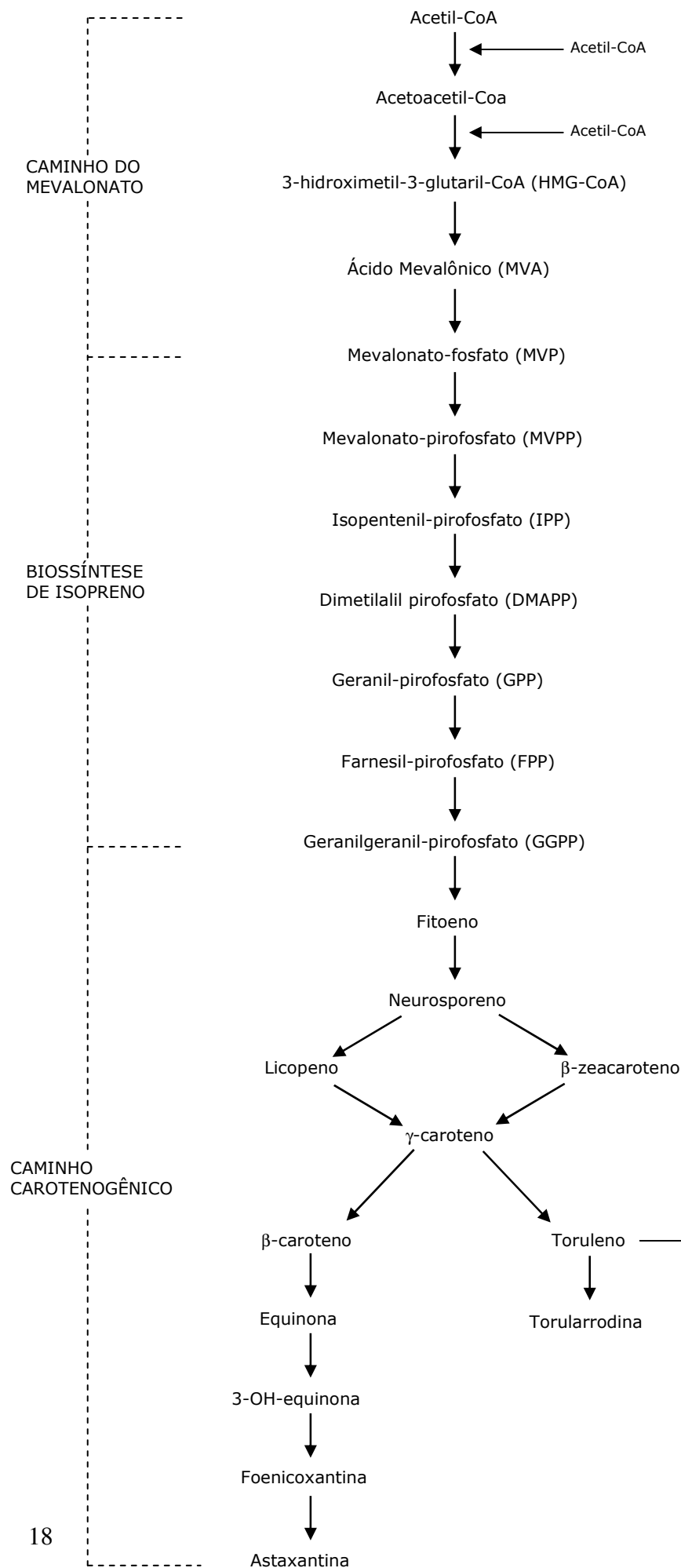
O reino dos fungos abrange uma enorme diversidade de táxons, com ecologias, estratégias de ciclos de vida e morfologias variadas. Dentre eles, destacam-se as leveduras, fungos unicelulares. As vantagens da utilização de leveduras na produção de carotenóides é que estas são potencialmente menos tóxicas que bactérias e os demais fungos e seu cultivo é mais fácil e menos dispendioso que o das algas.

A produção de carotenóides por leveduras é alvo de investigação há muitos anos. A Figura 1 mostra o caminho biossintético dos carotenóides nesses microrganismos.

A conversão de acetil-CoA à 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é catalisada pela HMG-CoA sintase. HMG-CoA é então convertido em um composto de seis átomos de carbono, o ácido mevalônico (MVA), que é o primeiro precursor específico do caminho biossintético dos terpenóides. MVA é então convertido à isopentil pirofosfato (IPP) por uma série de reações envolvendo fosforilação por MVA quinase seguidas por descarboxilação. IPP é isomerizado à dimetilalil pirofosfato (DMAPP), base para a elongação da cadeia. Uma adição sequencial de moléculas de IPP à DMAPP levam à formação de geranilpirofosfato (GPP) (dez carbonos), farnesil pirofosfato (FPP) (quinze carbonos) e geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (vinte carbonos). Essas reações são catalisadas por prenil transferase. A condensação de duas moléculas de GGPP leva ao fitoeno, o primeiro carotenóide de quarenta carbonos do caminho, que sofre dessaturação para formar fitoflueno, neurosporeno e licopeno. Como este último é um composto *trans*, a isomerização da primeira ou segunda dupla ligação do fitoeno deve ocorrer no mesmo estágio que o

processo de dessaturação. O licopeno age como precursor dos carotenóides cíclicos, sofrendo algumas alterações (ex: ciclização) para formar  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno, torularrodina e astaxantina. O  $\gamma$ -caroteno é o maior ponto de ramificação e age como precursor para  $\beta$ -caroteno e toruleno. Hidroxilação e oxidação do toruleno levam à formação de torularrodina.

Ao longo dos anos, várias análises bioquímicas padronizadas, com precursores marcados, inibidores específicos e caracterização de mutantes foram realizadas em laboratórios. Essas análises, aliadas à ensaios *in vitro* com enzimas envolvidas no processo de conversão do fitoeno aos carotenos e xantofilas, permitiram a elaboração do esquema de biossíntese de carotenóides completo e detalhado.



**Figura 1:** Caminho biossintético de carotenóides em leveduras (Frengova e Beshkova, 2009)

A biossíntese dos carotenóides, tanto por leveduras quanto pelos demais fungos, é influenciada por diversos fatores, nutricionais e físicos. Leveduras do gênero *Rhodotorula* parecem ter temperatura ótima de crescimento e produção de carotenóides entre 25 e 30°C (Aksu e Eren, 2005, 2007; Uenojo et. al., 2007). Já para *Phaffia rhodozyma*, essa temperatura parece ser menor (Bhosale, 2004; Frengova e Beshkova, 2009; Valduga et. al., 2009). Os demais fungos crescem, de maneira geral, em temperaturas que variam de 25 a 30°C (Garbayo et. al., 2003; Estrada et. al., 2009; Csernetics, 2011).

Alguns trabalhos demonstram que determinadas leveduras biossintetizam carotenóides como mecanismo de defesa contra os danos causados pela luz (Valduga et. al., 2009). A quantidade e intensidade de luz tolerada pelo gênero *Rhodotorula* varia conforme a espécie. Em *Phaffia rhodozyma*, ocorre produção de astaxantina como resultado da foto-indução (Frengova e Beshkova, 2009). Em *Gibberella fujikurou*, o crescimento micelar sob luz produz carotenóides de cor laranja, enquanto que no escuro praticamente não há produção de pigmentos (Garbayo et. al., 2003).

O crescimento das leveduras e demais fungos naturalmente ocasiona mudanças do pH no meio de cultivo. O pH inicial adequado pode implicar em maior carotenogênese. Em geral, valores iniciais de pH ao redor de 6,0 parecem promover maior crescimento e produção de carotenóides em leveduras (Ramírez et. al., 2001; Aksu e Eren, 2005; Hu et. al., 2006; Razavi e March, 2006). Nos demais fungos, esse fator pode variar bastante (Garbayo et. al., 2003; Estrada et. al., 2009; Csernetics, 2011).

A composição do meio de cultivo influencia diretamente a biossíntese de carotenóides em fungos. Variações nas fontes de carbono e nitrogênio e adição

de agentes químicos, sais e metais podem promover maior ou menor rendimento de pigmentos e ainda alterar a produção qualitativamente. Nos últimos anos, pesquisadores têm dado atenção especial para a produção de carotenóides utilizando substratos mais baratos. As leveduras são capazes de biossintetizar carotenóides a partir de substratos contendo mono e dissacarídeos e em substratos naturais como melaço de cana de açúcar (Squina et. al, 2002; Colla et. al., 2010), água de maceração de milho, hidrolisado de levedura (Valduga et. al., 2007), melaço de sacarose, meio à base de lactose (Aksu e Eren, 2005), milhocina (Colla et. al, 2010) resíduo de feijão e extrato de batata doce (Tinoi et. al., 2005), entre outros.

O fungo zigomiceta *Blakeslea trispora* acumula  $\beta$ -caroteno, seu metabólito secundário, como principal carotenóide, e é o único mucoral utilizado em escala industrial para produção desse pigmento. Portanto, alternativas para aumentar a produção vêm sendo investigadas e envolvem a clonagem de genes da carotenogênese (Quiles-Rosillo et. al., 2005), manipulação das variáveis taxa de aeração e velocidade de agitação (Mantzouridou et. al., 2002), utilização de óleo vegetal bruto como co-substrato de glicose (Mantzouridou et. al., 2006) e alteração no meio de cultivo através do uso de diferentes fontes de carbono, como homo e hetero-sacarídeos, e de diferentes óleos vegetais refinados (Papaioannou e Liakopoulou-Kyriakides, 2010).

A levedura *Phaffia rhodozyma* tem potencial valor comercial como fonte de carotenóides naturais, principalmente por ser excelente produtora de astaxantina. Contudo, o alto custo da produção limita seu uso. Esse custo poderia ser reduzido com uso de substratos mais baratos ou então com o

aumento da produção de carotenóides (Frengova e Beshkova, 2009). O emprego de melaço de beterraba como substrato e a assimilação de nutrientes como uréia e fosfato de sódio promoveram bons rendimentos de carotenóides produzidos por essa levedura (An et. al., 2001). A manipulação do pH aliada ao emprego de glicose, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio e milho macerado também promoveu aumento de 23% na produção dos pigmentos (Liu e Wu, 2007). Já a otimização do conjunto pH, temperatura, porcentagem de inóculo e concentração de carbono e nitrogênio foi responsável por uma produção de astaxantina 92% maior que em condições não otimizadas (Ramírez et. al., 2001).

Outros gêneros de leveduras são capazes de produzir carotenóides, além de *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). Entre eles estão *Cystofilobasidium* (Herz et. al., 2007), *Sporobolomyces* (Davoli e Weber, 2002), *Rhodospiridium* (Sperstad et. al., 2006; Buzzini et. al., 2007) e, destacadamente, *Rhodotorula* (Buzzini et. al., 2007).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de sintetizar carotenóides intracelularmente, além de outras substâncias ativas exocelularmente e têm, portanto, potencial valor comercial. Ainda que a biossíntese de seus carotenóides seja bastante estudada, seu uso industrial ainda não aconteceu devido à pouca informação disponível sobre os mecanismos de regulação biossintética e à falta de estudos dirigidos, tanto para o aumento da biomassa quanto para a produção de carotenóides, além do aproveitamento de meios de cultivo baratos. Essa situação começou a mudar nos últimos anos, com alguns estudos focando a produção de carotenóides por

*Rhodotorula*. Com o intuito de reduzir os custos de produção ou aumentar o rendimento de carotenóides, várias alternativas têm sido investigadas.

Buzzini et. al. (2005) utilizaram traços de elementos ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ ) no meio de cultivo para a produção de carotenóides por *R. graminis* e conseguiram aumentar o conteúdo de carotenóides totais em 370%, com produção de 803  $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca. Buzzini (2000) utilizou mosto de uva concentrado como substrato na biossíntese de carotenóides por *R. glutinis* e conseguiu uma melhora de 116 e 200% na produção de  $\beta$ -caroteno e de carotenóides totais, respectivamente.

Aksu e Eren (2007) investigaram o emprego de melaço de sacarose e soro de lactose como fontes de carbono e a manipulação de fatores como pH, temperatura, taxa de aeração e concentração de sulfato de amônio no meio de cultura na produção de carotenóides por *R. glutinis*. Sob temperatura de 30°C, pH 6,0, taxa de aeração superior a 2,4 vvm e 2,0 g/L de sulfato de amônio, a maior concentração de carotenóides totais (125 mg/L de meio de cultura) foi obtida com melaço de sacarose na concentração de 20 g/L como fonte de carbono, enquanto que o maior rendimento (35,5 mg/g de biomassa seca) foi conseguido com soro de leite a 13,2 g/L.

A aplicação de substâncias como treonina, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e hidróxido de cálcio nos meios de cultivos, para a biossíntese de carotenóides por um mutante de *R. glutinis*, foi estudada por Bhosale e Gadre (2001a). O meio contendo 11,7 g/L de extrato de levedura, 46 g/L de glicose e 18 g/L de treonina, junto com micronutrientes, proporcionou um aumento de 4 vezes na produção de carotenóides (129 mg/L).

A produção direcionada de carotenóides por *Rhodotorula* também vem sendo investigada. Bhosale e Gadre (2002) manipularam a temperatura e as condições de iluminação para o aumento da produção de  $\beta$ -caroteno por um mutante de *R. glutinis*. A temperatura ótima de crescimento e produção do carotenóide foi 30 e 20°C, respectivamente. A 30°C, a produção de  $\beta$ -caroteno foi 125 mg/L e representou 66% do total dos carotenóides. A 20°C, foi 250 mg/L e representou 92% dos carotenóides totais. A 30°C e sob iluminação constante de 1000 lux, o teor de  $\beta$ -caroteno aumentou 58%. A 20°C nenhum aumento significativo foi notado.

Sakaki et. al. (2000, 2001) cultivaram a levedura *R. glutinis* sob estresse oxidativo e sob irradiação de luz branca, na tentativa de aumentar a produção de torularrodina. Quando exposta à irradiação por luz branca ou luz azul, a levedura produziu maiores quantidades de torularrodina. Com adição de azul de metileno, gerador de oxigênio singleto, as leveduras apresentaram resistência à inibição do crescimento induzida por este reagente.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A regulação da carotenogênese em microrganismos merece maiores investigações, a fim de aumentar a produção de carotenóides.

Pesquisas focam o isolamento e seleção de linhagens de microrganismos que produzam uma variedade desses pigmentos, destacando a produção comercial de  $\beta$ -caroteno e astaxantina. Porém, ainda hoje, o custo da biossíntese microbiana é maior que o custo da síntese química, o que torna fundamental o desenvolvimento de pesquisas visando aumentar o rendimento e minimizar os custos de produção.

Estudos para aumentar a produção microbiana de carotenóides baseados na manipulação das condições de cultivo, emprego de agentes químicos e aproveitamento de resíduos industriais como meio de cultivo podem reduzir os custos, além de direcionar a biossíntese para a obtenção de carotenóides de maior interesse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; HATTORI, H.; HIRANO, M. (2007). Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry*, 100, 656-661.
- AKSU, Z.; EREN, T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40, 2985-2991.
- AKSU, Z.; EREN, T. (2007). Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 107-113.
- AN, G.; JANG, B.; CHO, M. (2001). Cultivation of the carotenoid hyper-producing mutant 2A2n of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 121-125.
- ASKER, D.; OHTA, Y. (2002). Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 743-750.
- AUSICH, R.L. (1997). Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnonology. *Pure Applied Chemistry*, 69, 2169-2173.
- BEIHUI, L.; KUN, L.Y. (2001). In vitro biosynthesis of xanthophylls by cell extracts of a green alga *Chlorococcum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 147-154.
- BHOSALE, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 351-361.

- BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P.S. (2004).  $\beta$ -carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31, 565-571.
- BHOSALE, P.; GADRE, R.V. (2001a). Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 12-16.
- BHOSALE, P.; GADRE, R.V. (2001b)  $\beta$ -carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 327-332.
- BHOSALE, P.; GADRE, R.V. (2001c). Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. *Bioresource Technology*, 76, 53-55.
- BHOSALE, P.; GADRE, R.V. (2002). Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced  $\beta$ -carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 349-353.
- BHOSALE, P.; LARSON, A.J.; BERNSTEIN, P.S. (2004). Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 623-629.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (2004). Carotenoids Handbook. Birkhauser, Basel.
- BURTON, G.W. (1989). Antioxidant action of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 119, 109 – 111.
- BUZZINI, P. (2000). An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated

- rectified grape must as the sole carbohydrate source. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24, 41-45.
- BUZZINI, P.; INNOCENTI, M.; TURCHETTI, B.; LIBKIND, D.; van BROOCK, M.; MULINACCI, N. (2007). Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 1024-1031.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A.; GAETANI, M.; TURCHETTI, B.; PAGNONI, U.M.; DAVOLI, P. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 687-692.
- CHEN, D.; HAN, Y.; GU, Z. (2006). Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroids*. *Process Biochemistry*, 41, 1773-1778.
- CERNETICS, A.; NAGY, G.; ITURRIAGA, E.A.; SZEKERES, A.; ESLAVA, A.P.; VÁGVÖLGYI, C.; PAPP, T. (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinilloids*. *Fungal Genetics and Biology*, no prelo.
- COLLA, E.; PEREIRA, A.B.; HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. (2010). Optimization of trehalose production by *Rhodotorula dairenensis* following a sequential strategy of experimental design. *Food Bioprocess and Technology*, 3, 265-275.
- DAVOLI, P.; WEBER, R.W.C. (2002). Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*. *Mycologist*, 16, 102-108.

- DEL CAMPO, J.A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, M.A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M.G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp.* (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 76, 51-59.
- DOMÍNGUEZ-BOCANERA, A.R.; LEGARRETA, I.G.; JERONIMO, F.M.; CAMPOCOSIO, A.T. (2004) Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92, 209-214.
- DUFOSSÉ, L., ECHANOVE, M.C. (2005). The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Food Research International*, 38, 967-973.
- ESTRADA, A.F.; BREFORT, T.; MENGEL, C.; DIÁZ-SANCHÉZ, V.; ALDER, A.; AL-BABILI, S.; AVALOS, J. (2009). *Ustilago maydis* accumulates  $\beta$ -carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 803-813.
- FÁBREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMÍNGUEZ, A. (2001). Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 89, 65-71.
- FANG, C.; KU, K.; LEE, M.; SU, N. (2010). Influence of nutritive factors on C<sub>50</sub> carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource Technology*, 101, 6487-6493.
- FAZELI, M.R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. (2006). Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26

- isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, 97, 2453-2456.
- FLORES-COTERA, L.B.; MARTIN, R.; SANCHEZ, S. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 341-347.
- FRENGOVA, G.I.; BESHKOVA, D.M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 163-180.
- FRENGOVA, G.I.; SIMOVA, E.D., BESHKOVA, D.M. (2003). Carotenoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 58, 562-567.
- GARBAYO, I.; VÍLCHEZ, E.; NAUVA-SAUCEDO, J.E.; BARBOTIN, J.N. (2003). Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia on *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 629-634.
- GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; RUIZ-BARBA, J.L. (2010). Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 34-39.
- GERTH, C.; MORRISSEY, B.M.; CROSS, C.E.; WERNER, J.S. (2004). Lutein zeaxanthin, macular pigment, and visual function in adult cystic fibrosis patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1045-1052.

- GIOTTA, L.; AGOSTIANO, A.; ITALIANO, F. (2006) Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroids*. *Chemosphere*, 26, 1490-1499.
- GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z.; GU, F. (2008). Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroids*. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41, 1082-1088.
- GUYOMARC'H, F.; BINET, A.; DUFOSSÉ, L. (2000). Characterization of *Brevibacterium linens* pigmentation using spectrophotometry. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 201-210.
- HANDELMAN, G.J. (2001). The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Journal of Nutrition*, 17, 818-822.
- HERZ, S.; WEBER, R.W.S.; ANKE, H.; MUCCI, A.; DAVOLI, P. (2007). Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*, 68, 2503-2511.
- HU, Z.C.; ZENG, Y.G.; WANG, Z., SHEN, Y.C. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 586-590.
- JEON, Y.C.; CHO, W.C.; YUN, Y. (2006). Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 490-495.
- KERR, S.; CALÉ, C.; CABRAL, J.M.S.; van KEULEN, F. (2004). Factors enhancing lycopene production by a new *Mycobacterium aurum* mutant. *Biotechnology Letters*, 26, 103-108.

- KOH, H.; MURRAY, I.J.; NOLAN, D.; CARDEN, D.; FEATHER, J.; BEATTY, S. (2004). Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study. *Experimental Eye Research*, 79, 21-27.
- KRINSKY, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617-635.
- KRINSKY, N.I. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure Applied Chemistry*, 66, 1003-1010.
- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- KUZINA, V.; CERDA-OLMEDO, E. (2006). Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleanus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4917-4922.
- LEE, J.H.; KIM, Y.T. (2006). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Gene*, 370, 86-95.
- LIBKIND, D.; van BROOK, M. (2006). Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 687-692.
- LIU, Y.S.; WU, J.Y. (2006). Use of n-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1033-1038.

- LIU, Y.S.; WU, J.Y. (2007). Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experimental design. *Biochemical Engineering Journal*, 36, 182-189.
- LUTNAES, B.F.; STRAND, A.; PÉTURSDÓTT S.K.; LIAAEN-JENSEN, S. (2004). Carotenoids of thermophilic bacteria – *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 455-468.
- MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. (2002). Effect of the aeration rate and agitation speed on  $\beta$ -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 123-135.
- MANTZOURIDOU, F.; TSIMIDOU, M.F.; ROUKAS, T. (2006) Performance of crude olive pomace oil and soybean oil during carotenoid production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2575-2581.
- MASETTO, A.; FLORES-COTERA, L.B.; DÍAZ, C.; LANGLEY, E.; SANCHEZ, S. (2001). Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 55-58.
- MOELLER, S.M.; JACQUES, P.F.; BLUMBERG, J.B. (2000). The potencial role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 522-527.
- NANOU, K.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. (2007). Role of hydrolytic enzymes and oxidative stress in autolysis and morphology of *Blakeslea trispora*

- during  $\beta$ -carotene production in submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 447-453.
- NAVEENA, B.J.; AETAL, Md.; BHADRIAH, K.; REDDY, G. (2006) Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SST using wheat bran. *Bioresource Technology*, 96, 485-490.
- NI, H.; CHEN, Q.; RUAN, H.; YANG, Y.; LI, L.; WU, G.; HU, Y.; HE, G. (2007). Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8, 365-370.
- NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. (2009). Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483, 165-168.
- OLAIZOLA, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20, 459-466.
- OLSON, J. A. (1999). Carotenoids and human health. *Archives Latinoamericanas de Nutricion*, 49 (3 suppl 1), 7S-11S.
- OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12, 553-556.
- PAPAIOANNOU, E.H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. (2010). Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 305-311.

- PRIETO, A.; CAÑAVATE, J.P.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. (2011) Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of Biotechnology*, no prelo.
- QUILES-ROSILLO, M.D.; RUIZ-VÁZQUEZ, R.M.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. (2005). Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 141-153.
- RAJA, R.; HAEMAIWARYA, S.; RENGASAMY, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 517-523.
- RAMÍREZ, J.; GUTIERREZ, H.; GSCHAEGLER, A. (2001). Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 88, 259-268.
- RAO, A.R.; DAYANANDA, C.; SARADA, R.; SHAMALA, T.R.; RAVISHANKAR, G.A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98, 560-564.
- RAZAVI, S.H.; MARCH, I. (2006). Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 25, 59-64.
- RENZI, L.M.; JOHNSON, E.J. (2008). Lutein and age-related ocular disorders in the older adult: a review. *Journal of Nutrition for the Elderly*, 26, 139-157.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA FARFAN, J. (2008). Fontes brasileiras de carotenóides. Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

- RODRÍGUEZ-VILLÁLON, A.; PÉREZ-GIL, J.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. (2008). Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. *Journal of Biotechnology*, 135, 78-84.
- SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; SATONAKA, K.; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. (2000). Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 203-205.
- SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; TADA, A.; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. (2001). Activation of torularhodin producing by *Rhodotorula glutinis* using weak white irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 294-297.
- SILVA, C.; CABRAL, J.M.S.; van KEULEN, F. (2004). Isolation of a  $\beta$ -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 26, 257-262.
- SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, G.I.; BESHKOVA, D.M. (2004). Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED 8 co-cultivated with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 115-121.
- SIMPSON, K.L. (1983). Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proceedings of the Nutrition Society*, 42, 7-17 .
- SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. (2000). Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 491-493.

- SPERSTAD, S.; LUTNAES, B.F.; STORMO, S.K.; LIAAEN-JENSEN, S.; LANDFALD, B. (2006). Torularhodin and torulene are the major contributors to the carotenoid pool of marine *Rhodospiridium babjevae* (Golubev). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 269-273.
- SQUINA, F.M.; YAMASHITA, F.; PEREIRA, J.L.; MERCADANTE, A.Z. (2002). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnology*, 16, 227-235.
- STAHL, W.; ALE-AGHA, N.; POLIDORI, M.C. (2002). Non-oxidant properties of carotenoids. *The Journal of Biological Chemistry*, 383, 553-558.
- STAHL, W.; SIES, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 740, 101-107.
- TAKANO, H.; OBITSU, S.; BEPPU, T.; UEDA, K. (2005). Light-induces carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Identification of an Extracytoplasmic function sigma factor yhat directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *Journal of Bacteriology*, 187, 1825-1832.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 58, 100-110.
- TIAN, B.; HUA, Y. (2010). Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus* – *Thermus* bacteria. *Trends in Microbiology*, 18, 512-520.

- TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40, 2551-2557.
- TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. (2006). Utilization of mustard waste isolated for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 309-314.
- UENOJO, M.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. (2007). Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, 30, 616-622.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. (2009). Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, 32, 2429-2436.
- VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; JACQUES, R.A.; JÚNIOR, A.F. (2007). Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. *Química Nova*, 30, 1860-1866.
- VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1265-1271.
- YUAN, J.; CHEN, F.; LIU, X.; LI, X. (2002). Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. *Food Chemistry*, 76, 319-325.

- WEBER, R.W.C.; MADHOUR, A.; ANKE, H.; MUCCI, A.; DAVOLI, P. (2005). 2-Hydroxytorularhodin, a new xanthophylls from the red yeast *Sporobolomyces coprosmae*. *Helvetica Chimica Acta*, 88, 2960-2966.
- ZHENG, Y.G.; HU, Z.C.; WANG, Z.; SHEN, Y.C. (2006). Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Food and Bioprocess Processing*, 84, 164-166.

## *Capítulo 2*

*Efeito de ácido mevalônico na produção de  
carotenóides por *Rhodotorula glutinis**



## RESUMO

O ácido mevalônico atua como precursor chave no caminho biossintético dos carotenóides produzidos por leveduras. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes concentrações desse agente químico, adicionado ao meio de cultivo normal, na produção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis*. A 0,25, 0,50 e 1,0%, o ácido não afetou a produção de biomassa, mas aumentou em até 114% a produção de carotenóides totais. O rendimento de toruleno aumentou em até 157% e o de  $\beta$ -caroteno em até 168%, quando comparados ao meio controle.

**Palavras-chave:** Carotenóides, *Rhodotorula glutinis*, ácido mevalônico.

## ABSTRACT

Mevalonic acid acts as a key precursor in the biosynthetic pathway of carotenoids produced by yeasts. The aim of this study was to evaluate the influence of different concentrations of this chemical agent, added to normal culture medium, on carotenoids production of *Rhodotorula glutinis*. At 0.25, 0.50 and 1.0%, the acid did not affect biomass production, but the total carotenoid production increased up to 114%. The yield of torulene increased up to 157% and that of  $\beta$ -carotene up to 168%, when compared to those of the control medium.

**Key words:** Carotenoids, *Rhodotorula glutinis*, mevalonic acid.

## INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos, como algas (Jeon et. al., 2006; Raja et. al.; 2007), bactérias (Bhosale e Bernstein, 2004; Chen et. al., 2006), fungos (Kuzina e Cerda-Olmedo, 2006; Nanou et. al.; 2007) e leveduras (Frengova et. al., 2003; Simova et. al., 2004; Buzzini et. al., 2005; Weber et. al., 2005; Hu et. al., 2006; Tinoi et. al., 2006; Zheng et. al, 2006; Ni et. al., 2007) são capazes de produzir carotenóides naturalmente.

Para aumentar ou direcionar a produção desses pigmentos, estudos sobre a regulação do caminho biossintético, incluindo o uso de ativadores e inibidores do crescimento microbiano e da produção de carotenóides, vêm sendo realizados há alguns anos. Meyer e du Preez (1993) avaliaram o efeito de ácido acético sobre a síntese de carotenóides na levedura *Phaffia rhodozyma* com o objetivo de verificar se o ácido, atuando como precursor de acetil-CoA, poderia aumentar a produção de astaxantina. Eles notaram que as células da levedura deveriam permanecer na fase estacionária por um período maior, para ocasionar um aumento na produção de astaxantina. A produção deste carotenóide foi menor na presença de ácido acético que na presença de açúcar, o que sugeriu que o ácido acético não foi tão eficaz no estímulo da produção de astaxantina, ou então que a célula gastaria mais energia para manter o pH intracelular, reduzindo a energia disponível para a produção de pigmentos.

Squina e Mercadante (2005) investigaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis* adicionando nicotina e difenilamina ao meio de cultivo. Apenas *R. rubra* produziu mais carotenóides

totais quando 5  $\mu$ mol de difenilamina foi adicionado ao meio. Em ambas as linhagens, a suplementação com 5  $\mu$ mol de difenilamina causou uma significativa redução na proporção torularrodina/toruleno, indo de 1,5 para 0,5 em *R. rubra* e de 0,8 para 0,5 em *R. glutinis*. Com 10  $\mu$ mol desse suplemento, ocorreu acúmulo de  $\beta$ -caroteno de 13 para 47% em *R. rubra* e de 36 para 43% em *R. glutinis*. A suplementação com nicotina resultou em biossíntese seletiva de licopeno (acima de 93,8  $\mu$ g/g) e formação de um carotenóide minoritário, tentativamente identificado como didehidrolicopeno, não relatado previamente em *Rhodotorula sp.*

Ácido mevalônico é um composto formado a partir da condensação de acetil-CoA com acetoacetil-CoA, originando  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril CoA (HMG CoA), que é reduzido por piridina redutase até a formação de mevalonato (Ferguson et. al., 1959; Smith e Henrikson, 1964). Este composto é o primeiro precursor específico do caminho biossintético dos terpenóides. Ele é convertido em isopentil difosfato, que sofre isomerização para formar dimetilalil difosfato, base para a elongação da cadeia. Sucessivas adições de moléculas de isopentil difosfato levam à formação de geranil difosfato, farnesil difosfato e geranilgeranil difosfato, que sofre dimerização com outra molécula de geranilgeranil difosfato, formando fitoeno, o primeiro carotenóide (de 40 carbonos) no caminho biossintético (Davies e Taylor, 1976; Britton, 1989).

O objetivo deste estudo foi investigar a ação de ácido mevalônico na produção de biomassa e de carotenóides pela levedura *Rhodotorula glutinis*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Levedura**

Foi utilizada neste estudo a linhagem de *Rhodotorula glutinis* NCYC 1576, cedida pela Fundação André Tosello. As leveduras foram mantidas sob refrigeração, em tubos de ensaio contendo meio sólido "Yeast Malt" (YM) inclinado, preparado com 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 20 g/L de ágar, com repiques mensais.

### **Curva de crescimento**

A fim de estabelecer o melhor período para a transferência do inóculo ao meio de cultivo, foi feita a curva de crescimento para *Rhodotorula glutinis*. Devido ao fato da levedura estudada apresentar intensa pigmentação, o método escolhido foi o descrito por Miles e Misra (1938), com adaptações. Tal método consiste na análise por contagem em placas em diferentes períodos de cultivo.

Uma alçada homogênea e bem carregada de leveduras foi retirada do tubo de ensaio com meio YM inclinado e transferida para um frasco erlenmeyer contendo 200 mL de meio YM líquido, preparado como descrito anteriormente sem o ágar. Após 24, 48 e 72 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C, uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída em tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% estéril. A partir deste tubo foram feitas diluições sucessivas, até atingir  $10^{-8}$ . De cada diluição retirou-se 1 mL, que foi plaqueado em placas de Petri contendo meio YM sólido e incubadas a 30°C por

96 horas. Fez-se então a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas. O procedimento foi realizado em triplicata.

### **Condições de cultivo**

O inóculo foi preparado com a retirada de uma alçada homogênea e bem carregada de células viáveis, contidas em um tubo de ensaio com meio YM inclinado. As células foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio YM líquido, e incubadas em agitador rotatório a 30°C e 200 rpm, por 48 horas, até atingir  $10^8$  UFC/mL. Após este procedimento, 20 mL do inóculo foram transferidos para o meio de produção.

O crescimento das leveduras ocorreu em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido YM e concentrações de 0,25%, 0,50% e 1,0% de ácido mevalônico, sob agitação de 200 rpm a 30°C, por 144 horas. Os controles foram preparados com o meio YM, sem adição de ácido mevalônico. Para melhorar a aeração, foram utilizados tampões de espuma de 5 mm de espessura em substituição aos tradicionais tampões de algodão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Obtenção da biomassa**

Após o período de fermentação, os 200 mL de meio de cultivo foram separados em seis alíquotas de 30 mL, as quais foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C, para separação do sobrenadante. Este foi removido e a biomassa úmida foi pesada para as análises de carotenóides e quantificação de biomassa seca. As biomassas provenientes de três das seis

alíquotas foram transferidas para placas de Petri e levadas à estufa a 105°C, para secagem até peso constante.

### **Análise de açúcar residual**

A concentração de açúcar residual foi medida nos sobrenadantes das amostras através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959), com algumas adaptações.

A solução DNS foi preparada através de 0,6% de ácido dinitrossalicílico, 18,0% de sal Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), 0,5% de fenol, fundido a 50°C, 0,5% de bissulfito de sódio, 2,0% de NaOH e 78,4% de água destilada.

Para a análise das amostras, 2 mL do sobrenadante, diluído conforme necessário para se obter leitura, foram misturados em tubo de ensaio com 2 mL de HCl 2M e levados em banho em ebulição por 10 minutos. Após esse intervalo, 2 mL de NaOH 2M foram adicionados ao tubo e resfriados em banho de gelo. Então, uma alíquota de 2 mL foi retirada e levada a outro tubo de ensaio, e adicionaram-se 2 mL de reagente DNS. A mistura foi levada em banho fervente por 5 minutos, retirada e resfriada em banho de gelo. Fez-se então a leitura em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Coulter, Maryland, EUA) a 540 nm. O procedimento foi feito em triplicata para cada amostra.

A quantificação das amostras foi realizada através da construção de uma curva de calibração de dez pontos em triplicata, utilizando glicose numa faixa de concentração de 0,02 a 0,2 g/L.

## **Extração dos carotenóides**

Com o propósito de otimizar a extração dos carotenóides, alguns métodos de ruptura da parede celular foram previamente testados, tais como: utilização da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase, produzida pelo microrganismo *Cellulosimicrobium cellulans*; sonicação; maceração com areia tratada e acetona; tratamento em meio básico e maceração com hiflosupercel e acetona. Dentre eles, o método mais eficiente foi o último, sendo escolhido para as análises posteriores.

Para a extração dos carotenóides, aproximadamente 4 g de biomassa úmida (correspondente à alíquota de 30 mL de meio de cultura) foram misturados em almofariz com cerca de 30 g de hiflosupercel e 150 mL de acetona, e macerados com pistilo exaustivamente. A mistura foi filtrada em funil de placa sinterizada de porosidade G2 e o procedimento foi repetido até que o resíduo ficasse incolor. Os carotenóides foram transferidos da acetona para éter de petróleo por partição em funil de separação, com adição de água destilada para promover a separação das fases. A lavagem com água foi repetida 4–5 vezes para remoção da acetona. O extrato etéreo foi seco com sulfato de sódio anidro.

## **Análise qualitativa e quantitativa dos carotenóides**

Para a quantificação de carotenóides totais, o extrato foi transferido para um balão volumétrico, o volume sendo completado com éter de petróleo, e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 483 nm, comprimento de onda correspondente ao toruleno. A concentração foi calculada de acordo com a

fórmula fornecida por Davies (1976), usando como valor de absortividade 3240, correspondente à absorção deste pigmento em éter de petróleo.

O extrato foi concentrado em evaporador rotativo e seco com jato de nitrogênio, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência. A amostra foi redissolvida em 1 mL de acetona grau cromatográfico, filtrada em filtros PTFE 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) e injetada no cromatógrafo. Um sistema constituído de bomba quaternária (Waters modelo 2690, Milford, EUA) com degaseificador na linha, injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), alça de amostragem de 10  $\mu\text{L}$  de capacidade e detector com arranjo de diodos (Waters modelo 996) controlado por software Millennium (versão 3.2) foi utilizado para a análise cromatográfica. A detecção foi realizada em comprimento de onda máximo (maxplot). Os carotenóides toruleno e  $\beta$ -caroteno, total e *trans*, foram quantificados por padronização externa, através da construção de curvas de calibração de cinco pontos em triplicata, utilizando padrões de carotenóides nas faixas de concentração necessárias.

Para a identificação, os espectros de absorção foram analisados em termos de  $\lambda_{\text{max}}$  e estrutura espectral fina, expressa pela % III/II, que é a razão entre a altura do pico de absorção no maior comprimento de onda (III) e a altura do pico do meio (II), o mínimo dos dois picos tomado como linha de base.

Todas as análises foram feitas utilizando uma coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (Spherisorb S3 ODS2, 3  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm) (Waters Corporation, Milford, EUA). A fase móvel foi composta de acetonitrila (contendo 0,05% de trietilamina), metanol e acetato de etila, em gradiente linear iniciando com de

65:35:0 (v/v/v) alterado para 65:18:17 (v/v/v) , em 4 minutos, a última proporção mantida até o final da corrida (45 minutos). A temperatura foi de aproximadamente 22°C e o tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 15 minutos. A vazão foi de 0,5 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 10 µL.

A produção de carotenóides foi expressa em µg/L de meio de cultivo e em µg/g de biomassa seca.

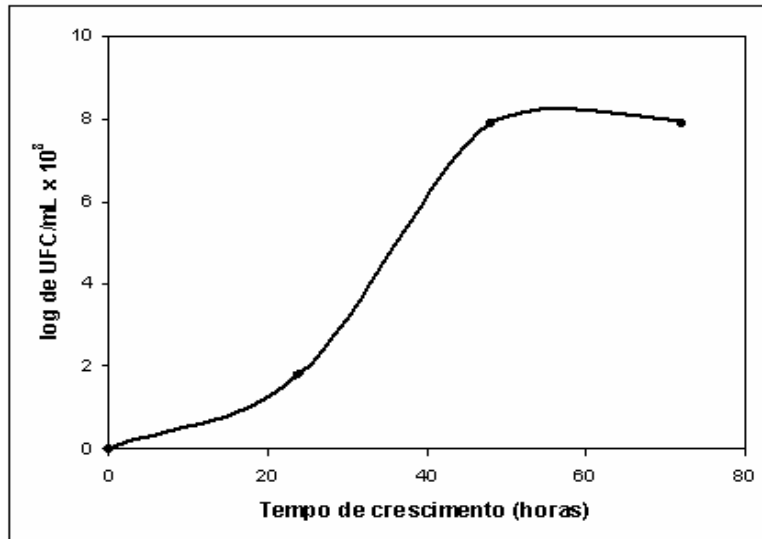
### **Análise estatística dos dados**

O tratamento estatístico dos dados de produção de biomassa, de carotenóides e de açúcar residual foi feito através de ANOVA e da aplicação do teste de Tukey, utilizando software estatístico Graphpad Prism.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A curva de crescimento da levedura, construída por meio do logaritmo de unidades formadoras de colônia (UFC) versus tempo, está apresentada na Figura 1.

A curva demonstrou que até 48 horas de cultivo as leveduras permaneceram em fase exponencial de crescimento e, a partir daí, entraram em fase estacionária. Portanto, o tempo ideal para a transferência do inóculo para o meio de cultivo foi 48 horas, assim os microrganismos estariam no máximo da fase de crescimento exponencial na transmissão para o meio de cultivo.



**Figura 1:** Curva de crescimento da levedura *Rhodotorula glutinis*

A Tabela 1 mostra a produção de biomassa e o teor de açúcar residual. A adição de diferentes concentrações de ácido mevalônico ao meio de cultivo não promoveu diferença significativa na produção da biomassa da levedura em estudo. Os teores de açúcar residual dos sobrenadantes destes meios mostraram-se bastante próximos, apesar da diferença significativa entre alguns deles, em concordância com a similaridade na produção de biomassa.

**Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de biomassa e teor de açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos**

| <b>Tratamento</b>         | <b>Biomassa seca<br/>(g/100 mL)*</b> | <b>Açúcar residual<br/>(g/100 mL)*</b> |
|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| Controle                  | 0,10 <sup>a</sup> ± 0,02             | 0,13 <sup>a</sup> ± 0,02               |
| 0,25% de ácido mevalônico | 0,10 <sup>a</sup> ± 0,02             | 0,10 <sup>b</sup> ± 0,00               |
| 0,50% de ácido mevalônico | 0,13 <sup>a</sup> ± 0,01             | 0,10 <sup>b</sup> ± 0,00               |
| 1,0% de ácido mevalônico  | 0,11 <sup>a</sup> ± 0,01             | 0,11 <sup>ab</sup> ± 0,00              |

\*Média de análises em triplicata

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤0,05)

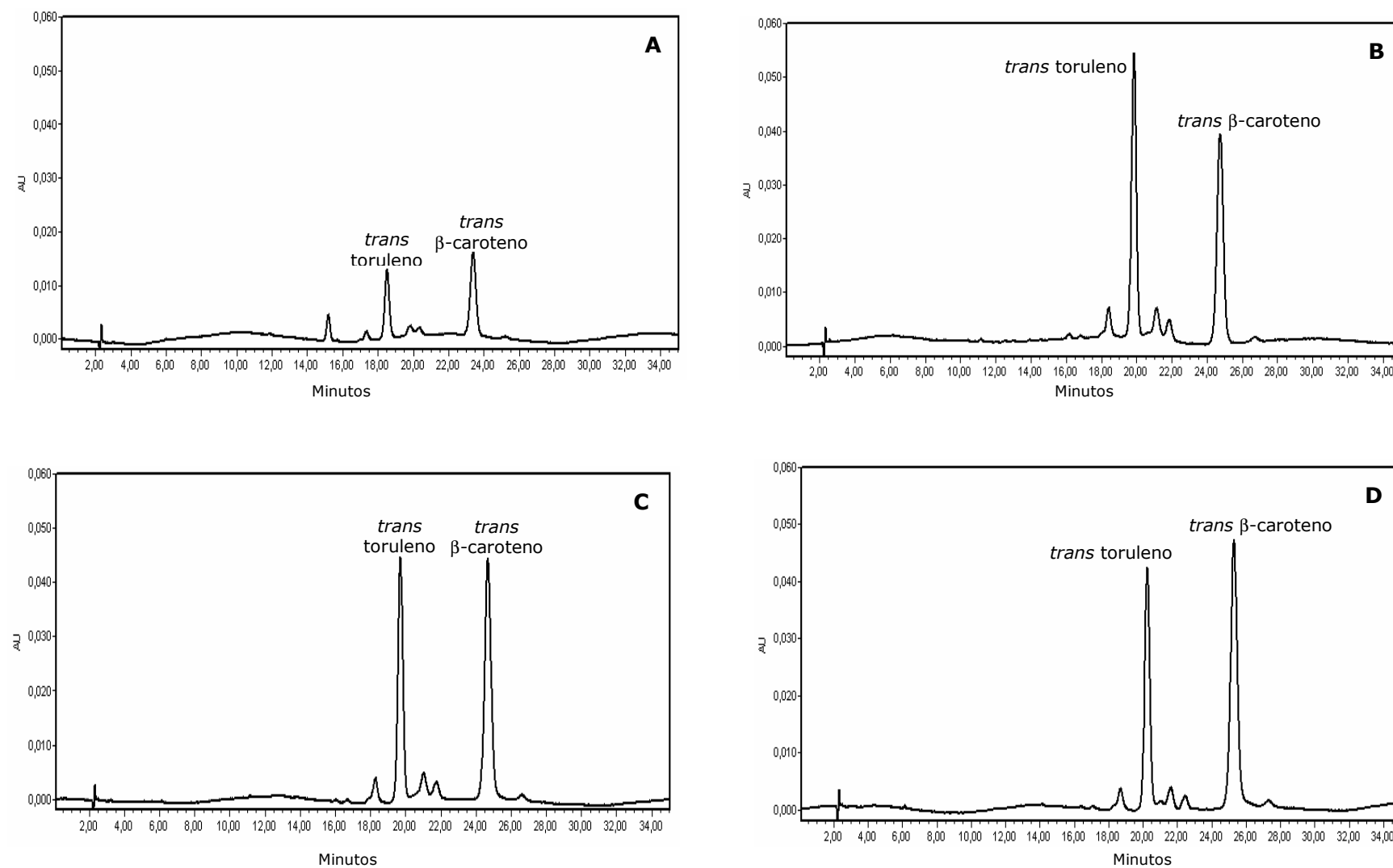
Os perfis cromatográficos dos carotenóides produzidos em diferentes concentrações de ácido mevalônico são demonstrados na Figura 2, ilustrando claramente o efeito marcante do ácido mevalônico quantitativamente. Esta substância estimula a produção de toruleno e β-caroteno em *Rhodotorula glutinis*, e pode ser utilizada na tentativa de desviar o caminho biossintético de carotenóides em leveduras, obtendo toruleno como pigmento majoritário. Este carotenóide é interessante para a comercialização. Tendo 13 duplas ligações conjugadas, tem uma coloração rosa-vermelho, em contraste com o β-caroteno, cuja coloração varia do amarelo ao laranja, dependendo da concentração. Provavelmente por não ser encontrado em alimentos, os possíveis efeitos do toruleno na saúde humana não foram estudados. Estruturalmente, contudo, esse composto preenche o requisito para atividade pró-vitâmica A, com um anel β-ionona sem substituintes e cadeia lateral poliênica de 11 carbonos. Além disso, pelo número de insaturações, é um

potencial antioxidante (Foote et. al., 1970; Terão, 1989; Maldonade et. al., 2008).

A Tabela 2 apresenta a produção de carotenóides na presença de ácido mevalônico. A concentração em µg/L de carotenóides totais aumentou 32% com adição de 0,25% de ácido mevalônico, 94% com adição de 0,5% e 114% com 1,0% do ácido, em relação ao controle. A produção de toruleno foi 83, 132 e 157% maior na presença de 0,25, 0,50 e 1,0% de ácido mevalônico, respectivamente. Para β-caroteno, o rendimento aumentou 25, 106 e 168% na presença de 0,25, 0,50 e 1,0% do ácido, respectivamente.

Calo et al. (1995) investigaram o efeito de 0,5 e 0,1% de ácido mevalônico no meio de cultivo de *Phaffia rhodozyma* e observaram que a produção de carotenóides aumentou 300%, com estímulo principalmente na produção de astaxantina, que aumentou 4 vezes.

Silva (2004) avaliou o efeito de 0,05, 0,1 e 0,2% de ácido mevalônico em linhagens de *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. O conteúdo total de carotenóides, em µg/g de massa celular seca, aumentou 22, 27 e 33% com adição de 0,05, 0,1 e 0,2% de ácido, respectivamente, em cultivo de *Rhodotorula glutinis*. Em *Rhodotorula mucilaginosa*, o aumento observado foi 55, 88 e 119% com adição de 0,05, 0,1 e 0,2% do ácido, respectivamente. O aumento na produção de carotenóides, por *R. glutinis*, nessas concentrações do agente químico foi menor que o obtido com a adição de 0,25%, 0,5% e 1,0% deste no presente estudo, quando a produção aumentou em até 114%. Esses dados demonstram que, de qualquer modo, quanto maior a concentração de ácido mevalônico, maior a produção de carotenóides.



**Figura 2:** Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE, nas condições descritas no texto. (A) cultivo em meio usual YM; (B) cultivo em meio suplementado com 0,25% de ácido mevalônico; (C) cultivo em meio suplementado com 0,50% de ácido mevalônico; (D) cultivo em meio suplementado com 1,0% de ácido mevalônico;

**Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de carotenóides em *Rhodotorula glutinis***

| Tratamento | Toruleno total*       |                       | Toruleno <i>trans</i> * |                       | β-caroteno total*     |                       | β-caroteno <i>trans</i> * |                       | Carotenóides totais*  |                        |
|------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|            | (μg/g MS)             | (μg/L)                | (μg/g MS)               | (μg/L)                | (μg/g MS)             | (μg/L)                | (μg/g MS)                 | (μg/L)                | (μg/g MS)             | (μg/L)                 |
| Controle   | 54 <sup>a</sup> ± 5   | 305 <sup>a</sup> ± 12 | 35 <sup>a</sup> ± 3     | 199 <sup>a</sup> ± 0  | 67 <sup>a</sup> ± 2   | 361 <sup>a</sup> ± 37 | 38 <sup>a</sup> ± 8       | 320 <sup>a</sup> ± 20 | 186 <sup>a</sup> ± 8  | 899 <sup>a</sup> ± 24  |
| 0,25%      | 97 <sup>b</sup> ± 5   | 558 <sup>b</sup> ± 9  | 67 <sup>b</sup> ± 3     | 396 <sup>b</sup> ± 7  | 79 <sup>a</sup> ± 1   | 451 <sup>a</sup> ± 13 | 74 <sup>ab</sup> ± 1      | 421 <sup>a</sup> ± 9  | 216 <sup>a</sup> ± 10 | 1184 <sup>b</sup> ± 32 |
| 0,50%      | 102 <sup>b</sup> ± 9  | 707 <sup>c</sup> ± 7  | 71 <sup>b</sup> ± 7     | 494 <sup>c</sup> ± 6  | 107 <sup>b</sup> ± 6  | 743 <sup>b</sup> ± 19 | 101 <sup>b</sup> ± 6      | 691 <sup>b</sup> ± 6  | 251 <sup>a</sup> ± 21 | 1743 <sup>c</sup> ± 88 |
| 1,0%       | 90 <sup>ab</sup> ± 14 | 785 <sup>c</sup> ± 63 | 66 <sup>b</sup> ± 11    | 560 <sup>c</sup> ± 41 | 118 <sup>c</sup> ± 21 | 967 <sup>c</sup> ± 59 | 110 <sup>b</sup> ± 18     | 912 <sup>c</sup> ± 59 | 267 <sup>a</sup> ± 0  | 1924 <sup>c</sup> ± 50 |

\*Média de análises em triplicata ± desvio padrão

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤0,05)

MS = massa seca

## CONCLUSÃO

A adição de ácido mevalônico ao meio de cultivo normal estimulou a produção de carotenóides totais em até 114%, com aumento significativo na produção específica de toruleno, que aumentou em até 157%.

Apesar do elevado custo do ácido mevalônico, este agente químico pode ser utilizado com sucesso no aumento da produção de carotenóides da levedura *Rhodotorula glutinis*, especialmente de toruleno, em pequenas quantidades.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P.S. (2004).  $\beta$ -carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31, 565-571.
- BRITTON, G. (1989). Carotenoid biosynthesis – an overview. In N.I. KRINSKY; M.M. MATHEUS-ROTH and R.F. TAYLOR (Ed.), *Carotenoids: Chemistry and Biology* (p. 167-184). New York: Plenum Press.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A.; GAETANI, M.; TURCHETTI, B.; PAGNONI, U.M.; DAVOLI, P. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 687-692.
- CALO, P.; MIGUEL, T.; VELÁSQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. (1995). Mevalonic acid increases *trans*-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters*, 17, 575-578.
- CHEN, D.; HAN, Y.; GU, Z. (2006). Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroids*. *Process Biochemistry*, 41, 1773-1778.
- DAVIES, B.H. (1976). Carotenoid. In T.W. GOODWIN (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (p. 38-165). New York: Academic Press.
- DAVIES, B.H.; TAYLOR, R.F. (1976). Carotenoid biosynthesis – the early steps. *Pure Applied Chemistry*, 47, 211-221.
- FERGUSON, J.J.J.; DURR, B.F.; RUDNEY, H. (1959). The biosynthesis of mevalonic acid. *Biochemistry*, 45, 499-504.

- FRENGOVA, G.I.; SIMOVA, E.D., BESHKOVA, D.M. (2003). Carotenoid production by lactoso-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 58, 562-567.
- FOOTE, C.S.; CHANG, Y.C.; DENNY, R.W. (1970). Chemistry of singlet oxygen X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 5216-5218.
- HU, Z.C.; ZENG, Y.G.; WANG, Z., SHEN, Y.C. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 586-590.
- JEON, Y.C.; CHO, W.C.; YUN, Y. (2006). Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalgae *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 490-495.
- KUZINA, V.; CERDA-OLMEDO, E. (2006). Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleanus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4917-4922.
- MALDONADE, I.R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SCAMPARINI, A.R.P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107, 145-150.
- MEYER, P.; DU PREEZ, J.C. (1993). Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants. *Biotechnology Letters*, 15, 919-924.
- MILES, A.A.; MISRA, J. (1938). The estimation of the bactericidal power of blood. *The Journal of Hygiene*, 38, 732-749.

- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- NANOU, K.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. (2007). Role of hydrolytic enzymes and oxidative stress in autolysis and morphology of *Blakeslea trispora* during  $\beta$ -carotene production in submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 447-453.
- NI, H.; CHEN, Q.; RUAN, H.; YANG, Y.; LI, L.; WU, G.; HU, Y.; HE, G. (2007). Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8, 365-370.
- RAJA, R.; HAEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 517-523.
- SILVA, M.C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas (2004).
- SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, G.I.; BESHKOVA, D.M. (2004). Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED 8 co-cultivated with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 115-121.
- SMITH, P.F.; HENRIKSON, C.V. (1964). Comparative biosynthesis of mevalonic acid by *Mycoplasma*. *Journal of Bacteriology*, 89, 146-153.
- SQUINA, F.M.; MERCADANTE, A.Z. (2005). Influence of nicotine and diphenylamine on the carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 638-652.

- TERÃO, J. (1989). Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24, 659-661.
- TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. (2006). Utilization of mustard waste isolated for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 309-314.
- WEBER, R.W.C.; MADHOUR, A.; ANKE, H.; MUCCI, A.; DAVOLI, P. (2005). 2-Hydroxytorularhodin, a new xanthophylls from the red yeast *Sporobolomyces coprosmae*. *Helvetica Chimica Acta*, 88, 2960-2966.
- ZHENG, Y.G.; HU, Z.C.; WANG, Z.; SHEN, Y.C. (2006). Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Food and Bioprocess Processing*, 84, 164-166.

## *Capítulo 3*

*Otimização da produção de carotenóides por  
Rhodotorula glutinis utilizando manipueira*



## RESUMO

Numa tentativa de reduzir os custos de produção, este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de carotenóides pela levedura *Rhodotorula glutinis* em manipueira, um resíduo da indústria de mandioca. Foram empregados um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>4</sup> e Análise de Superfície de Resposta. As variáveis avaliadas foram temperatura, velocidade de agitação, pH e volume de inóculo. As condições ótimas para a produção de carotenóides foram: temperatura de 26°C, 250 rpm de agitação, pH 7,0 e 10% de volume de inóculo. Nestas condições, a concentração de carotenóides aumentou mais que o dobro. Para a produção de biomassa, as condições ótimas foram: 30°C, 260 rpm, pH 6,0 e 10% de volume de inóculo.

**Palavras-chave:** Carotenóides; *Rhodotorula glutinis*; Manipueira.

## ABSTRACT

In an attempt to reduce production cost, this work had the objective of optimizing carotenoid production by the yeast *Rhodotorula glutinis* in cassava wastewater, a sub-product of the cassava industry. A Central Composite Rotatable Design (CCRD)  $2^4$  and Response Surface Analysis were employed. The variables evaluated were temperature, agitation velocity, pH and inoculum volume. The optimum conditions for the production of carotenoids were: 26°C, 250 rpm agitation, pH 7,0 and 10% inoculum volume. Under these conditions, the concentration of carotenoids increased more than twofold. For biomass production, optimal conditions were: 30°C, 260 rpm, pH 6,0 and 10% inoculum volume.

**Key words:** Carotenoids; *Rodhotorula glutinis*, Manipueira.

## INTRODUÇÃO

O interesse em carotenóides aumentou muito na última década porque além de serem pigmentos naturais, são também considerados compostos bioativos, devido à sua capacidade de prevenir doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular (Fraser e Bramley, 2004; Tapiero et. al., 2004; Krinsky e Johnson, 2005; Voutilainen et. al., 2006). Alguns carotenóides possuem atividade pró-vitâmica A, exibida pelos que possuem pelo menos um anel  $\beta$ -ionona não substituído e cadeia poliênica de no mínimo onze carbonos.

Carotenóides microbianos têm sido estudados e seu potencial reconhecido ao longo dos anos (Nelis e Leenheer, 1991). A aplicação comercial é, contudo, limitada. Nos últimos anos houve ressurgimento do interesse em produzir carotenóides biotecnologicamente.

Tradicionalmente, carotenóides têm sido comercializados na forma de pó seco ou extratos a partir de plantas, como urucum, páprica e açafrão. Corantes naturais de fontes vegetais, contudo, estão sujeitos às instabilidades da matéria-prima, que sofre influência de condições climáticas, bem como variação no nível de coloração e qualidade do produto final. O mercado internacional para carotenóides é suprido principalmente por carotenóides sintéticos com estruturas idênticas aos naturais, mas há crescente demanda por fontes naturais (Maldonade et. al., 2008).

A utilização comercial de microrganismos com potencial biotecnológico para produzir carotenóides é atualmente limitada pelo alto custo de produção. Entretanto, esse custo pode ser minimizado pelo uso de sub-produtos

industriais como fonte de nutrientes (Aksu e Eren, 2005; Maldonade et. al., 2008).

Fatores físicos e nutricionais, como natureza e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, presença de íons e sais minerais, pH, temperatura, luz e aeração são importantes fatores que influenciam na produção de biomassa e de carotenóides por microrganismos (Bhosale, 2004).

Há alguns anos pesquisadores vêm estudando a possibilidade de reduzir os custos do cultivo de microrganismos e, conseqüentemente, da produção de carotenóides, através da utilização de meios de baixo custo ou do aproveitamento de resíduos industriais como substrato. Fontana et. al. (1996) avaliaram o crescimento celular e a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* em caldo de cana, rico em fontes de carbono, adicionado de uréia, como fonte de nitrogênio, e fosfato de sódio, regulador do pH. Eles obtiveram como resultado uma melhora significativa na produção de astaxantina (mais de 1300 µg/g de células) e no rendimento de biomassa (mais de 5 g de células/L de meio de cultura).

Buzzini e Martini (1999) investigaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em diferentes materiais crus de origem agro-industrial (mosto de uva, mosto de uva concentrado, xarope de glicose, melaço de beterraba, extrato de farinha de soja e extrato de farinha de milho). O máximo rendimento foi obtido em substrato de mosto de uva concentrado depois de 120 horas de cultura. Nesta condição, a produção foi de 6,5 g de biomassa seca/L de cultura e a produção de carotenóides foi de 5,95 mg/L ou 915,4 µg/g de biomassa seca, sendo 9,2% β-caroteno, 9,3% toruleno e 78,8% torularrodina.

Valduga et. al. (2007) estudaram o pré-tratamento (com carvão ativo e ácidos sulfúrico e fosfórico) de resíduos industriais, como melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e hidrolisado de levedura, na produção de carotenóides pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor*. Uma mistura dos três rejeitos industriais, tratada com os ácidos, forneceu um maior rendimento de carotenóides (541,5 µg/L) que a mesma mistura tratada com carvão ativo (208 µg/L).

O objetivo deste trabalho foi verificar as condições ótimas de produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em manipueira. Esta é um líquido de cor amarelada que sai da mandioca depois da prensagem, durante a fabricação de farinha. Se ela for despejada na natureza, provoca a poluição do solo e das águas, causando grandes prejuízos ao meio ambiente. Porém, este resíduo pode ser aproveitado como fertilizante natural ou substituto de agrotóxicos na lavoura (pesticida), na produção de vinagre e de sabão e, por ser rico em nutrientes, como substrato no cultivo de microrganismos.

A mandioca é uma cultura amplamente difundida em todo o Brasil, com uma produção anual acima de 22 milhões de toneladas, representando o segundo produtor mundial (SEAB). Estima-se que 22,1% da produção nacional de mandioca seja destinada à produção de farinha. Como aproximadamente 30% do peso da mandioca é convertido em manipueira, seriam disponibilizadas mais de 1,5 milhões de toneladas deste resíduo anualmente.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Levedura**

A linhagem de *Rhodotorula glutinis* NCYC 1576, cedida pela Fundação André Tosello, foi utilizada neste estudo. As leveduras foram mantidas sob refrigeração, em tubos de ensaio contendo meio sólido "Yeast Malt" (YM) inclinado, preparado com 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 20 g/L de agar, com repiques mensais.

### **Preparo do inóculo e cultivo das leveduras**

Uma alçada homogênea e bem carregada de células viáveis foi retirada de um tubo de ensaio contendo meio YM inclinado. As células foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio YM líquido, e incubadas em agitador rotatório a 30°C e 200 rpm, por 48 horas, até atingir  $10^8$  UFC/mL. Quantidades variáveis do inóculo foram então transferidas para o meio de produção.

O cultivo das leveduras foi feito em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de substrato manipulada com pH inicial ajustado, sob agitação e temperatura variáveis, por 144 horas. A fim de melhorar a aeração, foram utilizados tampões de espuma de 5 mm de espessura em substituição aos tradicionais tampões de algodão.

Antes da utilização, a manipulada sofreu tratamento térmico por 30 minutos à temperatura de ebulição, para eliminação de cianeto. Após a

centrifugação, o sobrenadante foi removido e esterilizado em autoclave para uso posterior. A composição da manipueira utilizada neste trabalho está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1: Composição físico-química da manipueira**

| <b>Componentes</b> | <b>Concentração</b> |
|--------------------|---------------------|
| Umidade            | 93%                 |
| Carbono orgânico   | 329 g/kg            |
| Açúcares redutores | 37 g/L              |
| Nitrogênio total   | 26 g/kg             |
| Fósforo            | 4 g/kg              |
| Potássio           | 41 g/kg             |
| Cálcio             | 2 g/kg              |
| Magnésio           | 8 g/kg              |
| Enxofre            | 2 g/kg              |
| Ferro              | 46 mg/kg            |
| Zinco              | 13 mg/kg            |
| Manganês           | 20 mg/kg            |
| Cobre              | 7 mg/kg             |
| pH                 | 5,7                 |

(Valores fornecidos pelo CPQBA – Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas)

Pelos valores apresentados, nota-se que esse resíduo é rico em açúcares redutores, nitrogênio e minerais, fornecendo boas condições para o desenvolvimento microbiano.

### **Planejamento experimental**

A otimização da produção de carotenóides pela levedura foi realizada através da metodologia de Superfície de Resposta. Um delineamento estatístico completo  $2^4$ , Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Rodrigues e Iemma, 2005), foi escolhido para investigar os efeitos das variáveis independentes temperatura, agitação, pH e volume de inóculo sobre as variáveis dependentes (respostas) rendimento de biomassa, teor total de carotenóides e teores de toruleno e  $\beta$ -caroteno. Cada variável independente foi testada em três níveis.

### **Obtenção da biomassa**

Após o término do período de fermentação (144 horas), os 200 mL de meio de cultivo foram separados em seis alíquotas de 30 mL. Após centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C, o sobrenadante foi separado e a biomassa úmida foi pesada para as análises de carotenóides e quantificação de biomassa seca. As biomassas de três das seis alíquotas foram transferidas para placas de Petri e levadas à estufa a 105°C, para secagem até peso constante.

## **Análise dos carotenóides**

Os carotenóides foram extraídos das biomassas úmidas provenientes das três alíquotas restantes conforme descrito no Capítulo 2.

A identificação e quantificação dos carotenóides foram também realizadas segundo descrito no capítulo anterior.

## **Análise estatística dos dados**

O tratamento estatístico dos dados de produção de biomassa e de carotenóides como teste para falta de ajuste, determinação de coeficientes de regressão e geração de superfícies de resposta tridimensionais foi realizado através do software Statistica 5.5 (Statsoft, Tulsa, USA). O ajuste do modelo foi feito através da seguinte equação:

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (\text{Eq. 1})$$

onde Y é a variável resposta,  $i$  e  $j$  são valores que variam de 1 ao número de variáveis ( $n$ ),  $a_0$  é o termo de interceptação,  $a_i$  são os valores de coeficiente linear,  $a_{ij}$  são valores de coeficiente quadrático e  $x_i$  e  $x_j$  são os níveis das variáveis independentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização por delineamento experimental

As variáveis independentes (temperatura, agitação, pH e volume de inóculo), seus níveis e valores reais estão apresentados na Tabela 2. O delineamento experimental com os resultados das respostas estudadas é mostrado na Tabela 3.

Para cada resposta foi realizada uma regressão com nível de significância ( $\alpha$ ) de 5 ou 10%. Alguns dos termos não significativos foram excluídos e então fez-se a análise de variância (ANOVA), para verificar a validade dos modelos. Os resultados da ANOVA para cada resposta são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 2: Variáveis e níveis para DCCR**

| Variáveis                              | Níveis das variáveis codificadas |      |     |      |     |
|----------------------------------------|----------------------------------|------|-----|------|-----|
|                                        | -2                               | -1   | 0   | +1   | +2  |
| X <sub>1</sub> (Temperatura (°C))      | 25                               | 27,5 | 30  | 32,5 | 35  |
| X <sub>2</sub> (Agitação (rpm))        | 140                              | 170  | 200 | 230  | 260 |
| X <sub>3</sub> (pH)                    | 4,0                              | 5,0  | 6,0 | 7,0  | 8,0 |
| X <sub>4</sub> (Volume de inóculo (%)) | 5                                | 7,5  | 10  | 12,5 | 15  |

**Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> e respostas obtidas para *Rhodotorula glutinis***

| Ensaio | Variáveis      |                |                |                | Respostas       |                      |         |           |         |             |         |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------------|---------|-----------|---------|-------------|---------|
|        | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | Biomassa úmida* | Carotenóides Totais* |         | Toruleno* |         | β-caroteno* |         |
|        |                |                |                |                | (g/L)           | μg/L                 | μg/g MS | μg/L      | μg/g MS | μg/L        | μg/g MS |
| 1      | -1             | -1             | -1             | -1             | 0               | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 2      | +1             | -1             | -1             | -1             | 9               | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 3      | -1             | +1             | -1             | -1             | 45              | 684                  | 78      | 298       | 34      | 288         | 33      |
| 4      | +1             | +1             | -1             | -1             | 0               | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 5      | -1             | -1             | +1             | -1             | 66              | 823                  | 108     | 11        | 2       | 41          | 5       |
| 6      | +1             | -1             | +1             | -1             | 41              | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 7      | -1             | +1             | +1             | -1             | 67              | 2068                 | 162     | 980       | 77      | 699         | 55      |
| 8      | +1             | +1             | +1             | -1             | 74              | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 9      | -1             | -1             | -1             | +1             | 26              | 581                  | 469     | 14        | 12      | 27          | 22      |
| 10     | +1             | -1             | -1             | +1             | 14              | 118                  | 48      | 52        | 21      | 41          | 17      |
| 11     | -1             | +1             | -1             | +1             | 35              | 452                  | 67      | 116       | 17      | 282         | 42      |
| 12     | +1             | +1             | -1             | +1             | 0               | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 13     | -1             | -1             | +1             | +1             | 55              | 702                  | 102     | 15        | 2       | 35          | 5       |
| 14     | +1             | -1             | +1             | +1             | 55              | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 15     | -1             | +1             | +1             | +1             | 67              | 1479                 | 119     | 773       | 62      | 465         | 37      |
| 16     | +1             | +1             | +1             | +1             | 74              | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 17     | -2             | 0              | 0              | 0              | 73              | 1606                 | 181     | 155       | 17      | 71          | 8       |
| 18     | +2             | 0              | 0              | 0              | 0               | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 19     | 0              | -2             | 0              | 0              | 53              | 305                  | 43      | 9         | 1       | 17          | 2       |
| 20     | 0              | +2             | 0              | 0              | 77              | 1690                 | 150     | 154       | 14      | 139         | 12      |
| 21     | 0              | 0              | -2             | 0              | 0               | 0                    | 0       | 0         | 0       | 0           | 0       |
| 22     | 0              | 0              | +2             | 0              | 68              | 1205                 | 107     | 309       | 27      | 553         | 49      |
| 23     | 0              | 0              | 0              | -2             | 47              | 985                  | 124     | 643       | 81      | 244         | 31      |
| 24     | 0              | 0              | 0              | +2             | 63              | 658                  | 57      | 225       | 20      | 300         | 26      |
| 25     | 0              | 0              | 0              | 0              | 53              | 173                  | 17      | 27        | 3       | 138         | 14      |
| 26     | 0              | 0              | 0              | 0              | 52              | 179                  | 17      | 22        | 2       | 137         | 13      |

\* Média de análises em triplicata

MS = Massa seca

**Tabela 4: ANOVA do modelo quadrático**

| Fontes de Variação                      | SQ        | GL | QM        | F <sub>calculado</sub> | F <sub>tabelado</sub> | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------------|-----------|----|-----------|------------------------|-----------------------|----------------|
| Biomassa**                              |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 15635,5   | 5  | 3127,1    | 18,56                  | 2,14                  | 82%            |
| Resíduos                                | 3537,9    | 21 | 168,5     |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 3495,8    | 19 | 184,0     | 8,72                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 42,1      | 2  | 21,1      |                        |                       |                |
| Total                                   | 19173,5   | 26 | 737,4     |                        |                       |                |
| Carotenóides Totais (µg/g massa seca)** |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 122541,4  | 3  | 40847,1   | 7,16                   | 2,34                  | 48%            |
| Resíduos                                | 131168,8  | 23 | 5703,0    |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 129907,2  | 21 | 6186,1    | 9,81                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 1261,6    | 2  | 630,8     |                        |                       |                |
| Total                                   | 253710,2  | 26 | 9758,1    |                        |                       |                |
| Carotenóides Totais (µg/L de meio)**    |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 7745098,6 | 5  | 1549019,7 | 14,95                  | 2,14                  | 78%            |
| Resíduos                                | 2176046,8 | 21 | 103621,3  |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 1960109,8 | 19 | 103163,7  | 0,96                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 215937,0  | 2  | 107968,5  |                        |                       |                |
| Total                                   | 9921145,4 | 26 | 381582,5  |                        |                       |                |
| Toruleno (µg/g de massa seca)**         |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 10920,1   | 8  | 1365,0    | 7,65                   | 2,04                  | 77%            |
| Resíduos                                | 3211,5    | 18 | 178,4     |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 2964,4    | 16 | 182,3     | 1,48                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 247,2     | 2  | 123,6     |                        |                       |                |
| Total                                   | 14131,6   | 26 | 543,5     |                        |                       |                |
| Toruleno (µg/L de meio)*                |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 1346018,7 | 7  | 192288,4  | 9,51                   | 2,06                  | 78%            |
| Resíduos                                | 383994,9  | 19 | 20210,3   |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 345436,7  | 17 | 20319,8   | 1,05                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 38558,2   | 2  | 19279,1   |                        |                       |                |
| Total                                   | 1730013,6 | 26 | 66539,0   |                        |                       |                |
| β-caroteno (µg/g de massa seca)**       |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 4181,5    | 4  | 1045,4    | 7,07                   | 2,22                  | 56%            |
| Resíduos                                | 3253,6    | 22 | 147,9     |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 3184,9    | 20 | 159,2     | 4,63                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 68,7      | 2  | 34,4      |                        |                       |                |
| Total                                   | 7435,1    | 26 | 286,0     |                        |                       |                |
| β-caroteno (µg/L de meio)*              |           |    |           |                        |                       |                |
| Regressão                               | 593238,9  | 4  | 148309,7  | 9,16                   | 2,82                  | 63%            |
| Resíduos                                | 355994,8  | 22 | 16181,6   |                        |                       |                |
| Falta de ajuste                         | 340581,2  | 20 | 17029,1   | 2,21                   |                       |                |
| Erro Puro                               | 15413,6   | 2  | 7706,8    |                        |                       |                |
| Total                                   | 949233,7  | 26 | 36509,0   |                        |                       |                |

SQ = Soma de Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

F<sub>tabelado</sub> regressão = F (α; GL<sub>regressão</sub>; GL<sub>resíduos</sub>); F<sub>tabelado</sub> falta de ajuste = F (α; GL<sub>falta de ajuste</sub>; GL<sub>erro puro</sub>)

\* α = 5%; \*\* α = 10%

Através dos valores de  $R^2$  e  $F_{calculado}$  e  $F_{tabelado}$  verificou-se a adequação e ajuste do modelo. Valores de  $R^2$  acima de 62% e coerência no F teste permitiram que fossem obtidas superfícies de resposta e equações para as respostas.

### *Biomassa*

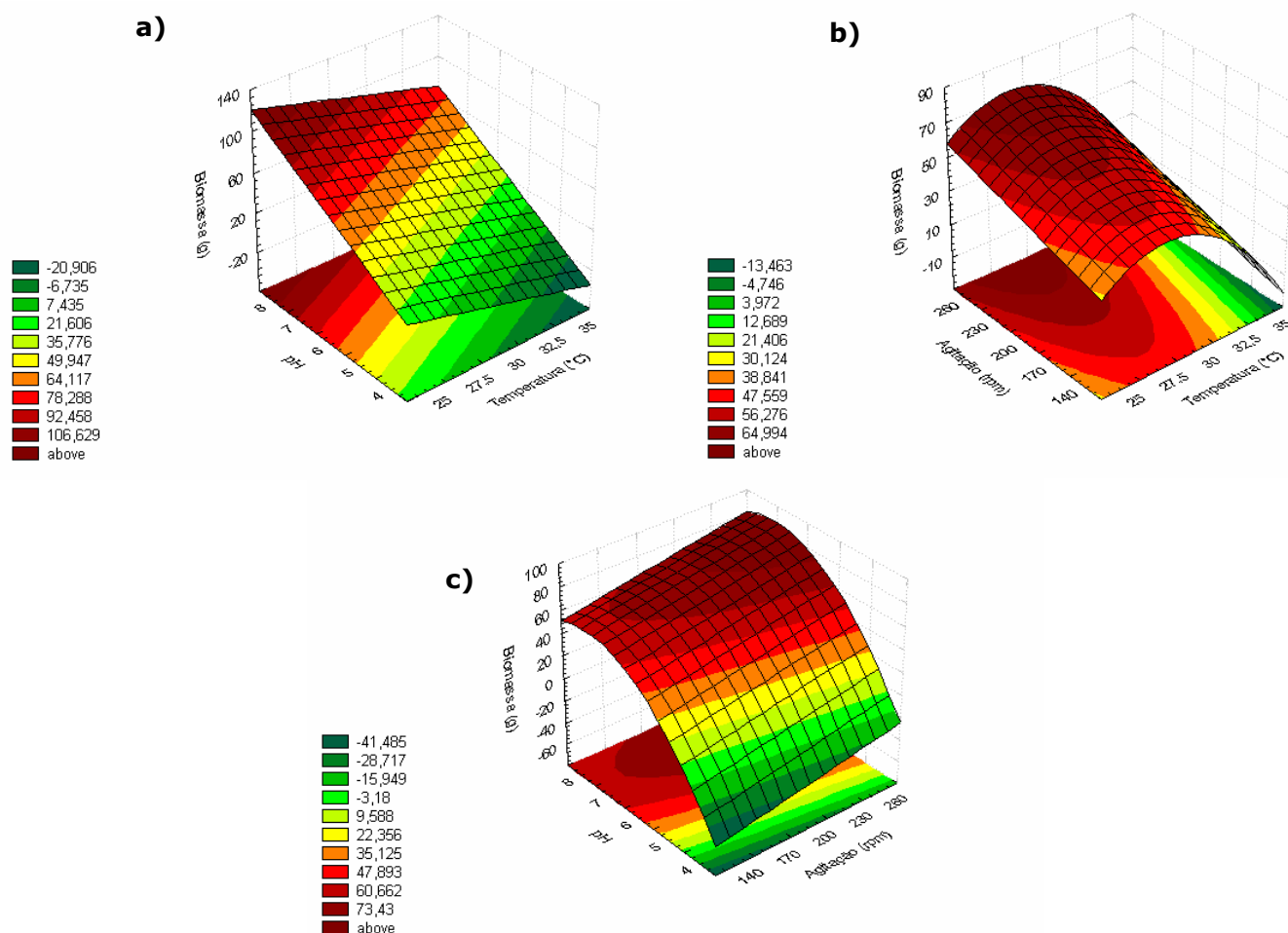
O modelo obtido para essa resposta foi:

$$\text{Biomassa (g)} = 54,6 - 10,1 T - 5,9 T^2 + 6,0 A + 21,1 \text{ pH} - 6,6 \text{ pH}^2$$

lembrando que T é a temperatura (°C) e A é a agitação (rpm).

A variável temperatura mostrou efeito negativo na produção de biomassa, a elevação no valor da mesma provocando diminuição no valor da resposta. A agitação teve efeito positivo na produção de biomassa; conforme o valor da variável aumentava, aumentava também o valor da resposta. O pH teve efeito também positivo na produção de biomassa. O volume de inóculo pareceu não influenciar a produção de biomassa e não houve interação entre as variáveis.

Através das superfícies de resposta (Figura 1), pôde-se observar que a faixa ótima de temperatura ficou entre 25 – 27°C, a de agitação entre 220 – 260 rpm e de pH entre 7,0 – 8,0. O ensaio que mais se aproximou dessas condições foi o 7, com produção de 67 g/L de biomassa.



**Figura 1:** Superfícies de resposta para produção de biomassa. a) Temperatura x pH; b) Temperatura x Agitação; c) Agitação x pH.

### *Carotenóides Totais*

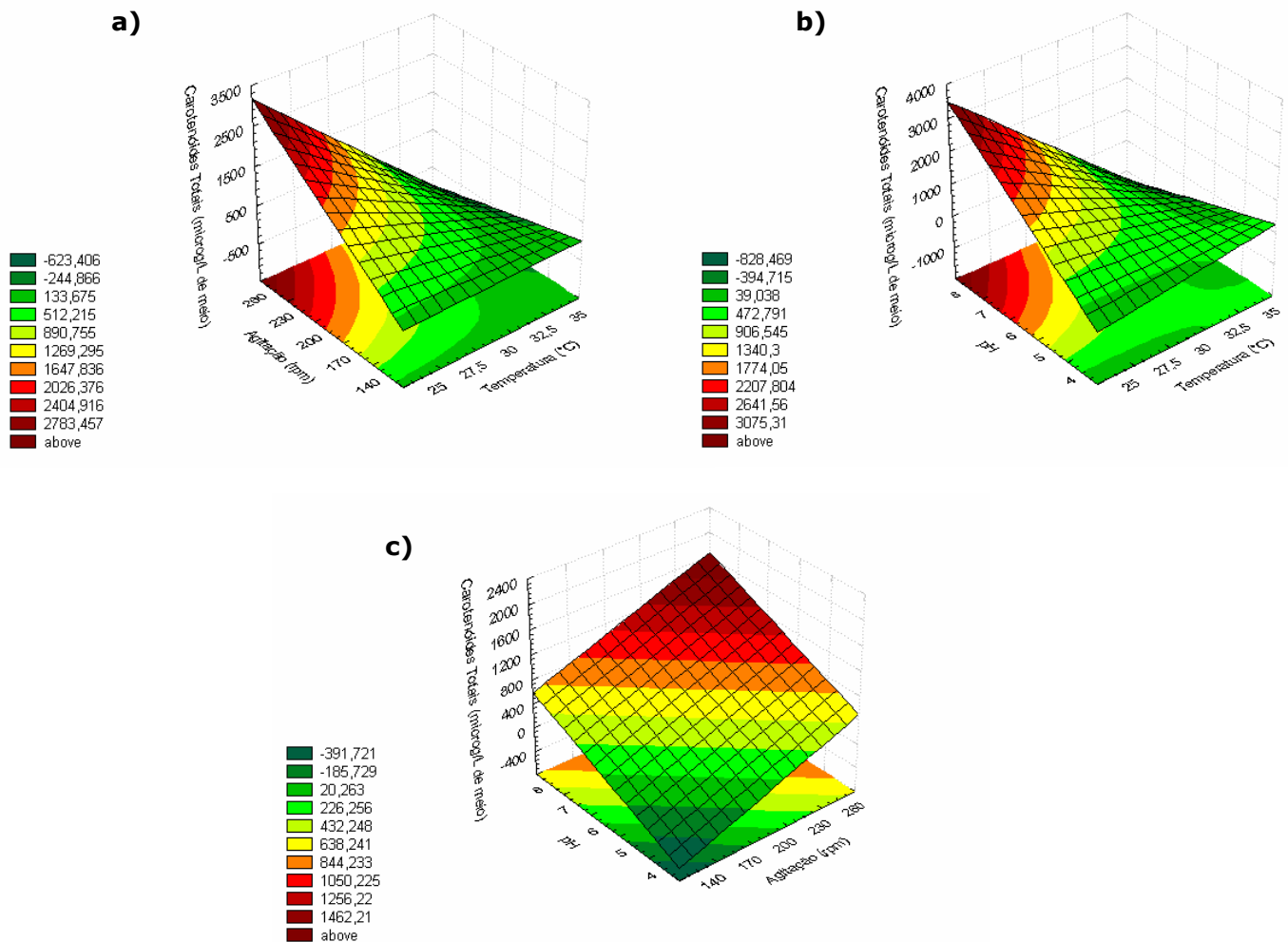
Para a resposta em  $\mu\text{g/g}$  de massa seca não foi possível ajustar uma equação e obter superfície de resposta, pois o valor de  $R^2$  foi muito baixo (48%). Para a resposta em  $\mu\text{g/L}$  de meio de cultivo o modelo obtido foi:

$$\begin{aligned} \text{Carotenóides totais } (\mu\text{g/g de massa seca}) = & 535,2 - 411,8 T + 217,9 A \\ & + 235,3 \text{ pH} - 168,4 T \cdot A - 217,0 T \cdot \text{pH} \end{aligned}$$

A variável temperatura teve efeito negativo na resposta. Acima de  $31^\circ\text{C}$  houve nenhuma ou quase nenhuma produção de carotenóides. A agitação e pH

tiveram efeito positivo. Valores baixos de agitação (<160 rpm) e de pH (<5,5) permitiram muito pouca ou nenhuma produção de carotenóides. O volume de inóculo parece não afetar a resposta. Houve interação entre as variáveis temperatura e agitação e maiores valores de resposta ocorreram com o aumento da agitação simultaneamente à diminuição da temperatura. Também houve interação entre temperatura e pH, sendo que maiores valores da produção de carotenóides ocorreram com aumento de pH concomitantemente à diminuição de temperatura.

Através das superfícies de resposta geradas (Figura 2), pôde-se observar que a faixa ótima de temperatura ocorreu entre 24 – 26°C, a de agitação entre 220 – 260 rpm e a de pH entre 7,0 – 8,0. O ensaio que mais se aproximou dessas condições foi o 7, com produção de 2068 µg/L de carotenóides totais.



**Figura 2:** Superfícies de resposta para produção de Carotenóides Totais (µg/L de meio). a) Temperatura x Agitação; b) Temperatura x pH; c) Agitação x pH.

### *Toruleno*

Para a resposta em µg/g de massa seca o modelo obtido foi:

$$\text{Toruleno } (\mu\text{g/g}) = 6,6 - 9,1 T + 7,4 A + 4,7 \text{ pH} - 5,0 V + 9,8 V^2 \\ - 12,2 T \cdot A - 6,3 T \cdot \text{pH} + 7,3 A \cdot \text{pH}$$

lembrando que V é o volume de inóculo.

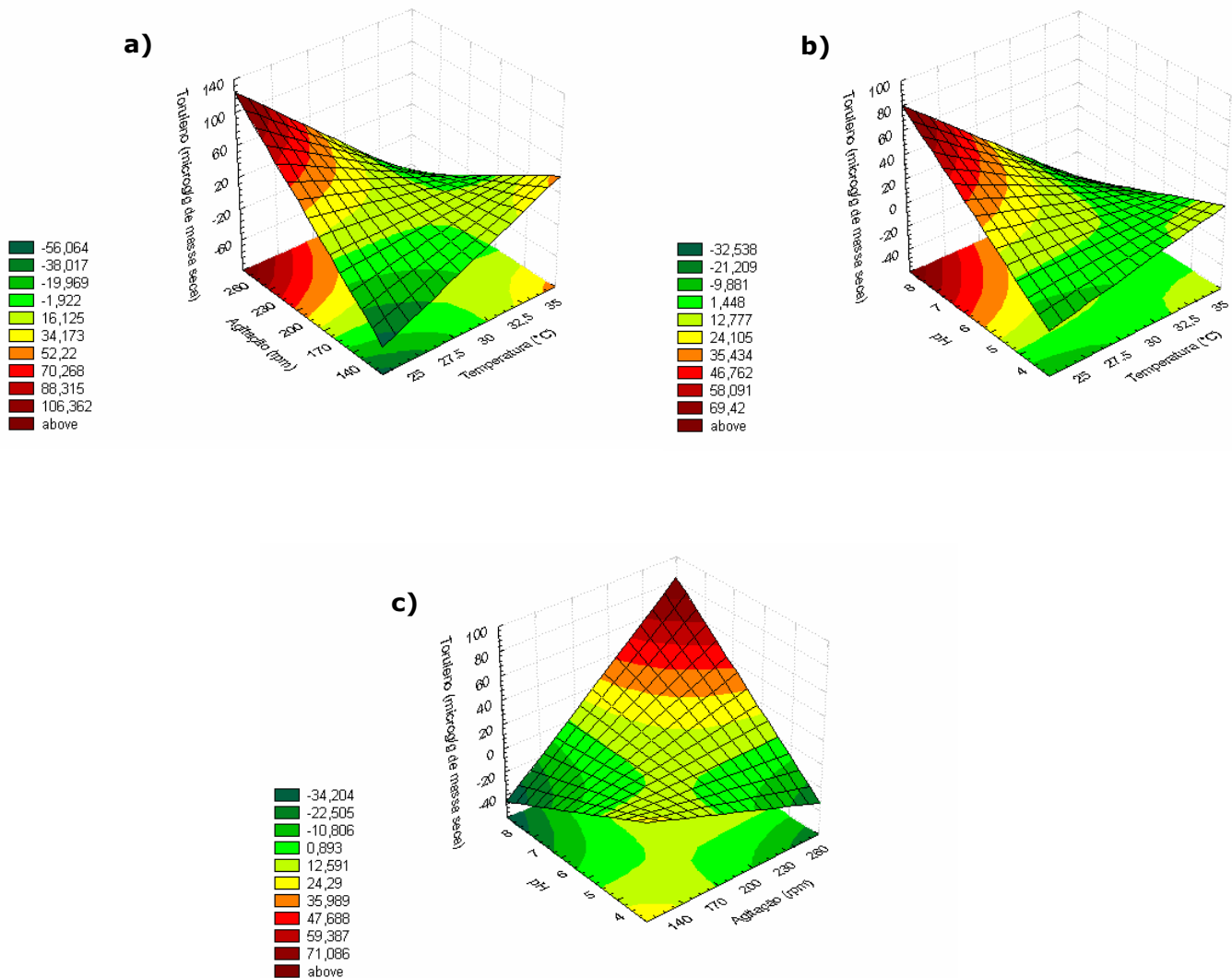
Para a resposta em µg/L de meio de cultivo o modelo obtido foi:

$$\text{Toruleno } (\mu\text{g/L}) = 80,0 - 102,7 T + 98,5 A + 79,9 \text{ pH} + 79,4 V^2$$

$$- 136,1 T \cdot A - 87,7 T \cdot \text{pH} + 82,6 A \cdot \text{pH}$$

A exemplo de carotenóides totais, a variável temperatura teve efeito negativo na produção de toruleno, enquanto que a agitação, o pH e o volume de inóculo tiveram efeito positivo. Acima de 31°C houve nenhuma ou quase nenhuma produção de toruleno. Valores baixos de agitação (<160 rpm) e de pH (<5,5) praticamente não permitiram a produção do pigmento. Houve interação entre as variáveis temperatura e agitação e maiores valores de resposta ocorreram com o aumento da agitação concomitantemente à diminuição da temperatura. A interação temperatura x pH promoveu aumento na produção de carotenóides com aumento de pH simultaneamente à diminuição de temperatura. Já a interação agitação x pH promoveu aumento na produção de toruleno com os aumentos simultâneos das duas variáveis.

Através das superfícies de respostas obtidas (Figura 3) pôde-se observar que a faixa ótima de temperatura ocorreu entre 24 – 27°C, a de agitação entre 240 – 260 rpm, a de pH entre 7,08 – 8,0 e a de volume de inóculo entre 10 – 15%. O ensaio que mais se aproxima dessa faixa é o 7, com produção de toruleno de 980 µg/L de meio.



**Figura 3:** Superfícies de resposta para produção de Toruleno. a) Temperatura x Agitação; b) Temperatura x pH; c) Agitação x pH.

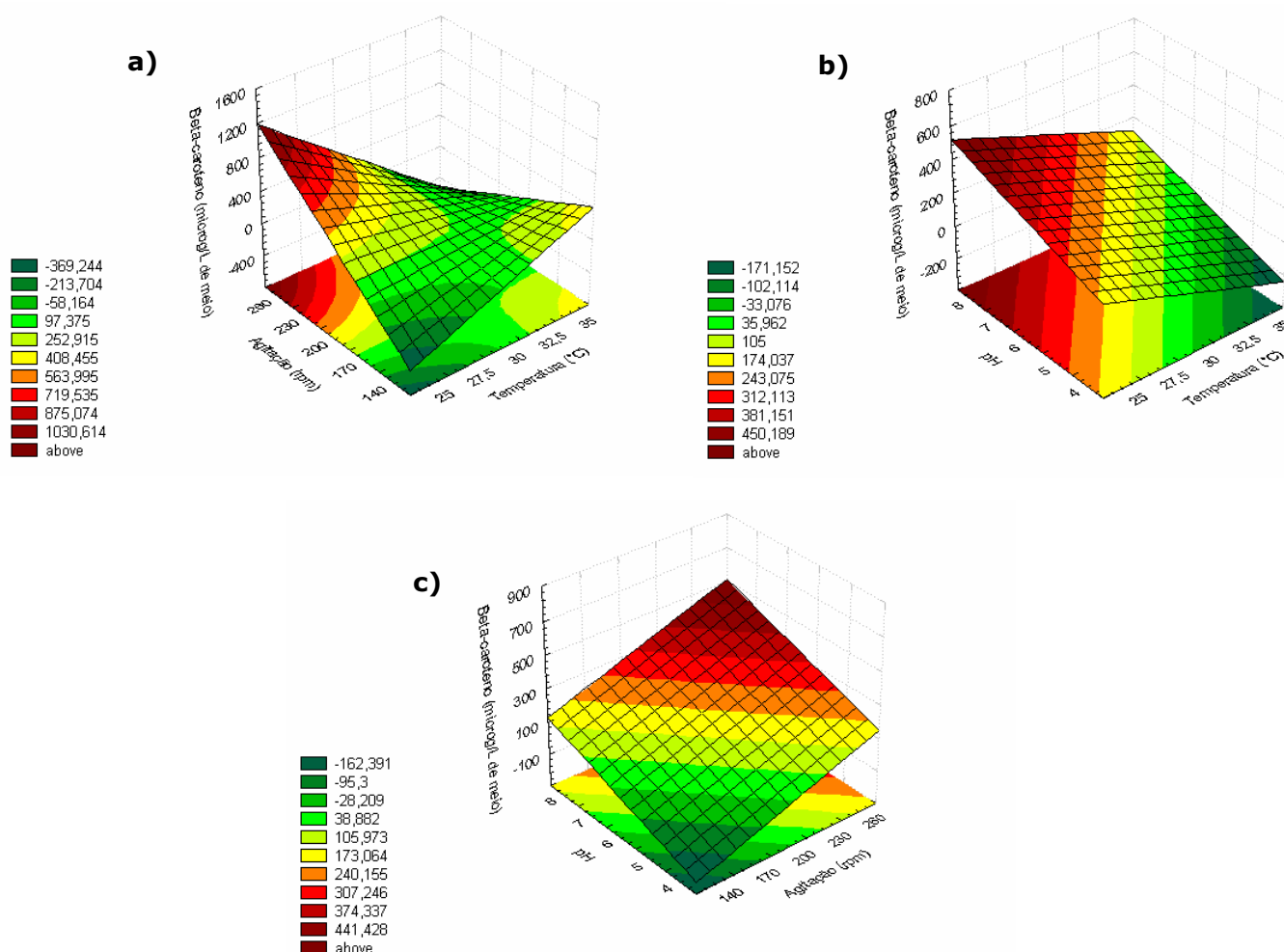
### *$\beta$ -caroteno*

Para a resposta em  $\mu\text{g/g}$  de massa seca, não foi possível ajustar uma equação e obter superfície de resposta, pois o valor de  $R^2$  foi muito baixo (56%). Para a resposta em  $\mu\text{g/L}$  de meio de cultivo o modelo obtido foi:

$$\beta\text{-caroteno } (\mu\text{g/L}) = 139,5 - 80,6 T + 76,5 A + 71,1 \text{ pH} - 104,6 T \cdot A$$

Notou-se que em temperaturas superiores a 31°C houve muito pouca ou quase nenhuma produção de  $\beta$ -caroteno. A agitação abaixo de 160 rpm e pH abaixo de 5,5 permitiram pouca ou nenhuma produção do carotenóide e o volume de inóculo pareceu não afetar a resposta. Houve interação entre as variáveis temperatura e agitação e a produção de  $\beta$ -caroteno aumentou com o aumento da agitação simultaneamente à diminuição da temperatura.

Através das superfícies de resposta geradas (Figura 4), foi possível observar que a faixa ótima de temperatura foi entre 24 – 27 °C, a de agitação entre 230 – 260 rpm e a de pH entre 7,0 – 8,0. O ensaio mais próximo dessas condições foi o 7, com produção de 699  $\mu\text{g/L}$  de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 4:** Superfícies de resposta para produção de  $\beta$ -caroteno. a) Temperatura x Agitação; b) Temperatura x pH; c) Agitação x pH.

Avaliando-se o conjunto de respostas, notou-se que as faixas ótimas das variáveis são muito próximas. Então, para a posterior produção de carotenóides utilizando manipueira como substrato, adotou-se como condição ótima a temperatura de 26°C, 250 rpm de agitação, pH 7,0 e 10% de volume de inóculo. O ensaio que mais se aproximou dessas condições foi o 7, que utilizou temperatura de 25°C, 230 rpm de agitação, pH 7,0 e 7,5% de volume de inóculo. A produção de carotenóides totais foi 2068 µg/L, a de toruleno foi 980 µg/L e a de β-caroteno foi 699 µg/L. A produção em meio YM, sem a otimização (temperatura de 30°C, 200 rpm de agitação, pH 6,0 e 10% de volume de inóculo), forneceu 899 µg/L de carotenóides totais, 350 µg/L de toruleno e 361 µg/L de β-caroteno. Isso significa que após a otimização, mesmo utilizando como substrato um resíduo industrial, a produção de carotenóides totais foi 2,3 vezes maior, a de toruleno 2,8 vezes maior e a de β-caroteno 1,9 vez maior.

O crescimento de *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis* em meio suplementado com caldo de cana e adicionado de extrato de levedura e peptona foi avaliado por Squina et. al. (2002). Eles notaram que, de maneira geral, uma maior produção de carotenóides era acompanhada de um menor crescimento celular. A máxima produtividade foi obtida com 2,88 g/L de açúcar no caldo de cana, 10 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona. Nesta condição, a produção de carotenóides totais foi de 426,6 µg/g de massa seca ou 4,4 mg/L de meio para *Rhodotorula rubra* e 197,2 µg/g de massa seca ou 6,7 mg/L de meio para *Rhodotorula glutinis*, sendo aproximadamente três vezes maior que a produção no presente estudo. Apesar do maior rendimento, deve-se ressaltar que o custo de produção nas condições utilizadas por estes

autores, com o uso de extrato de levedura e peptona, além de caldo de cana, é maior que com o uso de apenas manipueira, uma vez que peptona e extrato de levedura são adquiridos comercialmente a R\$ 650,00/Kg e R\$ 400,00/Kg, respectivamente.

Tinoi et. al. (2005) também estudaram a produção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis*, utilizando como substrato farinha de resíduo de feijão verde hidrolisado, oriundo da produção de macarrão, como principal fonte de nitrogênio e extrato de batata doce como principal fonte de carbono. A condição ótima para produção de carotenóides foi encontrada com 23,63 g/L de farinha, 51,76 g/L de extrato de batata doce, pH 5,91, temperatura de 30,3°C, velocidade de agitação de 258 rpm e tempo de incubação de 94,78 horas. Nesta condição, o conteúdo de carotenóides totais foi 3,48 mg/L de meio de cultivo, cerca de 70% mais elevado que neste trabalho. Apesar da produção ser maior, a farinha de feijão verde hidrolisado não é comumente encontrada no Brasil.

Aksu e Eren (2005) avaliaram os efeitos do pH, temperatura, taxa de aeração, concentração de açúcar e concentração de sulfato de amônia, independentemente, na produção de carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa*. O pH e temperatura ótimos para a produção de carotenóides foram determinados como 7,0 e 30°C, respectivamente. A concentração de carotenóides totais foi significativamente aumentada com o aumento da taxa de aeração para mais de 2,4 vvm. Uma concentração inicial de sulfato de amônia de 2 g/L promoveu a produção máxima de carotenóides. Glicose, melão de sacarose e lactose de soro de leite foram escolhidos como fonte de carbono e, de maneira geral, um aumento na concentração de açúcar

promoveu aumento da produção de carotenóides totais. A maior concentração de carotenóides (89 mg de carotenóides totais/litro de caldo fermentado) foi obtida quando 20 g/L de melaço de sacarose foram utilizados como fonte de carbono. O fato do melaço de sacarose fornecer mais açúcar para a levedura pode explicar a produção de carotenóides totais 4 vezes maior que no presente estudo. Porém, o melaço de sacarose é um produto comercial já destinado em grande escala à produção industrial, ao contrário de manipueira, cuja utilização industrial é ainda irrisória, e seu uso implica em custos maiores que o uso da manipueira, considerando que são utilizadas toneladas na produção industrial.

## CONCLUSÃO

A manipueira mostrou-se um bom substrato para o crescimento da levedura *Rhodotorula glutinis*. Das sete respostas, cinco forneceram equações ajustadas e superfícies de resposta. As condições ótimas obtidas através do planejamento experimental foram: temperatura de 26°C, 250 rpm de agitação, pH 7,0 e 10% de volume de inóculo. Sob essas condições, a produção de carotenóides (2068 µg/L) se mostrou mais que o dobro quando comparada ao tradicional meio YM (899 µg/L).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z.; EREN, T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40, 2985-2991.
- BHOSALE, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 351-361.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. (1999). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw material of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, 71, 41-44.
- FONTANA, J.D.; GUIMARÃES, M.F.; MARTINS, N.T.; FONTANA, C.A.; BARON, M. (1996). Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58, 413-422.
- FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43, 1-38.
- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- MALDONADE, I.R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SCAMPARINI, A.R.P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107, 145-150.
- NELIS, H.J.; DE LEENHER, A.P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. A Review. *Journal of Applied Bacteriology*, 60, 181-190.

- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. (2005). Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão Editora, Campinas.
- SEAB – Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. Acesso pelo site <http://www.seab.pr.gov.br> em 18/07/2011.
- SQUINA, F.M.; YAMASHITA, F.; PEREIRA, J.L.; MERCADANTE, A.Z. (2002). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnology*, 16, 227-235.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 58, 100-110.
- TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40, 2551-2557.
- VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; JACQUES, R.A.; JÚNIOR, A.F. (2007). Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. *Química Nova*, 30, 1860-1866.
- VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1265-1271.



## *Capítulo 4*

*Cinética de degradação de toruleno, licopeno  
e beta-caroteno em sistemas modelos*



## RESUMO

Por serem moléculas altamente insaturadas, carotenóides são bastante susceptíveis à degradação. Este trabalho avaliou a estabilidade de três carotenóides,  $\beta$ -caroteno, toruleno e licopeno, em sistemas modelos de baixa umidade, compostos de celulose microcristalina, à temperatura ambiente, na presença ou ausência de luz. Licopeno foi o carotenóide que mais sofreu degradação, tanto na presença quanto na ausência de luz. Sob exposição à luz, a constante de velocidade de reação do licopeno foi três vezes maior que a do  $\beta$ -caroteno e dez vezes maior que a do toruleno. No escuro, foi 14,5 vezes maior que a do  $\beta$ -caroteno e 30 vezes maior que a do toruleno.

**Palavras-chave:** Toruleno; Sistemas modelos; Cinética de degradação.

## **ABSTRACT**

Because they are highly unsaturated, carotenoids are very susceptible to degradation. This study evaluated the stability of three carotenoids,  $\beta$ -carotene, lycopene and torulene, in low moisture model systems, composed of microcrystalline cellulose, at room temperature in the presence or absence of light. Lycopene was the carotenoid that suffered greater degradation, both in the presence or absence of light. With light exposure, the reaction rate constant of lycopene was three times greater than that of  $\beta$ -carotene and ten times higher than that of torulene. In the dark, it was 14,5 times greater than that of  $\beta$ -carotene and 30 times higher than that of torulene.

**Key words:** Torulene; Model systems; Degradation kinetics.

## INTRODUÇÃO

Somado a sua capacidade corante, carotenóides têm grande importância do ponto de vista nutricional, já que alguns possuem atividade pró-vitáminica A. Em adição a essas importantes funções, há evidências de que eles podem proteger humanos de doenças graves como doenças de pele, doenças cardiovasculares, várias formas de câncer, degeneração macular e catarata (Olson, 1999; Moeller et. al., 2000; Handelman, 2001; Krinsky, 2001; Meléndez-Martínez et. al., 2004; Gerth et. al., 2004; Tapiero et. al., 2004; Krinsky & Johnson, 2005; Voutilainen et. al., 2006; Nishino et. al., 2009).

Por outro lado, devido à presença de uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, os carotenóides são muito susceptíveis à degradação oxidativa. Os principais fatores que influenciam a oxidação desses pigmentos são temperatura, luz e oxigênio (Rodriguez-Amaya, 1999). Dada a complexidade das matrizes carotenogênicas, a percepção do mecanismo e dos fatores que influenciam na degradação de carotenóides tem sido conseguida mais facilmente em sistemas modelos (Rodriguez-Amaya, 1993).

Padula (1999) acompanhou a cinética de degradação de  $\beta$ -caroteno, na presença e ausência de luz, e a formação de compostos de degradação não-voláteis em sistema modelo de baixa umidade, composto por celulose microcristalina (CMC). O trabalho foi conduzido à temperatura de 30°C para simular a estocagem de alimentos desidratados. Na ausência de luz foi observada cinética de primeira ordem, com constante  $K = 0,13 \text{ mg de } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , enquanto que na presença de luz a cinética de ordem zero foi a que melhor se adequou, com valores de  $K = -0,31$  e  $-0,16 \text{ mg de } \beta\text{-}$

caroteno.g<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Os produtos não-voláteis formados foram epoxicarotenóides, apocarotenóides, hidroxicarotenóides e isômeros *cis* de β-caroteno.

Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008) avaliaram licopeno e β-caroteno em sistema modelo composto de celulose microcristalina, na luz e no escuro, e obtiveram resultados similares. Em 10 dias, 77% do licopeno foi degradado no escuro e 95% na luz, e em 20 dias 74% do β-caroteno foi degradado no escuro e 92% na luz. Os modelos cinéticos obtidos por eles foram de primeira ordem e os parâmetros cinéticos encontrados foram, no escuro: constante de velocidade de reação (μg/dia) de 0,146 e 0,068 e tempo de meia-vida 4,8 e 10 dias, para licopeno e β-caroteno, respectivamente; e na luz: constante de velocidade de reação (μg/dia) de 0,295 e 0,128 e tempo de meia-vida 2,4 e 5,4 dias, para licopeno e β-caroteno, respectivamente. Na ausência de luz, a constante de velocidade de reação foi aproximadamente duas vezes maior para licopeno que para β-caroteno, e na presença de luz foi 2,3 vezes maior.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética de degradação de toruleno, licopeno e β-caroteno, em sistemas modelos de baixa umidade, na presença e ausência de luz.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Levedura, condições de cultivo e obtenção de biomassa**

A levedura (NCYC 1576) utilizada, as condições de cultivo e a obtenção de biomassa foram as mesmas descritas no Capítulo 2.

### **Obtenção dos carotenóides**

Licopeno e  $\beta$ -caroteno foram isolados a partir dos carotenóides extraídos de melancia e cenoura, respectivamente. O toruleno foi isolado através da separação dos carotenóides extraídos da levedura por cromatografia em coluna aberta de óxido de magnésio e hyflosupercel, na proporção 1:1, como fase estacionária, e éter de petróleo e acetona em diferentes proporções como fase móvel (Rodriguez-Amaya, 1999). A extração dos carotenóides de levedura, melancia e cenoura foi realizada conforme descrito no Capítulo 2. A pureza dos carotenóides licopeno e  $\beta$ -caroteno ficou acima de 95%, e para toruleno cerca de 90%.

### **Montagem do sistema modelo**

Utilizou-se como suporte sólido do sistema modelo de baixa umidade celulose microcristalina (CMC), da marca Synth (Labsynth, São Paulo, Brasil). Esta foi previamente seca em estufa a 75°C por 24 horas.

Cada carotenóide isolado foi dissolvido em cloreto de metileno e misturado com CMC em béquer encapado com papel alumínio e homogeneizado com baqueta de vidro. Quando visualmente a homogeneização

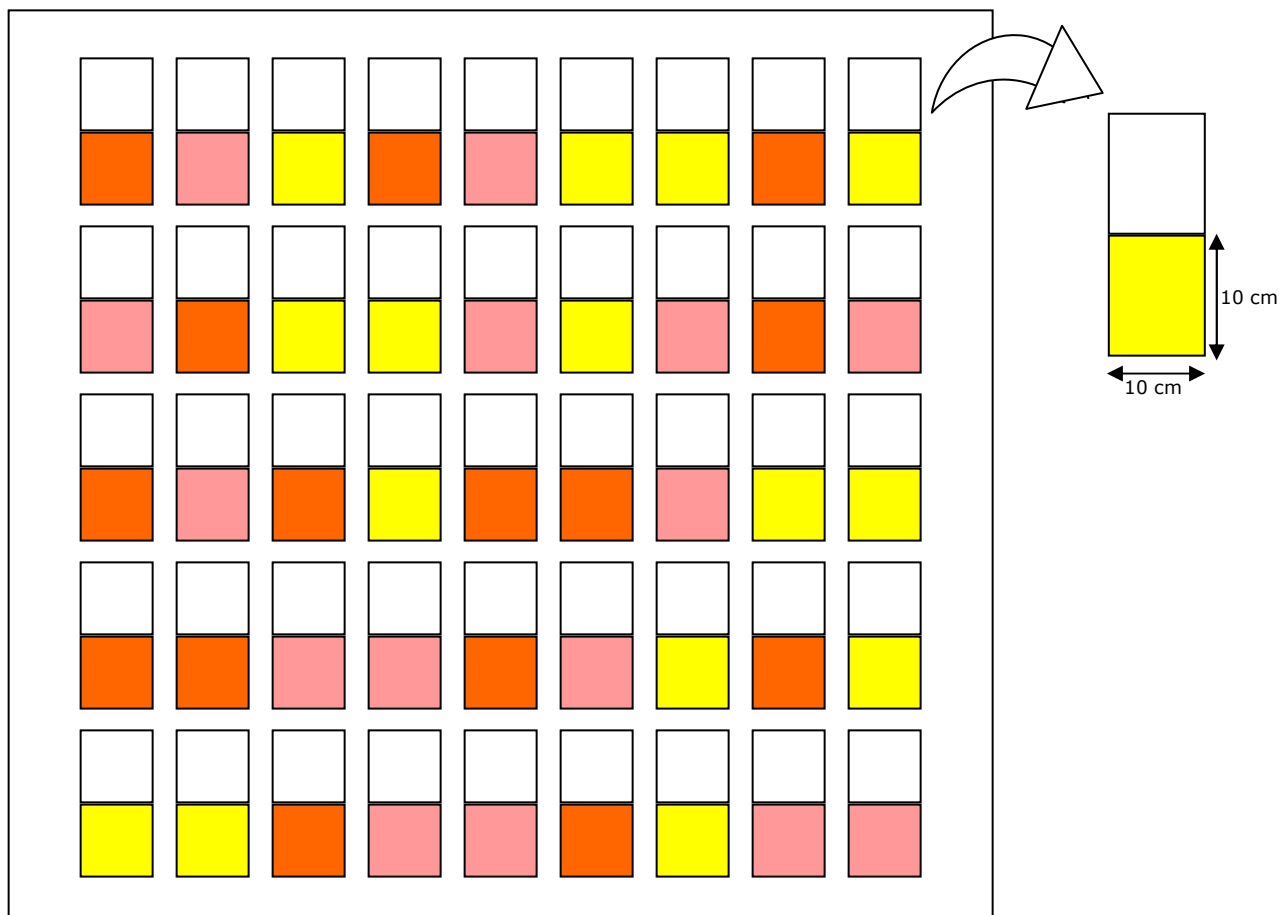
parecia completa, a mistura foi levada ao dessecador sob vácuo por duas a três horas para evaporação do solvente.

Os sistemas modelos foram então acondicionados em saquinhos de polietileno transparente, em quantidade aproximada de 4 g, com aproximadamente 40 a 50 µg do pigmento. Os saquinhos foram selados em seladora térmica, permitindo que a matriz se espalhasse numa área de 100 cm<sup>2</sup>. A disposição dos saquinhos foi feita aleatoriamente numa superfície de mármore de 95 x 204 cm (Figura 1). O ambiente foi iluminado com sete lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (branca) de 110 W e uma de 32 W, suspensas a uma altura de 170 cm da superfície dos saquinhos. A intensidade luminosa foi medida com luxímetro marca Testo modelo 545 (Testo AG, Lenzkirch, Alemanha). A umidade relativa do ar durante o experimento, de acordo com o CEPAGRI/UNICAMP, foi registrada. A temperatura também foi monitorada. Para avaliação da degradação na ausência de luz, os saquinhos dispostos na superfície de mármore foram protegidos da luminosidade por uma capa de polietileno preta e opaca revestida de papel alumínio.

A espessura do filme de polietileno transparente dos saquinhos foi determinada por meio de micrômetro de ponta plana da marca Starret (L. S. Starrett Company, Massachussets, EUA), modelo nº 732, com resolução de 0,01 mm. A taxa de permeabilidade ao oxigênio deste filme foi determinada em equipamento Oxtran (Mocon Company, Minneapolis, EUA), modelo 2/20, pelo método coulométrico, segundo procedimento descrito nas normas da American Society for Testing and Materials (1997).

A percentagem de transmissão de luz especular no filme de polietileno foi determinada em espectrofotômetro UV-visível de duplo feixe, marca Perkin

Elmer (Perkin Elmer, Massachussets, EUA), modelo Lambda, na faixa de 300 a 800 nm.



**Figura 1:** Esquema da disposição dos saquinhos contendo carotenóide impregnado em celulose microcristalina: Amarelo =  $\beta$ -caroteno; Laranja = licopeno e Rosa = toruleno

### Quantificação dos carotenóides

O período experimental durou 15 dias, com análises de cada carotenóide, na presença ou ausência de luz, de três em três dias, retirando-se 3 saquinhos para cada análise.

Os carotenóides foram extraídos dos sistemas modelos por acetona seguida por filtragem em funil de placa sinterizada, de porosidade G2, estas

operações sendo repetidas até que a celulose microcristalina ficasse incolor. Os carotenóides foram transferidos da acetona para éter de petróleo por partição em funil de separação, com adição de água destilada para separação das fases. A lavagem com água foi repetida 4–5 vezes para a remoção da acetona. O extrato etéreo foi seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotativo quando necessário (Rodriguez-Amaya, 1999).

Para a quantificação dos carotenóides, o extrato foi transferido para um balão volumétrico, o volume foi completado com éter de petróleo e fez-se a leitura em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Coulter, Maryland, EUA) no comprimento de onda correspondente a cada carotenóide. A concentração foi calculada de acordo com a fórmula fornecida por Davies (1976).

### **Análise dos resultados**

As porcentagens de carotenóides remanescentes foram analisadas por regressão linear, a qual permitiu definir o modelo matemático mais adequado à cinética de reação destes pigmentos. Com a definição da ordem de reação ( $n$ ) foram calculados as constantes de velocidade de reação ( $k$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos carotenóides, em cada tratamento experimental, segundo equação apresentada por Labuza (1982).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O filme de polietileno apresentou uma taxa de permeabilidade ao oxigênio de  $5740 \pm 130 \text{ cm}^3.\text{m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ , transmissão de luz de  $85 \pm 3\%$  e espessura de  $38 \pm 1 \text{ }\mu\text{m}$ . A alta taxa de permeabilidade do filme ao oxigênio demonstra a sua grande disponibilidade para a degradação dos carotenóides no sistema modelo.

A intensidade luminosa incidida sobre os sistemas modelos foi obtida pela média de um total de 108 aferições, sendo  $281 \pm 20 \text{ lux}$ . Deste total, aproximadamente 239 lux poderiam ter atingido os sistemas, uma vez que a transmissão de luz através do filme plástico foi 85%. A temperatura ambiente manteve-se entre 23 e 28°C, com uma média de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , e a umidade relativa do ar ficou entre 20 e 86%, com uma média de  $39 \pm 27^\circ\text{C}$ . A grande variação de umidade relativa deve-se ao fato de intercalarem-se dias secos com dias de chuva durante o período do experimento.

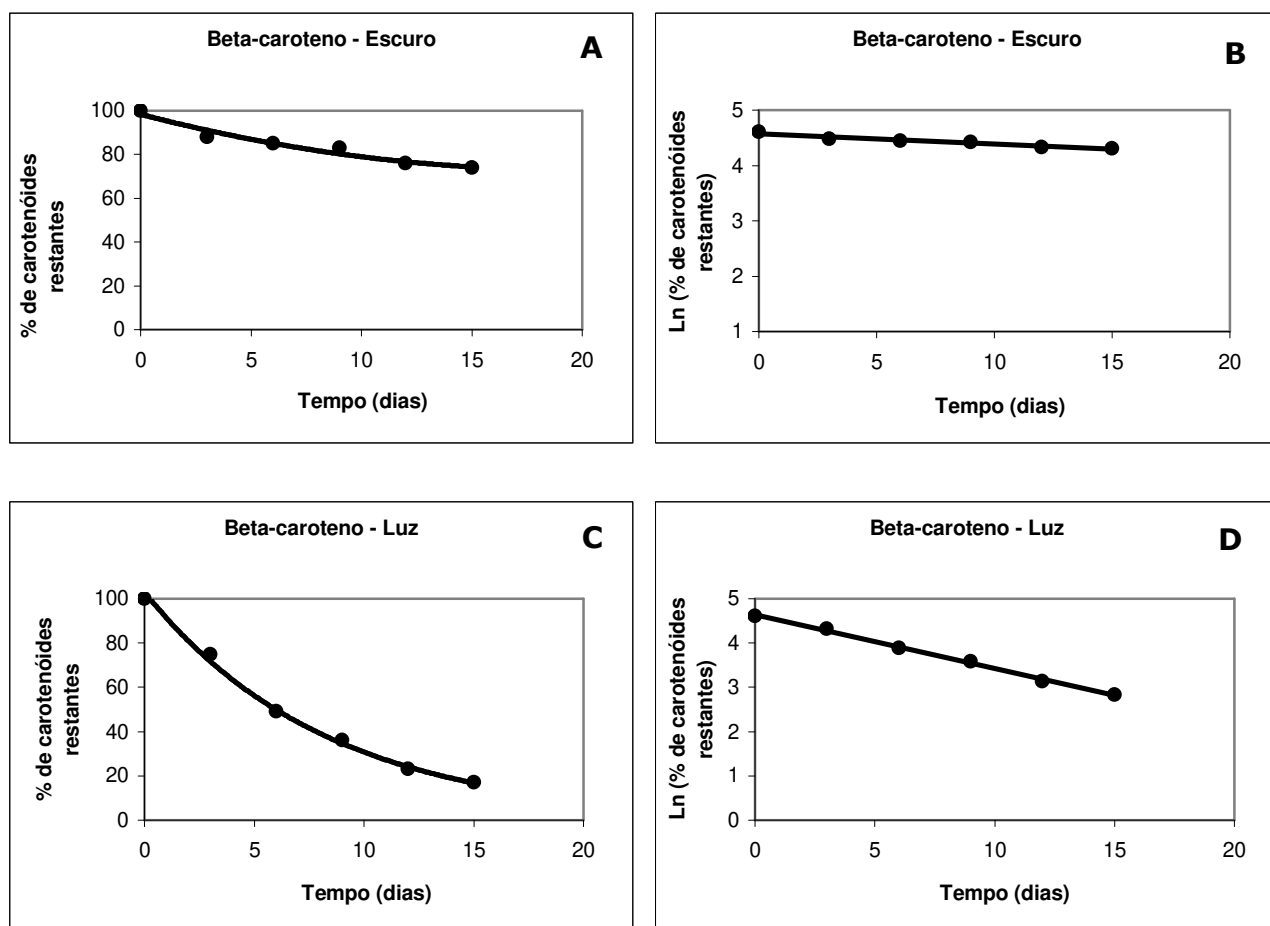
A Tabela 1 apresenta as concentrações dos carotenóides ao longo do período experimental e as porcentagens de perdas de carotenóides.

**Tabela 1: Concentrações e porcentagens de perda de carotenóides durante estocagem em sistemas modelos de baixa umidade**

| <b>Carotenóide/<br/>Tratamento</b> | <b>Tempo (dias)</b> | <b>Concentração<br/>(<math>\mu\text{g}</math>)*</b> | <b>% de perda do<br/>carotenóide</b> |
|------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b><math>\beta</math>-caroteno</b> |                     |                                                     |                                      |
| Escuro                             | 0                   | 58,8 $\pm$ 0,1                                      | 0                                    |
|                                    | 3                   | 51,8 $\pm$ 1,3                                      | 12                                   |
|                                    | 6                   | 50,1 $\pm$ 1,0                                      | 15                                   |
|                                    | 9                   | 48,7 $\pm$ 0,6                                      | 17                                   |
|                                    | 12                  | 44,5 $\pm$ 1,4                                      | 24                                   |
|                                    | 15                  | 43,7 $\pm$ 0,7                                      | <b>26</b>                            |
| Luz                                | 0                   | 58,9 $\pm$ 0,1                                      | 0                                    |
|                                    | 3                   | 44,3 $\pm$ 0,8                                      | 25                                   |
|                                    | 6                   | 28,8 $\pm$ 0,2                                      | 51                                   |
|                                    | 9                   | 21,5 $\pm$ 1,8                                      | 64                                   |
|                                    | 12                  | 13,4 $\pm$ 0,8                                      | 77                                   |
|                                    | 15                  | 9,9 $\pm$ 4,7                                       | <b>83</b>                            |
| <b>Toruleno</b>                    |                     |                                                     |                                      |
| Escuro                             | 0                   | 28,9 $\pm$ 0,2                                      | 0                                    |
|                                    | 3                   | 28,6 $\pm$ 0,2                                      | 1                                    |
|                                    | 6                   | 27,6 $\pm$ 0,1                                      | 5                                    |
|                                    | 9                   | 27,5 $\pm$ 0,2                                      | 5                                    |
|                                    | 12                  | 26,3 $\pm$ 0,2                                      | 9                                    |
|                                    | 15                  | 25,2 $\pm$ 1,4                                      | <b>13</b>                            |
| Luz                                | 0                   | 28,9 $\pm$ 0,2                                      | 0                                    |
|                                    | 3                   | 24,2 $\pm$ 3,4                                      | 16                                   |
|                                    | 6                   | 22,9 $\pm$ 0,2                                      | 20                                   |
|                                    | 9                   | 20,5 $\pm$ 0,6                                      | 29                                   |
|                                    | 12                  | 18,4 $\pm$ 0,8                                      | 36                                   |
|                                    | 15                  | 16,5 $\pm$ 0,3                                      | <b>43</b>                            |
| <b>Licopeno</b>                    |                     |                                                     |                                      |
| Escuro                             | 0                   | 45,3 $\pm$ 0,4                                      | 0                                    |
|                                    | 3                   | 11,6 $\pm$ 0,1                                      | 74                                   |
|                                    | 6                   | 8,7 $\pm$ 0,2                                       | 81                                   |
|                                    | 9                   | 7,8 $\pm$ 0,3                                       | 83                                   |
|                                    | 12                  | 7,5 $\pm$ 0,0                                       | 84                                   |
|                                    | 15                  | 6,9 $\pm$ 0,3                                       | <b>85</b>                            |
| Luz                                | 0                   | 45,3 $\pm$ 0,4                                      | 0                                    |
|                                    | 3                   | 9,3 $\pm$ 0,8                                       | 80                                   |
|                                    | 6                   | 5,1 $\pm$ 0,4                                       | 89                                   |
|                                    | 9                   | 4,2 $\pm$ 0,6                                       | 90                                   |
|                                    | 12                  | 3,1 $\pm$ 0,2                                       | 93                                   |
|                                    | 15                  | 2,9 $\pm$ 0,5                                       | <b>94</b>                            |

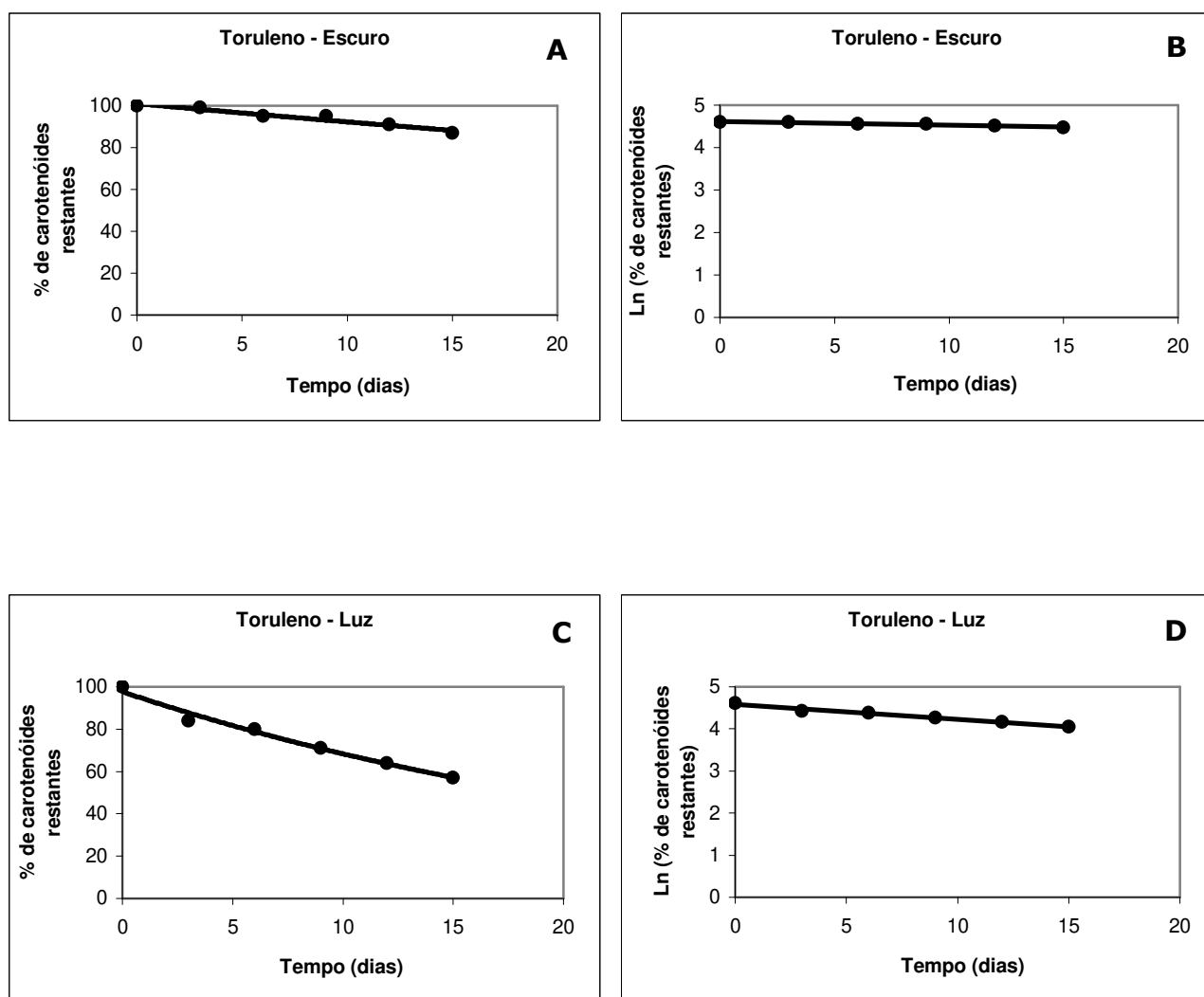
\*Médias de análises em triplicata

A Figura 2 mostra os gráficos das porcentagens de  $\beta$ -caroteno restantes, na presença ou ausência de luz, e seus logaritmos neperianos em função do tempo de estocagem. Na presença de luz, a degradação desse carotenóide atingiu 50% e foi possível definir um modelo de cinética de reação de primeira ordem. Na ausência de luz, a degradação não alcançou 50%. Segundo Labuza (1982), não é possível definir claramente a ordem cinética quando a extensão de degradação é inferior a 50%. No entanto, para ser coerente com os outros resultados deste trabalho e com a ordem demonstrada por  $\beta$ -caroteno e licopeno em trabalhos anteriores (Ferreira e Rodriguez-Amaya, 2008), a primeira ordem foi escolhida para o sistema modelo de  $\beta$ -caroteno no escuro.



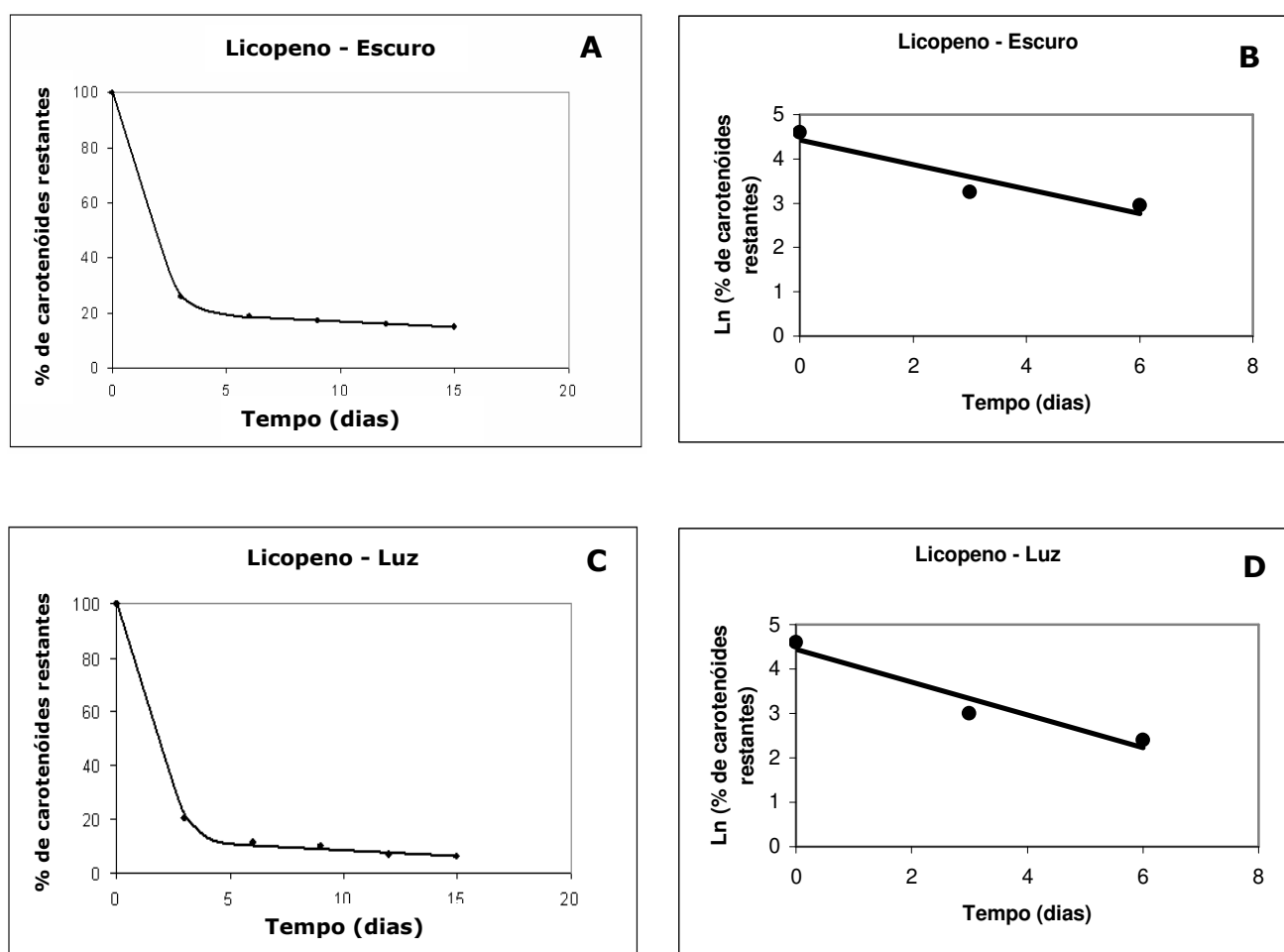
**Figura 2:** Progressão da degradação de  $\beta$ -caroteno em sistema modelo de celulose microcristalina mantido no escuro (A e B) e na luz (C e D).

A Figura 3 ilustra os gráficos das porcentagens de toruleno remanescente, na presença ou ausência de luz, e seus logaritmos neperianos em função do tempo de estocagem. Em nenhum dos dois casos toruleno atingiu degradação de 50%. Com as mesmas razões apresentadas para  $\beta$ -caroteno, a primeira ordem foi escolhida para este carotenóide.



**Figura 3:** Progressão da degradação de toruleno em sistema modelo de celulose microcristalina mantido no escuro (A e B) e na luz (C e D).

A Figura 4 ilustra os gráficos das porcentagens de licopeno remanescente, na presença ou ausência de luz, e seus logaritmos neperianos em função do tempo de estocagem. Os gráficos 4A e 4C são típicos de cinética de reação de primeira ordem. Como mais de 80% do licopeno foi degradado nos 6 primeiros dias e a concentração manteve-se em valores muito próximos nos dias seguintes, os gráficos de logaritmos neperianos em função do tempo de estocagem foram feitos apenas até o 6º dia, para obtenção de uma constante de velocidade de reação mais adequada.



**Figura 4:** Progressão da degradação de licopeno em sistema modelo de celulose microcristalina mantido no escuro (A e B) e na luz (C e D).

A Tabela 2 apresenta os valores das constantes de velocidade de reação, tempos de meia-vida e coeficientes de correlação para os carotenóides no escuro e sob exposição à luz.

**Tabela 2: Parâmetros cinéticos da degradação de carotenóides em sistema modelo de celulose microcristalina, mantidos na luz e no escuro.**

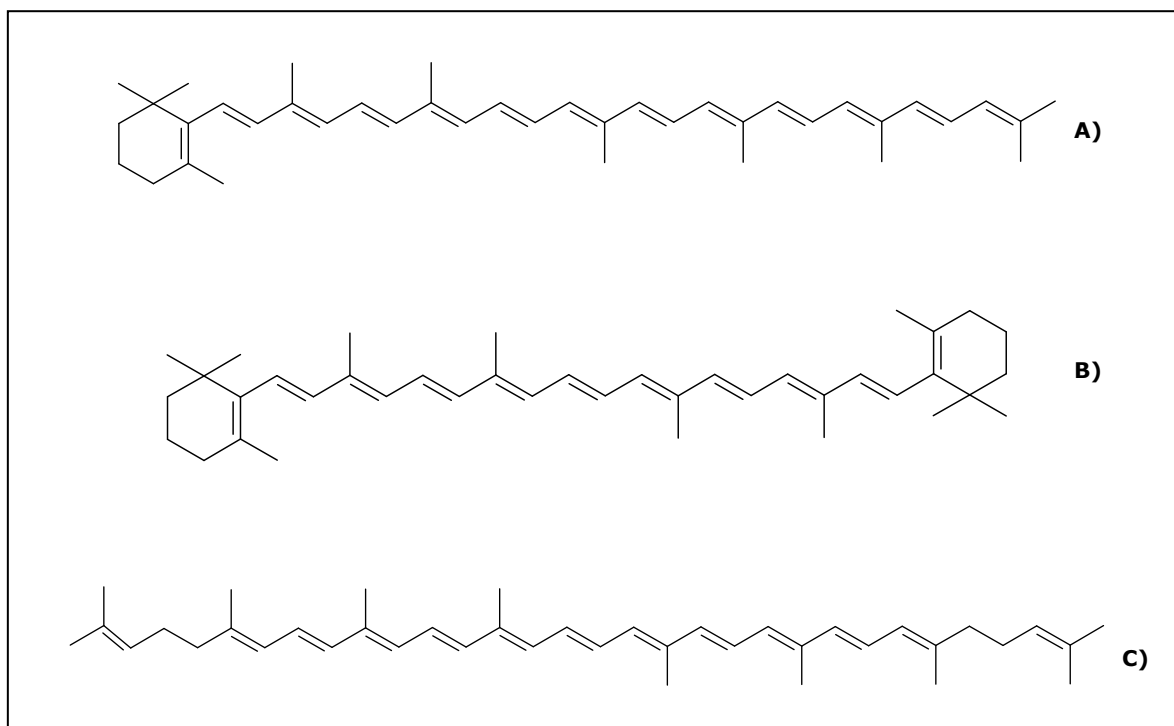
| <b>Carotenóide</b> | <b>Tratamento</b> | <b>K (<math>\mu\text{g. dia}^{-1}</math>)</b> | <b><math>t_{1/2}</math> (dias)</b> | <b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b> |
|--------------------|-------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| $\beta$ -caroteno  | Escuro            | 0,019                                         | 36,5                               | 0,94                                                |
|                    | Luz               | 0,121                                         | 5,7                                | 0,99                                                |
| Toruleno           | Escuro            | 0,009                                         | 77,0                               | 0,94                                                |
|                    | Luz               | 0,036                                         | 19,3                               | 0,99                                                |
| Licopeno           | Escuro            | 0,277                                         | 2,5                                | 0,89                                                |
|                    | Luz               | 0,368                                         | 1,9                                | 0,94                                                |

Pelas porcentagens de perdas de carotenóides (Tabela 1), constantes de velocidade de reação e tempos de meia-vida (Tabela 2), o licopeno foi o carotenóide que mais degradou na presença e ausência de luz, tanto que até o sexto dia mais de 80% do pigmento já havia sido degradado. A segunda maior degradação aconteceu com o  $\beta$ -caroteno, tanto na ausência como na presença de luz. O toruleno foi o carotenóide que se mostrou mais estável, nas duas condições.

Na presença de luz, a constante de degradação do licopeno foi três vezes maior que a do  $\beta$ -caroteno e dez vezes maior que a do toruleno. No

escuro, foi 14,5 vezes maior que a do  $\beta$ -caroteno e 30 vezes maior que a do toruleno.

A maior estabilidade de  $\beta$ -caroteno em relação ao licopeno é facilmente explicada estruturalmente. Embora ambos tenham 11 duplas ligações conjugadas, o licopeno é acíclico enquanto que duas duplas ligações conjugadas do  $\beta$ -caroteno estão em anéis (Figura 5), dificultando o deslocamento dos seus elétrons junto com os das duplas na cadeia.



**Figura 5:** Estrutura dos carotenóides A) Toruleno; B)  $\beta$ -caroteno e C) Licopeno.

Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008) avaliaram licopeno e  $\beta$ -caroteno em sistemas modelos aquoso e de baixa umidade composto de celulose microcristalina, na luz e no escuro. Os dois carotenóides seguiram modelo cinético de reação de primeira ordem em todos os sistemas modelos. O licopeno degradou muito mais rapidamente que o  $\beta$ -caroteno. No sistema

modelo de baixa umidade, a taxa de degradação do licopeno foi 2,3 vezes maior que a do  $\beta$ -caroteno sob iluminação. Já no escuro, foi 2,1 vezes maior. No sistema modelo aquoso, licopeno degradou 7,5 vezes mais rapidamente que  $\beta$ -caroteno na luz e 4 vezes mais rapidamente no escuro. Estas diferenças são menores que as observadas nesse trabalho.

A estabilidade marcante do toruleno, especialmente em comparação com licopeno e  $\beta$ -caroteno, não pode ser explicada estruturalmente. Toruleno tem 13 duplas ligações conjugadas, 12 na cadeia, o que deveria proporcionar maior susceptibilidade à degradação do que licopeno e  $\beta$ -caroteno.

Pode ser alegado que o resultado inesperado é devido ao erro experimental. Para licopeno e  $\beta$ -caroteno, porém, os resultados do presente trabalho são contundentes com os de Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008). Além disso, os estudos de degradação foram conduzidos simultaneamente, portanto em condições iguais para os três carotenóides e com procedimentos experimentais e analíticos também equivalentes. Visualmente, chamou atenção a perda rápida de cor do licopeno e a manutenção de cor do toruleno.

Maiores investigações devem ser realizadas para explicar a surpreendente estabilidade de toruleno extraído de levedura. Como  $\beta$ -caroteno e licopeno foram extraídos de fontes vegetais e toruleno de levedura, uma possibilidade é que alguma substância estabilizante foi co-extraída com o toruleno.

## CONCLUSÃO

Como pode ser explicado estruturalmente, o licopeno, que é acíclico, foi mais susceptível à degradação que o dicíclico  $\beta$ -caroteno, ambos tendo 11 duplas ligações conjugadas. A grande estabilidade do toruleno, que possui 12 duplas ligações na cadeia e uma em anel, não pode ser explicada estruturalmente. Maiores estudos devem ser realizados para justificar tal estabilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. (1997) Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometer sensor. ASTM D3985-95, section 15, v. 1509, 532-537. Philadelphia: ASTM.
- DAVIES, B.H. Carotenoid. (1976). In T.W. GOODWIN (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (p. 38-165). New York: Academic Press.
- FERREIRA, J.E.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2008). Degradation of lycopene and  $\beta$ -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. *Journal of Food Science*, 78, C589-C594.
- GERTH, C.; MORRISSEY, B.M.; CROSS, C.E.; WERNER, J.S. (2004). Lutein zeaxanthin, macular pigment, and visual function in adult cystic fibrosis patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1045-1052.
- HANDELMAN, G.J. (2001). The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Journal of Nutrition*, 17, 818-822.
- KRINSKY, N.I. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17, 815-817.
- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- LABUZA, T.P. (1982). *Shelf life dating of foods*. Massachusetts: Westport: Food & Nutrition Press Inc.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 149-154.

- MOELLER, S.M.; JACQUES, P.F.; BLUMBERG, J.B. (2000). The potencial role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 522-527.
- NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. (2009). Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483, 165-168.
- OLSON, J.A. (1999). Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49, 7-11.
- PADULA, M. Degradação de  $\beta$ -caroteno e cantaxantina em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não-voláteis e voláteis. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas (1999).
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1993). *Stability of carotenoids during the storage of foods. Chemical, biological, physical and nutritional aspects*(pg. 591-628). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1999). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, D. C.: International Life Sciences Institute Press.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 58, 100-110.
- VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1265-1271.



## *Capítulo 5*

*Estudo de compostos voláteis provenientes  
da degradação de toruleno*



## RESUMO

O toruleno é um carotenóide que apresenta grande potencial para ser utilizado em alimentos, mas está sujeito à degradação, característica do grupo. Assim, conhecer seu mecanismo de degradação e formação de compostos voláteis e não-voláteis torna-se necessário. O objetivo deste estudo foi investigar a formação de compostos de degradação voláteis de toruleno. Esse processo promoveu a formação de diversos compostos. Entre os majoritários, destacou-se a formação de metacroleína, prenatal, 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno, 6-metil-hept-5-en-2-ona, 2-etil-hexanol, 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno, 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno e  $\beta$ -ionona, além de ionona, embora em pequena proporção. A partir das estruturas moleculares destes compostos foi possível sugerir um possível esquema de clivagem oxidativa do toruleno, apesar do mecanismo não poder ser ainda completamente elucidado.

**Palavras-chave:** Carotenóides; Compostos voláteis; Degradação oxidativa; Mecanismo de degradação.

## ABSTRACT

Torulene is a carotenoid that has great potencial for use in foods, but is subject to degradation, characteristic of the group. Thus, knowing its mechanism of degradation and the formation of volatile and nonvolatile compounds becomes necessary. The aim of this study was to investigate the formation of volatile compounds from the degradation of torulene. This process promoted the formation of many compounds. Among the major compounds, the formation of methacrolein, prenal, 2,6-dimethyl-hept-2,4-diene, 6-methyl-hept-5-en-2-one, 2-ethyl-hexanol, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl-cyclohexene, 3,3-dimethyl-cyclohexilidene acetaldehyde and  $\beta$ -ionone was prominent. From the molecular structures of these compounds, a possible scheme of oxidative cleavage of torulene can be suggested, although the mechanism is far from being completely elucidated.

**Key words:** Carotenoids; Volatile compounds; Oxidative degradation; Degradation mechanisms.

## INTRODUÇÃO

Devido à presença de uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, os carotenóides são muito susceptíveis à degradação. Tanto a isomerização como a oxidação ocorrem, mas esta última é a principal causa da perda de carotenóides.

Ao contrário da oxidação lipídica, para a qual há informações detalhadas das diferentes reações que constituem o processo, seus produtos de decomposição voláteis e não-voláteis e seus mecanismos de reação, a oxidação de carotenóides ainda não está bem elucidada. O conhecimento das reações e mecanismos subjacentes da degradação oxidativa dos carotenóides é necessário, não apenas para evitar perdas destes compostos durante o processamento e estocagem de alimentos, mas também para avaliar as implicações na saúde humana (Rodriguez e Rodriguez-Amaya, 2007).

King et. al. (1997) e Aust et. al. (2003) sugeriram que produtos da degradação de carotenóides estimulam a comunicação célula-célula via *gap junctions*, que parece ser um dos processos relacionados à prevenção de câncer. Contudo, produtos da clivagem do  $\beta$ -caroteno são muito reativos, podendo participar de reações de oxidação de lipídios e até mesmo promover autooxidação (Young e Lowe, 2001). Produtos de sua degradação oxidativa contribuem com o efeito carcinogênico e dificultam a fosforilação oxidativa (Siems et. al., 2002), podendo, então, ser potencialmente tóxicos (Sommerburg et. al., 2003).

Alguns compostos de aromas são derivados da degradação dos carotenóides. Esses produtos voláteis são desejáveis em alguns casos, por

fazerem parte do aroma característico de vinhos (Mendes-Pinto, 2009; Ferreira et. al., 2008), madeira de carvalho (Nonier et. al., 2004), chá preto (Ravichandran, 2002), páprica (Cremer e Eicher, 2000; Rios et. al., 2007), tomate e melancia (Lewinsohn et. al., 2005). Em alguns casos são indesejáveis, formando odor estranho como no caso de cenoura desidratada (Falconer et. al., 1964) e alguns tipos específicos de vinho (Rapp e Marais, 1993).

Rodriguez e Rodriguez-Amaya (2007) investigaram a degradação oxidativa de  $\beta$ -caroteno em sistemas modelos aquoso e de baixa umidade, em temperatura ambiente, sob ausência ou exposição à luz, em comparação com epoxidação com ácido m-cloroperbenzóico (MCPBA) e clivagem oxidativa com  $\text{KMnO}_4$ . A presença de produtos de oxidação também foi verificada em produtos processados. A oxidação de  $\beta$ -caroteno produziu  $\beta$ -apo-15-carotenal,  $\beta$ -apo-14'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal e  $\beta$ -apo-10'-carotenal, que foram encontrados no sistema modelo de baixa umidade, na presença e ausência de luz, e no sistema modelo aquoso exposto à luz.  $\beta$ -apo-8'-carotenal e semi- $\beta$ -carotenona apareceram no sistema modelo aquoso mas não foram detectados no sistema modelo de baixa umidade.  $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido e  $\beta$ -caroteno-5,8-epóxido foram detectados em ambos os sistemas modelos.  $\beta$ -caroteno-5,6,5',8'-diepóxido e  $\beta$ -caroteno-5,8,5',8'-diepóxido foram encontrados apenas no sistema modelo de baixa umidade mantido no escuro. Alguns destes compostos foram encontrados também em suco de manga, suco de acerola e damasco seco, e os produtos da oxidação comuns aos três alimentos foram *trans*- $\beta$ -caroteno-5,8-epóxido, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno. A não detecção de um composto, porém, não significa que este não foi formado;

após formação, sua transformação rápida pode impedir o acúmulo de quantidades significativas para permitir a sua detecção.

Rodriguez e Rodriguez-Amaya (2009) investigaram também a degradação oxidativa de licopeno nas mesmas condições que  $\beta$ -caroteno, apenas sob exposição à luz. A presença de produtos de oxidação foi verificada também em suco de tomate, massa de tomate, extrato de tomate, suco de goiaba e goiabada. Apo-12'-licopenal, 2,6-ciclicopeno-1,5-diol, 13-*cis*-licopeno e 9-*cis*-licopeno foram encontrados nos sistemas modelos aquoso e de baixa umidade e em todos os produtos processados. Licopeno-1,2-epóxido, 2,6-ciclicopeno-1,5-epóxido e *cis*-2,6-ciclicopeno-1,5-epóxido foram encontrados nos dois sistemas modelos e em todos os alimentos processados, exceto em goiabada. Apo-8'-licopenal esteve presente nos dois sistemas modelos e em suco de tomate, massa de tomate e extrato de tomate. Já apo-6'-licopenal foi encontrado nos dois sistemas e em suco de tomate, extrato de tomate e goiabada.

O objetivo deste estudo foi investigar a degradação oxidativa de toruleno, em sistema modelo de baixa umidade, caracterizando os compostos voláteis formados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do toruleno**

Toruleno foi produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis*, linhagem NCYC1576, em manipueira, a 26°C e 250 rpm, por 144 horas. Os carotenóides da biomassa foram extraídos conforme descrito no Capítulo 2 e isolados por cromatografia em coluna aberta (CCA) conforme descrito no Capítulo 4. O toruleno em solução etérea foi quantificado espectrofotometricamente a 483 nm e a concentração foi corrigida de acordo com a pureza da solução determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **Preparação do sistema modelo**

O sistema modelo foi preparado dissolvendo-se toruleno em cloreto de metileno e misturando-se com celulose microcristalina, marca Synth (Labsynth, São Paulo, Brasil), de acordo com o procedimento utilizado por Padula (1999). A celulose microcristalina foi previamente seca em estufa à temperatura de 75°C por 24 horas. A mistura foi feita em um almofariz de porcelana com pistilo e homogeneizada até que o toruleno estivesse, visualmente, uniformemente distribuído sobre a celulose. O cloreto de metileno e o oxigênio adsorvido neste processo foram removidos mantendo o sistema modelo preparado em dessecador sob vácuo por duas horas. Todas as etapas foram conduzidas protegidas da luz. O sistema modelo continha, ao final, aproximadamente 1 mg de toruleno por grama de sólido seco.

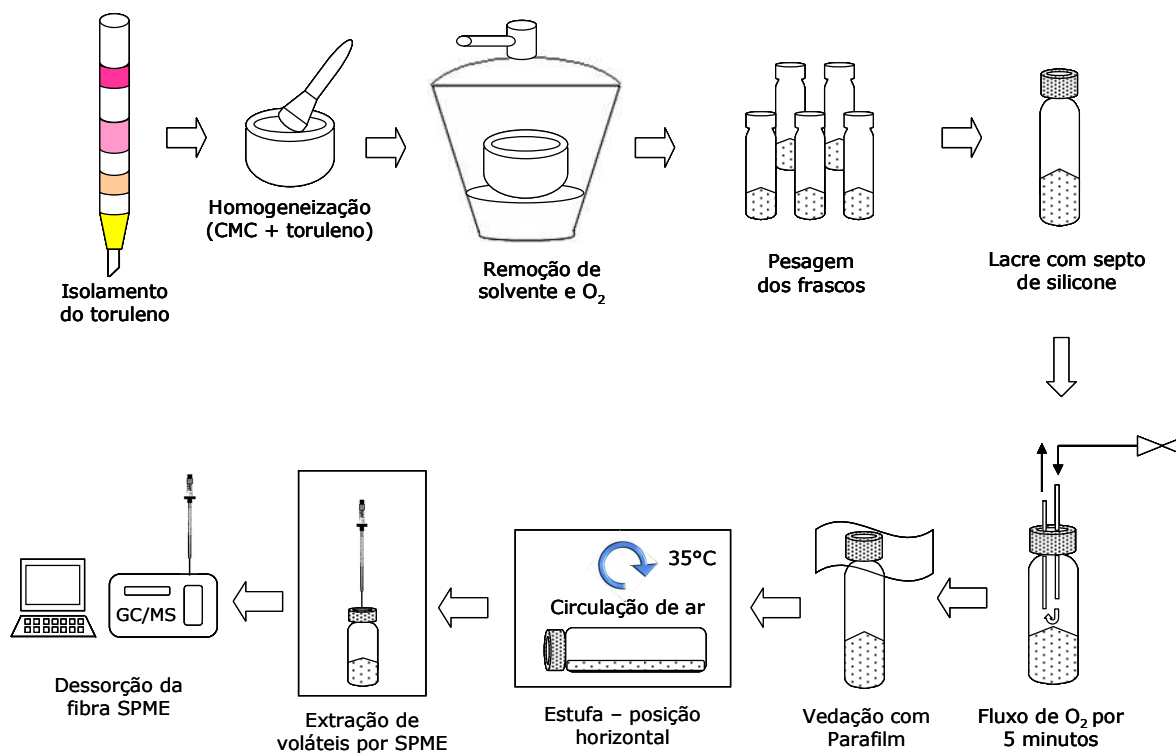
Porções de aproximadamente 500 mg do sistema modelo (toruleno + celulose microcristalina) foram adicionadas em frascos de vidro de 25 mL imediatamente tampados com septos de silicone, com parte interna de PTFE (politetrafluoretileno). A atmosfera do frasco foi modificada com a injeção de gás nitrogênio por 5 minutos. Para promover a degradação, um jato de gás oxigênio foi inserido no frasco durante 5 minutos e estes foram armazenados em estufa a temperatura de 35°C, protegidos da luz, na posição horizontal, para aumentar a área de superfície em contato com oxigênio, e mantidos 24 horas nessas condições.

### **Captura dos compostos voláteis**

A Figura 1 esquematiza o procedimento de obtenção dos compostos voláteis formados a partir da oxidação do toruleno, segundo a metodologia proposta por Kobori (2010). Utilizando a técnica de microextração por fase sólida (SPME), uma fibra SPME de revestimento misto DVB/Car/PDMS (2 cm x 50/30 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) foi utilizada para capturar os voláteis no espaço confinado (*headspace* - HS) entre a amostra e o frasco vedado. A fibra foi pré-condicionada de acordo com as instruções do fabricante: 270°C por uma hora.

O frasco permaneceu a 35°C por 20 minutos para equilibrar a temperatura. Então, a fibra foi introduzida no mesmo através de um septo de silicone e exposta ao *headspace* a 35°C por 30 minutos. Após o término do tempo de exposição da fibra, esta foi removida do frasco e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso. Esse procedimento foi realizado para as amostras sob

atmosfera de nitrogênio (controle) e sob atmosfera de oxigênio para promover a degradação.



**Figura 1:** Esquema proposto para a obtenção de compostos voláteis provenientes da oxidação de toruleno (Kobori, 2010).

### Condições cromatográficas para CLAE

A análise por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), para verificar a pureza do toruleno, foi conduzida em um módulo de separação Waters, modelo 2690 (Waters Co., Milford, EUA), equipado com bomba quaternária, injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), degasser a vácuo na linha e detector de arranjo de diodos (modelo 996), controlado por software Millenium versão 3.2. Foi utilizada coluna monomérica C<sub>18</sub>, Spherisorb ODS2, 3 µm, 4,6 x 150 mm. A fase móvel foi composta de acetonitrila, metanol e

acetato de etila, em gradiente linear iniciando com de 65:35:0 (v/v/v) alterado para 65:18:17 (v/v/v) , em 4 minutos, a última proporção mantida até o final da corrida (45 minutos). A temperatura foi de aproximadamente 22°C e o tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 15 minutos. A vazão foi de 0,5 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 10 µL.

### **Condições cromatográficas para a análise de voláteis (GC/MS)**

Os compostos voláteis foram analisados em um cromatógrafo gasoso, acoplado a um espectrômetro de massas, Shimadzu GC/MS, modelo QP2010 *Plus* (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). A dessorção térmica dos voláteis da fibra SPME foi realizada no injetor do cromatógrafo a 250°C, utilizando o modo *splitless*, com a abertura da válvula de divisão em 2 minutos na razão de 1:20. Foi utilizado insersor próprio para a dessorção da fibra de SPME, com diâmetro interno de 0,8 mm. A separação dos compostos ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida de fase estacionária constituída de 5% fenil e 95% dimetilsiloxisano, Zebron ZB-5MS (Phenomenex Inc., Califórnia, USA) de 30 m x 0,25 mm d.i.x 0,25 µm de espessura de fase estacionária. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão constante de 1,2 mL/min. A programação da temperatura da coluna foi iniciada a 40°C, permanecendo nesta temperatura por 2 minutos, em seguida elevando com uma taxa de 2 °C/min até atingir 150°C, quando foi aumentada a uma razão de 25 °C/min até 250°C, na qual foi mantida por 5 minutos. O espectrômetro de massas foi operado utilizando uma fonte de ionização por impacto de elétrons a +70 eV e analisador de massas tipo quadrupolo com varredura entre 40 a 350 m/z. A interface GC/MS e a fonte de íons foram mantidas a 230°C.

## Identificação dos compostos voláteis de degradação

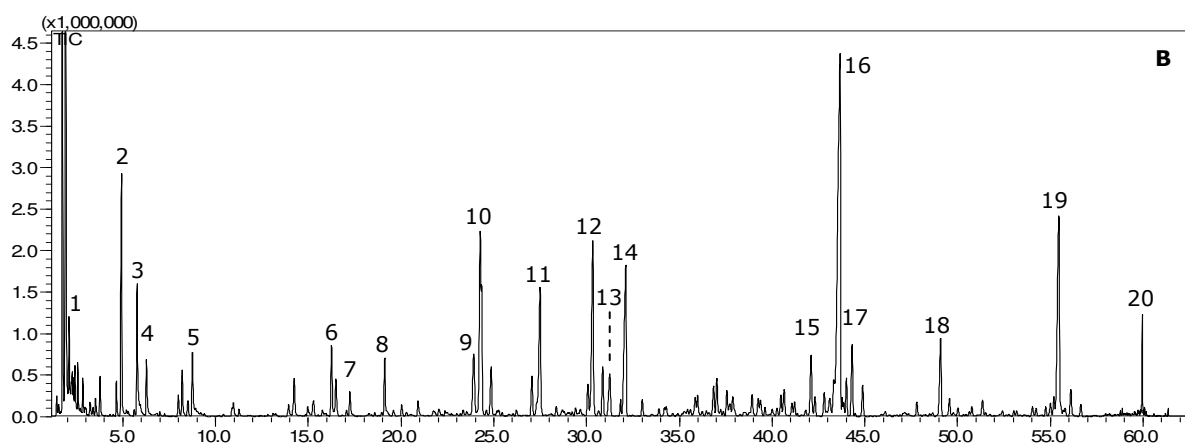
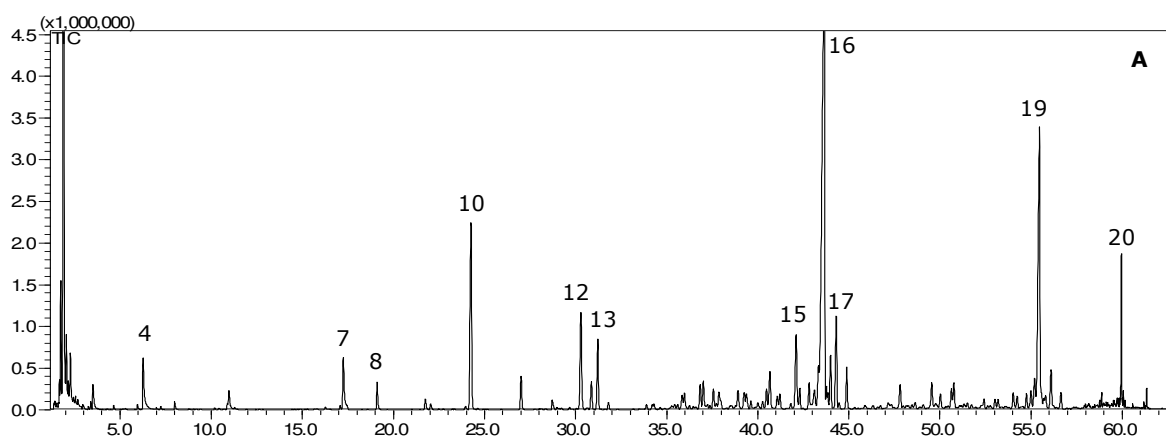
Os compostos voláteis foram, primeiramente, tentativamente identificados através da comparação dos espectros de massa obtidos com os fornecidos pela biblioteca do *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Adicionalmente, foram comparados os índices de retenção relativa – Índice de Kovatz (IK) – obtidos experimentalmente com valores já reportados na literatura. Para cálculo do IK, uma mistura de padrões de alcanos foi injetada no cromatógrafo, nas mesmas condições acima citadas, aplicando-se a seguinte equação:

$$IK = 100 Z + \frac{100[(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{[(\log t'_R Z + 1) - (\log(t'_R Z))]}$$

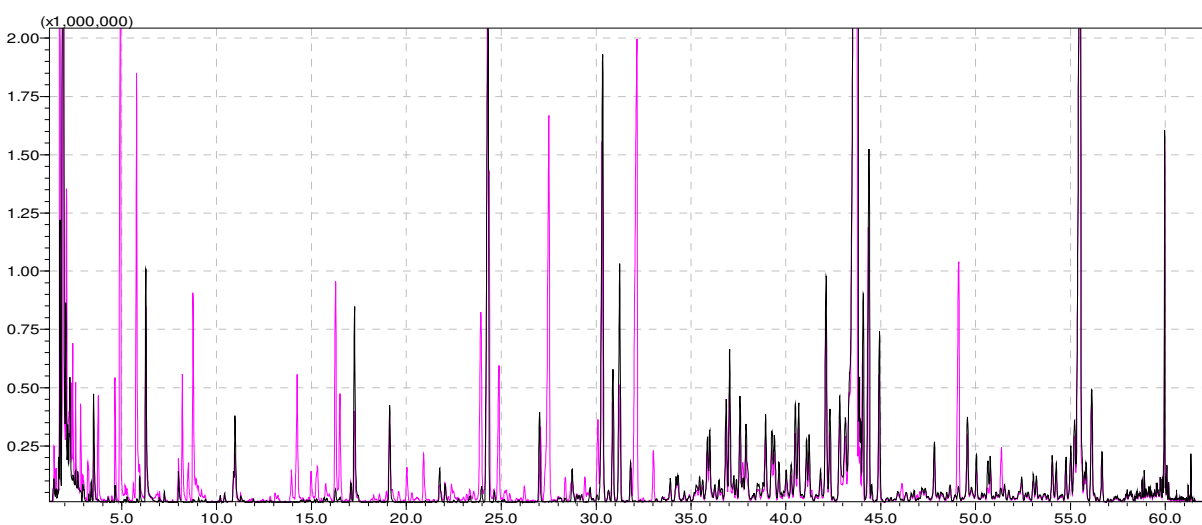
sendo X o analito de interesse,  $t'_R X$  o tempo de retenção ajustado de X, Z o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com o tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X,  $t'_R Z$  o tempo de retenção ajustado de Z e  $t'_R Z + 1$  o tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X (Jennings e Shibamoto, 1980).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 mostra os cromatogramas dos compostos voláteis capturados do *headspace* das amostras, em atmosfera de nitrogênio ou oxigênio. A Figura 3 mostra os dois cromatogramas sobrepostos.



**Figura 2:** Cromatogramas obtidos dos compostos voláteis formados a partir do toruleno. A) em atmosfera de nitrogênio; B) depois de 5 minutos sob fluxo de oxigênio e incubado a 35°C por 24 horas. Os picos estão identificados na Tabela 1.



**Figura 3:** Cromatogramas sobrepostos dos compostos voláteis obtidos a partir do toruleno em atmosfera de nitrogênio e exposto ao oxigênio. Preto: toruleno em atmosfera de nitrogênio; Rosa: toruleno em atmosfera de oxigênio.

O sistema modelo em atmosfera de nitrogênio totalizou 171 picos, muitos deles provenientes da própria celulose microcristalina, utilizada como suporte sólido. Sob fluxo de oxigênio por 5 minutos, houve 228 picos no total. Aqueles numerados na Figura 2, que não eram da celulose microcristalina, apresentaram as maiores proporções e foram tentativamente identificados (Tabela 1). Alguns picos comuns aos dois sistemas (sob atmosfera de nitrogênio e de oxigênio) podem ser oriundos de um princípio de degradação durante o transporte dos frascos, em atmosfera de nitrogênio, até o local de análise (Santa Maria – RS).

Nota-se, através das Figuras 2 e 3, que alguns compostos diminuíram (picos 7, 13, 16, 17, 19 e 20) e alguns aumentaram (picos 8 e 12) após a exposição ao O<sub>2</sub>, e outros foram formados, como metacroleína (1), prenal (3), 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno (5), 6-metil-hept-5-en-2-ona (6), 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno (9), 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno (14) e β-ionona (18), os 7 dentre os compostos majoritários.

**Tabela 1: Principais compostos voláteis formados a partir do toruleno.**

| Pico | Composto                                     | Q  | IK   | I |
|------|----------------------------------------------|----|------|---|
| 1    | Metacroleína                                 | 97 | 578  | B |
| 2    | NI                                           | -  | 758  | - |
| 3    | Prenal                                       | 96 | 786  | A |
| 4    | Hexanal                                      | 98 | 800  | A |
| 5    | 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno                  | 85 | 861  | B |
| 6    | 6-metil-hept-5-en-2-ona                      | 98 | 989  | B |
| 7    | Octanal                                      | 97 | 1003 | B |
| 8    | 2-etil-hexanol                               | 97 | 1033 | B |
| 9    | 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno          | 82 | 1100 | B |
| 10   | Nonanal                                      | 94 | 1106 | B |
| 11   | NI                                           | -  | 1157 | - |
| 12   | Pelargol                                     |    | 1193 | B |
| 13   | Decanal                                      | 95 | 1206 | B |
| 14   | 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno      | 97 | 1220 | A |
| 15   | Ácido butanóico-octil éster                  | 83 | 1373 | B |
| 16   | Tetradec-1-eno                               | 97 | 1386 | B |
| 17   | 1,1,3-trimetil-2-(3-metilpentil)-ciclohexano | 82 | 1407 | B |
| 18   | $\beta$ -ionona                              | -  | 1485 | A |
| 19   | Hexadec-1-eno                                | 92 | 1587 | B |
| 20   | Octadec-1-eno                                | 95 | 1795 | B |

Q: Qualidade da concordância do espectro de massas com a biblioteca NIST 98; IK: Índice de Kovatz experimentais para espectrometria de massas (coluna Zebron ZB-5MS);

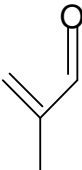
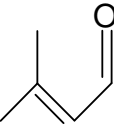
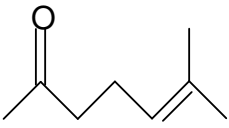
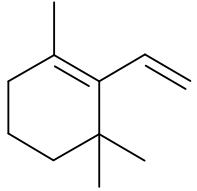
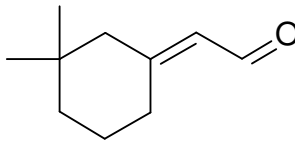
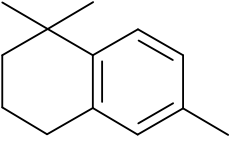
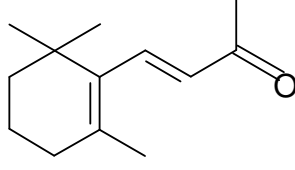
I: Confiabilidade da identificação. A. Índice de Kovatz em concordância com a literatura; B. Índice de Kovatz não encontrado na literatura ou encontrado em condições cromatográficas diferentes;

NI: Composto não identificado

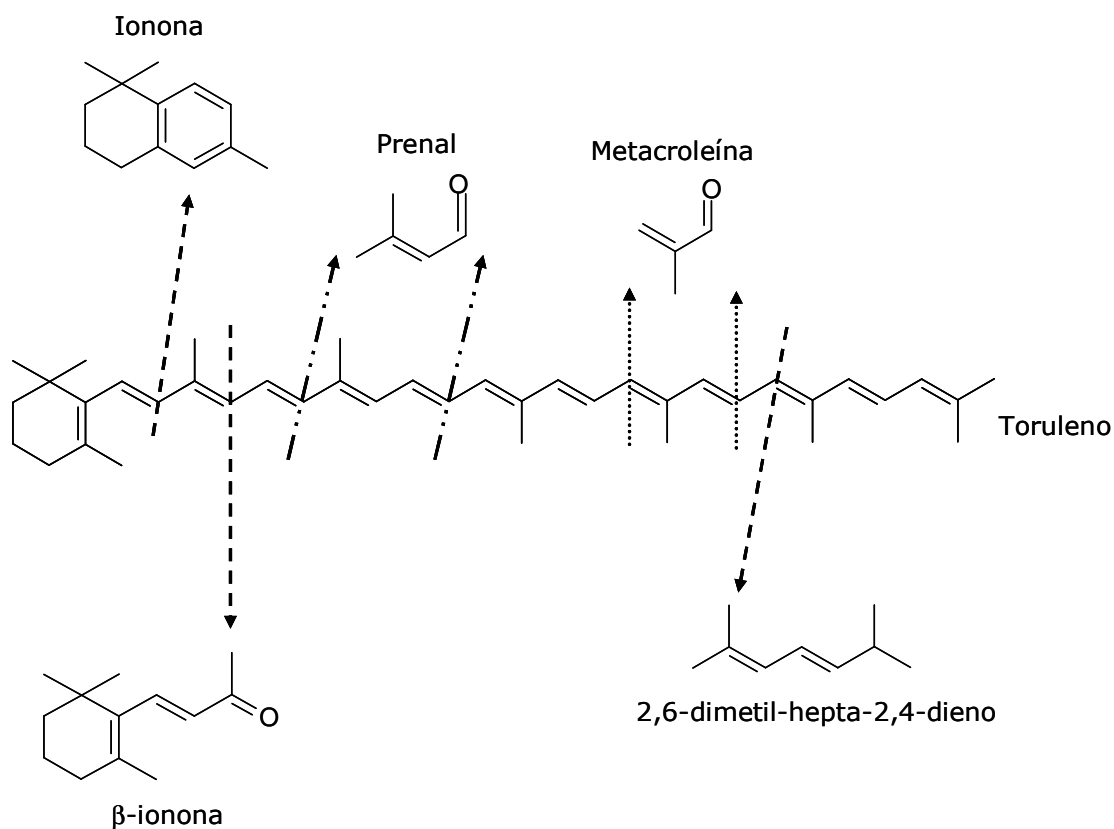
Não foi possível a identificação de compostos intermediários, que ajudariam a elucidar a formação destes compostos tentativamente identificados. Embora o método adotado não os tenha detectado, não significa que não tenham sido formados. Pode ter ocorrido uma transformação rápida que não permitiu que a quantidade momentânea acumulada fosse suficiente para ser detectada.

Nenhum estudo até o presente momento esclarece o mecanismo de degradação oxidativa do toruleno e a formação de compostos voláteis. A partir do cromatograma da Figura 2B, pode-se ter uma idéia de alguns dos compostos formados após a clivagem oxidativa da molécula de toruleno, apesar dos intermediários não terem sido detectados. A Tabela 2 apresenta as estruturas de tais compostos.

**Tabela 2: Estruturas de alguns dos compostos formados pela clivagem oxidativa do toruleno**

| Composto                                     | Estrutura molecular                                                                   |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Metacroleína (1)                             |    |
| Prenal (3)                                   |    |
| 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno (5)              |    |
| 6-metil-hept-5-en-2-ona (6)                  |    |
| 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno (9)      |  |
| 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno (14) |  |
| Ionona                                       |  |
| $\beta$ -ionona (18)                         |  |

A Figura 4 apresenta um possível esquema de clivagem do toruleno. Ionona, apesar de aparecer em picos muito pequenos e não ser considerada como um dos principais compostos, é um importante produto formado a partir do toruleno, já que está presente em diversos óleos essenciais.



**Figura 4:** Possível esquema de clivagem oxidativa do toruleno e formação de alguns dos compostos.

A oxidação do toruleno têm como resultado a formação de inúmeros compostos de degradação, entre eles hidrocarbonetos, cetonas e aldeídos. Infelizmente o mecanismo de formação desses produtos da degradação não pôde ser claramente elucidado. Mais estudos a respeito do assunto são necessários para que se possa propor um esquema mais completo da oxidação do toruleno, envolvendo também a formação de produtos não-voláteis.

Como nenhum estudo sobre a formação de compostos voláteis a partir da oxidação de toruleno foi realizado até o momento, este trabalho apresentou apenas uma primeira tentativa de esclarecimento da degradação oxidativa do toruleno, abrindo caminho para muitos estudos posteriores.

## **CONCLUSÃO**

A degradação oxidativa do toruleno promoveu a formação de diversos compostos. Entre os majoritários, destacou-se a formação de metacroleína, prenal, 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno, 6-metil-hept-5-en-2-ona, 2-etil-hexanol, 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno, 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno e  $\beta$ -ionona, além de ionona, embora em pequena proporção. A partir das estruturas moleculares destes compostos, foi possível sugerir um possível esquema parcial de clivagem oxidativa do toruleno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUST, O.; ALE-AGHA, N.; ZHANG, L.; WOLLERSEN, H.; SIES, H.; STAHL, W. (2003). Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food and Chemical Technology*, 41, 1399-1407.
- CREMER, D.R.; EICHER, K. (2000). Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2454-2460.
- FALCONER, M.E.; FISHWICK, M.J.; LAN, D.G.; SAYER, E.R. (1964). Carotene oxidation and of-flavour development in dehydrated carrot. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, 897-901.
- FERREIRA, A.C.S.; MONTEIRO, J.; OLIVEIRA, C.; PINHO, P.G. (2008). Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation. *Food Chemistry*, 110, 83-87.
- JENNINGS, W.; SHIBAMOTO, T. (1980). *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*. New York : Academic Press.
- KING, T.J.; KHACHIK, F.; BORTKIEWICZ, H.; FUKUSHIMA, L.H.; MORIOKA, S.; BERTRAM, J.S. (1997). Metabolites of dietary carotenoids as potencial cancer preventive agents. *Pure & Applied Chemistry*, 69, 2135-2140.
- KOBORI, C.N. (2010). Composição e estabilidade de carotenóides em alimentos. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas.
- LEWINSOHN, E.; SITRIT, Y.; BAR, E.; AZULAY, Y.; IBDAH, M.; MEIR, A.; YOSEF, E.; ZAMIR, D.; TADMOR, Y. (2005). Not just colors – carotenoid

- degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 407-415.
- MENDES-PINTO, M.M. (2009). Carotenoid breakdown products the – norisoprenoids – in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483, 236-245.
- NONIER, M.F.; GAULEJAC, N.V.; VIVAS, N.; VITRY, C. (2004). Characterization of carotenoids and their degradation products in oak Wood. Incidence on the flavor wood. *Comptes Rendus Chimie*, 7, 689-698.
- PADULA, M. (1999). Degradação de  $\beta$ -caroteno e cantaxantina em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não-voláteis e voláteis. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas.
- RAPP, A.; MARAIS, J. (1993). The shelf-life of wine: changes in aroma substances during storage and ageing of white wines. In G. CHARAMBOUS (ED.), *Shelf-life studies of food and beverages: Chemical, biological, physical and nutritional aspects* (p. 891-921). Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- RAVICHANDRAN, R. (2002). Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on tea quality and aroma. *Food Chemistry*, 78, 23-28.
- RIOS, J.J.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. (2008). Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*, 106, 1145-1153.

- RODRIGUEZ, E.B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2007). Formation of apocarotenals and epoxycarotenoids from  $\beta$ -carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chemistry*, 101, 563-572.
- RODRIGUEZ, E.B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2009). Lycopene epoxides and apo-lycopenals formed by chemical reactions and autoxidation in model systems and processed foods. *Journal of Food Science*, 74, C674-C682.
- SIEMS, W.; SOMMERBURG, O.; SCHILD, L.; AUGUSTIN, W.; LANGHANS, C.; WISWEDEL, I. (2002).  $\beta$ -carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration. *The FASEB Journal*, 16, 1289-1291.
- SOMMERBURG, O.; LANGHANS, C.; ARNHOLD, J.; LEICHSENRING, M.; SALERNO, C.; CRIFÒ, C.; HOFFMANN, G.F.; DEBATIN, K.; SIEMS, W. (2003).  $\beta$ -carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid – a model for neutrophil – derived degradation. *Free Radical Biology & Medicine*, 35, 1480-1490.
- YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. (2001) Antioxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 20-27.

## Conclusões Gerais

A adição de ácido mevalônico ao meio de cultivo YM estimulou a produção de carotenóides totais pela levedura *Rhodotorula glutinis*, com aumento significativo na produção específica de toruleno.

A manipueira mostrou-se um bom substrato para o crescimento da levedura e produção de carotenóides. Sob temperatura de 26°C, 250 rpm de agitação, pH 6,0 e 10% de volume de inóculo transferido para o meio de cultivo, a produção de carotenóides pode ser mais que o dobro (2068 µg/L) que no tradicional meio YM (899 µg/L).

Sob as condições adotadas para o estudo de estabilidade em sistemas modelos de baixa umidade, licopeno foi o carotenóide mais susceptível à degradação, seguido de β-caroteno e toruleno. Este último foi, surpreendentemente, o carotenóide mais estável dentre os três estudados, mostrando dessa forma a a grande aplicabilidade como corante em alimentos.

A degradação oxidativa de toruleno promoveu a formação de inúmeros compostos de degradação, entre eles hidrocarbonetos, cetonas e aldeídos. Entre os majoritários, destacou-se a formação de metacroleína, prenatal, 2,6-dimetil-hepta-2,4-dieno, 6-metil-hept-5-en-2-ona, 2-etil-hexanol, 2-etenil-1,3,3-trimetil-ciclohexeno, 3,3-dimetil-acetaldeído-ciclohexilideno e β-ionona, além de ionona, embora em pequena proporção.

