



UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES - URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LETÍCIA URNAU

PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES DE *Xanthophyllomyces*
dendrorhous Y-10921

ERECHIM/RS - BRASIL
ABRIL DE 2014

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
- URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LETÍCIA URNAU

PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES DE *Xanthophyllomyces*
***dendrorhous* Y-10921**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus Erechim.

Orientadores: Prof^a Dr. Eunice Valduga

Prof^a Dr. Clarice Steffens

ERECHIM, RS - BRASIL

ABRIL DE 2014

**PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES DE *Xanthophyllomyces*
dendrorhous Y-10921**

Letícia Urnau

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof.^a. Eunice Valduga, D. Sc.
(Orientadora)

Prof.^a. Clarice Steffens, D.Sc.
(Orientadora)

Prof. Elton Franceschi, D.Sc.
(UNIT- Aracaju)

Prof.^a Jamile Zeni, D.Sc.
(URI - Erechim)

Erechim, Abril de 2014.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS ERECHIM.

*Aos meus pais, Luís Antônio e Veranice, meus
mais sinceros agradecimentos, sem seu apoio
incondicional, o êxito na conclusão dessa etapa
não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, luz e PROTEÇÃO, para trilhar esse caminho.

Aos meus pais, Luís Antônio e Veranice, e à minha irmã Luísa, que, mesmo distantes me incentivaram em todos os momentos, principalmente nos difíceis enfrentados.

As minhas orientadoras, Eunice Valduga e Clarice Steffens, por todo o conhecimento repassado, compreensão e dedicação para com esse trabalho.

Aos membros da banca, por aceitarem fazer parte desse trabalho.

A minha companheira de trabalho Rosicler Colet, por toda a ajuda e ensinamento repassado. Com sua ajuda, esse trabalho se tornou mais fácil e divertido.

As bolsistas, Daiane Trentin e Juliana Zanatta, que estiveram sempre presentes, prestando auxílio quando necessário.

A minha colega e amiga, Naira, que esteve presente durante toda a etapa de realização do trabalho, trazendo momentos de descontração.

Aos meus colegas do laboratório, Ana, Júnior, Naiane, Jonaína, Márcia, Marceli, Graci, Ceni, Marshall e Carol, pelos momentos de apoio, tanto no trabalho, quanto nos momentos de diversão.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim, pelas orientações, conselhos e transmissão de seus conhecimentos e experiências.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio e suporte financeiro.

A Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI- Erechim, pela estrutura fornecida para realização do trabalho.

Enfim, OBRIGADA a todos que, de alguma forma, se fizeram presentes na realização desse trabalho.

***“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que
você veja toda a escada. Apenas dê
o primeiro passo.”***

Marthin Luther King

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921

Letícia Urnau

Abril/2014

Orientadores: Eunice Valduga, Clarice Steffens.

Os carotenoides são pigmentos naturais e podem ser sintetizados por plantas, algas e micro-organismos. Quando esses são bioproduzidos por micro-organismos, são encontrados intracelularmente, assim, algumas vezes, a rigidez da parede celular, dificulta a extratibilidade dos pigmentos, sendo necessário a aplicação de técnicas de recuperação dos biocompostos. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes técnicas de ruptura celular de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 afim de recuperar os carotenoides bioproduzidos. Inicialmente, a bioprodução dos carotenoides por *X. dendrorhous* foi realizada em meio composto por 3 g/L de extratos de levedura e de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose, em frascos agitados (150 rpm), 25°C, sem iluminação por aproximadamente 96 h. Posteriormente, empregou-se metodologia de planejamento de experimentos (planejamentos sequenciais), visando otimização das condições operacionais e do meio de bioprodução de carotenoides. Nos ensaios de recuperação de carotenoides empregou-se diferentes métodos de rompimento celular (dimetilsulfóxido - DMSO, sistema ultrassônico, N₂ líquido e sistemas combinados), células *in natura* e liofilizadas, e de extração dos pigmentos (acetona, metanol, acetato de etila, éter de petróleo, clorofórmio, hexano e sistemas combinados). A máxima recuperação de carotenoides específicos foi de 697 µg/g, em meio de bioprodução composto por 40 g/L de glicose, 30 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de extrato de malte, produzido em 180 rpm, 30°C com pH inicial de 4,5, empregando como agente de ruptura celular sistema ultrassônico (0,05 g de célula liofilizada e 4 mL de acetona:metanol (7:3 v/v), 40 KHz, 56 min de reação e 22±3°C), e extração com a mistura acetona:metanol (7:3 v/v).

Palavras-Chave: Carotenoides. Ruptura celular. Extração. *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Ultrassom.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Engineering.

PRODUCTION AND RECOVERY OF CAROTENOIDS FROM *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921

Letícia Urnau

April/2014

Advisors: Eunice Valduga, Clarice Steffens.

Carotenoids are natural pigments that can be synthesized by plants, algae and microorganisms. When these carotenoids are bioproduced by microorganisms, these are founded intracellularly, thus, sometimes the rigidity of the cell wall makes the extractability of the pigments difficult, being the application of many techniques necessary. Therefore, the aim of this study was to promote cell rupture of *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 through different techniques in order to recover carotenoids. Initially, the bioproduction of carotenoids by *X. dendrorhous* was performed in medium composed of 3 g/L of yeast and malt extract, 5 g/L of peptone and g/L of glucose, in shake flasks (150 rpm), 25°C, without illumination for about 96 h. Subsequently, the methodology of design of experiments (sequential planning) was used, aiming at the optimization of the operating conditions and bioproduction medium of carotenoids. In carotenoids recovery tests, different methods of cell disruption (dimethyl – DMSO, ultrasonic system, N₂ liquid and combined systems), lyophilized cells and in natura and extraction of the pigments (acetone, methanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, hexane and combined systems) was employed. Maximum recovery of specific carotenoids was 697 µg/g in bioproduction medium composed by 40 g/L of glucose, 30 g /L of yeast extract, 30 g/L of malt extract, produced at 180 rpm, 30°C with initial pH 4.5, using ultrasonic system as cell disruption agent (0.05 g lyophilized cells and 4 mL of acetone: methanol (7:3 v/v), 40 KHz, 56 min reaction and 22± 3°C) and extracted with acetone: methanol (7:3 v/v).

Keywords: Carotenoids. Cell disruption. Extraction. *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Ultrasound.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Carotenoides	15
3.1.1 <i>Propriedades e funções dos carotenoides</i>	16
3.2 Produção biotecnológica de carotenoides	18
3.2.1 <i>Fatores que influenciam a produção de carotenoides por via biotecnológica</i>	19
3.3 Recuperação de biocompostos	21
3.3.1 <i>Ruptura celular</i>	21
3.3.2 <i>Ultrassom</i>	22
3.3.3 <i>Extração de carotenoides</i>	24
3.3.4 <i>Considerações Finais</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Bioprodução de carotenoides totais	27
4.1.1 <i>Delineamento experimental</i>	27
4.2 Recuperação dos carotenoides	29
4.2.1 <i>Preparo das amostras</i>	29
4.2.2 <i>Ensaio preliminares</i>	29
4.2.3 <i>Delineamento experimental: Ruptura Celular e extração</i>	32
4.3 Metodologia analítica	34
4.3.1 <i>Determinação de carotenoides totais</i>	34
4.4 Tratamentos estatísticos	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Influência do agente de ruptura celular e condições de extração na recuperação de carotenoides	35
5.2 Otimização das condições operacionais da ruptura celular	37
5.2.1 <i>Ruptura celular com DMSO</i>	37
5.2.2 <i>Ruptura celular com sistema ultrassônico</i>	42
5.3 Otimização da bioprodução de carotenoides	47
5.3.1 <i>Ultrassom</i>	47
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química dos pigmentos carotenoides (LA FUENTE et al., 2006).....	16
Figura 2- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para recuperação de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) em função da agitação (rpm) e tempo (min), respectivamente.	41
Figura 3- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para recuperação de carotenoides específicos $\mu\text{g/g}$ em função do tempo (min) e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).	46
Figura 4- Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental do tipo Plackett–Burman, para a recuperação de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$).	49
Figura 5- Superfícies de resposta e curvas de contorno para recuperação de carotenoides específicos em função da concentração de extrato de levedura e glicose (a), concentração de extrato de malte e extrato de levedura (b) e concentração de extrato de malte e glicose (c).	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.....	28
Tabela 2- Variáveis independentes e níveis empregados no planejamento fatorial 2^3 completo.....	29
Tabela 3- Variáveis Independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 completo para o rompimento celular com dimetilsulfóxido.....	32
Tabela 4- Variáveis Independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 completo para o rompimento celular empregando sistema ultrassônico.....	33
Tabela 5- Influência do agente de ruptura e de condições de extração na resposta dos carotenoides específicos.	35
Tabela 6- Carotenoides específicos recuperados empregando sistema ultrassônico no rompimento celular e diferentes solventes na extração.....	37
Tabela 7- Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos após tratamento de ruptura celular com DMSO.	38
Tabela 8- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para os carotenoides específicos empregando o sistema DMSO.....	39
Tabela 9 - Análise de variância para a ruptura celular com DMSO e resposta em carotenoides específicos, do planejamento fatorial 2^2 completo.	40
Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos após tratamento de ruptura celular com sistema ultrassônico.	43
Tabela 11 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para os carotenoides específicos empregando sistema ultrassônico de ruptura celular.....	44
Tabela 12- Análise de variância para a ruptura celular com sistema ultrassônico e resposta em carotenoides específicos, do planejamento fatorial completo 2^2	45
Tabela 13- Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores reais e codificados) e respostas em carotenoides específicos em rompimento celular realizado com ultrassom. ...	48
Tabela 14- Matriz do planejamento fatorial 2^3 completo (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos.	51
Tabela 15- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^3	52
Tabela 16- Análise de variância para a produção de carotenoides do planejamento fatorial completo 2^3	53

1. INTRODUÇÃO

A produção biotecnológica de carotenoides para a aplicação industrial, por micro-organismos, tem sido objeto de destaque nos últimos anos, pois a grande maioria dos carotenoides utilizados industrialmente é obtida por via química ou por extração de plantas ou algas. Devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, os processos biotecnológicos para obtenção de carotenoides têm sido alvo de um crescente interesse. Além disso, a produção se dá em pequeno espaço, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo; existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenoides de maior importância e a utilização de substratos de baixo custo (JOHNSON; SCHROEDER, 1995; AKSU; EREN, 2007).

Na grande maioria os carotenoides produzidos por micro-organismos encontram-se nas paredes internas da célula, necessitando dessa forma, métodos de ruptura celular e de extração para recuperação dos biocompostos. Nesse sentido, algumas técnicas de ruptura celular foram desenvolvidas ao longo dos anos, mas poucas estão disponíveis em larga escala. Atualmente, o uso de métodos mecânicos, como a maceração, é o mais difundido na indústria, embora uma série de métodos não mecânicos ou combinados podem ser aplicados e tem sido relatados, tais como enzimático (ASENJO et al., 1985; SALAZAR, 2007, FLEURI et al., 2005, MONKS et al., 2013), fluidos pressurizados (MONKS et al., 2011), sistema ultrassônico (MEDEIROS et al., 2008), químicos através de permeabilização celular que pode utilizar dimetilsulfóxido (VALDUGA et al., 2013), etanol (PANESAR et al., 2007), isopropanol (KONDO et al., 2000) e butanol (CHAMPLUVIER et al., 1989). A desvantagem da maioria dos métodos de rompimento celular é que, além de rompimento celular, também resultam na degradação e desnaturação de proteínas (EGYHÁZI et al., 2004) e/ou de degradação de biocompostos de interesse.

Após o rompimento celular, os carotenoides devem ser extraídos a partir das células. Na maioria das vezes são utilizados solventes orgânicos, como acetona, éter de petróleo, etanol e metanol. Alguns desses solventes foram testados quanto à sua capacidade de isolar os carotenoides, sendo que a maioria desses estudos se concentram na recuperação de carotenoides utilizando um único solvente (MENDES-PINTO et al., 2001). É presumível que alguns solventes, quando combinados possam demonstrar interações sinérgicas, resultando em um rendimento melhor de carotenoides (LIM et al., 2002; MENDES-PINTO et al., 2001; PARK et al., 2007).

Neste contexto e frente às importantes aplicações dos carotenoides, tanto na indústria de alimentos (como por exemplo, sua utilização como composto de proteção à oxidação de produtos industrializados) quanto no seu uso farmacêutico (como fonte de pró vitamina A), surge a necessidade do estudo de técnicas de recuperação de carotenoides, que envolvam o rompimento celular efetivo e extratibilidade dos biocompostos, possibilitando a utilização dos carotenoides de fontes microbianas. Desta forma, este estudo tem como objetivo principal a produção e a recuperação de carotenoides sintetizados por *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921, empregando diferentes métodos de rompimento celular e solventes na extração.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Produzir e recuperar carotenoides de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921, empregando diferentes métodos de ruptura celular e de extração dos biocompostos.

2.2 Objetivos específicos:

- Otimizar a produção de carotenoides em frascos agitados utilizando substratos sintéticos;
- Empregar sistemas físicos e químicos na ruptura celular;
- Utilizar combinações de solventes orgânicos na extração dos carotenoides;
- Quantificar os carotenoides recuperados pelos sistemas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

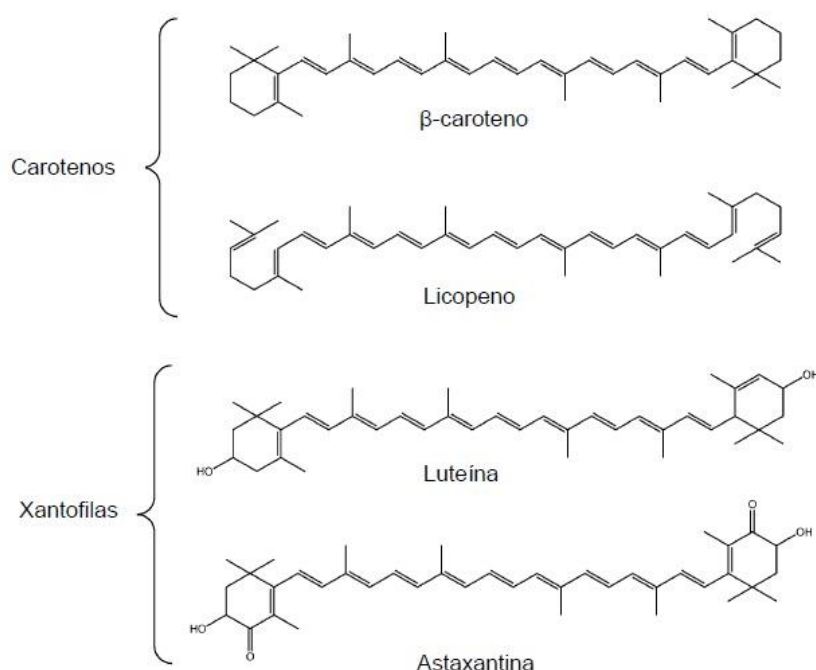
Neste item serão apresentados aspectos gerais dos carotenoides, informações sobre sua bioprodução e recuperação, abordando aspectos estruturais, biossíntese, propriedades e funções dos carotenoides, micro-organismos produtores, fatores que influenciam a bioprodução e métodos de recuperação (ruptura celular e extratibilidade) dos biocompostos.

3.1 Carotenoides

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis, sendo encontrados em fungos, bactérias, tecidos de plantas verdes e também em animais (MEZZOMO, 2012). Apresentam capacidade corante, que provem da presença de uma longa série de duplas ligações conjugadas, que é também responsável por suas propriedades antioxidantes (MACÍAS-SANCHEZ et al., 2010).

Esta classe de pigmento compreende duas classes principais, os carotenos e as xantofilas. Os carotenos consistem em hidrocarbonetos poliênicos cíclicos ou lineares, enquanto as xantofilas são carotenos com pelo menos um átomo de oxigênio funcional ($-OH$ e $=O$) em sua molécula e representam a grande maioria dos carotenoides (LA FUENTE et al., 2006).

Figura 1- Estrutura química dos pigmentos carotenoides (LA FUENTE et al., 2006).



3.1.1 Propriedades e funções dos carotenoides

Os carotenoides são os pigmentos mais difundidos na natureza, sendo os mais importantes β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina. São reportados mais de 600 variantes estruturais desta família de pigmentos, que se encontram em fontes naturais (LOPES FILHO et al., 2008; AUSICH, 1997). São corantes naturais responsáveis pelas cores vermelha, amarela e laranja, muito empregadas nas indústrias alimentícias, farmacêutica, de cosméticos e até mesmo de ração animal (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

O valor de mercado na comercialização de carotenoides foi de aproximadamente 1,2 bilhão de dólares em 2010, podendo chegar a 1,4 bilhões em 2018. O β -caroteno é o carotenoide de maior consumo, estimado em um valor de mercado de 261 milhões de dólares em 2010, apresentando um crescimento anual

de 3,1%. Em seguida no mercado de consumo encontram-se a luteína e astaxantina (BCC, 2013).

O interesse no uso de carotenoides está baseado na vantagem de que os mesmos não são afetados (ao contrário de muitos outros corantes) pela presença de ácido ascórbico, ou ciclos de aquecimento e resfriamento. Além disso, são corantes de alto poder colorífico, podendo ser usados até mesmo em partes por milhão (MACÍAS- SANCHEZ et al, 2004).

O interesse em carotenoides tem aumentado nos últimos anos, pois além da demanda por esse produto pelas diversas indústrias, o interesse por produtos naturais tem mostrado um relevante aumento, o que possibilita o desenvolvimento de carotenoides por meios biotecnológicos (VALDUGA et al., 2008).

Nas indústrias de alimentos, o principal objetivo na utilização dos carotenoides é colorir ou repor a cor dos alimentos perdida durante processamento ou armazenamento, e uniformizar a coloração de alguns produtos (MALDONADE, 2003). Além disso, uma das características mais importantes dos carotenoides, é a sua capacidade de atuar como antioxidante, protegendo células e tecidos da ação dos radicais livres (SOWMYA; SACHINDRA, 2012). Por serem apolares, os carotenoides ficam imersos nas membranas sequestrando radicais gerados no ambiente (TRUSCOTT, 1996).

Os carotenoides também são conhecidos por serem precursores de vitamina A, conversão essa, que ocorre naturalmente no fígado (UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007). Essa vitamina é essencial para a promoção do crescimento, desenvolvimento embrional e função visual (HOF et al., 2000). Além disso, há indícios de que os carotenoides em associação com outros componentes de frutas e vegetais apresentam efeito protetor contra algumas doenças crônicas (UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007).

A astaxantina, principal composto recuperado pela levedura *X. dendrorhous*, tem despertado grande interesse devido à sua capacidade antioxidante e possível papel na redução do risco de algumas doenças. A atividade antioxidante da astaxantina, tem demonstrado importante função na modulação de funções biológicas relacionadas à peroxidação lipídica, desempenhando efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, degenerativas e câncer (SEABRA e PEDROSA, 2010).

3.2 Produção biotecnológica de carotenoides

Os carotenoides estão amplamente distribuídos na natureza, mas mesmo assim, em todo o mundo, o volume de produção é dominado pelos métodos sintéticos. No entanto, o impacto negativo causado por compostos sintéticos em produtos alimentícios, está forçando as indústrias a buscarem uma alternativa, e a produção biotecnológica vem sendo uma opção para esses mercados (MATTEA; MARTÍN; COCERO, 2008).

Uma variedade de carotenoides, com estruturas específicas pode ser obtida através da exploração dos micro-organismos. A produção de carotenoides através de via microbiana constitui atualmente uma alternativa interessante devido à possibilidade da obtenção de pigmentos de origem natural em escala industrial (DA SILVA, 2004).

Há uma grande quantidade de micro-organismos com capacidade para produzir carotenoides, no entanto, nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pela sua utilização como fonte proteica, capacidade de crescimento em substratos menos dispendiosos e alto teor de açúcar (VALDUGA et al., 2009b).

A produção de carotenoides pelo processo biotecnológico tem sido amplamente investigada, dando destaque para a produção comercial de β - caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora*, pelas microalgas *Dunaliella* (MACÍAS-SÁNCHEZ, 2008), a produção de astaxantina pela microalga *Haematococcus sp* (ZHANG, 2009) e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (MORIEL et al., 2004).

O uso de substratos industriais baratos como fonte de nutrientes e a adequação das características de meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), temperatura, pH, taxa de aeração e agitação, tornam esse processo industrialmente praticável, reduzindo assim o custo de produção (DAS et al., 2007; BUZZINI et al., 2005).

3.2.1 Fatores que influenciam a produção de carotenoides por via biotecnológica

A produção de carotenoides por micro-organismos é afetada por fatores físicos (temperatura, luminosidade e teor de oxigênio) e pela composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), os quais variam em intensidade e concentração de acordo com as necessidades que cada micro-organismo possui. Sendo assim, a mudança nesses fatores pode influenciar positiva ou negativamente a biossíntese de pigmentos (BHOSALE, 2004).

A temperatura e o pH exercem influência no crescimento microbiano, metabolismo e na viabilidade celular. Johnson & Gil-Hwan (1991) verificaram que as condições ótimas para a produção de carotenóides não são as mesmas para o crescimento celular. O pH ótimo de crescimento para *P. rhodozyma* foi de 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi a pH 5,0.

A temperatura é um dos fatores mais importantes, que exerce influência direta no crescimento e no metabolismo de micro-organismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese (SILVA, 2004; ZENI, 2009). A temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides e mudanças na concentração enzimática (VALDUGA, et al. 2009e). Aksu e Eren (2007) estudando a produção de carotenoides com *R. glutinis*, perceberam que a taxa de crescimento específico da levedura aumentou com a elevação da temperatura de 25 °C para 30 °C e, diminuiu de maneira drástica em faixas superiores de temperatura. A taxa de formação de carotenoides também foi influenciada pelo aumento da temperatura, onde até 30 °C foi observado um crescimento acentuado na concentração de carotenoides totais, e acima desta apenas um leve crescimento foi observado. Em testes, Ramírez et al. (2001) concluíram que na otimização da produção de astaxantina por *P. rhodozyma*, a temperatura foi o fator que mais causou influência.

A biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento do micro-organismo. De modo geral, em leveduras o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 h de fermentação, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese (FRENGOVA et al.,1994). A partir daí, o pH permanece constante

indicando o final do processo fermentativo. O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes para o crescimento celular e formação de produto, tornando-se uma variável a ser estudada na produção de carotenoides (COLET, 2012).

A produção de carotenoides é afetada pela irradiação de luz, contudo, a intensidade e a forma de iluminação variam de acordo com o micro-organismo (BHOSALE, 2004). Em estudos, Jhonson et al. (1979) revelaram que a intensidade luminosa não influenciou a pigmentação de *P. rhodozyma*. Já Gil-Hwan & Jhonson (1990), utilizando alta intensidade luminosa, concluíram que a luz inibiu o crescimento celular e a formação de pigmento, ambas causadas pelo estresse celular.

Outro fator que exerce influência é o teor de oxigênio. Esse efeito foi estudado por Davioli et al. (2004) na utilização da levedura *Sporobolomyces roseus*, onde um aumento na aeração causou um incremento significativo na concentração de carotenoides. Em estudo realizado por Liu et al. (2006), houve evidências de que o aumento da agitação e a diminuição no volume de líquido ocasionaram elevação no crescimento celular e produção de carotenoides, sendo que a mudança na velocidade de agitação apresentou maiores efeitos no rendimento de carotenoides nos maiores volumes de líquido.

Maldonade (2003) estudando a composição de carotenoides, das leveduras isoladas no Brasil e cultivadas em meio YM, 200 rpm, 25 °C por 5 dias, sem iluminação, encontrou concentrações de carotenoides totais de 881 µg/L para *Rhodotorula glutinis*, 594 µg/L para *R. graminis*-125, 590 µg/L para *R. mucilaginosa*-137, 545 µg/L para *R. mucilaginosa*-135, 168 µg/L para *R. minuta* e 237 µg/L para *Sporobolomyces* sp. Os principais pigmentos encontrados nestas linhagens foram toruleno e β-caroteno, sendo o β- caroteno predominante em *R. graminis*-125, *R. glutinis* e *Sporobolomyces* sp, enquanto que o toruleno foi o carotenoide principal de *R. mucilaginosa*.

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides. De acordo com Buzzini & Martini (2000), o uso de glicose levou a maiores rendimentos na produção específica de carotenoides (1000 µg/g) por *Rhodotorula* sp. Sutherland et al. (1996) verificaram que concentrações altas de glicose inibem a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e

celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados na produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*.

Fontes de nitrogênio também afetam o crescimento e a pigmentação em *Phaffia rhodozyma*. A peptona foi considerada melhor fonte de nitrogênio para pigmentação, entretanto, estudos relataram que o uso do extrato de leveduras como fonte de nitrogênio aumentou a concentração de carotenoides totais (MEYER & PREEZ, 1994). Resultados similares foram obtidos por Calo et al. (1995), que observaram o aumento de duas vezes na concentração de astaxantina quando foi empregado extrato de levedura.

3.3 Recuperação de biocompostos

A bioprodução industrial de carotenoides está bem estabelecida e vem se expandindo comercialmente. No entanto, as etapas de recuperação e extração do produto ainda estão em fase de desenvolvimento (MEZZOMO, 2012). Assim, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados visando estudar a recuperação eficiente dos carotenoides intracelulares e, conseqüentemente contribuindo para a redução de custos operacionais (VALDUGA et al., 2009d).

O processo de extração de carotenoides com solventes orgânicos é um dos métodos mais utilizados. Park et al. (2007) relataram que a extração do carotenoide presente na parede celular do micro-organismo depende da habilidade de permeabilização do solvente através da parede celular e da solubilidade dos carotenoides com o solvente utilizado. Porém, com o aumento da restrição ao uso de solventes, por vezes tóxicos, o interesse dos consumidores por produtos naturais, promoveu a busca por outros métodos de extração (SUN, 2006).

3.3.1 Ruptura celular

A parede celular é uma camada relativamente rígida presente nas células de vegetais e micro-organismos como bactérias, algas, fungos e leveduras. Ela fornece

suporte osmótico e determina o formato da célula, além de estar relacionada a sinalização celular, adesão e digestão extracelular (MAGNELLI et al., 2005).

As leveduras são envolvidas por uma rígida parede celular, representando cerca de 20 a 25% do peso seco da célula. Em uma grande parte das leveduras, a parede celular consiste em 85 a 90% de polissacarídeos e 10 a 15% de proteínas (NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998). Dessa forma, para que os carotenoides possam ser extraídos, essa parede deverá ser eficazmente quebrada.

Uma das técnicas de rompimento celular mais utilizada é o choque osmótico, que pode ser feito com tampão fosfato ou acetato, ou até mesmo com água destilada. A extração pode ser realizada com esses solventes, ou combinada com métodos físicos como congelamento, descongelamento, digestão, sonicação, entre outros (PATEL et al., 2005; CHEN et al., 2006).

3.3.2 Ultrassom

O ultrassom é um processo que utiliza energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz). As ondas de ultrassom se propagam na matéria, criando meios de compressão e expansão, fazendo com que as moléculas se afastem e se aproximem diversas vezes (LUQUE-GARCÍA; DE CASTRO, 2003).

O ultrassom aumenta a permeabilidade das paredes celulares, a produção de cavitação, resultando em um forte estresse dinâmico, e consequentemente o aumento do estresse mecânico das células, também chamado de fricção interfacial. As ondas ultrassônicas rompem as paredes celulares presentes na matriz vegetal, aumentando a penetração do solvente e o contato entre as fases soluto/solvente e assim, facilitando a liberação dos extratos (JACQUES, 2005; MA et al., 2008).

O ultrassom pode ser utilizado para melhorar efetivamente a taxa de extração, aumentando as taxas de transferência de massa e possível ruptura da parede celular devido à formação de microcavidades levando a maiores rendimentos com tempos e consumo de solventes reduzidos (SHIRSATH et al., 2012).

O emprego do ultrassom pode ser uma importante ferramenta para processos de extração, podendo ser utilizado em pequena ou grande escala (VINATORU, 2001).

Em um estudo comparando a extração de carotenoides de microalga por técnica de ultrassom e extração supercrítica, Macías- Sanchez et al. (2009) obtiveram superioridade do método de ultrassom em relação ao rendimento de extração, mas em relação a seletividade, a tecnologia supercrítica se sobressaiu.

Medeiros et al. (2008), comparando a técnica de abrasão utilizada tradicionalmente para ruptura celular em agitador tipo vórtex com o processo de ruptura celular baseado no uso conjugado de ondas ultrassônicas e pérolas de vidro para extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 708, concluiu que o uso dessa nova metodologia por um período de 40 minutos, pode ser aplicado eficientemente para extração.

Jadhav et al (2009) utilizando extração através de ultrassom para comparar com os resultados com o processo tradicional de Soxhlet, obteve resultados 20% superiores com técnica ultrassônica. Além disso, enquanto no método tradicional, temperaturas de 95-100°C são requeridas, com a utilização de ultrassom, a mesma pode ser reduzida para a temperatura ambiente, reduzindo também, o tempo de 8 para 1 hora.

Em estudos semelhantes, Kimbaris et al. (2005) utilizando método de extração por destilação e por ultrassom para obter óleos essenciais de alho, perceberam que utilizando sistema ultrassônico, os compostos de aroma sofreram menores danos, resultando em óleos com melhores sabores e odores. Este fato pode estar relacionado à temperaturas mais amenas que podem ser utilizadas quando se tratando de extração através de ultrassom.

Ho et al. (2006) estudaram o rompimento celular de células de *E. coli* para liberação de HbcAg intracelular utilizando ultrassom e concluíram que esse método foi mais eficaz quando comparado ao método enzimático, em termos de liberação de proteínas.

3.3.3 Extração de carotenoides

Após o rompimento celular, os carotenoides devem ser extraídos a partir da célula microbiana. Como os carotenoides são lipossolúveis, geralmente são extraídos com solventes orgânicos, como acetona, éter de petróleo, hexano, etanol (MENDES-PINTO et al., 2010).

Em geral, os carotenoides são compostos solúveis em solventes não polares, pelo qual este tipo de solvente tem sido utilizado para realizar a sua extração. No entanto, quando as amostras que contêm os carotenoides possuem uma umidade considerável, estes precisam ser extraídos usando um solvente polar (por exemplo, etanol ou acetona).

A seleção de um solvente é de extrema importância para obtenção de extratos de boa qualidade e, além disso, não deve ser inflamável, não tóxico e não volátil. No entanto, até hoje, não tem se encontrado solvente com tais características (CAMARGO, 2010).

Alguns estudos têm testado a habilidade dos solventes para isolar carotenoides de células microbianas. A maioria desses estudos estão focados em testar a recuperação de carotenoides utilizando apenas um solvente. Uma área que tem recebido atenção é a mistura sinérgica desses solventes, com o objetivo de uma melhor extração (MONKS et al., 2011; LIM et al., 2002).

Monks et al. (2011) testaram mistura de acetona: metanol (7:3 v/v), etanol: diclorometano (1:3 v/v) e etanol: acetato de etila (1:3 v/v), obtendo melhores resultados para acetona: metanol, com um conteúdo de carotenoides de 2875,23 µg/L.

Maciás-Sanchez (2009) adicionaram etanol ao dióxido de carbono pressurizado como co-solvente, tendo um rendimento aumentado na extração de carotenoides. Neste caso, as ótimas condições de pressão de temperatura foram 500 bar e 60°C para *Nannochloropsis gaditana* e para *Dunaliella salina* foram 400 bar e 60°C.

3.3.4 Considerações Finais

Após as considerações apresentadas, verifica-se a importância de se obter carotenoides de fontes biotecnológicas, tendo em vista seu grande emprego na área alimentícia e farmacêutica. Além disso, a relevância de se avaliar diferentes métodos de ruptura celular, visando à recuperação de biocompostos intracelulares de interesse.

A levedura *X. dendrorhous*, tem sido objeto de alguns estudos desde que foi descoberta como produtora natural do carotenoide astaxantina, obtendo níveis promissores do mesmo (WANG et al., 2006).

Hu et al. (2006) investigaram o efeito do pH no processo de produção de carotenoides pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, com meio de cultivo contendo 80 g/L de glicose, 8 g/L de extrato de levedura. O cultivo foi realizado em agitador rotatório a 200 rpm, 20°C durante 7 dias, avaliando os pH iniciais de: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. Concluiu-se que o pH mais adequado para o crescimento celular é 6,0, para a produção de astaxantina específica (1,52 mg/g).

Hu et al. (2007) estudaram a recuperação de astaxantina pela levedura *X. dendrorhous* através da fermentação em batelada alimentada e controle de pH. A produção foi realizada em meio YM (10 g/L de glicose, 3 g/L de extratos de malte e levedura e 5 g/L de peptona). Os resultados mostraram que a fermentação em batelada alimentada com a estratégia de mudança do pH foi o melhor alcançando uma concentração máxima de astaxantina de 39,47 mg/L com 132 h.

Em relação a diferentes métodos de ruptura celular, não há muitos estudos na literatura. Silva (2009), avaliando a utilização de água de parboilização de arroz como meio de cultura na bioprodução através da levedura *Phaffia rhodozyma* (formalmente *X. dendrorhous*), utilizou método de autólise de células liofilizadas com 2 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) com homogeneização em vórtex obtendo níveis máximos otimizados de 538 µg/g de carotenoides específicos.

Storebakken et al. (2004), avaliaram os efeitos da ruptura celular enzimática da levedura *X. dendrorhous* produtora de astaxantina, utilizada como ração na alimentação de trutas. A levedura foi submetida a três graus diferentes de ruptura

celular, o que resultou no aumento da extração de 45, 70 e 97% em relação a levedura não tratada, concluindo que, a ruptura da parede celular é fundamental para otimizar a produção de carotenoides, sejam eles totais ou específicos.

Não há relatos de ruptura celular empregando ultrassom para a levedura, apesar de o mesmo ser uma tecnologia limpa, pois consegue recuperar carotenoides sem a utilização de compostos tóxicos, facilitando assim, com que os mesmos sejam utilizados em produtos alimentícios sem apresentar riscos à saúde do consumidor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados as etapas da bioprodução, ruptura celular e de extração, visando à recuperação de carotenoides.

4.1 Bioprodução de carotenoides totais

A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 foi utilizada na bioprodução dos carotenoides devido ao fato de ser uma excelente produtora do carotenoide astaxantina. Inicialmente, a cultura liofilizada foi hidratada em meio YM (*Yeast Malt Extract*): 3 g/L de extrato de levedura (Vetec), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L de peptona (Himedia) e 10 g/L de glicose (Vetec). Uma alçada da suspensão foi adicionada em placas contendo YMA (Ágar YM, preparado da mesma maneira citada anteriormente adicionado de 30 g/L de ágar) e incubadas a 25°C por 2 a 4 dias. Posteriormente, as placas contendo a cultura foram armazenadas a 5°C.

Inicialmente, a bioprodução dos carotenoides foi realizada em frascos agitados contendo 100 mL de meio YM. Após a esterilização a 121°C durante 15 minutos em autoclave (Phoenix, modelo AV75), os frascos foram inoculados com uma alçada de células, e incubados a 25°C, 150 rpm, sem iluminação por aproximadamente 96 horas em agitador orbital (New Brunswick Scientific- Series Excella E25).

4.1.1 Delineamento experimental

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições na maximização e/ou otimização da bioprodução foi utilizado metodologia de planejamento de experimentos. Inicialmente, um planejamento do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais (HAALAND, 1989). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 1. A matriz do planejamento experimental Plackett-Burman e as respostas encontram-se descritas na Tabela 13. Nestes ensaios foram empregados os

sistemas de ruptura celular e extração otimizados, conforme serão descritos nos itens 4.2.3.

Tabela 1- Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett- Burman.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0*	1
Temperatura (°C)	X ₁	20	25	30
Agitação (rpm)	X ₂	150	180	200
pH	X ₃	4	5	6
Extrato de levedura (g/L)	X ₄	0	5	10
Extrato de malte (g/L)	X ₅	0	5	10
Peptona (g/L)	X ₆	0	5	10
Glicose (g/L)	X ₇	10	20	30

* Triplicata do ponto central. **Variáveis fixas: Tempo de bioprodução: 96 horas

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman realizou-se um planejamento fatorial 2³ completo (2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes). Esse delineamento apresenta ainda dois níveis de variáveis axiais codificadas com - α e + α . O valor de α é função do número de variáveis independentes, sendo definido pela seguinte equação (HAALAND, 1989): $\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,68$. A faixa de estudo de cada variável foi estabelecida a partir dos resultados obtidos no delineamento anterior (Plackett-Burman).

As variáveis independentes estudadas foram extrato de malte, extrato de levedura e glicose, e as variáveis fixadas foram temperatura (25°C), agitação (180 rpm) e pH (4,0). A resposta ou variável dependente estudada foi os carotenoides específicos (µg/g). Na Tabela 2 são apresentadas as variáveis estudadas e seus respectivos níveis.

Tabela 2- Variáveis independentes e níveis empregados no planejamento fatorial 2³ completo.

Variáveis Independentes*	Níveis					
	Códigos	-1,68	-1	0*	1	1,68
Glicose (g/L)	X ₁	33,2	40	50	60	66,8
Extrato de levedura (g/L)	X ₂	3,2	10	20	30	36,8
Extrato de malte (g/L)	X ₃	3,2	10	20	30	36,8

* Triplicata do ponto central **Variáveis fixas: Temperatura: 25°C; Agitação: 180 rpm; pH: 4,0; Peptona: 0 g/L.

4.2 Recuperação dos carotenoides

4.2.1 Preparo das amostras

Para a recuperação dos carotenoides, inicialmente, as células foram separadas em centrífuga (Fanem, modelo 403), a 6000 x g, por 10 min a 5° C. Parte das células separadas foi utilizada *in natura* e parte foi congelada em freezer (Hitachi) a -80°C por aproximadamente 5 h e secas em liofilizador (Edward) por aproximadamente 36 h.

4.2.2 Ensaios preliminares

Afim de encontrar um agente adequado de ruptura para a levedura, determinar melhor forma de célula (*in natura* ou liofilizada) e condições que influenciem o processo, além de testar diferentes solventes de extração e/ou combinações dos mesmos, ensaios preliminares de ruptura e de extração dos carotenoides foram realizados, conforme metodologias descritas por VALDUGA et al. (2011), com modificações e de SILVA (2009), com modificações. Nestes ensaios, foram empregadas as células bioproduzidas em meio YM. A seguir, os métodos de recuperação empregados nos testes preliminares são detalhados:

Método 1 - As células *in natura* (2 g), após centrifugação, foram submetidas a sucessivas macerações em almofariz juntamente com N₂ líquido. Em seguida adicionou-se 4 mL da mistura acetona: metanol (1:1 v/v) e homogeneizou-se,

seguido de centrifugação (6500x g, 5°C, 10 min). O sobrenadante foi separado e foram realizadas extrações sucessivas (2 a 3 extrações), até que o solvente e as células permanecessem sem coloração.

Método 2 - As células *in natura* (2 g), após centrifugação, foram submetidas a sucessivas macerações em almofariz juntamente com N₂ líquido. No pellet macerado foram adicionados 4 mL de dimetilsufóxido (DMSO), a amostra foi pré-aquecida a 55°C/30 min e homogeneizada periodicamente. Em seguida, adicionou-se 2 mL da mistura acetona: metanol (1:1 v/v) e foi realizada centrifugação (6500xg, 5 °C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração.

Método 3 - Às células *in natura* previamente maceradas com N₂ líquido, foram adicionados 4 mL de solução tampão Tris-HCl (Merck) 20 mM (pH 8,0) e homogeneizou-se. Em seguida, o tampão foi eliminado por centrifugação. Posteriormente, os carotenoides das células foram extraídos com 2 mL de uma mistura acetona: metanol (7:3 v/v) e centrifugados a 6500xg a 5 °C por 10 min. O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração.

Método 4 - Nas células *in natura* (2 g) adicionaram-se 2 mL de dimetilsufóxido - DMSO (Nuclear), homogeneizou-se e a suspensão foi pré-aquecida a 55 °C/10 min (Fanem 102). Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato de sódio (Merck) 1 M (pH = 7,0), agitou-se, centrifugou-se (6500xg, 5 °C, 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, adicionou-se 2 mL da mistura hexano: acetato de etila (1:1 v/v), seguida de centrifugação. O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração.

Método 5 - As células *in natura* (2 g), após centrifugação, foram submetidas a rompimento celular com a adição de 4 mL de dimetilsufóxido (DMSO), a solução foi aquecida a 55° C/30 min e homogeneizada periodicamente. Em seguida, adicionou-se 2 mL da mistura acetona: metanol (7:3 v/v) e centrifugou-se (6500xg, 5°C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração.

Métodos 6, 7 e 8 - A etapa de rompimento celular *in natura* foi realizada com maceração em almofariz com N₂. As extrações foram realizadas, com 2 mL de acetona, acetona: metanol (6:4, v/v), metanol:éter de petróleo (6:4, v/v), respectivamente.

Métodos 9, 10, 11, 12, 13 e 14 - A etapa de rompimento celular foi realizada da mesma forma que no tratamento 2. As extrações foram realizadas, com 2 mL da mistura acetona: metanol (7:3, v/v), acetona: metanol (1:1, v/v), clorofórmio: metanol (1:1, v/v), metanol:éter de petróleo (9:1, v/v), hexano:acetato de etila (1:1, v/v) e metanol:éter de petróleo (7:3, v/v), respectivamente.

Métodos 15 e 16 - Foram utilizadas 2 g de células *in natura* e 0,05 g de células liofilizadas, respectivamente e adicionados 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizadas e deixando a reação ocorrer por 30 min. Após a ruptura foram adicionados 6 mL de acetona para facilitar a extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada a 6500xg por 10 min, a fase solvente separada e o procedimento de ruptura repetido, até o branqueamento total da célula. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20 % (m/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases foi realizado uma filtração com adição de sulfato de sódio (Na₂SO₄), e retirada a fase sobrenadante com auxílio de pipeta.

Métodos 17, 18 e 19 – Com o objetivo de determinar melhor frequência ultrassônica e melhor solvente a ser utilizado, foram utilizadas 0,05 g de célula liofilizada e 4 mL de solvente, submetidos a testes de rompimento celular em sistema ultrassônico com uma temperatura de 4°C por um tempo de 40 minutos, onde foram testadas três faixas de frequência ultrassônica: 40 KHz (frequência máxima), 28 KHz (70 % da frequência máxima) e 16 KHz (40 % da frequência máxima), seguindo metodologia descrita por SILVA (2009), com modificações. Para determinar o solvente adequado a ser utilizado na extração, foi testado a acetona e combinação de acetona: metanol (7:3 v/v), segundo metodologia de VALDUGA et al. (2011). Com ambos solventes, realizaram-se lavagens sucessivas até que o solvente ou a célula permanecessem sem coloração.

4.2.3 Delineamento experimental: Ruptura Celular e extração

De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares, realizaram-se experimentos empregando metodologia de planejamento de experimentos (Planejamentos sequenciais), a fim de avaliar os efeitos das condições operacionais do rompimento celular (células liofilizadas) e da extração, na recuperação dos carotenoides. Nestes ensaios, foram empregadas as células bioproduzidas em meio YM (conforme descrito no item 4.1).

a) Ruptura celular com Dimetilsulfóxido (DMSO)

Um planejamento fatorial 2^2 completo foi utilizado para otimizar as condições operacionais da ruptura celular com DMSO. As variáveis independentes de estudo foram a agitação e tempo de reação (Tabela 3) e as variáveis fixas foram a quantidade de célula liofilizada (0,05 g), temperatura (35°C) e volume de DMSO (2 mL). Posteriormente, extraiu-se os carotenoides com 4 mL de acetona.

Tabela 3- Variáveis Independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 completo para o rompimento celular com dimetilsulfóxido.

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Níveis</i>					
	<i>Códigos</i>	<i>-1,41</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,41</i>
Agitação (rpm)	X ₁	107,7	120	150	180	192,3
Tempo (min)	X ₂	17,7	30	60	90	102,3

*Variáveis Independentes Fixas: 0,05g de célula liofilizada, temperatura de 35°C, volume de DMSO (2 mL).

Após serem submetidas aos intervalos de tempo e agitação, de acordo com o descrito no planejamento, as células foram adicionadas de 4 mL de solvente (acetona) e centrifugadas (6500 rpm/10min/5°C). Foram realizadas sucessivas lavagens, até branqueamento total da célula.

A variável dependente (resposta) foi a quantidade de carotenoides específicos.

b) Ruptura celular com banho Ultrassônico

Os experimentos para ruptura celular seguiram metodologia descrita por Medeiros *et al.* (2008), com modificações e, também, baseados nos ensaios preliminares realizados anteriormente. Empregou-se um banho de ultrassom (Unique UltraSonic Cleaner, modelo: USC- 1800^a), frequência máxima de US: 40 KHz, potência US: 154 W. Os ensaios foram realizados em frascos âmbar. As variáveis tempo de reação e temperatura do banho foram definidas através de planejamento fatorial 2² completo e fixou-se a quantidade de células liofilizadas (0,05 g), frequência (40 KHz) e volume de solvente (4 mL de acetona:metanol 7:3 v/v).

Tabela 4- Variáveis Independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2² completo para o rompimento celular empregando sistema ultrassônico.

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Níveis</i>					
	<i>Códigos</i>	<i>-1,41</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,41</i>
Tempo (min)	X ₁	42	46	56	66	70
Temperatura (°C)	X ₂	7	11	19	27	30

*Variáveis Independentes Fixas: 0,05 g de célula liofilizada, frequência ultrassônica máxima (40 KHz), 4 mL de acetona:metanol (7:3 v/v).

Após serem submetidas à sonicação, de acordo com o descrito no planejamento, as células foram adicionadas de 4 mL da mistura acetona: metanol (7:3 v/v) e centrifugadas (6500 rpm/10min/5°C). Foram realizadas sucessivas lavagens, até branqueamento total da célula. A quantidade de carotenoides específicos foi quantificada espectrofotometricamente.

A variável dependente (resposta) foi a quantidade de carotenoides específicos.

4.3 Metodologia analítica

4.3.1 Determinação de carotenoides totais

A absorbância da amostra após extração foi medida em espectrofotômetro (Perkin Elmer- Lambda 35). A concentração total de carotenoides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 474 nm, utilizando a Equação 1 descrita por Davies (1976).

$$CE = \frac{A * V * 10^6}{A_{1cm} * 100 * m} \quad (1)$$

Onde:

CE = Carotenoides específicos (µg/g); A = absorbância, V = volume de corante produzido (mL), A_{1cm} = coeficiente de extinção para as xantofilas (1600) e m = massa de célula utilizada (g).

4.4 Tratamentos estatísticos

Os resultados da recuperação de carotenoides foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos e/ou Análise de variância – ANOVA, com auxílio do software Statistica versão 8.0, com nível de significância de 95 % de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados referentes ao rompimento celular empregando diferentes métodos (DMSO, N₂ líquido, ultrassom) e posterior otimização do método mais adequado, bem como métodos de extração de carotenoides bioproduzidos pela levedura *X. dendrorhous*.

5.1 Influência do agente de ruptura celular e condições de extração na recuperação de carotenoides

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nos testes preliminares para recuperação de carotenoides em função do método de ruptura celular e de extração.

Tabela 5- Influência do agente de ruptura e de condições de extração na resposta dos carotenoides específicos.

Ensaio	Carotenoides específicos * (µg/g)
1	0,0030 ^d ± 0,00015
2	0,0027 ^d ± 0,00013
3	0,0053 ^c ± 0,00026
4	0,0005 ^f ± 0,00001
5	0,0024 ^d ± 0,00011
6	0,0027 ^d ± 0,00012
7	0,0056 ^c ± 0,00015
8	0,0066 ^c ± 0,00020
9	0,0027 ^d ± 0,00021
10	0,0021 ^d ± 0,00032
11	0,0010 ^e ± 0,00012
12	0,0028 ^d ± 0,00021
13	0,0052 ^c ± 0,00032
14	0,0046 ^c ± 0,00025
15	8,32 ^b ± 0,05100
16	595,35 ^a ± 1,1500

* média ± desvio padrão seguido de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (Teste de Tukey)

De acordo com resultados obtidos, observa-se que a utilização de célula *in natura* não foi eficaz para os tratamentos de ruptura celular e de extração empregados. A máxima recuperação de carotenoides foi verificada no Ensaio 16, onde empregou-se 0,05 g de célula liofilizada, 2 mL de DMSO e acetona como agente de extração. Em função dos resultados obtidos, os ensaios subsequentes foram realizados com células liofilizadas.

Resultado semelhante foi obtido por Silva (2009), que obteve uma recuperação de carotenoides de *X. dendrorhous* de 538,4 µg/g ao utilizar método de ruptura de célula liofilizada com 2 mL de DMSO com homogeneização em vórtex e extração com 6 mL de acetona.

Valduga et al. (2011), empregando diferentes métodos de rompimento celular de *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636, e extração, obtiveram uma concentração máxima de carotenoides específicos de 313,8 µg/g empregando maceração com N₂ líquido combinada a DMSO.

Colet (2012) otimizando condições de produção de carotenoides e células em bioreator, com pH inicial de 4, 180 rpm e T° de 25°C, em meio composto de 80 g/L de glicerol bruto, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte com a levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 e empregando método combinado de ruptura de N₂ líquido com DMSO em células *in natura*, obteve 817,1 µg/g de carotenoides.

A Tabela 6 apresenta a recuperação dos carotenoides específicos ao empregar sistema ultrassônico de rompimento celular e diferentes solventes na extração. Para manter a temperatura do banho ultrassônico em 4°C, a água do mesmo foi parcialmente substituída por água gelada conforme necessário.

Tabela 6- Carotenoides específicos recuperados empregando sistema ultrassônico no rompimento celular e diferentes solventes na extração.

Ensaio	Frequência (KHz)	Carotenoides específicos *	
		(µg/g)	
		Acetona	Acetona:Metanol (7:3 v/v)
17	16	78,75 ^{bc} ± 0,02	168,12 ^{ac} ± 0,5
18	28	378,45 ^{bb} ± 0,9	428,12 ^{ab} ± 0,7
19	40	419,75 ^{ba} ± 0,8	563,37 ^{aa} ± 0,9

* médias ± desvio padrão seguidas de letras minúsculas/maiúsculas nas linhas/colunas indicam não haver diferença significativa á nível de 5% (Teste “*t student*”/Teste Tukey).

De acordo com a Tabela 6, verifica-se que a máxima recuperação de carotenoides foi de 563,37 µg/g (Ensaio 19), ao empregar o rompimento celular com a frequência ultrassônica máxima de 40 KHz e a extração com a mistura acetona:metanol (7:3 v/v). Assim, essas condições foram adotadas para experimentos realizados posteriormente.

5.2 Otimização das condições operacionais da ruptura celular

5.2.1 Ruptura celular com DMSO

A Tabela 7 apresenta a matriz do Planejamento fatorial 2² completo com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em carotenoides específicos, empregando sistema de ruptura celular com DMSO e extração com acetona.

Tabela 7- Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos após tratamento de ruptura celular com DMSO.

<i>Ensaio</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>		<i>Respostas</i>
	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>Carotenoides específicos (µg/g)</i>
1	-1 (120)	-1 (30)	526,25
2	1 (180)	-1 (30)	416,25
3	-1 (120)	1 (90)	481,25
4	1 (180)	1 (90)	613,75
5	-1,41 (107,7)	0 (60)	503,43
6	1,41 (192,3)	0 (60)	478,12
7	0 (150)	-1,41 (17,7)	366,25
8	0 (150)	1,41 (102,3)	680,00
9	0 (150)	0 (60)	607,50
10	0 (150)	0 (60)	580,00
11	0 (150)	0 (60)	613,75

*X₁= agitação (rpm); X₂= tempo (min). Variáveis fixas: 0,05g de célula liofilizada, 35°C.

De acordo com a Tabela 7, é possível verificar que no Ensaio 8, com agitação de 150 rpm e 102 min de reação, obteve-se a maior recuperação de carotenoides específicos de 680 µg/g. Resultado similar foi obtido no Ensaio 11, com a mesma agitação e 60 min de reação, com uma recuperação de 613,75 µg/g. Estes resultados podem ser melhor visualizados pela Tabela 8, a qual apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para os carotenoides específicos. A agitação e o tempo quadrático mostraram uma influência negativa ($p < 0,05$) e o tempo linear e a interação das variáveis com efeitos positivos, sobre os carotenoides específicos. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 9).

Tabela 8- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para os carotenoides específicos empregando o sistema DMSO.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	600,09	10,37	57,89	0,0003
(1)Agitação (L)	-3,30	12,71	-0,26	0,819
Agitação (Q)*	-108,64	15,18	-7,15	0,019
(2)Tempo (L)*	149,48	12,69	11,78	0,007
Tempo (Q)*	-75,41	15,06	-5,00	0,038
1L.2L*	121,25	17,95	6,75	0,021

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

A Equação 2 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve os carotenoides específicos em função das variáveis analisadas (agitação e tempo), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 9), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,87 e o F calculado de 3,58 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção de superfície de resposta e de curva de contorno apresentadas na Figura 2. O coeficiente de correlação quantifica a qualidade do ajuste, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, variando de 0 a 100 % (RODRIGUES e IEMMA, 2005). O valor de F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado, ou seja, sempre que esta relação for maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes (BARROS, 1996).

Tabela 9 - Análise de variância para a ruptura celular com DMSO e resposta em carotenoides específicos, do planejamento fatorial 2² completo.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	78658	3	26219,23	15,56
Resíduo	11796	7	1685,21	
Falta de Ajuste	11151,70	5		
Erro Puro	644,79	2		
Total	90454,18	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,87, F_{tab,95%}=4,35

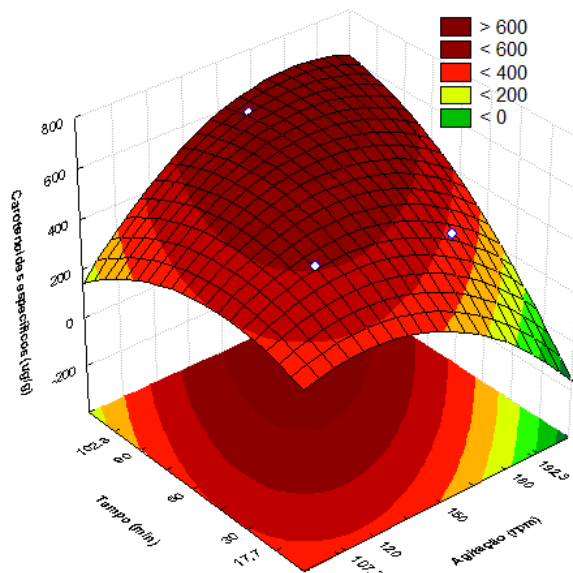
Equação 2:

$$CE = 600,090 - 108,643 X_1^2 + 149,484 X_2 - 75,407 X_2^2 + 121,250 X_1 X_2 \quad (2)$$

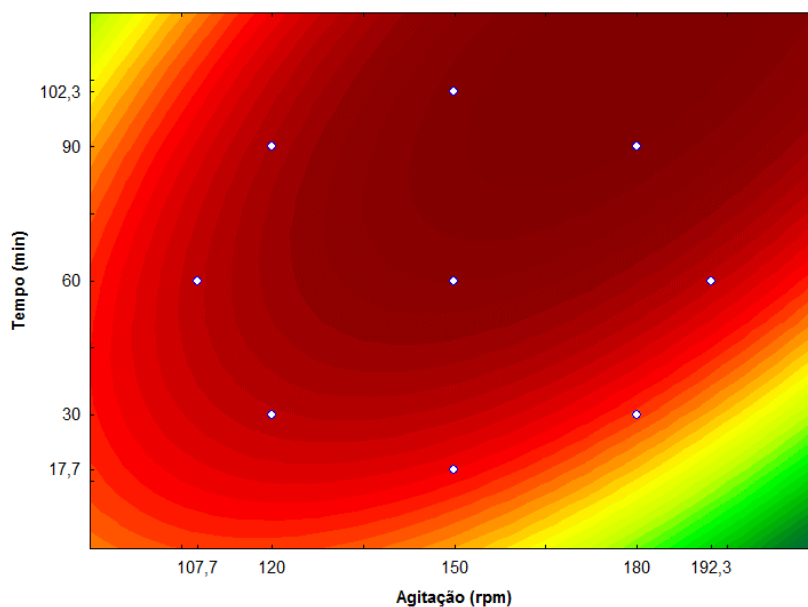
Onde:

CE = Carotenoides específicos (µg/g); X₁= agitação (rpm); X₂= Tempo (min)

Figura 2- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para recuperação de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) em função da agitação (rpm) e tempo (min), respectivamente.



(a)



(b)

Conforme observado na Figura 2a e 2b, há uma região de máxima recuperação de carotenoides, na faixa de 150 a 180 rpm e tempo de reação próximo a 90 min.

Silva (2009), realizando homogeneização da célula de *P. rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) com o agente de ruptura em vórtex, durante 30 min, obteve uma recuperação de carotenoides de 538,4 µg/g. A partir disso, em comparação com o presente trabalho, observa-se que a alternativa de homogeneização em agitador orbital (shaker) se mostrou eficaz, para que uma ruptura adequada ocorresse, possibilitando assim, uma maior recuperação de carotenoides específicos.

Moriel et al. (2004), otimizou a biomassa e a produção de astaxantina pela levedura *X. dendrorhous* ATCC 24202 usando frascos agitados com 150 rpm, 24°C e 48 h, obtendo 364,59 µg/g de astaxantina. Ao comparar os resultados obtidos, no presente estudo, com os do referido autor, verifica-se que são superiores, e demonstrando que o método com dimetilsulfóxido é promissor na recuperação de carotenoides, visto que, segundo LIU, et al. (2006), a astaxantina é o carotenoide produzido majoritariamente por essa levedura.

5.2.2 Ruptura celular com sistema ultrassônico

A Tabela 10 apresenta a matriz do Planejamento fatorial 2² completo com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em carotenoides específicos, empregando sistema ultrassônico e extração com acetona: metanol (7:3 v/v).

É possível observar que, no banho ultrassônico, quando utilizou-se uma temperatura de 30°C durante um tempo de exposição de 56 minutos (Ensaio 8- Tabela 10), houve a maior recuperação de carotenoides específicos (614,25 µg/g), o que demonstra que o método além de ser uma tecnologia limpa, é eficaz para a recuperação dos carotenoides específicos.

Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos após tratamento de ruptura celular com sistema ultrassônico.

<i>Ensaíos</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>		<i>Carotenoides específicos</i> ($\mu\text{g/g}$)
	X_1	X_2	
1	-1 (46)	-1 (11)	264
2	1 (66)	-1 (11)	535
3	-1 (46)	1 (27)	510
4	1 (66)	1 (27)	390,47
5	-1,41 (42)	0 (19)	201,56
6	1,41 (70)	0 (19)	322,5
7	0 (56)	-1,41 (7)	426,37
8	0 (56)	1,41 (30)	614,25
9	0 (56)	0 (19)	580
10	0 (56)	0 (19)	589
11	0 (56)	0 (19)	586,25

* X_1 = tempo (min); X_2 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Variáveis fixas: 0,05 g de célula liofilizada, frequência ultrassônica máxima (40Khz), 2 mL de solvente (acetona:metanol, 7:3, v/v).

Estes resultados podem ser melhor visualizados pela Tabela 11, a qual apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para os carotenoides específicos. O tempo e a temperatura quadrática, e a interação entre tempo e temperatura mostraram uma influência negativa ($p < 0,05$) sobre os carotenoides específicos. Já o tempo e a temperatura linear influenciaram positivamente ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para os carotenoides específicos empregando sistema ultrassônico de ruptura celular.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	586,74	2,66	220,63	0,000021
(1)Tempo (L)*	81,00	3,28	24,71	0,0016
Tempo (Q)*	-312,67	3,95	-79,17	0,00016
(2)T° (L)*	88,85	3,25	27,36	0,0013
T° (Q)*	-46,93	3,77	-12,44	0,0064
1L.2L*	-195,26	4,61	-42,34	0,00056

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 3 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve os carotenoides específicos em função das variáveis analisadas (temperatura e tempo), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 12), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,97 e o F calculado de 18,44 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção de superfície de resposta e de curva de contorno apresentadas na Figura 3.

Conforme a Figura 3 percebe-se a influência das variáveis temperatura e tempo, na recuperação dos carotenoides. Observa-se na Figura 3a e 3b que existe um máximo de recuperação de carotenoides, situando-se próximos ao ponto central de tempo (56 min) e temperatura em torno de 19°C. Dessa forma, a fim de otimizar o processo, utilizando menor energia possível, selecionou-se a temperatura ambiente (22±3°C) a ser utilizada nos tratamentos de ruptura celular empregando sistema ultrassônico.

Tabela 12- Análise de variância para a ruptura celular com sistema ultrassônico e resposta em carotenoides específicos, do planejamento fatorial completo 2².

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	202924	3	67641,27	80,23
Resíduo	5902	7	843,12	
Falta de Ajuste	5859,40	5		
Erro Puro	42,50	2		
Total	208825,70	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,97, F_{tab,95%}=4,35

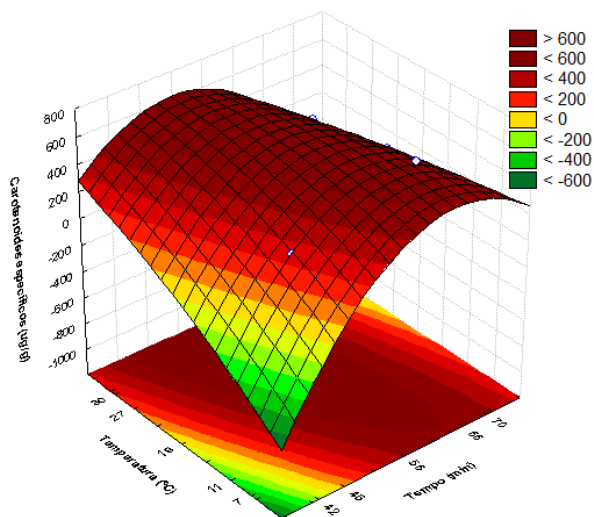
Equação 3:

$$CE = 586,74 + 81,01 X_1 - 312,67 X_1^2 + 88,85 X_2 - 46,93 X_2^2 - 195,26 X_1 X_2 \quad (3)$$

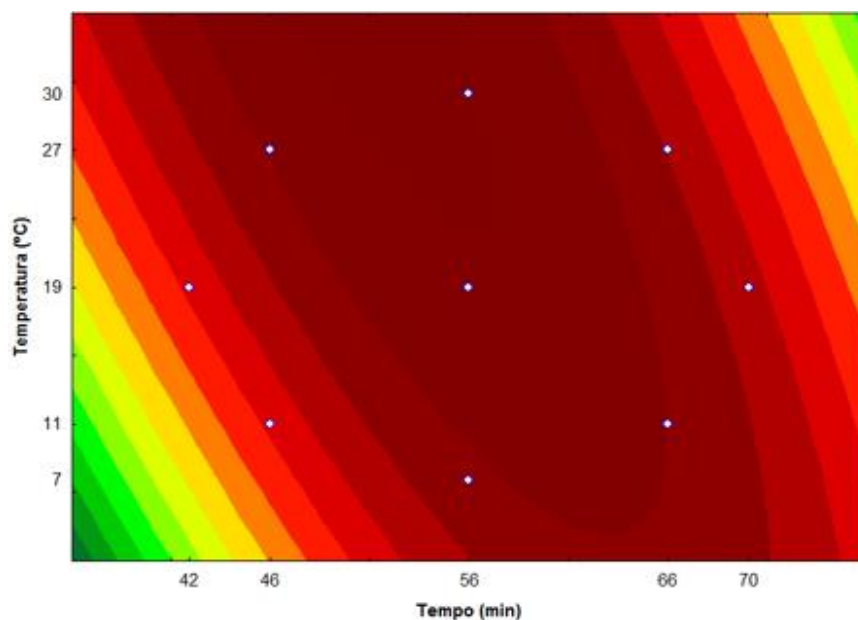
Onde:

CE = Carotenoides específicos (µg/g); X₁= tempo (min); X₂= Temperatura (°C).

Figura 3- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para recuperação de carotenoides específicos $\mu\text{g/g}$ em função do tempo (min) e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).



(a)



(b)

Monks et al. (2013) utilizando a levedura *S. salmonicolor* para a produção de carotenoides e empregando o método de ultrassom (4 ciclos de 10 min a 40 KHz em 4°C), obteve resultados inferiores ao do presente estudo, de cerca de 6,072 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos e ao combinar o método ultrassônico com a adição de

bicarbonato de sódio, a recuperação foi de cerca de 11,396 µg/g de carotenoides específicos. Porém, esta diferença poderá estar relacionada a composição da parede celular das diferentes leveduras, visto que, os pigmentos se encontram nas mesmas, intracelularmente.

Sarada et al. (2006) estudou um método de extração de astaxantina de *H. pluvialis* sem homogeneização, o que pode se assemelhar ao método de ultrassom, onde a extração do solvente foi facilitada pelo tratamento das células com HCl 4N em uma temperatura de 70°C, onde foi obtida uma extração de aproximadamente 90% dos pigmentos.

O método ultrassônico, além de ser uma tecnologia limpa, torna-se uma tecnologia promissora para rompimento celular da levedura *X. dendrorhous*, pois os resultados foram semelhantes quando comparado ao rompimento celular químico com DMSO.

5.3 Otimização da bioprodução de carotenoides

Neste item serão apresentados os resultados dos efeitos das condições operacionais e do meio da bioprodução de carotenoides por *X.dendrorhous*, empregando a ruptura celular em sistema ultrassônico otimizado.

5.3.1 Ultrassom

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento tipo Plackett-Burman com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em carotenoides específicos (µg/g) para tratamento de ruptura celular realizado com ultrassom.

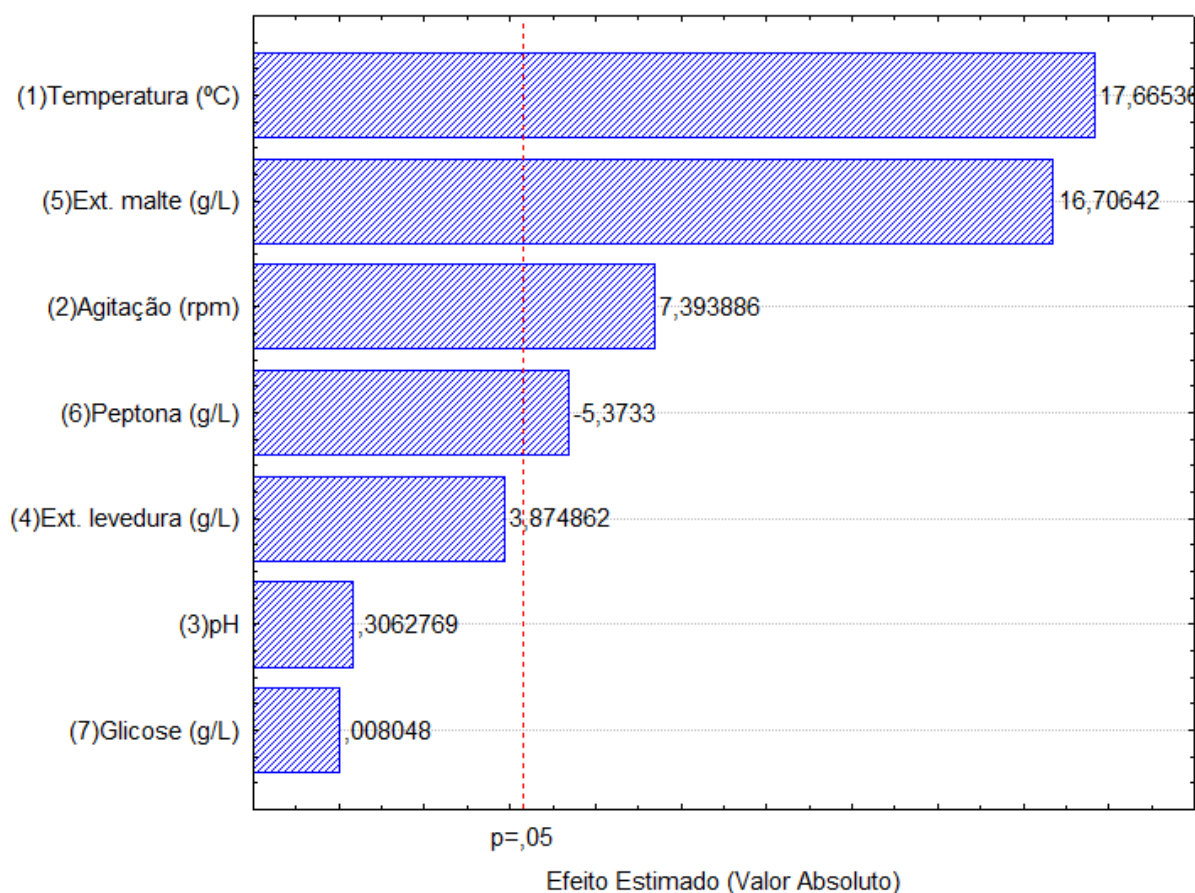
Tabela 13- Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores reais e codificados) e respostas em carotenoides específicos em rompimento celular realizado com ultrassom.

<i>Ensaio</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>							<i>Respostas</i>
	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>X₃</i>	<i>X₄</i>	<i>X₅</i>	<i>X₆</i>	<i>X₇</i>	<i>Carotenoides específicos (µg/g)</i>
1	1 (30)	-1(150)	1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	418,38
2	1 (30)	1 (200)	-1 (4)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	266,25
3	-1 (20)	1 (200)	1 (6)	-1 (0)	1 (10)	-1 (0)	-1 (10)	440,00
4	1 (30)	-1 (150)	1 (6)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	-1 (10)	319,00
5	1 (30)	1 (200)	-1 (4)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (30)	463,75
6	1 (30)	1 (200)	1 (6)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	-1 (10)	191,25
7	-1(20)	1 (200)	1 (6)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	1 (30)	237,5
8	-1 (20)	-1 (150)	1 (6)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (30)	191,25
9	-1 (20)	-1 (150)	-1 (4)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	-1 (10)	361,25
10	1 (30)	-1 (150)	-1(4)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (30)	341,00
11	-1 (20)	1 (200)	-1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	1 (10)	1 (30)	281,25
12	-1 (20)	-1 (150)	-1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	76,78
13	0 (25)	0 (180)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (20)	237,50
14	0 (25)	0(180)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (20)	250,00
15	0 (25)	0 (180)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (20)	247,50

*X1=Temperatura (°C); X2= Agitação (rpm); X3=pH; X4=Extrato de levedura (g/L); X5=Extrato de malte (g/L); X6=Peptona (g/L); X7= Glicose (g/L)

Conforme resultados apresentados na Tabela 13, a máxima recuperação de carotenoides específicos foi de 463,65 µg/g (Ensaio 5), onde o meio de cultivo apresentava as maiores concentrações de glicose (30 g/L) e sem adição de peptona, nesse ensaio também foram utilizadas as maiores faixas de temperatura (30°C) e pH (4). A Figura 4 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas.

Figura 4- Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental do tipo Plackett–Burman, para a recuperação de carotenoides específicos (µg/g).



Verifica-se (Figura 4) que as variáveis temperatura, extrato de malte, glicose, agitação e extrato de levedura apresentaram efeito significativo positivo a nível de confiança de 95%, demonstrando que quando a concentração e/ou faixa desta

variável aumentar do nível -1 para o +1, possivelmente ocasionará um incremento no valor da produção de carotenoides. Entretanto, a variável peptona apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) negativo, sendo assim, excluída do meio de cultura utilizado para bioprodução de carotenoides. De acordo com os resultados obtidos com o planejamento tipo Plackett–Burman (Tabela 13), as faixas das variáveis foram deslocadas. A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 e as respostas em carotenoides específicos. A máxima recuperação de carotenoides foi de 697,75 $\mu\text{g/g}$ (Ensaio 7- 40 g/L de glicose e 30 g/L de extratos de malte e levedura).

Tabela 14- Matriz do planejamento fatorial 2^3 completo (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos.

Ensaíos	Variáveis Independentes*			Carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$)
	X_7	X_4	X_5	
1	-1 (40)	-1 (10)	-1 (10)	426,50
2	1 (60)	-1 (10)	-1 (10)	446,50
3	-1 (40)	1 (30)	-1 (10)	439,00
4	1 (60)	1 (30)	-1 (10)	477,75
5	-1 (40)	-1 (10)	1 (30)	562,75
6	1 (60)	-1 (10)	1 (30)	440,00
7	-1 (40)	1 (30)	1 (30)	697,75
8	1 (60)	1 (30)	1 (30)	430,00
9	0 (50)	0 (20)	0 (20)	536,50
10	0 (50)	0 (20)	0 (20)	400,00
11	0 (50)	0 (20)	0 (20)	466,50
12	0 (50)	0 (20)	-1,68 (3,2)	486,50
13	0 (50)	0 (20)	1,68 (36,8)	516,50
14	0 (50)	-1,68 (3,2)	0 (20)	477,75
15	0 (50)	1,68 (36,8)	0 (20)	586,50
16	-1,68(33,2)	0 (20)	0 (20)	585,25
17	1,68 (66,8)	0 (20)	0 (20)	587,75

* X_7 = Glicose (g/L), X_4 = Extrato de levedura (g/L), X_5 = Extrato de malte (g/L). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 30°C e $\text{pH}_{\text{inicial}}=4,5$.

A Tabela 15 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para carotenoides específicos. Verifica-se que todas as variáveis estudadas exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a produção de carotenoides.

Tabela 15- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2³.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média	545,53	0,722	812,90	0,000002
(1)Glicose (L)*	-41,12	0,338	-121,51	0,000068
Glicose (Q)*	-38,31	0,373	-102,77	0,000095
(2)Ex.Lev. (L)*	14,83	0,338	43,82	0,000520
Ex.Lev. (Q)*	-35,39	0,373	-94,93	0,000111
(3)Ex. de malte(L)*	20,20	0,338	59,70	0,000280
Ex. de malte(Q)*	-28,08	0,373	-75,32	0,000176
1L.2L*	-15,78	0,442	-35,71	0,000783
1L.3L*	-56,16	0,442	-127,07	0,00062
2L.3L*	10,16	0,442	22,98	0,001888

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a produção de carotenoides e em função das variáveis analisadas (glicose, extrato de malte e extrato de levedura), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 16), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,92 e o F calculado de 1,22 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 5.

Tabela 16- Análise de variância para a produção de carotenoides do planejamento fatorial completo 2³.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	85007	9	9445,26	4,51
Resíduo	14633	7	2090,37	
Falta de Ajuste	14629,49	5		
Erro Puro	3,13	2		
Total	99639,93	16		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,92, F_{tab,95%}=3,68

Equação 4:

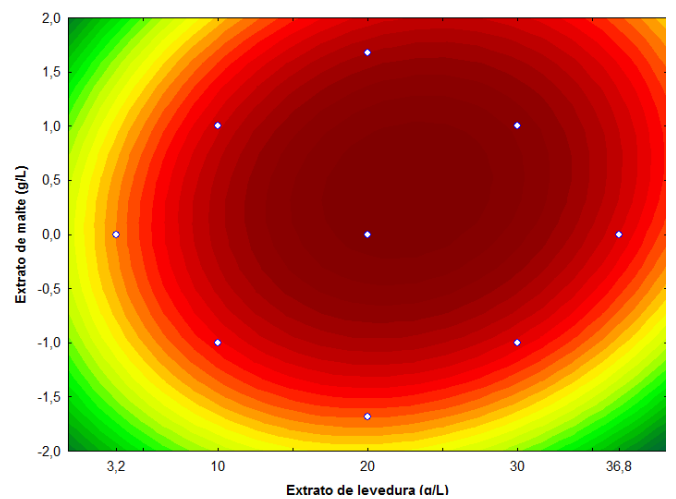
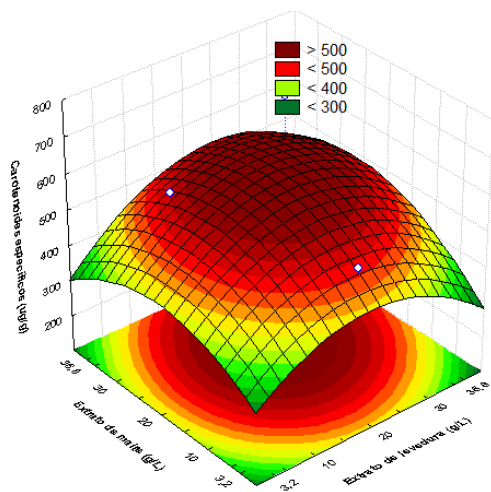
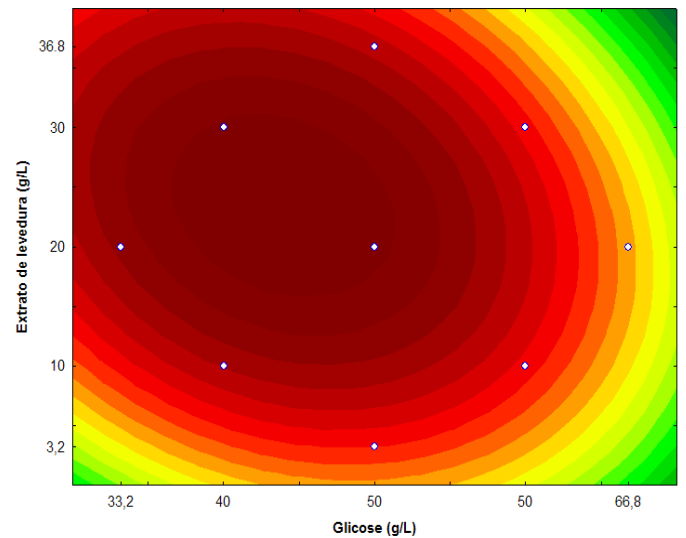
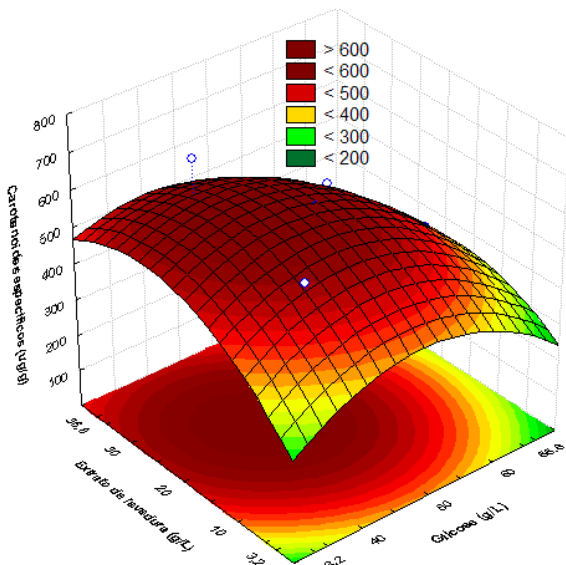
$$CE = 585,74 - 41,12 X_7 - 38,31 X_7^2 + 14,83 X_4 - 35,39 X_4^2 + 20,20 X_5 - 28,08 X_5^2 - 15,78 X_7X_4 - 56,16 X_7X_5 + 10,16 X_4X_5 \quad (4)$$

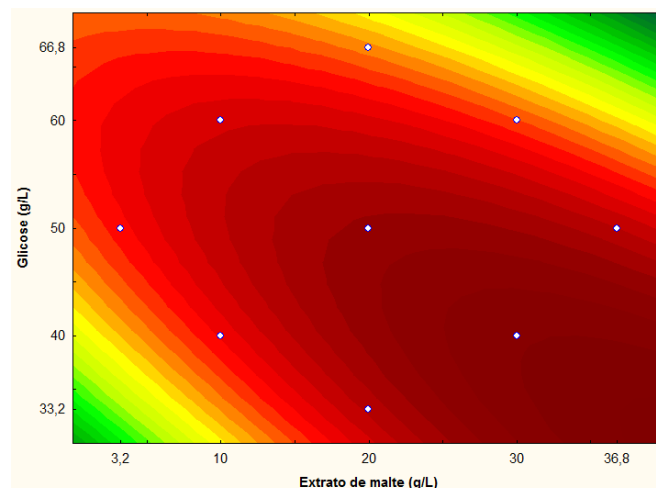
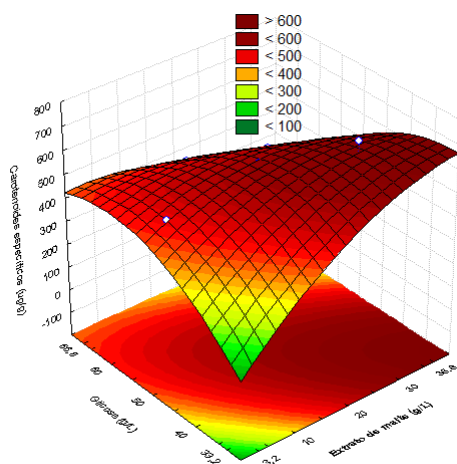
Onde:

CE = Carotenoides Específicos (µg/g); X₇= Glicose (g/L); X₄= Extrato de levedura (g/L); X₅= Extrato de malte (g/L).

A Figura 5 mostra que a máxima produção de carotenoides específicos, encontra-se na região próxima aos pontos centrais de concentrações de extrato de levedura e malte e em concentrações na faixa de 40 a 50 g/L de glicose.

Figura 5- Superfícies de resposta e curvas de contorno para recuperação de carotenoides específicos em função da concentração de extrato de levedura e glicose (a), concentração de extrato de malte e extrato de levedura (b) e concentração de extrato de malte e glicose (c).





Foi possível otimizar a ruptura e a produção através de meio sintético, através do emprego de ultrassom nas condições de 180 rpm, 30°C, pH inicial 4,5 em meio composto por 40 g/L de glicose, 30 g/L de extratos de malte e levedura, obtendo-se uma máxima produção de 697 µg/g de carotenoides específicos.

Além disso, pode-se perceber, que a utilização de um método limpo, além de apresentar vantagens em relação ao uso de compostos tóxicos, apresentou um incremento na recuperação dos carotenoides específicos. Dessa forma, foi possível otimizar as condições de produção em meio sintético, e também a recuperação de carotenoides.

Na literatura científica não há relatos de extração de astaxantina a partir de leveduras utilizando ultrassom como técnica de rompimento e extração. Mas quando comparado às técnicas convencionais utilizadas, o mesmo se mostrou eficaz por além de se tratar de uma técnica não agressiva (possibilitando o uso em alimentos) os resultados obtidos foram similares e/ou superiores aos que utilizam como agente de ruptura substâncias tóxicas.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho foram investigadas diferentes técnicas para o rompimento celular de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 objetivando a recuperação de carotenoides específicos. Foram testados os métodos de ruptura através de dimetilsulfóxido (DMSO) e banho ultrassônico. Além disso, análises da composição do meio de cultura e das condições de bioprodução foram realizadas. A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

Na realização dos testes preliminares, foi possível perceber que o rompimento da parede celular das células in natura não foi eficaz, necessitando-se assim um prévia liofilização para que a extração pudesse ser realizada, fato este que pode estar relacionado a composição da parede celular da levedura.

A ruptura celular realizada com DMSO variando-se agitação e tempo de exposição ao mesmo, alcançou uma recuperação máxima de carotenoides específicos (680 µg/g) quando aplicada uma agitação de 150 rpm durante 102 minutos. No entanto, se o tempo for reduzido para 60 minutos, ocasionando assim, um menor consumo de energia, a recuperação se dá de forma similar. Sendo assim, o menor tempo foi considerado como mais adequado.

A fim de otimizar a recuperação em banho ultrassônico, com a variação do tempo de exposição e da temperatura do banho, os melhores resultados (614,25 µg/g) foram obtidos com um tempo de 56 minutos e uma ampla faixa de temperatura, tendo-se assim, tomado a temperatura ambiente (25°C) como apropriada para realização do procedimento.

Na bioprodução de carotenoides primeiramente foi aplicado planejamento do do tipo Placket- Burman seguido de delineamento fatorial 2^3 completo para avaliar os efeitos da composição do meio de cultivo e das condições de bioprodução, onde foi possível otimizar as condições em meio composto por 40 g/L de glicose e 30 g/L dos extratos de malte e levedura, obtendo-se máxima produção. Pôde-se concluir que a concentração de peptona no meio apresentou efeito negativo, tendo sido assim, eliminada no meio. Fixando-se as condições operacionais de bioprodução em 30°C

e 180 rpm, com um pH inicial do meio de 4,5, os resultados máximos em carotenoides específicos para ruptura com ultrassom foi de 697,75 µg/g.

Portanto, o presente trabalho teve conclusões significativas, visto que, o uso do ultrassom apresentou valores de recuperação de carotenoides específicos em alguns casos similares, e até superiores àqueles encontrados quando utilizando-se DMSO, que é um composto tóxico, e assim, pouco recomendável na utilização. Dessa forma, o processo biotecnológico desenvolvido para a produção e o processo de extração de corantes de micro-organismo, foi eficaz, possibilitando que, posteriormente, caso haja interesse, os mesmos possam ser aplicados em produtos alimentícios.

Através da experiência adquirida neste trabalho, pode-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

- Aplicar os métodos empregados neste estudo para outros micro-organismos;
- Quantificar os carotenoides majoritários através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.
- Realizar a bioprodução do micro-organismo não apenas em frascos agitados, mas também em batelada e/ou batelada alimentada, sistema contínuo com e sem reciclo de células;
- Utilizar resíduos agroindustriais como substrato para meio de cultura;
- Modelagem matemática do processo otimizado;
- Encontrar parâmetro cinético estequiométrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASENJO J. A.; ANDREWS, B. A.; HUNTER, J. B.; LE CORRE, S. Microbial cell- lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 158-164, 1985.
- AKSU, Z.; EREN, A.T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107 – 113, 2007.
- AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997.
- BCC. **Global carotenoids market value by product type, 2010 and 2018**. 2013. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>>. Acesso em: 09 Ago. 2013.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microrganismo. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 351-361, 2004.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**. v. 67, p. 21–33, 2005.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A.; GAETANI M.; TURCHETTI B.; PAGNONI, U. M.; DAVOLI, P. 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**, v. 36, p. 687 – 692, 2005.
- CAMARGO, A. P. S. **Extração supercrítica de astaxantina e lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.
- CHAMPLUVIER, B.; MARCHAL, F.; ROUXHET, P. G. Immobilization of lactase in yeast cells retained in a glass wool matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 422-430, 1989.
- CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of phothosyntethic pigments. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, p. 103-107, 2006.
- COLET, R. Produção de carotenoides por *Sporidiobolus Salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2012.

DA SILVA, M. C. **Alteração na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. Tese (Doutorado em ciência de alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

DAS, A.; YOON, S- H.; LEE, S- L.; KIM, J- Y.; OH, D- K.; KIM; S- W. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 505–512, 2007.

DAVIES, B. H. **Carotenoid**. In T. W. Goodwin (Ed.), **Chemical biochemistry plant pigments**. New York: Academic, 1976.

DAVIOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R.W. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.4, p.392-397, 2004.

EGYHÁZI, A.; DIENES, D.; RECZEY, K.; SIMANDI, B. Examination of Cellulase Enzyme Production by *Trichoderma Reesei* Rut C30 Using Supercritical Carbon Dioxide Cell Disruption. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**. v. 18, n.3, p. 257-261, 2004.

FARCADE, V. D.; HARRISON, S.; PANDIT, A. B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, n. 3, p. 247-257, 2005.

FILHO, G. L.; DE ROSSO, V. V.; MEIRELES, M.A.A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia Uniflora* L.). **The journal of supercritical fluids**, v. 46, p 33-39, 2008.

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

FRANKEN L. P. G.; MARCON, N. S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 511–520, 2010.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K. et al. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, 44:888-894 (1994).

FRICKS, A.T.; SOUZA, D. P. B. ; OESTREICHER , E. G.; ANTUNES, O. A. C. ; GIRARDI, J. S.; OLIVEIRA, D. ; DARIVA, C. Evaluation os radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 347- 353, 2006.

HABULIN, M.; KNEZ, Z. Pressure stability of lipases and their use in different systems. **Acta Chimica Slovenica**, n.48, v.4, p. 521-532, 2001.

HO, C.W.; CHEW, T. K.; LING, T. C.; KAMARUDDIN, S.; TAN, W. S.; TEY, B. T. Efficient mechanical cell disruption of *Escherichia coli* by an ultrasonicator and recovery of intracellular hepatitis B core antigen. **Process Biochemistry**, n.41, p. 1829-1834, 2006.

HOF, K. H. V. H.; WEST, C. E.; WESTSTRATE, J. A.; HAUTVAST, J. G.A.J. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**, v. 130, n.3, p. 503– 506, 2000.

HU, Z.; WANG, Z.; SHEN, Y. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 586-590, 2006.

HU, Z. C.; ZHENG, Y.; WANG, Z.; SHEN, Y. Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 with Fed-Batch Fermentation in 2.0 M³ Fermentor. **Food Technology Biotechnology**, v. 45, p. 209-212. 2007.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*) aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. Porto Alegre, 2005. Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2005.

JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, R. G.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v.93, p. 421-426, 2009.

JOHNSON, E. A. et al. *Astaxanthin formation by the yeast Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, v.115, p. 173-183, 1989.

JOHNSON, E. A.; GIL- HWAN, A. N. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Microbiology and Serology**, v.57, p.191-202, 1990.

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

JOSHI, M. S.; GOWDA, L.R.; KATWA, L.C.; BHAT, S.G. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n.7, p. 439-443, 1989.

KIMBARIS, A. C.; SIATIS, N. G.; DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C. S.; POLISSIOU, M. G. Comparison of distillation and ultrasound-assisted

extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v.13, p. 54-60, 2005.

KONDO, A.; LIU, Y.; FURUTA, M.; FUJITA, Y.; MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H. Preparation high activity whole cell biocatalytic by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n. 10, p. 806-811, 2000.

LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; DEL VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, p. 90-95, 2006.

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

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

LUQUE-GARCÍA, J. L.; DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5682-5690, 2008.

MACHMUDAH, S.; KAWAHITO, Y.; SASAKI, M.; GOTO, M. Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO₂. **The Journal of supercritical fluids**, v. 44, p. 308-314, 2008.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 245-251, 2004.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77. P. 948-952, 2008.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; SERRANO,C. M.; RODRÍGUEZ, M. R.; OSSA, E. M. de La; Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO₂ and ethanol as cosolvent. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, p. 104–113, 2009.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; FERNANDEZ-SEVILLA, J.M.; ACIÉN FERNANDEZ, F.G.; CERÓN GARCIA, M.C.; GRIMMA, E.M. Supercritical fluid extraction of

carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**. V. 123, p. 928–935, 2010.

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

MALDONADE, I. R. **Produção de carotenóides por leveduras. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.**

MATTEA, F.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Carotenoid processing with supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**. v.93, p. 255-265, 2009.

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

MENDES- PINTO, M. M.; Raposo, M. F. J.; BOWEN, J.; YOUNG, A. J.; MORAIS, R. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications. **Journal of Applied Physiology**, v.13, n.1, p. 19-24, 2001.

MERCADANTE, A. Z. Analysis of Carotenoids. In: **Food Colorants: Chemical and Functional Properties**. SOCACIU C. (Ed). CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

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

MONKS, L. **Métodos químicos, físicos e enzimáticos utilizados na ruptura celular de *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, 2012.

MONKS, L.; TIGGAMANN, L.; MAZUTI, M. A.; OLIVEIRA, V. J.; VALDUGA, E. Assesment of Carotenoids Recovery through Cell Rupture os *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food Bioprocess Technology**, v.5, p. 2353-2359, 2011.

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

MORIEL, D. G.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; BONFIM, T. M. B. Optimization of biomass and astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 40, n. 3. 2004.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2000.

NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell wall of several yeast species. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.50, n.206-212, 1998.

PANESAR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; BERA, M.B. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. **Food Chemistry**, v.101, p.786-790, 2007.

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

PATEL, A., MISHRA, S., PAWAR, R., GHOSH, P. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v.40, p. 248-255, 2005.

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

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

RODRIGUES-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008.

SALAZAR, O.; ASENJO J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, Oxford, v. 29, p. 984 – 994, 2007.

SARADA, R.; VIDHYAVATHI, R.; USHA, D.; RAVISHANKAR, G. A. An efficient method of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of agricultural and food Chemistry**, v. 54, p. 7585-7588, 2006.

SEABRA, L. M. J.; PEDROSA, L. F. C. Astaxanthin: structural and functional aspects. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 1041-1050, 2010.

SHI, J.; YI, C.; YE, X.; XUE, S.; JIANG, Y.; MA, Y.; LIU, D. Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. **Food Science and Technology**, v. 43, p.39-44, 2009.

SHIRSATH, S.R., SONAWANE, S. H., GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering and processing: Process Intensification**. v.53, p.10-23, 2012.

SILVA, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* utilizando água de parboilização de arroz. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande. 2009.

SILVA, C.; CABRAL J. M. ; KEULEN, F.V. Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v.26, p. 257-262, 2004.

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

SOWMYA, R.; SACHINDRA, N.M. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. **Food Chemistry**, v. 134, p. 308-314. 2012.

STOREBAKKEN, T.; SORENSEN, M.; BJERKENG, B.; HIU, S. Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature. **Aquaculture**, v.236, p. 391-403, 2004.

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

TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1996.

TRUSCOTT, T. G. β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and antioxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. **Journal Photocem Photobiology Biology**, v. 35, p. 233-235, 1996.

UENOJO, M.; JUNIOR, R. M.; PASTORE, G.M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v.30, p.616-622. 2007.

VALDUGA, E. Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus Salmonicolor* CBS 2636. **Tese de doutorado em Engenharia Química**, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis. 2005.

VALDUGA, E. ; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FURIGO JUNIOR, A. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p.1267 - 1274, 2008.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; FURIGO JÚNIOR, A.; DI LUCCIO, M. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the Production of Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in Synthetic and Agroindustrial Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.157, p. 61- 69, 2009a.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009b.

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

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; COLET, R.; CANSIAN, J. M.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p. 2445-2551, 2009d.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. E.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, p. 2429-2436, 2009.

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

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A. H. R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Article in press, 2013.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-13, 2001.

WANG, W.; YU, L.; ZHOU, P. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.97, p.26-31, 2006.

ZHANG, B. Y.; GENG, Y. H.; LI, Z. K.; HU, H. J.; LI, Y. G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, p. 275-281, 2009.

ZENI, J. Screening de microrganismos produtores de carotenoides. **Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos**. Universidade Regional Integrada. Erechim. 2009.