



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

WILLEN SILVA IGREJA

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LEVEDURAS
Rhodotorula rubra, UTILIZANDO CAROÇO DE AÇAÍ
(*Euterpe oleracea* Mart.) COMO SUBSTRATO PARA A
FERMENTAÇÃO**

BELÉM-PA

2020

WILLEN SILVA IGREJA

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LEVEDURAS
Rhodotorula rubra, UTILIZANDO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe
oleracea* Mart.) COMO SUBSTRATO PARA A
FERMENTAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renan Campos Chisté.

COORIENTADORA: Prof. Dra. Alessandra Santos Lopes.

BELÉM-PA

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

S586p Silva Igreja, Willen.
Produção de carotenoides por leveduras *Rhodotorula rubra*,
utilizando caroço de açaí (*Euterpe oleracea* mart.) como substrato
para a fermentação / Willen Silva Igreja. — 2020.
128 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Renan Campos Chisté
Coorientação: Prof^a. Dra. Alessandra Santos Lopes
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2020.

1. *Rhodotorula rubra*. 2. compostos bioativos. 3. Resíduo
agroindustriais. 4. Pré-tratamento. 5. Açaí. I. Título.

CDD 660.6

WILLEN SILVA IGREJA

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LEVEDURAS *Rhodotorula rubra*,
UTILIZANDO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) COMO SUBSTRATO
PARA A FERMENTAÇÃO**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

CONCEITO: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Renan Campos Chisté

(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof. Dra. Alessandra Santos Lopes

(PPGCTA/ITEC/UFPA – Coorientadora)

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira

(PPGCTEA/ITEC/UFPA)

Profa. Dra. Luiza Helena da Silva Martins

(Pós-Doutoranda PPGCTEA/ITEC/UFPA)

Profa. Dra. Consuelo Lucia Sousa de Lima

(PPGCTEA/ITEC/UFPA – membro interno suplente)

Prof. Dr. Johnatt Allan Rocha de Oliveira

(FANUT/ICS/UFPA – membro externo suplente)

BELÉM-PA

2020

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES);

A Fábrica Xingu Fruit por doar o resíduo agroindustrial para esta pesquisa;

Aos meus orientadores Dr Renan Campos Chisté e a Dra Alessandra Santos Lopes por todo o conhecimento repassado, confiança e credibilidade depositados em meu trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Dra Luiza Helena Martins e ao Dr Nelson Rosa Ferreira pelas contribuições para a realização desta pesquisa;

Aos meus colegas, professores e funcionários do Laboratório de Tecnologia de alimentos (LTA), Laboratório de Biotecnologia de alimentos (LABIOTEC), Laboratório de Óleos da Amazônia (LOA) e ao Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA) da Universidade Federal do Pará, pela ajuda e apoio na realização deste trabalho;

À todos os professores, funcionários e amigos do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos que contribuíram de forma direta ou indireta nesta pesquisa.

À Emanuelle Leão, Rosana Santos, Valéria Vianna e Kayany Reis por todas as vezes que demonstraram seu amor e carinho ajudando-me durante a realização desta pesquisa, que por diversas vezes, necessitou de horas de trabalhos adicionais durante as madrugadas e aos finais de semana, vocês foram incansáveis e incessantes durante esses momentos.

DEDICATÓRIA

Esta pesquisa é dedicada à minha mãe Selma Santos e ao meu esposo Marcelo Yokoyama, ambos pedras angulares de todas as conquistas alcançadas até aqui. Os quais me consolaram em momentos de fracassos, comemoram em momentos de felicidade, me fortaleceram em momentos de dúvidas e me levantaram em momentos de desistência. Vocês são as pedras angulares do meu sucesso e os braços seguros que me abraçam e me reconfortam nos momentos de dor.

RESUMO

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis presentes em plantas, animais e também em microrganismos, possuindo ampla aplicação biotecnológica, farmacêutica e alimentícia. As leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de biosintetizar carotenoides no interior de suas células quando são submetidas a condições adversas do meio, esse processo biotecnológico pode ser industrialmente viável se o custo de produção puder ser minimizado através do uso de subprodutos de baixo custo como fontes de nutrientes. O subproduto de baixo custo promissor selecionado para este estudo foi o caroço de açaí, que é um resíduo amplamente produzido e descartado indevidamente na região Norte do Brasil. Portanto este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial da produção de carotenoides a partir da levedura *Rhodotorula rubra* utilizando o caroço de açaí como substrato para a fermentação. O caroço do açaí foi caracterizado e exibiu percentual de 3,62% de celulose; 58,61% de hemicelulose, 11,63% de lignina; 14% de extrativo; 4,63% proteína 1,52% e 1,93% de cinzas. Após o pré-tratamento do caroço através da hidrólise ácida com ácido sulfúrico diluído, o licor resultante apresentou 45,25 g/L de açúcares, sendo constituído majoritariamente de xilose (93%), e baixas concentrações de inibidores do crescimento microbiano (0,0088 g/L de furfural; 0,2382 de hidroximetilfurfural e $1,76 \pm$ de ácido acético). Com relação ao cultivo da levedura utilizando o licor hidrolisado oriundo da biomassa do caroço de açaí, observou-se que as melhores condições de cultivo para a produção de biomassa foram as condições (pH 7, 40°C e 200 rpm) enquanto as melhores condições para a biossíntese de carotenoides foram (pH 7, 30°C e 200 rpm), estas condições proporcionaram 2 g de biomassa seca de levedura e uma concentração de carotenoides de 37,59 $\mu\text{g/g}$ de biomassa seca. Dentre os carotenoides identificados na biomassa de leveduras, o β -caroteno (77%), *cis*- γ -Caroteno (6,9%) e o toruleno (4,5%) foram os carotenoides majoritários. Portanto, o caroço de açaí apresentou elevado potencial para ser utilizado como substrato de fermentação para a levedura *R. rubra* biosintetizar carotenoides como produto de alto valor agregado.

Palavras-chave: Biotecnologia; hidrólise ácida; resíduo agroindustrial; Fruta Amazônica.

ABSTRACT

Carotenoids are fat-soluble bioactive compounds present in plants, animals and in microorganisms, with wide biotechnological, pharmaceutical and food applications. *Rhodotorula* yeasts are able to biosynthesize carotenoids inside their cells when they are subjected to adverse environmental conditions, this biotechnological process can be industrially viable if the production cost can be minimized with low-cost by-products as sources of nutrients. Therefore, the objective of this work was the production of carotenoids using açai seed as a substrate for the fermentation of the yeast *Rhodotorula rubra*. The açai seeds were characterized and exhibited 3,62% of cellulose; 58,61% hemicellulose, 11,63% lignin; 14% extractive; 4,63% 1,52% protein and 1,93% ash. The liquor from acid hydrolysis with diluted sulfuric acid was characterized and provided a liquor with 45.25 g/L of sugars, consisting mainly of xylose (93%), and low concentrations of inhibitors (0.0088 g / L of furfural; 0,2382 hydroxymethylfurfural and $1,76 \pm$ acetic acid). Regarding the cultivation of yeast with açai seed as substrate, the best conditions for the production of biomass were pH 7, 40 °C and 200 rpm, while the best conditions for carotenoid biosynthesis were pH 7, 30 °C and 200 rpm. These conditions provided 2 g of dry yeast biomass and a carotenoid concentration of 37.59 µg/g of dry biomass. Among the identified carotenoids, β -carotene (77%), cis- γ -Carotene (6,9%) and torulene (4,5%) were the major carotenoids. Therefore, açai seed showed a high potential to be used as a fermentation substrate for the yeast *R. rubra* to biosynthesize carotenoids as a product with high added value.

Keywords: Biotechnology; acid hydrolysis; agroindustrial waste; Amazonian fruit.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

AAPH- 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)-dicloridrato

ACETIL-CoA- Acetilcoenzima A

AMV- ácido mevalônico

ART- Açúcares Redutores Totais

ATP- Adenosina trifosfato

DMAPP -Dimetilalil pirofosfato

DNS- ácido dinitro-3,5-salicílico

FPP- Farnesil pirofosfato

FSC- Fator Severidade Composta

GGPP- Geranilgeranil pirofosfato

GPP - Geranil pirofosfato

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

H₃PO₄ – Ácido fosfórico

HMF- Hidroximetilfurfural

HMG-CoA- acetil-CoA à 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

HPLC- High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IPP- isopentenil pirofosfato

l.d.c- Ligações duplas conjugadas

MEP- Metileritritol fosfato

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NMC- Nomenclatura Comum do Mercosul

OH- Hidroxilas

R- Rhodotorulla

RNS- Reactive Nitrogen Species (Espécies reativas de nitrogênio)

ROS- Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 GERAL	5
2.2 ESPECÍFICOS	5
3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	6
4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	6
 CAPÍTULO I.....	7
PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE CAROTENOIDES: INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE CULTIVO E SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS DE BAIXO CUSTO	7
RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. CAROTENOIDES: ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO	9
3. BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES EM LEVEDURAS	14
4. PRINCIPAIS CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS.....	15
4.1. β -CAROTENO	16
4.2. TORULENO.....	17
4.3. TORULARODINA.....	18
4.4. γ -CAROTENO	18
4.5 ASTAXANTINA	19
5. POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES DE LEVEDURAS.....	20
6. MERCADO DE CAROTENOIDES NO BRASIL	21
7. PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR VIA BIOTECNOLÓGICA	23
8. LEVEDURAS PRODUTORAS DE CAROTENOIDES.....	25

9. FATORES QUE AFETAM A BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES	28
9.1. pH.....	29
9.2. TEMPERATURA	31
9.3. TAXA DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO	32
9.4. LUMINOSIDADE.....	34
9.5. COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO	35
10. EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS CAROTENOIDES DE LEVEDURAS	38
11. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	40

CAPÍTULO II.....	54
------------------	----

CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) E DO LICOR OBTIDO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO, POR HIDRÓLISE ÁCIDA, PARA A APLICAÇÃO COMO SUBSTRATO FERMENTESCÍVEL.....	54
---	----

RESUMO.....	55
-------------	----

1. INTRODUÇÃO.....	56
--------------------	----

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
----------------------------	----

2.1. AQUISIÇÃO DOS CAROÇOS DE AÇAÍ.....	57
---	----

2.2. PREPARO DA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ.....	57
--	----

2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA SECA.....	59
--	----

2.3.1. Teor de umidade por infravermelho	59
--	----

2.3.2. Determinação do teor de extrativos	59
---	----

2.3.3. Determinação dos carboidratos estruturais.....	59
---	----

2.4. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA BIOMASSA SECA.....	62
---	----

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO LICOR OBTIDO NA MELHOR CONDIÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTO POR HIDRÓLISE ÁCIDA.....	64
--	----

2.6. CARACTERIZAÇÃO DO CAROÇO DE AÇAÍ POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	64
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ	65
3.2 CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS PRESENTES NA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ.....	67
3.3 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ POR HIDRÓLISE ÁCIDA UTILIZANDO H_3PO_4 E H_2SO_4	68
3.4 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ COM H_2SO_4 NOS TEORES DE ART, HMF E MASSA SOLUBILIZADA	70
3.5 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA SECA DO CAROÇO DE AÇAÍ UTILIZANDO O H_2SO_4 E H_2SO_4	73
3.5.1. Pré-tratamento da biomassa seca utilizando H_3PO_4	73
3.5.2. Pré-tratamento da biomassa seca utilizando H_2SO_4	77
3.6 FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA A MELHOR CONDIÇÃO DO PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA SECA DO CAROÇO DE AÇAÍ COM H_2SO_4	84
3.7. CARACTERIZAÇÃO DOS AÇÚCARES E COMPOSTOS INIBIDORES NO LICOR RECÉM-HIDROLISADO E NO LICOR NEUTRALIZADO PARA UTILIZAÇÃO COMO SUBSTRATO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	85
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA BIOMASSA DE CAROÇO DE AÇAÍ ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM H_2SO_4	88
4 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS	89

CAPÍTULO III	95
PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LEVEDURAS <i>RHODOTORULA RUBRA</i> UTILIZANDO CAROÇO DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i> MART.) COMO SUBSTRATO PARA A FERMENTAÇÃO.....	95
RESUMO.....	96
1. INTRODUÇÃO.....	97
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1. PREPARO DO SUBSTRATO A PARTIR DO CAROÇO DE AÇAÍ.....	98
2.2. PREPARO DA BIOMASSA SECA DE CAROÇO DE AÇAÍ.....	98
2.3. PREPARO DO PRÉ-TRATAMENTO PARA OBTENÇÃO DO LICOR.....	99
2.4. <i>RHODOTORULA RUBRA</i> E PREPARO DO INÓCULO.....	99
2.5. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E BIOMASSA	100
2.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS.....	100
2.7 PERFIL DE CAROTENOIDES NA CONDIÇÃO OTIMIZADA.....	101
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
3.1 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA LEVEDURA <i>RHODOTORULA RUBRA</i>	102
3.2. Metodologia de superfície de resposta para determinação das melhores condições de bioprodução de carotenoides e biomassa.....	105
3.3 PERFIL DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS PELA <i>R. RUBRA</i> UTILIZANDO O CAROÇO DE AÇAÍ COMO FONTE DE SUBSTRATO	110
4. CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS	113

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Pará é o maior produtor brasileiro de açaí (IBGE, 2018), a polpa ou vinho é o produto obtido da cadeia produtiva do açaí e corresponde a 15% do beneficiamento do fruto, sendo 85% restante constituído do caroço e fibras, os quais são descartados (ALMEIDA *et al.*, 2017). Este resíduo com características fibrosas, formado por celulose, lignina, hemicelulose, material graxo, nitrogenado, antocianinas, minerais, ácido ascórbico e vitaminas do complexo B (MESQUITA, 2013) são susceptíveis à pré-tratamentos para utilização como meio de cultivo, os quais podem ser utilizados como fonte de carbono por microrganismos em diversos processos.

Diversos pré-tratamentos vem sendo relatados na literatura com o objetivo de fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar componentes de celulose, hemicelulose e lignina para fins específicos, sendo o pré-tratamento ácido um dos mais empregados para este fim, devido sua capacidade de desconstruir a cadeia lignocelulósica e alterar a conformação estrutural da lignina, proporcionando a liberação de monômeros de açúcares, como a glicose e xilose (MAURYA *et al.*, 2015). Além disso, o processo também deve limitar a formação de componentes tóxicos que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos (ALVIRA *et al.* 2010), como por exemplo, o furfural, hidroximetilfurfural e derivados fenólicos (SAHA *et al.*, 2013). O caroço de açaí destaca-se, portanto, por sua composição lignocelulósica que em função da sua natureza renovável e seu baixo custo pode ser utilizados, após hidrólise, para processos fermentativos visando à obtenção de produtos de alto valor agregado, como, por exemplo, a produção de carotenoides.

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis presentes em plantas, animais e também em microrganismos. São amplamente utilizados como corantes alimentícios (β -caroteno, licopeno, luteína, astaxantina, bixina), sua ingestão vem sendo associado ao fortalecimento do sistema imunológico e também à diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular, entre outras (LAVECCHIA *et al.*, 2013).

Muitos microrganismos produzem carotenoides, porém nem todos são industrialmente e/ou economicamente viáveis. Alguns estudos já abordaram o potencial da produção de carotenoides por diferentes cepas de microrganismos por via fermentativa

utilizando diversos resíduos agrícolas (frutas, mostos de uvas, xarope de glicose, mosto de beterraba, extrato de soja, extrato de farinha de milho, extrato de farinha de feijão e soro oriundo da produção de queijos) (Buzzini *et al.*, 1999; TINOI *et al.*, 2005; AKSU *et al.*, 2007; VALDUGA *et al.*, 2009a; ZENI *et al.*, 2011). Neste sentido, as leveduras do gênero *Rhodotorula* possuem a capacidade de sintetizar diferentes tipos de carotenoides em variadas proporções em resposta ao estresse ambiental durante o cultivo (VALDUGA *et al.*, 2009b).

A produção de carotenoides por via fermentativa pode vir a ser industrialmente viável se o custo de produção puder ser minimizado através do uso de subprodutos de baixo custo como fontes de nutrientes, tais como resíduos advindos da produção agroindustrial. A produtividade e a otimização de um bioprocessamento em um determinado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando, desta forma, não somente o crescimento celular como a produção do pigmento (MATA-GOMÉZ *et al.*, 2014). Além disso, o perfil de carotenoides e a quantidade relativa destes pigmentos podem variar dependendo da composição do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e a luminosidade (VALDUGA *et al.*, 2009b; ZENI *et al.*, 2011).

Até o presente momento, não há dados disponíveis na literatura que avaliam o potencial da produção de carotenoides por leveduras do gênero *Rhodotorula* utilizando resíduos agroindustriais da região Amazônica, nomeadamente o caroço de açaí, como substrato para a fermentação. Os resultados encontrados neste trabalho serão de interesse para a indústria de alimentos e biotecnológica, pois pode viabilizar a obtenção de corantes naturais com propriedades antioxidantes através da levedura do gênero *Rhodotorula*, utilizando como substrato resíduos agroindustriais, viabilizando o barateamento e o aumento da produção e comercialização de carotenoides.

REFERÊNCIAS

- Almeida AVC, Melo IM, Pinheiro IS, Freitas JF, Melo ACS. Revalorização do caroço de açaí em uma beneficiadora de polpas do município de Ananindeua/PA: proposta de estruturação de um canal reverso orientado pela PNRS e logística reversa. GEPROS. 2017, set; 12(3): 59–83, DOI: <https://doi.org/10.15675/gepros.v12i3.1668>
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura, 2018- Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por

- tipo de produto extrativo. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado> acessado em 14 de abril de 2020.
- Mesquita, A. de L. Estudos de processos de extração e caracterização de fibras do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) da Amazônia para produção de ecopainel de partículas de média densidade. Tese (Doutorado em engenharia de recursos naturais da amazônia) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 189, 2013
- Maurya, D. P., Singla, A., & Negi, S. *An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. 3 Biotech, 5(5), 597–609, 2015*
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology, 101, 4851–4861, 2010*
- Saha, B.C., Yoshida, T., Cotta, M.A., Sonomoto, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Industrial Crops and Products, 44, 367–372, 2013.*
- Lavecchia, T., Rea, G., Antonacci, A., Giardi, M.T. Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53, 198–213, 2013.*
- Buzzini, P., Martini, A. Production of Carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* Cultured in Raw Materials of Agro-Industrial Origin. *Bioresource Technology, 71, 41-44, 1999.*
- Tinoi, J., Rakariyatham, N., Deming, R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry, 40, 2551 – 2557, 2005.*
- Valduga, E., Tatsch, P., Vanzo, L., Rauber, F., Di Luccio, M., Treichel H. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 89, 1060–1065, 2009a.*
- Valduga, E., Tatsch, P.O., Tiggeman, L., Treichel, H., Toniazzo, G., Zeni, J., Di Luccio, M.D. Produção de carotenoides: microorganismos como fontes de pigmentos naturais. *Química Nova, 32, 2429-2436, 2009b.*

Zeni, J., Colet, R., Cence, K., Tiggeman, L., Toniazzo, G., Cansian, R.L., Di Luccio, M., Oliveira, D., Valduga, E. Screening of microorganisms for production of carotenoids. *CyTA – Journal of Food*, 9, 160-166, 2011.

Mata-Gómez, L., Montañez, J., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13, 12, 2014.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial da produção de carotenoides por leveduras *Rhodotorula rubra*, utilizando o caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como substrato de baixo custo durante a fermentação.

2.2 Específicos

A seguir serão mostrados resumidamente todos os objetivos específicos desta dissertação.

1. Avaliar as características físico-químicas e a composição centesimal do caroço de açaí, incluindo os carboidratos estruturais;
2. Determinar as condições de pré-tratamento do caroço de açaí por hidrólise ácida para a liberação de carboidratos fermentescíveis;
3. Identificar os açúcares do licor obtido após o pré-tratamento ácido, assim como os inibidores de processo fermentativo (furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético).
4. Otimizar a produção de carotenoides através da variação dos parâmetros de cultivo, como composição do meio, pH, temperatura, incidência luminosa e agitação.
5. Avaliar o perfil de carotenoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos.

3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação foi organizada da seguinte forma: o **Capítulo I** apresenta o manuscrito em forma de artigo de revisão intitulado “Produção biotecnológica de carotenoides: influência de parâmetros de cultivo e substratos agroindustriais de baixo custo”; o **Capítulo II** apresenta o manuscrito a ser submetido para publicação no formato de artigo original intitulado “Caracterização da biomassa seca de caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e do licor obtido após o pré-tratamento, por hidrólise ácida, para a aplicação como substrato fermentescível”; e por último, o **Capítulo III** apresenta o manuscrito a ser submetido para publicação no formato de artigo original intitulado “Produção de carotenoides por leveduras *Rhodotorula rubra*, utilizando caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como substrato para a fermentação”.

4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- MAIA, Felipe de Andrade; **IGREJA, Willen Silva**; XAVIER, Ana Augusta Odorissi; LOPES, Alessandra Santos; CHISTÉ, Renan Campos. Perfil de carotenoides produzidos por *Rhodotorula glutinis* cultivadas utilizando a manipueira como substrato de baixo custo. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA 2020), 2, 3 e 4 de dezembro de 2020. Congresso ONLINE <<https://cbcta2020.galoa.com.br>>.
- **IGREJA, Willen Silva**; SILVA, Jhonathan Vinicius Menezes; OLIVEIRA, Eliane da Conceição; LIMA, Ana Julia Mota; MARTINS, Luiza Helena da Silva; LOPES, Alessandra Santos; CHISTÉ, Renan Campos. Caroço de açaí (*Euterpe oleracea*): caracterização da biomassa e do licor após o pré-tratamento para aplicação como substrato fermentescível (*Trabalho apresentado no formato oral*). Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA 2020), 2, 3 e 4 de dezembro de 2020. Congresso ONLINE <<https://cbcta2020.galoa.com.br>>.

CAPÍTULO I

Produção biotecnológica de carotenoides: influência de parâmetros de cultivo e substratos agroindustriais de baixo custo

Produção biotecnológica de carotenoides: influência de parâmetros de cultivo e substratos agroindustriais de baixo custo

Willen Silva Igreja¹, Felipe de Andrade Maia², Alessandra Santos Lopes^{1,2}, Renan Campos Chisté^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

²Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

Resumo

Os carotenoides são pigmentos naturais lipofílicos amplamente encontrados em frutas e outros vegetais, mas também podem ser encontrados em alguns animais, e sintetizados por alguns microrganismos. Esses pigmentos são amplamente utilizados pelas indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentícia como corantes naturais devido ao crescente apelo para substituir os corantes artificiais. Além disso, os carotenoides não são conhecidos apenas por suas propriedades corantes, mas também por seus potenciais benefícios à saúde humana como compostos antioxidantes e pela atividade provitamina A de alguns compostos. A produção de carotenoides por abordagens biotecnológicas tem potencial para ser mais atrativa do que a extração a partir de materiais vegetais, e embora muitos microrganismos sejam relatados como produtores de carotenoides, nem todos são industrialmente viáveis. Nesse contexto, a utilização de resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo para o cultivo de microrganismos pode vir a diminuir os custos do processo biotecnológico. Portanto, nesta revisão, reunimos informações a respeito de algumas leveduras que despertam o interesse industrial e científico pela capacidade de biosintetizar carotenoides (carotenogênese) em resposta ao estresse do meio de cultivo, com foco na utilização de substratos de baixo custo.

Palavras-chaves: *Rhodotorula*; biotecnologia; compostos bioativos; corantes naturais.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis presentes em plantas, animais e também em microorganismos. São amplamente utilizados como corantes alimentícios (β -caroteno, licopeno, luteína, astaxantina, bixina), e a sua ingestão vem sendo associado ao fortalecimento do sistema imunológico e também à diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular, entre outras (LAVECCHIA *et al.*, 2013).

Muitos microorganismos produzem carotenoides, porém nem todos são industrialmente e/ou economicamente viáveis. Alguns estudos já abordaram o potencial da produção de carotenoides por diferentes cepas de microorganismos por via fermentativa utilizando diversos resíduos agrícolas (BAUZINI *et al.*, 1999; TINOI *et al.*, 2005; AKSU *et al.*, 2007; VALDUGA *et al.*, 2009a; ZENI *et al.*, 2011).

A produção de carotenoides por via fermentativa pode vir a ser industrialmente viável se o custo de produção puder ser minimizado através do uso de subprodutos de baixo custo como fontes de nutrientes, tais como resíduos advindos da produção agroindustrial. A produtividade e a otimização de um bioprocessamento em um determinado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando, desta forma, não somente o crescimento celular como a produção do pigmento (MATA-GOMÉZ *et al.*, 2014). Além disso, o perfil de carotenoides e a quantidade relativa destes pigmentos podem variar dependendo da composição do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e a luminosidade (VALDUGA *et al.*, 2009b; ZENI *et al.*, 2011).

Portanto, esta revisão irá apresentar uma abordagem específica da literatura sobre a produção dos principais carotenoides produzidos por leveduras (β -caroteno, toruleno e torularodina), suas estruturas químicas, classificação, propriedades, rota biosintética, microrganismos produtores, condições que controlam a bioprodução, assim como a inserção comercial nos mercados nacional e internacional.

2. CAROTENOIDES: ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

Os carotenoides são pigmentos naturais, nutricionalmente benéficos e são sintetizados principalmente por plantas, bactérias e fungos (BERMAN *et al.*, 2014); os humanos e os animais não podem sintetizar carotenoides e devem obtê-los a partir de

fontes alimentares. Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis presentes em alimentos com coloração que variam do amarelo ao vermelho e sua estrutura química é composta de isoprenóides e tetraterpenos de quarenta carbonos formados basicamente por oito unidades de isoprenos contendo um extenso sistema de ligações duplas conjugadas (l.d.c) que gera um sistema de ressonância de elétrons π movimentando-se por toda a cadeia poliênica. Devido a essas características estruturais, os carotenoides são moléculas altamente reativas e absorvem radiação eletromagnética na região do visível (360-780 nm) (MERCADANTE, 2007). Essa estrutura básica dos carotenoides pode ser alterada por reações como hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de ligação dupla, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação, influenciando em suas propriedades químicas, físicas e bioquímicas. (OLIVIER & PALOU, 2000; TRÊS *et al.*, 2007; GÓMEZ-GARCÍA & OCHOA-ALEJO, 2013; ALMANZA *et al.*, 2014).

Mais de 700 carotenoides já foram relatados, os quais apresentam coloração amarela, laranja e vermelha; no entanto, alguns carotenoides incolores, como o fitoeno e o fitoflueno também já foram reportados (FONTANA *et al.*, 2000, ERNST *et al.*, 2002; SIES *et al.*, 2004). Os carotenoides são classificados basicamente em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas, sendo o primeiro formado apenas por carbono e hidrogênio e o segundo que são os derivados oxigenados, respectivamente. Os carotenos, tais como β -caroteno e licopeno são hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula. Já as xantofilas, as quais são derivados oxigenados de carotenos podem conter grupos funcionais de hidroxila, carbonila, metoxila, carboxila e epóxi, como a luteína, violaxantina, neoxantina, cantaxantina, torularodina e zeaxantina (TRÊS *et al.*, 2007; RIVERA & CANELA-GARAYOA, 2012; VALDUGA *et al.*, 2009b).

Os carotenoides hidrocarbonetos apresentam em sua estrutura somente átomos de carbono e hidrogênio; os ácidos possuem grupos carboxila ligados na extremidade da cadeia carbônica, pois não possuem anéis ionona; Os carotenoides éteres apresentam oxigênio entre carbonos, os ésteres, por sua vez, apresentam o grupo carboxil entre carbonos, os álcoois possuem um grupo hidroxila (OH) ligado aos anéis iononas da cadeia, os carotenoides cetonas possuem grupos carbonilas ligados aos anéis iononas e os carotenoides epóxidos apresentam oxigênio entre carbonos formando ciclos (GOODWIN, 1952; VILLELA *et al.*, 1966; BENDICH & OLSON, 1989; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) (Figuras 1-6).

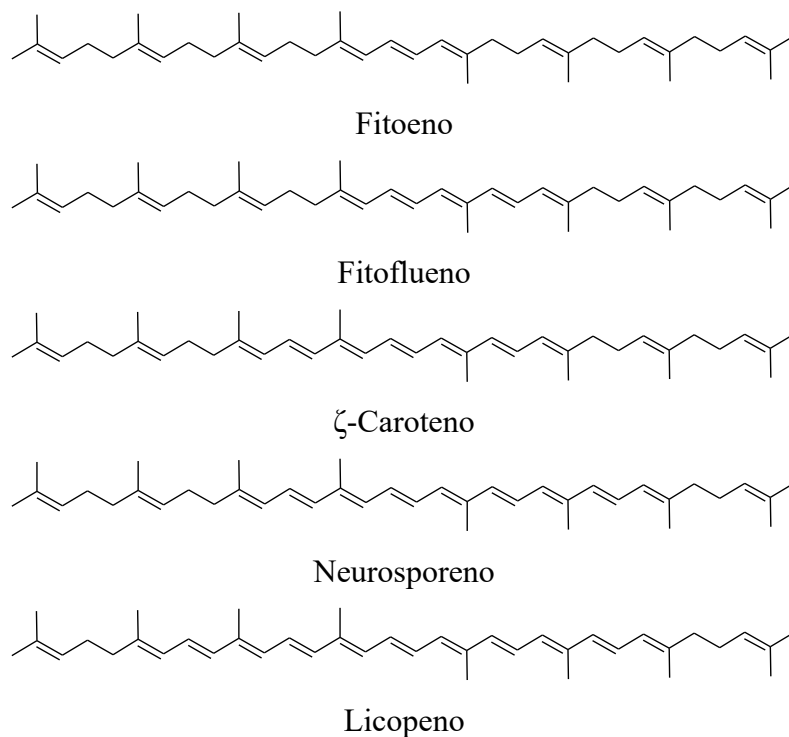


Figura 1 –Exemplo de carotenos acíclicos: fitoeno, fitoflueno, ζ-caroteno, neurosporeno e licopeno.

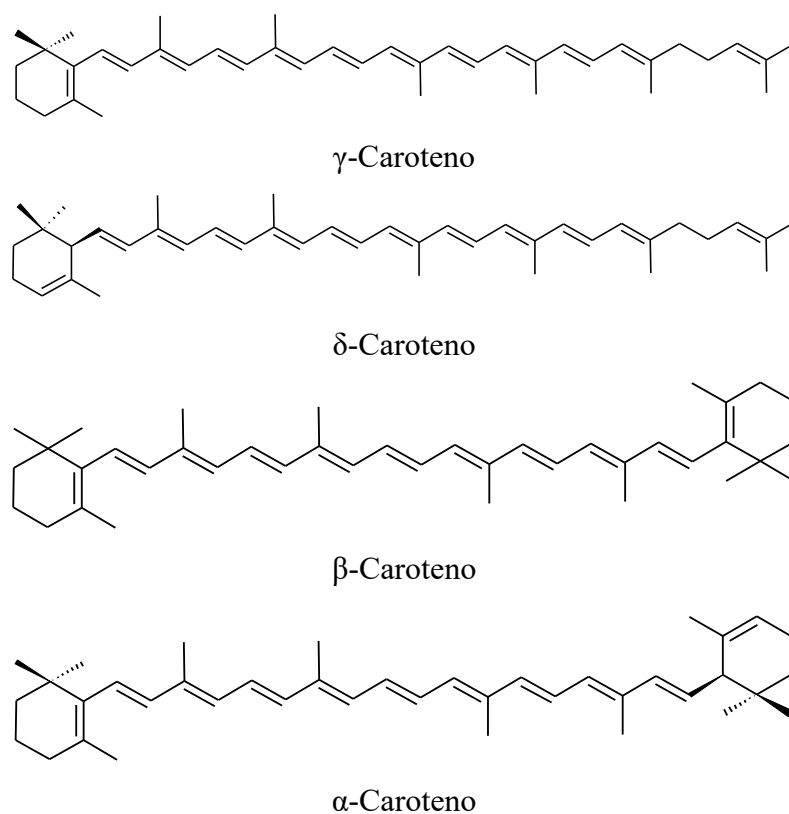
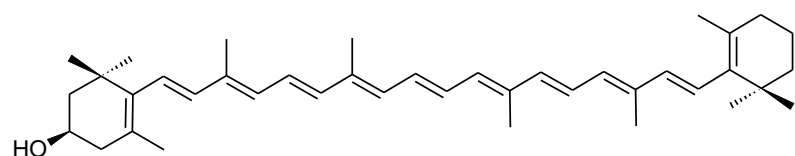
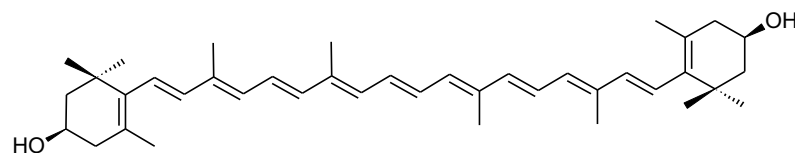


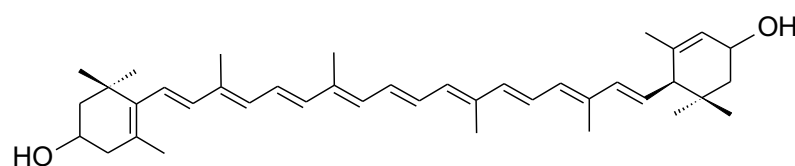
Figura 2 –Exemplos de carotenos cíclicos: γ-caroteno, δ-caroteno, β-caroteno e α-caroteno.



β -Criptoxantina

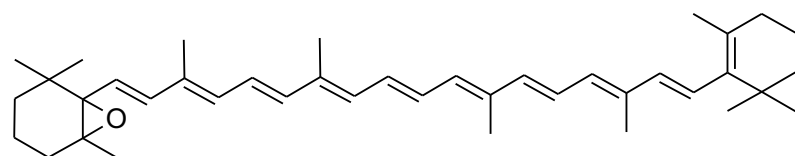


Zeaxantina

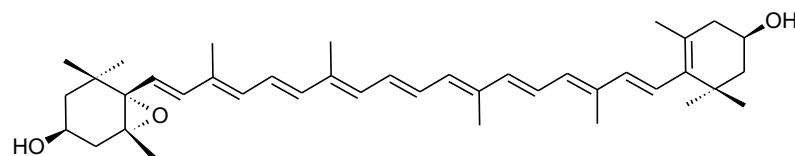


Luteína

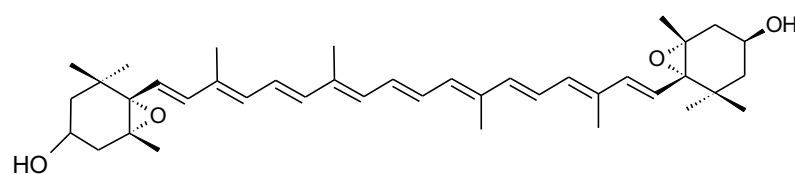
Figura 3 –Exemplos de hidroxicarotenoides: β -criptoxantina, zeaxantina eluteína.



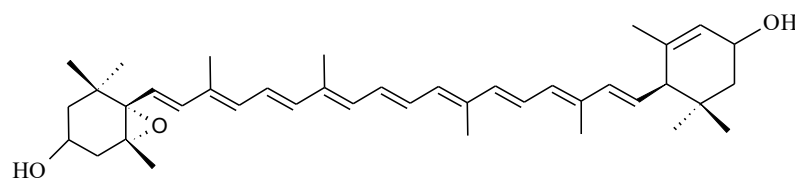
β -Caroteno 5,6 epóxido



Anteraxantina



Violaxantina



Luteína 5,6 epóxido

Figura 4- Exemplos de epóxi-carotenoides: β -caroteno 5,6 epóxido, anteraxantina,violaxantina, e luteína 5,6-epóxido.

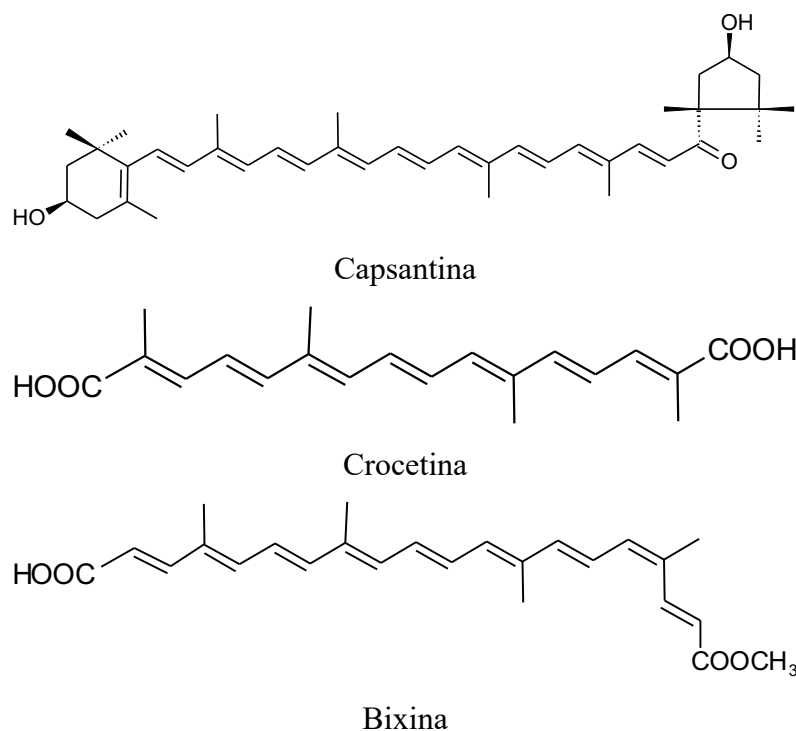


Figura 5 –Exemplo de carotenoides com outros grupos funcionais na estrutura: capsantina, crocetina e bixina.

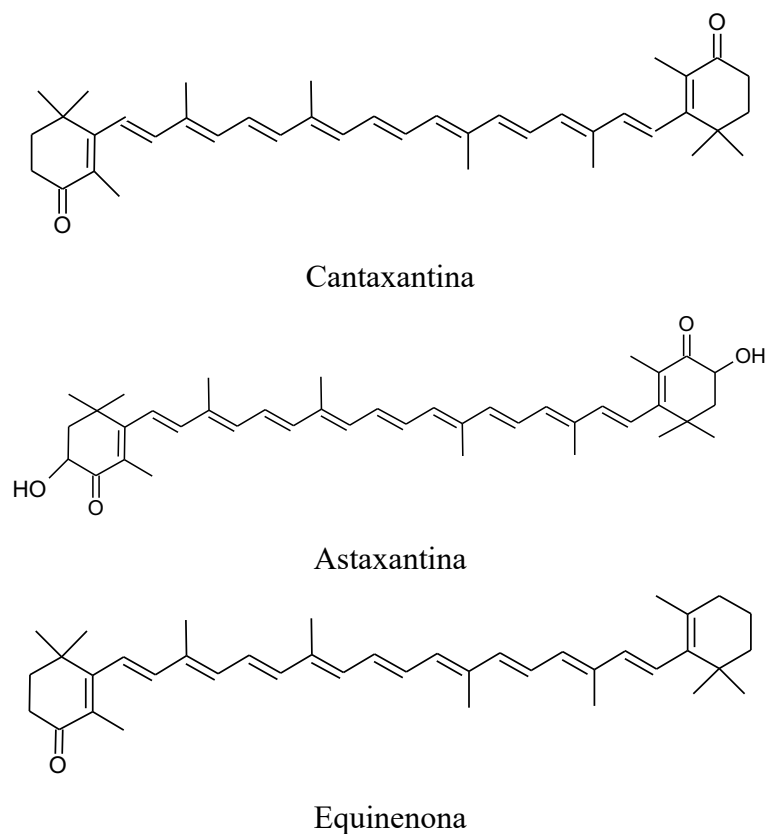


Figura 6 – Exemplos de carotenoides tipicamente encontrados em animais: cantaxantina, astaxantina e equinenona.

3. BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES EM LEVEDURAS

O conhecimento dos mecanismos moleculares para a produção de carotenoides pode ser conduzido a uma melhoria do processo biotecnológico; por isso, sua biossíntese nas leveduras é alvo de investigação há muitos anos. A Figura 7 mostra um esquema da via carotenogênica em leveduras a partir do Acetilcoenzima A (Acetil-CoA).

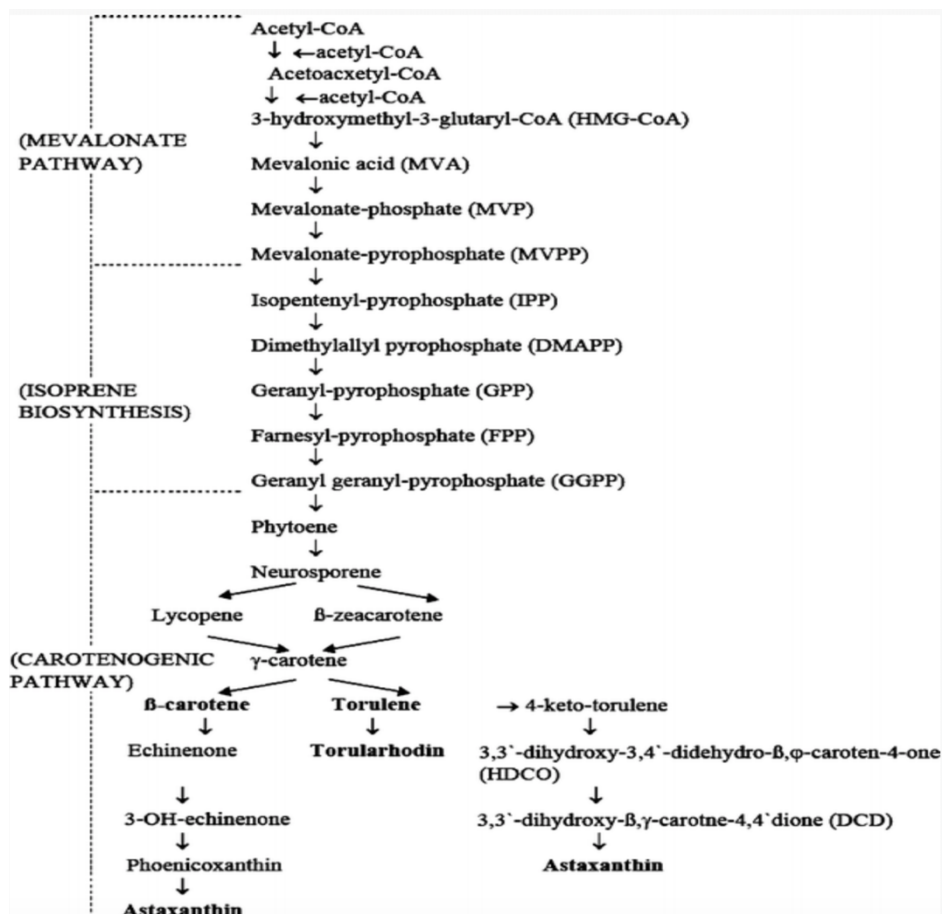


Figura 7. Rota biossintética da produção de carotenoides em leveduras.

Fonte: (FRENGOVA & BESHKOVA, 2009)

Na rota do ácido mevalônico ocorre a conversão de três moléculas de acetil-CoA à 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela enzima HMG-CoA sintase. A HMG-CoA sofre a ação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase transformando-se em um composto de seis carbonos, chamado de ácido mevalônico (MVA), que é o primeiro precursor específico da rota biossintética dos terpenóides. Em seguida, o MVA é fosforilado, pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil pirofosfato (IPP), que é a unidade básica na formação dos terpenos por enzimas quinases e descarboxilases (FRENGOVA & BESHKOVA, 2009).

Vegetais usam a rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos plastídios para formar IPP. Nesta rota, o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato combinam-se para formar um intermediário que é convertido em IPP. O IPP é isomerizado à dimetilalil pirofosfato (DMAPP), o IPP e o DMAPP são unidades de cinco carbonos as quais se unem para formar moléculas maiores (DEWICK, 2009).

Na primeira etapa, o IPP e seu isômero reagem e formam o geranyl pirofosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos. Em seguida, há adição de sequências de IPP na molécula de GPP para formar farnesil pirofosfato (FPP) (quinze carbonos), precursor da maioria dos sesquiterpenos. Posteriormente, outra molécula de IPP é adicionada a molécula de FPP para formar geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpenos. Estas reações são catalisadas pela enzima prenil transferase. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (trinta carbonos) e tetraterpenos (quarenta carbonos), respectivamente (FRENGOVA & BESHKOVA, 2009).

A condensação de duas moléculas de GGPP leva a formação do fitoeno, o primeiro carotenoide de quarenta carbonos; este, por sua vez, sofre dessaturação para formar fitoflueno, neurosporeno e licopeno respectivamente (VALDUGA *et al.*, 2009b). Devido o licopeno ser um composto *trans*, a isomerização da primeira ou segunda ligação dupla do fitoeno deve ocorrer no mesmo estágio que o processo de dessaturação (MORAES *et al.*, 2010). O licopeno é um precursor dos carotenoides cíclicos, sua ciclização leva a formação de β -caroteno, γ -caroteno, toruleno, torularodina e astaxantina (BARREDO *et al.*, 2017). O γ -caroteno é o maior ponto de ramificação e age como precursor para β -caroteno e toruleno. A hidroxilação e oxidação do toruleno, por sua vez, levam à formação de torularodina (VALDUGA *et al.*, 2009b).

4. PRINCIPAIS CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS

Diversos micro-organismos podem biosintetizar carotenoides; no entanto, muitos destes acabam não sendo comercialmente viáveis. As leveduras vêm se destacando neste sentido pela sua capacidade de crescimento utilizando substratos de baixo custo. Alguns gêneros como *Sporidiobolus spp* (BUZZINI *et al.*, 2007), *Phaffia rhodozyme* (JOHNSON & LEWIS, 1979; BHATT *et al.*, 2013), *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium* e *Rhodotorula spp* (CARDOSO *et al.*, 2016) vem sendo relatados como potenciais produtores de

carotenoides. Sendo relatados como carotenoides majoritários nessas espécies o β -caroteno, γ -caroteno, astaxantina, toruleno e a torularodina (Figura 8).

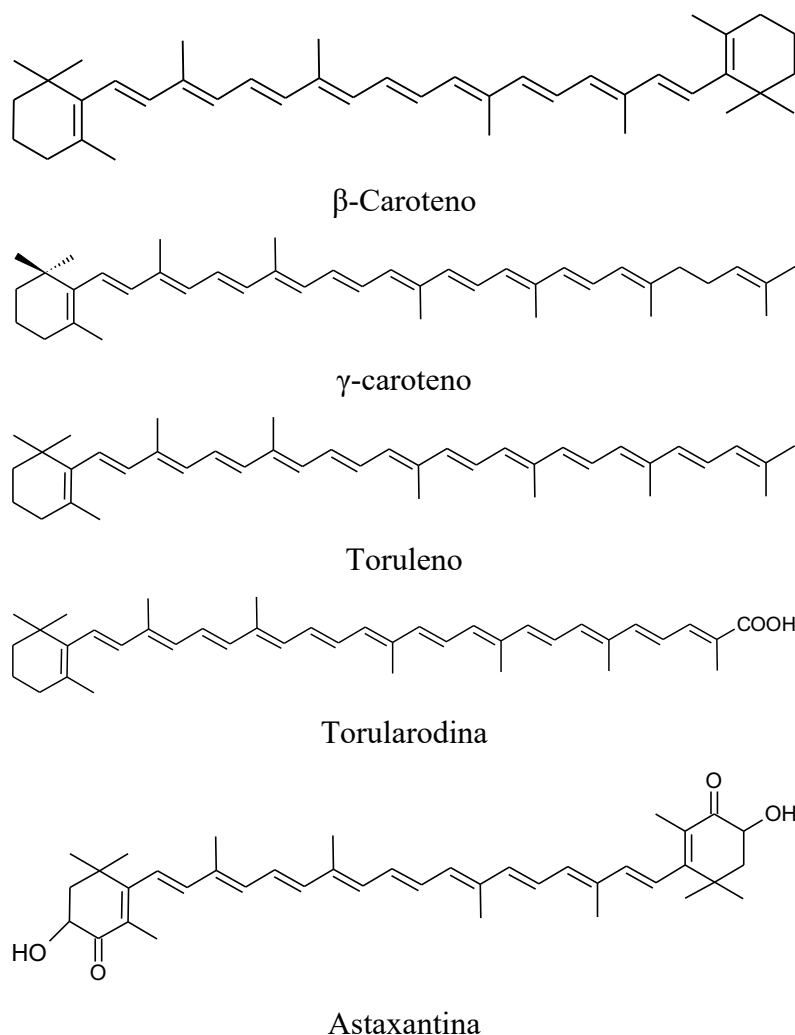


Figura 8– Fórmula estrutural dos principais pigmentos sintetizados por leveduras.

4.1. β -Caroteno

Dos mais de 700 carotenoides conhecidos, cinquenta podem ser metabolizados em vitamina A, sendo o β -caroteno o mais estudado, pois é o que possui a maior atividade provitamina A (KRINSKY & JOHNSON, 2005), sendo amplamente relatada sua produção microbiológica em diversos microrganismo como *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU *et al.*, 2008), *Phaffia rhodozyma* (LIU *et al.*, 2006), *Rhodospiridium toruloides* (DIAS *et al.*, 2015), *Sporidiobolus salmonicolor* (VALDUGA *et al.*, 2009) e leveduras do gênero *Rhodototula* (SQUINA *et al.*, 2003; AKSU & EREN., 2005; Cheng & Yang, 2016). O β -caroteno (Figura 8) possui 40 carbonos, composto por

11 ligações duplas conjugadas e possuindo dois anéis β -ionona não oxigenados, podendo ser clivado oxidativamente no intestino em duas moléculas de retinal para posteriormente ser transformado em retinol (Figura 9). Este carotenoide também é usado como antioxidante para reduzir danos celulares ou de tecidos, sendo relatado como antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares (GALE *et al.*, 2001; OSGANIAN *et al.*, 2003; AMBRÓSIO *et al.*, 2006; TRÊS *et al.*, 2007; CHOUDHARI; ANANTHANARAYAN; SINGHAL, 2008; RODRIGUEZ-AMAYA, 2011).

Para que um carotenoide apresente atividade provitamina A, sua molécula deve conter no mínimo 11 carbonos e, pelo menos um anel β não substituído, assim como ligações duplas conjugadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Em animais vertebrados, ocorre a clivagem enzimática simétrica (central) e a assimétrica dos carotenoides com atividade provitamina A; após ingeridos, eles sofrem ação enzimática na mucosa intestinal se transformando em retinal, que pode ser convertido de forma reversível a retinol (vitamina A) e irreversível a ácido retinóico, após o processo enzimático, o retinol é transportado para o fígado onde é armazenado (AMBRÓSIO *et al.*, 2006;).

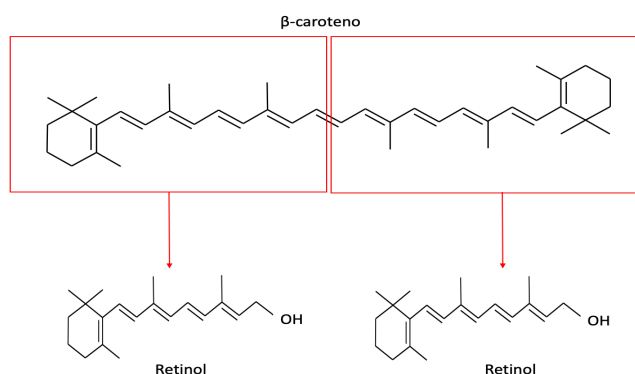


Figura 9. Clivagem do β -caroteno para a produção de vitamina A.

Fonte: (MESQUITA *et al.*, 2017).

4.2. Toruleno

O toruleno (Figura 8) é um carotenoide hidrocarboneto com quarenta carbonos e treze ligações duplas conjugadas possuindo atividade provitamina A, sendo o principal carotenoide da levedura *R. mucilaginosa*, possui cor vermelha, em contraste com outros carotenoides produzidos pelos microrganismos como o β -caroteno, que possui uma cor variante de amarela a alaranjado, dependendo da concentração (MALDONADE *et al.*,

2008). O toruleno, com 13 l.d.c, possui um anel ionona e uma cadeia poliênica linear mais longa que a do β -caroteno (11 l.d.c e 2 anéis β) (SAKAKI *et al.*, 2001).

O toruleno pode ser usado como pigmento natural da mesma forma que outros carotenoides hidrocarbonetos, tais como β -caroteno ou licopeno, possuindo conotação de aditivo natural, além de capacidade provitamina A (50% em relação ao β -caroteno) e atividade antioxidante (DE CARVALHO *et al.*, 2014; ZOZ *et al.*, 2015).

4.3. Torularodina

A torularodina (Figura 8) é um carotenoide natural com quarenta carbonos e 13 l.d.c possuindo um grupo carboxílico em sua estrutura e um anel ionona (SAKAKI *et al.*, 2001; ZOZ *et al.*, 2015). Sendo relatada como um produto da oxidação do toruleno, que foi derivado diretamente do γ -caroteno (GRIBANOVSKI-SASSU & FOPPEN 1968) e apresenta elevada atividade antioxidante (SAKAKI *et al.*, 2002).

Muitos microrganismos produzem torularodina e toruleno como, por exemplo, a levedura *Rhodotorula rubra* (UNGUREANU *et al.*, 2012), além disso, o fungo *Neurospora crassa* produz toruleno e torularodina, sendo amplamente utilizado em pesquisas (HAUSMANN & SANDMANN, 2000; ESTRADA *et al.*, 2008).

A torularodina é um carotenoide com característica ácidas e pode ser usada como corante para a substituição de bixina e a norbixina em produtos cárneos, atuando também como antioxidante e possuindo atividade provitamina A (50% em relação ao β -caroteno). Além disso, a torularodina pode ser vantajosa em formulações específicas devido ao seu grupo carboxila, que pode aumentar sua solubilidade em formulações aquosas (DE CARVALHO *et al.*, 2014; ZOZ *et al.*, 2015).

4.4. γ -Caroteno

O γ -caroteno (Figura 8) é um carotenoide hidrocarboneto monocíclico formado a partir da ciclização do licopeno, sendo composto por 11 l.d.c. e um anel β -ionona não oxigenado, podendo ser clivado oxidativamente no intestino em uma molécula de retinal, que após algumas reações bioquímicas pode ser transformado em vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2011).

A produção biotecnológica de γ -caroteno através de leveduras foi relatada em cinco linhagens da levedura *Rhodotorula* (SQUINA *et al.*, 2003), outras leveduras do

gênero *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* também foram relatadas como produtoras deste carotenoide (MALDONADE et al., 2007). Este carotenoide monocíclico faz parte da dieta humana, porém possui uma natureza rara quando comparado com β -caroteno ou o licopeno, possuindo estudos escassos quanto a suas propriedades químicas, biodisponibilidade e sua capacidade antioxidante (SÓLYOM et al., 2014).

4.5 Astaxantina

A astaxantina (Figura 8) é um carotenoide natural com quarenta carbonos, possuindo uma longa cadeia poliênica com um anel aromático benzoico em cada extremidade da cadeia contendo um grupo hidroxila e um grupo carbonila/cetônico. Esta xantofila não apresenta em sua estrutura um anel β não substituído e, portanto, não possui atividade provitamina A (ZALUAGA et al., 2018). Contudo, sua capacidade antioxidante vem se destacando devido sua atividade desativadora de oxigênio singlete e radical ânion superóxido (XUE et al., 2017), além de radicais hidroxilas (HAMA et al., 2012a; HAMA et al., 2012b).

A produção de astaxantina por via biotecnológica usando microrganismos vem aumentando nos últimos anos, por possuir um alto valor agregado no mercado (FONSECA et al., 2011), sendo encontrada principalmente na levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (o estado teleomórfico de *Phaffia rhodozyma*) (RODRÍGUEZ-SÁIZ et al., 2010). Esta xantofila é usada para prover a coloração característica em alguns peixes como a truta e o salmão, crustáceos, pássaros e como material de coloração em alimentos e cosméticos (NI et al., 2008; FRANCO-ZAVALETA et al., 2010).

A produção, isolamento e purificação da astaxantina por fontes biotecnológicas ainda é considerada cara, no entanto, pesquisas recentes tem demonstrado que a levedura *Phaffia rhodozyma* é promissora para a produção industrial deste carotenoide. Após o β -caroteno, a astaxantina é o segundo carotenoide mais importante comercialmente, representando cerca de 29% das vendas totais de carotenoides (SCHMIDT et al., 2011).

5. POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES DE LEVEDURAS

Dentre os carotenoides provenientes de leveduras com grande potencial de carotenogênese destacam-se o β -caroteno, toruleno e a torularodina (JOHNSON & LEWIS, 1979; BUZZINI *et al.*, 2007; ZOZ *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2016), pois além de sua atividade provitamina A, eles também possui elevada capacidade antioxidante (ZOZ *et al.*, 2015; KOT *et al.*, 2018). O toruleno é o principal carotenoide da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo considerado um carotenoide com grande potencial de interesse para aplicações industriais (ZOZ *et al.*, 2015), a torularodina, por sua vez, é considerada um dos poucos carotenoides com função de ácido carboxílico e possui atividade antioxidante considerável (SAKAKI *et al.*, 2002).

Como o toruleno e torularodina estão ausentes em matrizes vegetais e animais, portanto não fazem parte da dieta humana, sua influência sobre o corpo humano ainda não foi totalmente elucidada, tão pouco são produzidos ou utilizados industrialmente (KOT *et al.*, 2018). Com base na sua estrutura química e consecutivamente suas propriedades, há grande possibilidade de serem utilizados como aditivos alimentares e cosméticos (ZOZ *et al.*, 2015) e até mesmo como ingrediente de medicamentos (UNGUREANU & FERDES 2012).

Quanto a capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), a torularodina e o toruleno mostrou-se mais eficiente para a inibição do oxigênio singlete do que o β -caroteno, devido ao maior número de l.d.c., confirmando que os carotenoides que possuem uma cadeia poliênica mais longa podem exibir uma capacidade maior de suprimir o oxigênio singlete (SAKAKI *et al.*, 2001a).

A torularodina também foi investigada por seu papel como sequestrante de radicais peroxilas, a adição de 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)-dicloridrato (AAPH) como um gerador de radicais peroxilas foi analisado e a eliminação dos radicais peroxilas pela torularodina foram comparados com o β -caroteno. O aumento de AAPH induziu a torularodina ser consumida mais rapidamente que o β -caroteno, o estudo em questão, demonstrou entre outros fatores, a capacidade da torularodina em sequestrar radicais peroxilas de maneira mais eficaz que β -caroteno (SAKAKI *et al.*, 2001 b). Contudo, Dimitrova *et al.* (2012) determinaram a capacidade antioxidativa (ORAC) de carotenoides provenientes de *Sporobolomyces salmonicolor*. Neste estudo, o toruleno e a torularodina exibiram capacidade antioxidante inferiores aos β -caroteno.

Em outro estudo, o azul de metileno, o metilvioleno e o dicloridrato de AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano)] foram usados como geradores de oxigênio singlete, radicais ânion superóxido e radicais peróxidos, respectivamente. O estudo revelou que a torularodina exibiu uma capacidade superior de eliminar radicais peroxilas e inibiu a degradação do substrato pelo oxigênio singlete mais efetivamente do que o β -caroteno (SAKAKI *et al.*, 2002).

O dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células estromais da próstata humana foram submetidos a capacidade antioxidante do toruleno e da torularodina. Quando as células foram pré tratadas com esses dois carotenoides houve inibição da superprodução de ROS intracelulares indicando que tanto o toruleno como a torularodina podem proteger as células do estroma da próstata humana do dano do estresse oxidativo, sendo constatado um aumento da capacidade de defesa antioxidante celular, que pode ser até mesmo superior ao efeito do licopeno, sugerindo que tanto o toruleno quanto a torularodina são promissores na prevenção do início e progressão de doenças prostáticas (DU *et al.*, 2017).

6. MERCADO DE CAROTENOIDES NO BRASIL

A produção industrial de corantes alimentícios vem se expandindo nas últimas décadas; contudo, devido à constante procura por produtos naturais, visando uma maior preocupação pela saúde por parte dos consumidores, o mercado internacional de pigmentos busca incorporar corantes naturais em seus produtos ao invés dos sintéticos (ou artificiais) (AGÓCS & DELI, 2011). Desta forma, corantes biosintetizados vem despertando o interesse científico e comercial devido ao seu apelo natural.

Dados sobre as importações e as exportações do comércio brasileiro de carotenoides são encontrados no portal de dados de estatística do comércio exterior do Brasil (COMEX STAT, 2018), a partir da inserção da Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) do produto que se deseja buscar. No caso de produtos relacionados a carotenoides, três buscas podem ser possíveis:

- Carotenoides (NMC 32041911);
- Preparações contendo beta-caroteno, ésteres metílico ou etílico do ácido 8'-apo-beta-carotenóico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina, próprias para colorir alimentos (NCM 32041912);
- Outras preparações à base de carotenoides (NCM 32041919)

Na Tabela 1, são relatadas as quantias em valor (US\$) e as quantidades (kg) importadas e exportadas das três NCM mencionadas acima.

Tabela 1. Importação e exportação de carotenoides, preparações contendo β -caroteno e outras preparações a base de carotenoides entre os anos 2013 e 2018.

	NMC 32041911		NCM 32041912		NCM 32041919	
Ano	Importação (kg)	Exportação (kg)	Importação (kg)	Exportação (kg)	Importação (kg)	Exportação (kg)
2013	61.476	573	104.752	1.021	292.859	15
2014	62.184	800	97.330	805	284.614	62
2015	113.916	811	92.868	0	468.364	30
2016	79.062	2.901	79.985	175	158.177	130
2017	118.259	846	58.578	190	926.866	31
2018	41.901	220	52.382	1.180	687.803	765

	Importação (US\$)	Exportação (US\$)	Importação (US\$)	Exportação (US\$)	Importação (US\$)	Exportação (US\$)
2013	2.985.376	40.140	3.998.369	121.405	1.227.018	276
2014	2.985.827	50.512	2.771.384	52.834	991.527	1.248
2015	3.809.948	60.281	2.730.419	36	1.366.252	521
2016	1.563.544	170.994	2.948.609	20.464	451.865	2.552
2017	1.577.405	66.234	2.180.819	4.492	2.051.999	612
2018	1.416.461	14.311	2.203.618	59.448	1.669.065	11.647

Fonte: Portal de dados de estatística do comércio exterior do Brasil (COMEX STAT, 2018).
 NMC32041911 =mercado brasileiro de carotenoides; NCM 32041912= preparações contendo beta-caroteno, ésteres metílico ou etílico do ácido 8'-apo-beta-carotenóico ou cantaxantina, com óleos ou gorduras vegetais, amido, gelatina, sacarose ou dextrina, próprias para colorir alimentos; e NCM 32041919 =outras preparações à base de carotenoides.

No período de 2013 a 2018, o Brasil importou um total de 3.781.376 kg das três NCM mencionadas acima, movimentando US\$ 38.929.505, para o mesmo período, exportou apenas 10.555 kg, o que correspondeu a US\$ 678.007 tornando o Brasil um país essencialmente importador de carotenoides e seus derivados. O mercado global de carotenoides está avaliado com uma taxa anual de 2,3%, movimentando US\$ 1,4 bilhão até o ano de 2018 (BCC RESEARCH, 2011). A maioria dos carotenoides no mercado são derivados de síntese química, aproximadamente 90%, contudo, com a crescente

preocupação com o uso aditivos químicos em alimentos, o mercado de corantes via síntese química tornou-se limitado no sentido de satisfazer o desejo dos consumidores por carotenoides naturais (VILA *et al.*, 2008).

7. PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR VIA BIOTECNOLÓGICA

A possibilidade de perspectiva da visão de produção de corantes naturais em escala industrial e o elevado valor agregado dos produtos tornam a produção biotecnológica de carotenoides uma área de intensa pesquisa. Estes pigmentos podem ser produzidos por fermentação industrial, onde ocorre uma fase de crescimento para aumentar a biomassa microbiana, seguida por uma fase de produção em que a biomassa permanece constante; contudo, a síntese de carotenoides é aumentada (BERMAN *et al.*, 2014). A busca pelos corantes naturais tem impulsionado diversos países a investirem na produção de carotenoides naturais por via biotecnológica (Tabela 2).

Tabela 2. Empresas produtoras de carotenoides por rota biotecnológica.

Empresas	Produto final	País de Produção	Website
Alga Technologies	Oleoresina, cápsulas, pó e emulsão de astaxantina	Israel	algatech.com
BASF	Mistura de carotenoides	Austrália	worldaccount.basf.com
BlueBiotech	Pó de microalga com astaxantina	Alemanha	bluebiotech.de/com
Cyanotech	Cápsulas de astaxantina	Estados Unidos da América	cyanotech.com
Fuji Chemical Industries	Astaxantina em cápsulas gelatinosas, tabletes, pó e em biomassa de microalga	Estados Unidos da América e Suécia	astareal.com
Parry Nutraceuticals	Astaxantina e mistura de β -caroteno, zeaxantina, criptoxantinas e luteína	Índia	parrynutraceuticals.com
Plankton Australia Pty Limited	Pó de microalga com mistura de β -caroteno, zeaxantina, criptoxantinas e luteína	Austrália	planktonaustralia.com
Carote Nature	Possui mais de 150 carotenoides em sua lista de compra na forma <i>cis</i> e <i>trans</i>	Suíça	carotenature.com

Fonte: adaptado de MESQUITA *et al.* (2017).

A produção comercial de carotenoides a partir de microrganismos concorre principalmente com a produção sintética obtida por via química ou pela extração a partir de plantas e/ou algas. No entanto, com a crescente preocupação com o uso aditivos químicos em alimentos, houve um maior interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos. Além da conotação natural, produtos obtidos via produção microbiana podem ser obtidos em curto prazo e em qualquer época do ano (VALDUGA *et al.*, 2009b). Neste sentido, muitas leveduras de interesse biotecnológico possuem a capacidade de biosintetizar diferentes tipos de carotenoides em variadas proporções em resposta ao cultivo.

8. LEVEDURAS PRODUTORAS DE CAROTENOIDES

A produção de carotenoides por fungos e leveduras é alvo de investigação há muitos anos. Como resposta ao estresse celular, o microorganismo produz metabólitos secundários de interesse biotecnológicos como os carotenoides, onde durante a carotenogênese, os pigmentos formados e a concentração dependem das condições de cultivo e das espécies destes microorganismos.

Neste contexto, as leveduras podem ser destacadas pelo seu uso como fonte proteica e pela capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar (VALDUGA *et al.*, 2009b).

Fungos e leveduras podem sintetizar carotenoides quando cultivadas em meios de cultivo contendo vários monossacarídeos ou dissacarídeos. Sendo a carotenogênese em muitos organismos regulada pela luz; Valduga *et al.*, (2009b) relatou em seu estudo que algumas leveduras sintetizam carotenoides quando submetidas a condições adversas de cultivo ou estresse celular, como por exemplo, os danos causados pela incidência luminosa.

Diversos estudos visando a carotenogênese desses microorganismos foram relatados na literatura e podem ser acompanhadas na Tabela 3.

Tabela 3. Carotenoides produzidos biotecnologicamente a partir de fungos.

Espécie	Principais carotenoides	Referências
<i>Blakeslea trispora</i>	β -Caroteno	Mantzouridou <i>et al.</i> , (2008)
	Licopeno	
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Pichia pastoris</i>	Licopeno	Bhataya <i>et al.</i> , (2009)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -Caroteno	Liu <i>et al.</i> , (2006); Dominguez Bocanegra <i>et al.</i> , (2007)
<i>Rhodospiridium</i> sp	Toruleno, β -Caroteno	Johnsone & Schroeder (1995)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NCYC 921	β -Caroteno	Dias <i>et al.</i> , (2015)
<i>Rhodotorula graminis</i>	Toruleno	Buzzini <i>et al.</i> , (2005)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Torularodina, β -Caroteno, Toruleno	Buzzini & Martini (1999); Aksu & Eren (2005)
<i>Rhodotorula rubra</i>	β -caroteno	Shih & Hang (1996)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularodina, β -Caroteno, toruleno	Buzzini <i>et al.</i> , (1999)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	β -Caroteno	Valduga <i>et al.</i> , (2009)
<i>Sporidiobolus</i> sp	Torularodina, β -Caroteno, Toruleno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularodina, β -Caroteno, Toruleno	Davoli <i>et al.</i> , (2004)

<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Torularodina, β -Caroteno	Razavi & March (2006)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> H110	Torularodina, Toruleno, β -Caroteno e γ -Caroteno	Cardoso <i>et al.</i> , (2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutants	β -Caroteno	Li <i>et al.</i> , (2013)

A composição de carotenoides biosintetizados por cinco linhagens de *Rhodotorula* foi reportada por Squina *et al.*, (2003), em todas as linhagens, os carotenoides majoritários encontrados foram torularodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno. Os teores totais de carotenoides, em $\mu\text{g/g}$ em base seca, foram de 251,7 em *R. glutinis*, 123,5 em *R. rubra*, 113,2 em *R. araucariae*, 105,8 em *R. lactosa* e de 103,7 em *R. minuta*.

Banzatto *et al.* (2013) relatou a produção de biomassa e de carotenoides por *R. rubra* cultivadas em meios à base de caldo, melaço e xarope de cana e concluiu que a produção de carotenoides intracelular foi elevada (329 $\mu\text{g/g}$, em base seca) em todos os meios estudados, sem a necessidade de suplementação e os principais carotenoides produzidos foram toruleno, torularodina e β -caroteno. Em estudos com a linhagem *R. mucilaginosa* para produzir carotenoides utilizando resíduos alimentares, foi reportado que o melaço pode ter potencial como resíduo aceitável devido à sua capacidade de produção de baixo custo para a biossíntese de carotenoides naturais com uma composição de 23,8% de β -caroteno, 67,5% de toruleno e 8,7% de torularodina (Cheng & Yang, 2016).

Em um estudo com o objetivo de investigar a produção de lipídios microbianos para a produção de biodiesel e de carotenoides de alto valor por *R. glutinis*, combinada com o uso de efluentes de cervejaria como fonte de carbono, foi verificado que os carotenoides foram sintetizados em todos os tratamentos com teores totais de carotenoides entre 0,6 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$ e com altas proporções de β -caroteno (~50%) (SCHNEIDER *et al.*, 2013). Zang & Tan (2014) avaliaram a capacidade de produção de lipídios e de carotenoides por *R. glutinis* sob diferentes condições de irradiação, temperaturas e relações carbono/nitrogênio. Os resultados mostraram que a temperatura baixa/ambiente escuro aumenta o conteúdo lipídico, enquanto a irradiação/alta

temperatura aumentava a produção de biomassa e de carotenoides. Em outro estudo, a relação entre a produção de carotenoides, a biorremediação de cobre e o estresse oxidativo em *R. mucilaginosa* RCL-11 foi avaliada (IRAZUSTA *et al.*, 2013) e foi verificada alteração nas proporções de torularodina, toruleno e β -caroteno dependendo do estresse celular ao qual a levedura havia sido submetida.

Alguns estudos com o objetivo de aumentar a produção de carotenoides por leveduras também foram reportados na literatura. Cardoso *et al.* (2016) avaliou a melhoria da produção de carotenoides por *Sporobolomyces ruberrimus* pelo uso de glicerol bruto e identificou a presença de torularodina, toruleno, β -caroteno e γ -caroteno. Os autores concluíram que o uso de glicerol bruto aumentou a proporção de torularodina e a adição de ácidos graxos individuais de glicerol puro resultou em aumentos entre 15% e 25% na concentração máxima e entre 1,6 e 2,0 vezes na produtividade de carotenoides. Em outro estudo, Varmira *et al.* (2016) investigaram o efeito da presença de sais minerais e solventes na carotenogênese em *R. rubra*, utilizando glicose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, os resultados desse estudo demonstraram que a carotenogênese é melhorada na presença de sulfato de magnésio (MgSO_4). Os resultados também indicaram que a combinação de MgSO_4 e metanol teve o maior impacto no desempenho da carotenogênese da célula onde os carotenoides detectados foram a torularodina, toruleno e β -caroteno.

9. FATORES QUE AFETAM A BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES

A produtividade de um bioprocessamento em um dado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento (LIU & WU, 2007).

Alguns trabalhos indicam que as condições ótimas para a produção de carotenoides não são as mesmas que para o crescimento celular (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014). Neste contexto, as condições como a temperatura de cultivo, aeração, pH, iluminação e composição dos substratos utilizados devem ser avaliados, a fim de se obter um processo visando o crescimento de microorganismos e a produção/composição de carotenoides de interesse (VALDUGA *et al.*, 2009; ZENI *et al.*, 2011).

Desta forma, uma avaliação desses fatores é de primordial importância na bioprodução de carotenoides, uma vez, que para ser viável industrialmente, faz-se

necessário reduzir os custos e melhorar os rendimentos, além de investigar técnicas de recuperação (extração) e preservação destes compostos.

9.1. pH

O pH é considerado um dos parâmetros ambientais de maior influência no crescimento celular e formação de produtos de interesse. Sendo o pH inicial o objeto de estudo na carotenogênese (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Durante a biossíntese de carotenoides em processos fermentativos, ocorre naturalmente a mudança de pH no meio de cultivo, decorrente da atividade metabólica das leveduras. Via de regra, há o decréscimo de pH durante as primeiras 72 horas, após este período, ocorre a fase intensa de carotenogênese, como consequência há a elevação do pH. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final da bioprodução (FRENGOVA *et al.*, 1984).

Tinoi *et al.* (2005) estudaram as condições ótimas para a produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis* em faixas de pH que variaram de 3,0 -7,5 e verificaram que no pH ótimo de 5,91 foi obtido aproximadamente 3,48 µg/mL de carotenoides totais e biomassa de 10,35 g/L.

As condições ótimas de pH para uma cepa de levedura *R. glutinis* isolada de flor de coxim (*Scabiosa atropurpurea*) foi reportada no valor de pH de 6,2 do meio de cultivo (EL-BANNA *et al.*, 2012). Estes autores descreveram que a cepa de levedura foi cultivada sob as condições ótimas durante 6 dias, a produção começou após o primeiro dia de incubação e a maior parte do conteúdo de carotenoides nas células de levedura foi produzida durante a fase estacionária com os teores mais elevados de carotenoides totais (861 µg/g) alcançados após 5 dias de crescimento. Em um estudo de fermentação em estado sólido, as condições ótimas de cultivo para a *R. glutinis* elucidaram a preferência das leveduras por valores de pH mais ácidos (próximos de 4,0), com valores de carotenoides totais de 340 µg/mL (HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014). Em seu estudo, Kot *et al.* (2017) relataram o pH 5,0 como ótimo para a produção de biomassa e de carotenoides pela *R. glutinis*. Uma diminuição no pH do meio para 2,0 inibiu completamente o crescimento da levedura e durante o cultivo da mesma e, em meio com pH 3,0 houve redução significativa do crescimento.

Naghavi *et al.* (2014) ao investigarem a influência do pH (3-8) nas leveduras *R. mucilaginosa* afirmaram que o aumento do pH do meio para 5 teve um efeito significativo

na produção de pigmentos e de biomassa, porém para valores de pH mais elevados causaram um declínio significativo em ambos os fatores. A maior concentração de biomassa seca e de carotenoides foi 16,33 g/L e 3930 µg/mL respectivamente. Para a mesma levedura (*R. mucilaginosa*), foi observado também que a elevação do pH de 3,0 para 7,0 no meio de cultivo resultou em um aumento no crescimento celular (5,1 g/L de células secas) e nas concentrações dos carotenoides totais (69,8 µg/mL) (AKSU & EREN, 2005).

Nasrabadi & Razavi (2011) relataram as condições ótimas para a produção do β-caroteno para a levedura *Rhodotorula acheniorum* mutante, onde o pH ótimo foi fixado em 5,85. A otimização do meio resultou em um aumento de 4,62 vezes na acumulação celular (262,12 µg/g) de β-caroteno.

Para a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), a bioprodução de carotenoides foi associada parcialmente com o crescimento celular, onde a concentração máxima de 3,42 µg/mL de carotenoides totais foi alcançada em um biorreator com pH inicial do meio no valor de 4,0 (VALDUGA *et al.*, 2009a).

As leveduras *Rhodospiridium diobovatum* foram inoculadas a um valor inicial de pH 5,5 e após 96 horas de incubação o pH diminuiu para 4,2 e, em seguida atingiu um pico de pH 5,0 após 120 horas de incubação onde o pico de carotenoides totais foi máximo (186 µg/g) (NASIRIAN *et al.*, 2018).

Shih & Hang (1996) avaliaram três cepas de *R. rubra* em um meio ácido e observaram que em valores de pH demasiadamente baixos (pH 3,4 - 4,5) ocorreu a inibição do crescimento celular e da produção de carotenoides, sendo que a máxima concentração celular e produção dos pigmentos foram obtidas em pH inicial de 5,0. Em outro estudo, Mihalcea *et al.* (2011) examinaram o efeito do pH em uma faixa de 3 a 8 em *R. rubra* e mostraram que o pH ótimo para o crescimento da levedura foi o pH 5,0. Verificaram ainda que a formação de torularodina foi favorecida no intervalo de pH entre 6,0 e 7,0, porém no pH 8,0 o crescimento da levedura foi limitado e em pH 3 a produção de carotenoides não foi favorável.

O pH exerce grande influência sobre as leveduras na carotenogênese, em geral as leveduras têm preferência por valores de pH mais ácidos, porém em pH demasiadamente ácidos ocorre a inibição de crescimento das leveduras e consequentemente a diminuição da produção de carotenoides. Diferentemente dos fungos filamentosos, as leveduras não toleram pH alcalinos. Portanto a faixa de pH do meio em qual as leveduras são submetidas afeta significativamente seu crescimento e sua carotenogênese.

9.2. Temperatura

A importância da temperatura está associada a dois fatores principais: metabolismo enzimático e crescimento celular. A temperatura exerce influência no controle da concentração enzimática envolvida na carotenogênese, variações destas concentrações controlam a produção biotecnológica de carotenoides por microorganismos (HAYMAN *et al.*, 1974).

Segundo Valduga *et al.* (2009b) a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos microorganismos, causando alterações em muitas vias biosintéticas, inclusive na carotenogênese. Em geral, a temperatura média de crescimento de fungos é entre 25 °-30 °C.

Um estudo sobre a otimização da produção de carotenoides totais por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) usando a metodologia de superfície de reposta relatou a máxima concentração de carotenoides totais quando a temperatura foi ajustada para 25 °C (VALDUGA *et al.*, 2008). Nasirian *et al.* (2018), por sua vez, estabeleceu, entre outros fatores, a temperatura de 30 °C para leveduras *R. diobovatum* serem inoculadas e obterem o pico máximo de crescimento celular.

Em seus estudos, Aksun & Eren (2007) avaliaram a taxa de crescimento específica da levedura *R. glutinis* e constataram que a taxa de crescimento aumentou com a elevação da temperatura de 25 °C para 30 °C e, diminuiu de maneira drástica em temperatura superior, a temperatura também influenciou a taxa de formação dos carotenoides, a qual apresentou uma elevada concentração de carotenoides totais até 30 °C. Anteriormente, os mesmo autores avaliaram o efeito da temperatura na levedura *R. mucilaginosa*; estes, relataram que a elevação da temperatura de 25 °C para 30 °C proporcionou um aumento na taxa de formação de carotenoides totais, porém em temperatura acima de 30 °C houve à desnaturação do sistema enzimático do microorganismo diminuindo dessa forma a biossíntese de carotenoides (AKSUN & EREN, 2005). Em fermentação em estado sólido, a levedura *R. glutinis* produziu 340 e 323 µg/mL de carotenoides totais nas temperaturas 25 e 30 °C, respectivamente (HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014). Por outro lado, El-Banna *et al.* (2012) reportou em sua pesquisa que a temperatura ótima para a produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis* para a produção celular foi de 15 °C. No entanto, a temperatura ideal para o crescimento celular (biomassa seca) e consequentemente a produção de carotenoides foi de 25 °C. Os autores também relataram que a temperatura

de cultivo afetou as proporções no perfil de carotenoides: A concentração de β -caroteno aumentava e a de toruleno e torularodina diminuíram com o aumento da temperatura.

Em outro experimento, a *R. glutinis* foi submetida a diferentes condições de irradiação, temperaturas e relações C/N. Os resultados mostraram que temperaturas baixas (24 °C) e ambiente escuro favoreceram o conteúdo lipídico, enquanto a irradiação em alta temperatura (30 °C) e em ambientes com maior luminosidade aumentou a produção de biomassa e de carotenoides (ZANG & TAN, 2014).

Para a *R. acheniorum* mutante isolada do soro do leite, a produção máxima otimizada de β -caroteno (262,12 $\mu\text{g/ml}$) foi reportada na temperatura de 23 °C. (NASRABADI & RAZAVI, 2011). Em estudo com a *R. mucilaginosa*, a concentração de biomassa aumenta (3,93 g/L) quando a temperatura é elevada de 10 para 30 °C, assim como a concentração de carotenoides (3400 $\mu\text{g/mL}$) (NAGHAVI *et al.*, 2014). No entanto, a levedura *R. Rubra* não apresenta diferença significativa nas temperaturas entre 20-30 °C para a produção de carotenoides e crescimento da biomassa (MIHALCEA *et al.*, 2011).

A faixa de temperatura em que são submetidas as leveduras para a carotenogênese muitas vezes não são as mesmas para o crescimento celular, em geral uma grande faixa de temperatura é estudada durante os dois processos. No entanto, percebe-se que temperaturas baixas não contribuem para o crescimento celular e tão pouco para a produção de carotenoides. Por outro lado, faixas elevadas de temperatura, desnaturam enzimas importantes para o processo de carotenogênese, além de inibirem o crescimento celular.

9.3. Taxa de agitação e aeração

Microorganismos aeróbios necessitam das melhores condições de aeração e agitação para maior rendimento. Um estudo realizado por Tinoi *et al.* (2005) demonstraram que em baixas taxas de agitação (100 a 150 rpm), é obtido o menor crescimento celular da levedura *R. glutinis* devido à redução da disponibilidade de nutrientes na superfície das células, porém em taxas elevadas de agitação (> 250 rpm) ocorre ruptura celular. El-Bana *et al.* (2012), cultivou a levedura *R. glutinis* sob condições específicas de temperatura (25 °C) e tamanho do inóculo com agitação constante de 100 rpm para obter os maiores teores de carotenoides (1,9 $\mu\text{g/mL}$).

Hernández-Almanza *et al.* (2014) estudaram as condições de cultivo para *R. glutinis* com e sem agitação, e as maiores concentrações de carotenoides totais foram obtidas, entre outras variáveis, quando obtiveram agitação de 125 rpm durante o processo fermentativo. Para a *R. mucilaginosa*, a incubação realizada em agitador rotativo a 150 rpm por 72 h resultou na produção maximizada de carotenoides (3,40 µg/mL) (NAGHAVI *et al.*, 2014). No entanto, valores superiores de agitação (250 rpm) durante 5-6 dias foram reportados em um bioprocessamento aeróbico descontínuo para a obtenção de torularodina pela levedura *R. rubra* ICCF 209 (MIHALCEA *et al.*, 2011).

Liu *et al.* (2006) estudaram os efeitos da transferência de oxigênio em frascos agitados com *P. rhodozyma*, observaram que a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida foi diminuída, com valores próximos a zero com 30 h de fermentação; no entanto, na fase gasosa a concentração de oxigênio foi reduzida minimamente. Os autores também evidenciaram que o aumento da agitação e a diminuição do volume reacional proporcionaram um crescimento celular e produção de carotenoides, todavia, a mudança na velocidade de agitação apresentou maior efeito no rendimento de carotenoides. O coeficiente de transferência de oxigênio diminuiu com a redução do volume de líquido e aumentou com a velocidade de agitação.

Em um outro estudo, a limitação de oxigênio afetou negativamente a produção da biomassa e, como consequência a concentração de carotenoides totais pelo fungo *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 utilizando o xarope de polpa de alfarroba como substrato (MARTINS *et al.*, 2018). Valduga *et al.* (2009a) ao avaliarem as condições de cultivo para maximizar a produção de carotenoides totais por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) reportou uma taxa de aeramento de 1,5 volumes de ar por volume de meio por minuto (vvm) e 180 rpm. Borba *et al.* (2018) afirmou que a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em cultivo no fermentador de tanque agitado foi 3,5 vezes maior do que o valor obtido com frascos de agitação (1969,3 µg/L). Em seu estudo, os autores não demonstraram apenas a influência dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de carotenoides pela levedura *S. pararoseus*, mas também mostraram que sua capacidade de produção pode ser aumentada, modificando os parâmetros de aeração e agitação.

Nas leveduras, em geral, taxas de agitação baixas afetam o crescimento das leveduras pelo déficit de disponibilidade de nutrientes e faixas muito elevadas de agitação ocasionam ruptura celular. Além disso, altas faixas de aeração são essenciais para a otimização do processo fermentativo das leveduras aeróbias.

9.4. Luminosidade

Segundo Valduga *et al.* (2009b) a produção e o acúmulo de carotenoides são positivamente afetados pela irradiação de luz branca em algas, fungos e bactérias. Contudo, a intensidade e forma de iluminação variam com o microorganismo. Bhosale (2004) considera que a teoria da fotoindução pode ser descrita em duas fases: a primeira relacionada ao efeito que a luz branca pode exercer no crescimento microbiano como estimulante da produção; e a segunda fase, por sua vez, considera que o acúmulo de carotenoides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese desses carotenoides.

Sakaki *et al.* (2001) reportou a ativação da produção de torularodina por *R. glutinis* usando irradiação fraca de luz branca, a qual inibiu o crescimento da levedura; no entanto, simultaneamente, a produção de torularodina aumentou acentuadamente, enquanto que para levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mesma radiação não apresentou efeito sobre o crescimento das células, evidenciando desta forma, que determinadas leveduras biossintetizam carotenoides contra os danos causados pela luz.

As lâmpadas LED's (Light Emitting Diode) emitem luz com comprimento de onda variável. Kim *et al.* (2006) relataram que vários fatores afetaram a acumulação de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*, entre eles, a luz. Em um estudo, quando as culturas de *H. pluvialis* foram iluminadas por LED's azul ($\lambda_{\text{máx}}$ de 470 nm), obtiveram um aumento na concentração de astaxantina rapidamente, enquanto que na presença de LED's vermelho ($\lambda_{\text{máx}}$ de 625nm), a produção começava mais lentamente e diminuía com o tempo (LABABPOUR *et al.*, 2005). As culturas da levedura *R. glutinis* foram submetidas à iluminação com lâmpadas LED (800 mol/m²s), e a produtividade de carotenoides foi observada como máxima (2,6 µg/mL) quando a cultura foi iluminada com três lâmpadas de LED, o que constituiu um aumento de mais de 2 vezes em comparação com a cultura controle de *Haematococcus pluvialis* sem iluminação (1,2 µg/mL). Os autores também relataram que a incidência de luz não inibiu o crescimento das leveduras (ZHANG *et al.*, 2014).

Fré *et al.* (2014) ao avaliarem a influência da luminosidade na produção de carotenoides pela *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlif* iluminados continuamente na seção riser a 17,5 kLux por um painel de lâmpadas eletrônicas, mostraram que a iluminação e a salinidade afetaram significativamente a produção de

carotenoides, e quanto maiores as condições de estresse salino e luminoso, após a fase de crescimento, maior a síntese de carotenoides.

9.5. Composição do substrato

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides. O tipo de substrato impacta diretamente no rendimento dos pigmentos e subsequentemente no custo deste processo biotecnológico. O rendimento global dos carotenoides está diretamente correlacionado com o rendimento total de biomassa; desta forma, manter altas taxas de crescimento e o alto fluxo de eficiência de carbono são consideradas as condições ideais para atingir a máxima produtividade de pigmento (MAROVA *et al.*, 2012).

Desta forma, diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de microorganismos devido a alta disponibilidade e baixo custo. A Tabela 4 mostra alguns dos resíduos agroindustriais utilizados como substratos para a produção de carotenoides por leveduras.

Tabela 4. Resíduos agroindustriais utilizados como substratos para a produção de carotenoides em leveduras.

Espécie	Substrato	Principais Carotenoides	Referência
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Extrato de soja	β -caroteno, toruleno, toruladina	Buzzini & Martini, (2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Xarope de glicose	β -caroteno, toruleno, toruladina	Buzzini & Martini, (2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Whey ultrafiltrado	Carotenoides totais	Frengova <i>et al.</i> , (1994); (2003)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Extrato de milho	β -caroteno, toruleno, toruladina	Buzzini & Martini, (2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glicerol bruto	Carotenoides totais	Saenge <i>et al.</i> , (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Farinha de feijão-mung e extrato de batata-doce	Carotenoides totais	Tinoi <i>et al.</i> , (2005)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Whey	β -caroteno	Marova <i>et al.</i> , (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Salmoura de rabanete fermentada	β -caroteno	Malisorn & Suntornsuk, (2008)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Penas de galinha	Carotenoides totais	Taskin <i>et al.</i> , (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Salmoura de rabanete fermentada	β -caroteno	Malisorn & Suntornsuk, (2009)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	efluentes de cervejaria	β -caroteno	Schneider <i>et al.</i> , (2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Efluente residual da fécula da batata	Torularodina, toruleno e β -caroteno	Kot <i>et al.</i> , (2017)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Melaço de beterraba	β -caroteno, toruleno, toruladina	Buzzini & Martini (2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Mosto de uva	β -caroteno, toruleno, toruladina	Buzzini & Martini (2000)

<i>Rhodotorula rubra</i>	Meios à base de caldo, melão e xarope de cana	Toruleno, TORULARODINA e β -caroteno	Banzatto <i>et al.</i> , (2013)
<i>Rhodotorula rubra</i>	Soro de leite ultrafiltrado	Toruleno, TORULARODINA e β -caroteno	Frengova <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhodotorula rubra</i>	Caldo de cana	Carotenoides totais	Bonadio <i>et al.</i> , (2018)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Batata	β -caroteno	Marova <i>et al.</i> , (2011)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Resíduos de café	β -caroteno	Moreira <i>et al.</i> , (2018)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Melão	Toruleno, TORULARODINA e β -caroteno	Cheng & Yang (2016)
<i>Rhodotorula acheniorum</i>	Whey ultrafiltrado	β -caroteno	Nasrabadi & Razavi., (2012)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Água de maceração de milho	β -caroteno	Colet <i>et al.</i> , (2017)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Soro de leite	Carotenoides totais	Valduga <i>et al.</i> , (2009)
<i>Sporidiobolus salmonicolo</i>	Água de parboilização de arroz	β -caroteno	Colet <i>et al.</i> , (2017)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	licor de milho e melão de cana-de-açúcar pré-tratado	Carotenoides totais	Borba <i>et al.</i> , (2018)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Xarope de polpa de alfarroba	Carotenoides totais	Martins <i>et al.</i> , (2018)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Flor <i>Calendula officinalis</i> , farinha de sementes de <i>Zea mays</i> , farinha de semente de batata, farinha de semente de	Astaxantina	Bhatt <i>et al</i> & Panda, (2013)

Pennisetum
glaucum, farinha
 de *Triticum*.

10. EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS CAROTENOIDES DE LEVEDURAS

Apesar da elevada bioprodução de carotenoides a partir de microorganismos, na carotenogênese, muito desses compostos são normalmente produzidos no interior das células causando limitações para seu uso industrial, devido à parede celular desses microorganismos apresentarem estrutura rígida, dificultando o acesso a estes compostos durante os procedimentos de extração. Após o rompimento celular, os carotenoides podem ser extraídos das células microbianas pela dissolução em solventes orgânicos, como acetona, éter de petróleo, hexano, clorofórmio, etanol e metanol. (KAISER *et al.*, 2007).

Valduga *et al.* (2009) avaliaram 11 métodos diferentes de rompimento celular e extração de carotenoides com solventes, constatando que quando utilizada a combinação de nitrogênio líquido mais dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e, extração com mistura de acetona e etanol (7:3, v/v), obteve-se maior recuperação de carotenoides da levedura *S. salmonicolor* cultivada em meio YM. A extração de carotenoides utilizando diferentes técnicas de ruptura celular estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Extração de carotenoides totais por diferentes técnicas de ruptura celular.

Leveduras	Descrição da Técnica	Rendimento de carotenoide	Referência
<i>Phaffia</i> <i>rhodozyma</i>	Congelamento e maceração com terra diatomácea	93,13 µg/g de biomassa	Michelon <i>et al.</i> , (2012)
<i>Phaffia</i> <i>rhodozyma</i>	Congelamento e DMSO	155,72 µg/g de biomassa	Michelon <i>et al.</i> , (2012)
<i>Phaffia</i> <i>rhodozyma</i>	Lise enzimática e ondas ultrassônicas	163,12 µg/g de biomassa	Michelon <i>et al.</i> , (2012)
<i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i>	Moedor de talão	125 mg/L de biomassa	Aksu & Eren, (2007)

<i>Rhodotorula glutinis</i>	Liofilização	266,1 µg/g de biomassa	Park <i>et al.</i> ,(2007)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Congelamento em N ₂ líquido e maceração	590,4 µ/L de biomassa	Valduga <i>et al.</i> , (2009)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DMSO, acetona e éter de petróleo	92 mg/L de biomassa	Taskin <i>et al.</i> , (2011)
<i>Rhodotobacter sphaeroides</i>	HCl e acetona	4790 µg/g de biomassa	Gu <i>et al.</i> ,(1997)
<i>Rhodotorula graminis</i>	DMSO, acetona e éter de petróleo	803,2 µg/g de biomassa	Buzzini <i>et al.</i> ,(2001)

Fonte: Adaptado de MATA-GOMEZ *et al.*, (2014)

11. CONCLUSÃO

A produção de carotenoides por leveduras é uma estratégia promissora e viável industrialmente, pois possibilita o uso de resíduos agroindustriais como substrato durante o processo fermentativo, possibilitando uma diminuição dos custos e contribuição para o meio ambiente, oferecendo uma alternativa econômica e ambiental para diversos resíduos.

A aplicação destes carotenoides abrange os mais diversos setores, como o uso na avicultura, piscicultura, suplementação, cosmético, ração animal, indústria farmacêutica e alimentícia. Movimenta um mercado promissor e em expansão. Suas propriedades provitamina A e antioxidante *in vivo* e *in vitro* tem sido foco de estudos para o seu uso na prevenção de diversas doenças e combate de processos oxidativos naturais.

Esta revisão contribuiu com a discussão de diferentes estratégias de controle para produção de carotenoides microbianos, suas aplicações, além de suas propriedades estruturais, precursoras de vitamina A e antioxidantes; proporcionando um setor com ascendência econômica irrefutável. Sendo concludente que tais conhecimento são fundamentais para futuras aplicações, tecnologias, pesquisas e produção da carotenogênese microbiana.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Projeto 403121/2016-7). W.S. Igreja

agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado (código 001, Processo 00214342204).

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29, 675–685, 2011.
- Agócs, A.; Deli, J. Pigments in your food. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 757-759, 2011.
- Aksu, Z., Eren, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40, 2985–299, 2005.
- Aksu, Z., Eren, A.T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 107–113, 2007.
- Alga Technologies. Disponível em: <<http://www.algatech.com/>> Acesso em: 14 junho 2018.
- Ambrósio, C.L.B., Campos, F. de A.C.S., Faro, Z.P. de. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, 19, 233–243, 2006.
- Astareal. Disponível em: <<http://www.astareal.com/products/retail> >Acesso em: 14 junho 2018.
- Banzatto, D., de Freitas, L.A., Mutton, M.J.R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33, 14–18, 2013.
- Barredo, J.L., García-Estrada, C., Kosalkova, K., Ribeiro, C. Biosynthesis of Astaxanthin as a Main Carotenoid in the Heterobasidiomycetous Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Fungi*, 3, 44, 2017.
- BASF. Disponível em: <https://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en_US/Catalog/HumanNutrition/pi/BASF/productgroup/mixed_carotenoids_from_algae> Acesso em: 14 junho 2018.
- BCC Research (2011) Disponível em <<http://www.bccresearch.com/report/carotenoids-global-market-fod025d.html>> Acesso em: 14 junho 2016.
- Bendich, A., Olson, J.A. Biological actions of carotenoids. *The FASEB Journal*, 3, 1927–1932, 1989.

- Berman, J., Zorrilla-López, U., Farré, G., Zhu, C., Sandmann, G., Twyman, R. M., Christou, P. Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 14, 727–743, 2014.
- Bhataya, A., Schmidt-Dannert, C., Lee, P.C. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochemistry*, 44, 1095–1102, 2009.
- Bhatt, P.C., Ahmad, M., Panda, B.P. Enhanced bioaccumulation of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* by utilising low-cost agro products as fermentation substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 58–63, 2013.
- Bhosale, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 351 – 361, 2004.
- Bhosale, P., Gadre, R.V. β -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 327–332, 2001.
- BlueBioTech Mikroalgen Biotechnologie. Disponível em <<https://www.bluebiotech.de/com/produkte/chemikalien.html>> Acesso em: 14 junho 2018.
- Bonadio, M. de P., Freitas, L.A. de, & Mutton, M.J.R. Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* 102. *Brazilian Journal of Microbiology*, 29, 872-878, 2018.
- Borba, C.M., Tavares, M.D., Moraes, C.C., Burkert, J.F.M. Carotenoid production by *Sporidiobolus pararoseus* in agroindustrial medium: optimization of culture conditions in shake flasks and scale-up in a stirred tank fermenter. *Brazilian journal chemical engineering*, 35, 509-520, 2018
- Butinar L., Santos, S., Spencer-Martins I., A, Oren., Gunde-Cimerman N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 229–234, 2005.
- Buzzini, P; Innocenti, M; Turchetti, B; Libkind, D; Van, B.M; Mulinacci N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian journal of microbiology*, 53, 1024-1031, 2007.
- Buzzini, P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 843-847, 2001.

- Buzzini, P., Martini, A. Production of Carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* Cultured in Raw Materials of Agro-Industrial Origin. *Bioresource Technology*, 71, 41-44, 1999.
- 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*, 36, 687–692, 2005.
- Buzzini, P., Martini, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, 71, 41–44, 2000.
- Cardoso, L.A.C., Jäckel, S., Karp, S. G., Framboisier, X., Chevalot, I., & Marc, I. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. *Bioresource Technology*, 200, 374–379, 2016.
- CaroteNature, disponível em < <http://www.carotenature.com/index.php/our-services/>> acesso em novembro de 2018
- Chandi, G.K., Gill, B.S. Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review. *International Journal of Food Properties*, 14, 503-513, 2011.
- Cheng, Y.-T., & Yang, C.-F. Using the *Rhodotorula mucilaginosa* lineage to produce carotenoids using food waste. *Journal of the Institute of Chemical Engineers of Taiwan*, 61, 270-275, 2016.
- Choudhari, S.M., Ananthanarayan, L., Singhal, R.S. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of b-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896. *Bioresource Technology*, 99, 3166 - 3173, 2008.
- Colet, R., Urnau, L., Bampi, J., Zeni, J., Dias, B.B., Rodrigues, E., Valduga, E. Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 268–274, 2017.
- Comex Stat disponível em <<http://comexstat.mdic.gov.br/>> Acesso em: 14 junho 2018.
- Csernetics, A., Nagy, L., Iturriaga, E.A., Szekeres, U., Eslava, A.P., Vágvölgyi, C., Papp, T. Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 696-703, 2011.

- Cyanotech. Disponível em <<https://www.cyanotech.com/astaxanthin/>> Acesso em: 14 junho 2018.
- Davoli, P., Mierau, V., & Weber, R.W.S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 392-397, 2004.
- De Carvalho, J.C., Cardoso, L.C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R. *Microbial Pigments. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, Springer. 73-97, 2014.
- De Haan, A., Burke, R., Bont, J. Microbial production of food colors. *Med Fac Landbouww Rijisuniv Gent*, 56, 1655–1660, 1991.
- DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach* 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2009.
- Dias, C., Sousa, S., Caldeira, J., Reis A, Silva, T.L . New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, 189, 309-318, 2015.
- Dimitrova, S., Pavlova, K., Lukanov, L., Korotkova, E., Petrova, E., Zagorchev, P., & Kuncheva, M. *Production of Metabolites with Antioxidant and Emulsifying Properties by Antarctic Strain Sporobolomyces salmonicolor AL1. Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(1), 301–311. doi:10.1007/s12010-012-9983-2 , 2012
- Domínguez-Bocanegra, A.R., Ponce-Noyola, T., Torres-Muñoz, J.A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 83–791, 2007.
- Du, C., Guo, Y., Cheng, Y., Han, M., Zhang, W., & Qian, H. Torulene and torularhodin, protects human prostate stromal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the regulation of Bcl-2/Bax mediated apoptosis. *Free Radical Research*, 51, 113–123, 2017.
- Ekendahl, S., O'Neill, A.H., Thomsson, E., Pedersen, K. Characterisation of yeasts isolated from deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. *Microbial Ecology*, 46, 416–428, 2003.
- El-Banna, A.A., El-Razek, A.M., El-Mahdy, A.R. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food and Nutrition Sciences* ,3, 64-71, 2012

- Ernst, H. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Applied Chemistry*, 74, 2213- 2226, 2002.
- Estrada, A.F., Brefort. T., Mengel, C., Sánchez, V.D., Alder, A., Al-Babili, S., Avalos, J. *Ustilago maydis* accumulates beta-carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 803-813, 2009.
- Estrada, A.F., Maier, D., Scherzinger, D., Avalos, J., Al-Babili, S. New intermediates of apocarotenoids in mutants of *Neurospora crassa* imply a new sequence of biosynthetic reactions leading to the formation of neurosporaxantina. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1497-1505, 2008.
- Fonseca, R. A. S., Rafael, R.S., Kalil, S.J., Burkert, A.V., Burkert, J. F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *African Journal of Biotechnology* 10: 1165-1171, 2011
- Fontana J.D., Mendes, S. V., Persike, D. S., Peracetta, L. F., Passos, M. Carotenoides. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 13, 40-45, 2000.
- Franco-Zavaleta, M. E., Jiménez-Pichardo, R., Tomasini-Campocosio, A., & Guerrero-Legarreta, I. *Astaxanthin Extraction from Shrimp Wastes and its Stability in 2 Model Systems. Journal of Food Science*, 2010.
- Fré, N.C., RECH, R., MARCÍLIO N. R.. XX congresso brasileiro de engenharia química. influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift. Dispononível em https://www.researchgate.net/profile/rosane_rech/publication/300656734_influencia_da_luminosidade_e_concentracao_salina_na_producao_de_lipidios_e_carotenoide_s_pela_microalga_dunaliella_tertiolecta_em_fotobiorreator_airlift/links/58093e6e08ae1c98c2525fb2/influencia-da-luminosidade-e-concentracao-salina-na-producao-de-lipidios-e-carotenoides-pela-microalga-dunaliella-tertiolecta-em-fotobiorreator-airlift.pdf.> acesso em 11/11/2018.
- Frengova, G.I., & Beshkova, D.M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 163-180, 2009.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., & Beshkova, D.M. Beta-carotene-rich carotenoid-protein preparation and exopolysaccharide production by *Rhodotorula rubra* GED8 grown with a yogurt starter culture. *Journal of bioscience*, 61, 571-7, 2006.

- Frengova, G.I., Simova, E.D., & Beshkova, D.M. Carotenoid production by lactosenegative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58, 562–567, 2003.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., Pavlova K., Beshkova, D.M., Grigorova D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 888–894, 1994.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., & Beshkova, D.M. “Effect of Temperature Changes on the Production of Yeast Pigments Co-Cultivated with Lacto-Acid Bacteria in Whey Ultrafiltrate. *Biotechnology Letters*, 17, 1001-1006, 1995.
- Gale, C.R., Ashurst, H.E., Powers, H.J., Martyn, C.N. Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 402-408, 2001.
- Garbayo, I., Vílchez, E., Nauva-Saucedo, J.E., Barbotin, J.N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia on *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 629-634, 2003.
- Gómez-García, M.R., Ochoa-Alejo, N. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum spp.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19025-19053, 2013.
- Goodwin, T. W. The comparative biochemistry of carotenoids. Chapman & Hall LTD., 1^a edition, London, 1952.
- Gribanovski-Sassu, O., Foppen, F.H. Effect of light and temperature on *Epicoccum nigrum*. *Phytochemistry*, 7, 1605-1612, 1968.
- Gu, W.L., An, G.H., Johnson, E.A. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 114–117, 1997.
- Hagler N., Mendonca-Hagler, L.C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil,” *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 173–178, 1981.
- Hama, S., Takahashi, K., Inai, Y., Shiota, K., Sakamoto, R., Yamada, A., Tsuchiya, H., Kanamura, K., Yamashita, E., Kogure, K. Protective Effects of Topical Application of a Poorly Soluble Antioxidant Astaxanthin Liposomal Formulation on Ultraviolet-Induced Skin Damage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(8), 2909–2916 (2012)

- Hama, S., Uenishi, S., Yamada, A., Ohgita, T., Tsuchiya, H., Yamashita, E., Kogure, K. (2012). *Scavenging of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution by Astaxanthin Encapsulated in Liposomes. Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(12), 2238–2242 (2012) b
- Hausmann, A; Sandmann, G. A Single Five-Step Desaturase Is Involved in the Carotenoid Biosynthesis Pathway to β -Carotene and Torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 30, 147-153, 2000.
- Hayman, E.P., Yokoyama, H., Chichester C., Simpson, K.L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bacteriology*, 120, 1339-1343, 1974.
- Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64–72, 2014.
- Hernández-Almanza, A., Montañez-Sáenz, J., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. *Food Bioscience*, 7, 31–36, 2014.
- HU, Z-C., Zheng, Y-G., Wang, Z., Shen, Y-C. PH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 586-590, 2006.
- Irazusta, V., Nieto-Peñalver, C.G., Cabral, M.E., Amoroso, M.J., de Figueroa, L.I.C. Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. *Process Biochemistry*, 48, 803–809, 2013.
- Johnson, E.A., Lewis, M.J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of general microbiology*, 115, 173-183, 1979.
- Johnson, E.A., Schroeder, W.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 8374-18379, 1995.
- Kaiser, P., Surmann, P., Vallentin, G., Fuhrmann, H. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 142–149, 2007.
- Kim, Z.H., Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, C. G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 414-419, 2006.

- Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17, 1-14, 2018.
- Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Bryś, J., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Reczek, L. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 25–31, 2017.
- Krinsky, N. I., Johnson, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516, 2005.
- Lababpour, A., Keishi, H., Shimahara, K., Katsuda, T., Katoh, S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 452-456, 2004.
- Lavecchia, T., Rea, G., Antonacci, A., Giardi, M.T. Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 198–213, 2013.
- Lemos, G.S., Santos, J.S., Santos, M.L.P. Validação do método para determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Química Nova*, 33, 1682-1685, 2010.
- Li, Q., Sun, Z., Li, J., Zhang, Y. Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Microbiology Letters*, 345, 94-101, 2013.
- Libkind, D., Brizzio, S., & Broock, V.M. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude Lake. *Folia Microbiologica*, 49, 19–25, 2004.
- Liu, Y.-S., Wu, J.-Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal*, 36, 182–189, 2007.
- Liu, Y.-S., Wu, J.-Y., Ho, K. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 27, 331-335, 2006.
- Maldonado, I. R., Rodriguez-Amaya, D.B., Scamparini, A.R. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107, 145-150. 2008.

- Malisorn, C., Suntornsuk, W. Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 27–32, 2009.
- Mantzouridou, F., Roukas, T., Kotzekidou, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on B-carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 123- 135, 2002.
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., Haronikova, A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95, 338–342, 2012
- Martins, V., Dias, C., Caldeira, J., Duarte, L., Reis, A., da Silva, T.L. Carob pulp syrup: A potential Mediterranean carbon source for carotenoids production by *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology Reports*, 3, 177–184, 2018.
- Mata-Gómez, L., Montañez, J., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13, 12, 2014
- Mercadante, A.Z. In: Socaciu C, editor. *Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage*. New York: CRC Press, 213-235, 2007.
- Mesquita, S. S., Teixeira, C.M.L.L., Servulo, E.F.C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. *Rev. Virtual Química*, 9, 672-688, 2017.
- Michelon, M., de Borba T.M, Rafael, R.S, Burkert C.A.V., Burkert J.F.M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1–8, 2012
- Mihalcea, A., Ungureanu, C., Ferdes, M., Chirvase A.A., Tanase C., The Influence of Operating Conditions on the Growth of the Yeast *Rhodotorula Rubra* ICCF 209 and on Torularhodin Formation. *Revista de Chimie*, 62, 659-665, 2011
- Moraes, H., Abram, A., Ferreira, F. Carotenoids Biosynthesis – a review. *Revista Lusófona de Humanidades e Tecnologias*, 10, 22-42, 2010.
- Moreira, M.D., Melo, M.M., Coimbra, J.M., Reis, K.C., Schwan, R. F., Silva, C.F. Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. *Waste Management*, 82, 93–99, 2018.

- Naghavi F.S., Hanachi, P., Saboor, A. Effect of Temperature, pH and Salinity on carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Research in Biotechnology*, 5, 01-04, 2014.
- Nasirian, N., Mirzaie, M., Cicek, N., Levin, D B. Lipid and carotenoid synthesis by *Rhodospiridium diobovatum*, grown on glucose versus glycerol, and its biodiesel properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 64, 277–289, 2018.
- Nasrabadi, M.R. N., Razavi, S. H. Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Science and Biotechnology*, 20, 445–454, 2011.
- Ni, H., Chen, Q., He, G., Wu, G., Yang, Y. 2008. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang* 9: 51-59.
- Olivier, J., Palou, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal Chromatography*, 881, 543 - 555, 2000.
- Osganian, S.K., Stampfer, M.J., Rimm, E, Spiegelman, D., Manson, J.E, Willett, W.C. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1390-1399, 2003.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F. Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 327–348, 2012.
- Park, P., Kim, E., Chu, K. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 53, 148–152, 2007.
- Park, P.K., Cho, D.H., Kim, E.Y., Chu, K.H. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 21, 429 – 434, 2005.
- Parry Nutraceuticals. Disponível em <<http://www.parrynutraceuticals.com/>> Acesso em: 14 junho 2018.
- Pavlova, K., Grigorova, D., Hristozova, T., Angelov, A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica*, 46, 397–401, 2001.
- Plankton Australia Pty Limited. Disponível em <<http://www.planktonaustralia.com/>> Acesso em: 14 junho 2018.
- Polulyakh, O., Podoprigova, O., Eliseev, S., Ershov, Y. Biosynthesis of torulene and torularhodin by yeast *Phaffia rhodozyma*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 27, 411–419, 1991.
- Razavi, S.H., Marc, I. Effect of Temperature and pH on the Growth Kinetics and Carotenoid Production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 Using Technical

- Glycerol as Carbon Source. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineerin*, 25, 59-64, 2006.
- Rengova, G.I., Beshkova, D.M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 163-180, 2009.
- Rivera, S. M., Canela-Garayoa, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1-10, 2012.
- Rodriguez-Amaya, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods, Ilsi: Washington, 2001.
- Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J. L., & Barredo, J. L. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), 645–658., 2010.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T., Bourtoom, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46, 210–218, 2011.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Komemushi, S., Namikawa, K., & Miki, W. Torularhodin as a potent scavenger against peroxyl radicals isolated from a soil yeast *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 30, 1–10, 2001b.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Tada, A., Miki, W., & Komemushi, S. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 294–297, 2001a.
- Sakaki, H., Nochide, H., Komemushi, S., & Miki, W. Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 338–340, 2002.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M. Schrader, J. (2010). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 555–571, 2010.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Pham, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, 61, 34–43, 2013.
- Shih, C.T., Hang, Y.D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologi*, 29, 570–2, 1996.
- Sies, H., Stahl, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annual Review of Nutrition*, 24, 173, 2004

- Sólyom, K., Maier, C., Weiss, J., Cocero, M. J., Mato, R. B., Carle, R., & Schweiggert, R. Structure–response relationship of carotenoid bioaccessibility and antioxidant activity as affected by the hydroxylation and cyclization of their terminal end groups. *Food Research International*, 66, 107–114, 2014.
- Squina, F.M., Mercadante, A.Z. Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, 309-318, 2003.
- Taskin, M., Sisman, T., Erdal, S., Basaran, E.K. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *European Food Research and Technology*, 233, 657–665, 2011.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N., Deming, R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40, 2551 – 2557, 2005.
- Três, M.V., Francheschi, E., Borges, G.R., Dariva, C., Corazza, F.C., Oliveira, J.V.; Corazza, M.L. Influence of temperature on the solubility of β -carotene in organic solvents at ambient pressure. *Food Science and Technology Magazine*, 27, 737-743, 2007.
- Ungureanu C & Ferdes M. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of torularhodin. *Advanced Science Letters*, 5, 1-4, 2012.
- Ungureanu, C., Marchal, L., Chirvase, A.A., Foucault, A. Centrifugal partition extraction, a new method for the direct recovery of culture broth metabolites: Case study of the recovery of torularodine from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 132, 406-409, 2012.
- Valduga, E., Tatsch, P., Vanzo, L., Rauber, F., Di Luccio, M., Treichel H. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1060–1065, 2009.
- Valduga, E., Tatsch, P.O., Tiggeman, L., Treichel, H., Toniazzi, G., Zeni, J., Di Luccio, M.D. Produção de carotenoides: microorganismos como fontes de pigmentos naturais. *Química Nova*, 32, 2429-2436, 2009.
- Valduga, E., Tatsch, P.O., Tiggemann, L., Zeni, J., Colet, R., Cansian, J.M., Treichel, H., 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 & Technology*, 44, 2445–2451, 2009.

- Valduga, E., Valerio, A., Tatsch, P.O., Treichel, H., Furigo Júnior, A., Luccio, M.D. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Food and Bioprocess Technology*, 2, 234 - 238, 2009.
- Valduga, E., Valério, A., Treichel, H., Furigo Júnior, A., Di Luccio, M. Optimization of the Production of Total Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) Using Response Surface Technique. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 415–421, 2008.
- Valduga, E., Valerio, A., Treichel, H., Furigo Júnior, A., Luccio, M.D. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the Production of Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in Synthetic and Agroindustrial Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 61- 69, 2009 a.
- Varmira K., Habibi A., bahramian E, Jamshidpou S. Progressive agents for improvement of carotenogenesis in *rhodotorula rubra*. *Journal of Advances in Food Science & Technology*, 2, 70-78, 2016.
- Vila, M., Couso, I., Leo'N, R. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochemistry*, 43, 1147–1152, 2008.
- Villela, G.G., Bacila, M., Tastaldi, H. *Bioquímica*. Editora Guanabara Koogon S.A., 2ª edição, 785-790, 1966.
- Wirth, F., Goldani, L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1–7, 2012
- Woodside, J.V., McGrath, A.J., Lyner, N., McKinley, M.C . Carotenoids and health in older people. *Maturitas*, 80, 63-68, 2014.
- Xue, X.-L., Han, X.-D., Li, Y., Chu, X.-F., Miao, W.-M., Zhang, J.-L., & Fan, S.-J. (2017). Astaxanthin attenuates total body irradiation-induced hematopoietic system injury in mice via inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1).
- Yan, L., Zhang, H., Chen, J., Lin, Z., Jin, Q., Jia, H., Huang, H. Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment of corn stover for enhancement of sugar recovery. *Bioresource Technology*, 100, 1803–1808, 2009.
- Yoo, A.Y., Alnaeeli, M., Park, J.K. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. *Process Biochemistry*, 51, 463–473, 2016.

- Zaidi A, Li H, Sliwka HR, Partali V, Ernst H, Melo TB. Energy and electron transfer reactions of polyenic acids with variable chain lengths. *Tetrahedron*, 69, 219-227, 2013.
- Zeni, J., Colet, R., Cence, K., Tiggeman, L., Toniazzo, G., Cansian, R.L., Di Luccio, M., Oliveira, D., Valduga, E. Screening of microorganisms for production of carotenoids. *CyTA – Journal of Food*, 9, 160-166, 2011.
- Zhang, Z., Zhang, X., Tan, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, 157, 149–153, 2014.
- Zoz, L., Carvalho, J.C., Soccol, V.T., Casagrande, T.C., Cardoso L. Torularhodin and torulene: Bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics - a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 278-288, 2015
- Zuluaga, M., Gueguen, V., Letourneur, D., Pavon-Djavid, G. Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 145–158. (2018).

CAPÍTULO II

Caracterização da biomassa seca de caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e do licor obtido após o pré-tratamento, por hidrólise ácida, para a aplicação como substrato fermentescível

Caracterização da biomassa seca de caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e do licor obtido após o pré-tratamento, por hidrólise ácida, para a aplicação como substrato fermentescível

Willen Silva Igreja¹, Luiza Helena da Silva Martins², Alessandra Santos Lopes^{1,3},
Renan Campos Chisté^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

²Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), 66077-830, Belém, Pará, Brasil.

³Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

Resumo

A Amazônia possui uma vasta participação no mercado agroindustrial, sendo o açaí um dos principais produtos explorados, durante o processo de beneficiamento do açaí para a obtenção do suco, apenas 15% do fruto é aproveitado no processo, sendo os 85% restante constituídos de fibras, as quais podem ser hidrolisadas através do pré-tratamento com ácido diluído para aplicação como substrato em processos fermentativos. A biomassa foi seca, caracterizada quanto suas propriedades físico-químicas e carboidratos estruturais. Foi realizado um planejamento composto central rotacional 2³ com as variáveis concentração de ácido (1-4 m/v), concentração de sólidos (5-20% m/v) e tempo (30-90 min). O pré-tratamento com ácido sulfúrico mostrou-se mais profícuo que com ácido fosfórico. A condição estabelecida visando o uso do licor como substrato para processos fermentativos foram ácido sulfúrico a 3,5 % (m/v), concentração de sólidos de 25% (m/v) durante 70 min, resultando em uma concentração de 55,08 g/L de açúcares, constituído majoritariamente de xilose (93%) e baixos teores de inibidores (furfural 9,8 mg/L, hidroximetilfurfural 337,9 mg/L, ácido acético 1,83 g/L).

Palavras-chaves: Açaí; Pré-tratamento; Biomassa; Resíduo agroindustriais.

1. INTRODUÇÃO

A economia mundial tem se aperfeiçoado em sistemas produtivos com rendimentos cada vez mais altos e custos operacionais cada vez mais baixos proporcionando, desta forma, produções agroindustriais cada vez mais rentáveis. Para que isto ocorra, é imprescindível que a matéria prima empregada no processo seja aproveitada em sua totalidade, assim como seus subprodutos. Neste sentido, a Amazônia possui uma vasta participação no mercado agroindustrial, sendo o açaí um dos principais produtos explorados (IBGE, 2018), movimentando em 2019 cerca de R\$ 3 bilhões na economia da região amazônica (EMBRAPA, 2020).

Apesar dos números expressivos, durante o processo de beneficiamento do açaí para a obtenção do suco, apenas 15% do fruto é aproveitado no processo (epicarpo e mesocarpo), sendo os 85% restante constituídos de fibras (endocarpo), os quais são descartados (ALMEIDA et al., 2017). Resíduos com características fibrosas formado por celulose, lignina e hemicelulose são susceptíveis à pré-tratamentos para liberação de açúcares fermentescíveis (MARTINS et al., 2015), que posteriormente podem ser usados como meio de cultivo em processos biotecnológicos, com o objetivo de promover e produzir produtos de alto de valor agregado, a partir de substratos de baixo custo, proporcionando a redução de custos no processo.

O estudo de utilização de novos meios industriais de fermentação a partir de resíduos agroindústrias vem se intensificado nos últimos anos (ROCHA et al., 2014; MARTINS et al., 2015), podendo ser produzido a partir de vários complexos lignocelulósicos representando uma fonte barata, renovável e farta (MAURYA et al., 2015), possibilitando uma produção sustentável e rentável. Diante disto, diversos pré-tratamentos vem sendo relatados na literatura com o objetivo de fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar os componentes da biomassa para fins adequados, sendo o pré-tratamento ácido um dos mais promissores em desconstruir a cadeia lignocelulósica e alterar a conformação estrutural da lignina (MAURYA et al., 2015).

Até o presente momento, há uma escassez de dados na literatura que avaliem a potencial aplicação de resíduos agroindustriais, nomeadamente o caroço de açaí, como substrato para a produção de produtos de alto valor agregado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a biomassa do caroço de açaí “*in natura*” e do licor obtido após

o pré-tratamento ácido para aplicação como substrato fermentescível em processos biotecnológicos. O caráter inovador deste trabalho consiste em proporcionar uma alternativa socioeconômica e ambiental através do resíduo gerado na cadeia produtiva do açaí, possibilitando o barateamento de diversos processos fermentescíveis para a produção de produtos economicamente viáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aquisição dos caroços de açaí

Os caroços de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) (25 kg) (Figura 1) foram doados por uma fábrica processadora do fruto na cidade de Castanhal, Pará, Brasil, cujos frutos foram provenientes da cidade de Igarapé-Miri (Latitude 1°58'37" Sul, Longitude 48°57'34" Oeste), no mesmo estado. O acesso à matéria-prima foi cadastrado no Sistema Nacional e Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, (Cadastro: AF18EDC). A coleta dos caroços foi realizada logo após o despulpamento dos frutos para a obtenção da polpa (suco) do açaí.



Figura 1. Caroços de açaí coletados após o processamento do fruto.

2.2. Preparo da biomassa seca de caroço de açaí

Os caroços de açaí foram lavados com água corrente para a retirada dos resíduos da coleta e outras impurezas, seguido de sanitização com solução de hipoclorito de sódio

(100 mg/L /10 min) e secagem em estufa com circulação forçada de ar (65 °C/48 h) até que atingissem umidade < 10%, conforme recomendado pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL, 2009).

A biomassa seca foi triturada em um moinho de facas, e a biomassa utilizada foi aquela que passou na peneira de 20 mesh (0,841 mm) e foi retida na peneira de 60 mesh (0,250 mm). A biomassa seca foi armazenada a vácuo em sacos plásticos a -20 °C até o momento de utilização. A composição da biomassa, em triplicada, foi determinada antes da aplicação do pré-tratamento. As Figuras 2 e 3 mostram o material recém coletado, após a lavagem com água corrente e o material seco e triturado.



Figura 2. Carço de açai antes e após a lavagem e sanitização.



Figura 3. Carço de açai seco e triturado.

2.3. Caracterização físico-química da biomassa seca

Para a caracterização química do caroço de açaí, foram realizadas as seguintes análises, em triplicata: umidade, proteínas totais (fator 6,25 de conversão de nitrogênio total em proteína total), lipídeos totais, acidez total (meq NaOH/100 g), pH e cinzas (incineração em mufla a 550 °C) (AOAC, 1997). O teor de carboidratos (%) totais foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens obtidas para umidade, proteínas, lipídeos e cinzas.

2.3.1. Teor de umidade por infravermelho

A determinação do teor de umidade através do analisador de umidade por infravermelho (MARCA, modelo IV 2000) foi realizada periodicamente para assegurar que durante o armazenamento a biomassa permanecia com um teor de umidade menor que 10% (NREL, 2009).

2.3.2. Determinação do teor de extrativos

O teor de extrativos totais (compostos metabólitos secundários dos vegetais que podem incluir ceras, gorduras, resinas, taninos, gomas, açúcares, amidos e pigmentos) foi determinado, de acordo com Sluiter et al. (2015), com o objetivo de eliminar os extrativos para as análises posteriores do material lignocelulósico, para que não houvesse superestimação no teor dos carboidratos estruturais. Em resumo, 4 g da amostra foram extraídas por refluxo em solução de álcool etílico à 99% de pureza até completa descoloração do solvente. Em seguida, foi realizada uma segunda extração utilizando água destilada. A água era trocada periodicamente à medida que esta apresentava coloração escura. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa até massa constante.

2.3.3. Determinação dos carboidratos estruturais

A determinação dos carboidratos estruturais na biomassa seca foi realizada no material após o procedimento de remoção dos extrativos, seguido de hidrólise ácida.

2.3.3.1. Hidrólise dos carboidratos estruturais

Após a remoção dos extrativos da biomassa, foi realizada a determinação do teor de umidade por infravermelho para verificar se o material apresentava teor de umidade < 10%. Em seguida, o material (aproximadamente 0,3 g) foi submetido a uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico para a caracterização química dos carboidratos estruturais, de acordo com Sluiter et al. (2008a).

Resumidamente, 0,3 g da biomassa foram acondicionados em tubos de ensaio com 3 mL de H₂SO₄ 72% (m/v) e imediatamente depositados em banho maria a 35 °C por 1 h, sendo agitados a cada 10 min com o auxílio de um bastão de vidro, a fim de garantir uma mistura mais homogênea da amostra. Após o período estabelecido, foram adicionados 84 mL de água destilada nos tubos e o conteúdo foi transferido para frascos de borosilicato de 250 mL, os quais foram fechados e autoclavados a 121 °C durante 60 min para a total hidrólise dos oligômeros presentes na amostra, sendo a reação interrompida com um banho de gelo.

2.3.3.2. Determinação de lignina insolúvel e solúvel

A lignina insolúvel (Lignina de Klason) foi determinada de acordo com Sluiter et al., (2008a). Considerando que uma parte do material insolúvel presente na biomassa é constituído de resíduo mineral fixo (cinzas), visto que estes não são solúveis em ácido, foi realizado o procedimento de determinação do teor de cinzas (AOAC, 1997), para que não houvesse superestimação dos valores de lignina insolúvel.

A determinação do teor de lignina solúvel foi realizada por espectrofotometria a 205 nm, de acordo Sluiter et al.(2008b). O cálculo da concentração da lignina solúvel foi realizado pela equação 1 e 2.

$$C_{\text{lig}} = 4,187.10^{-2} * (A_T - A_{PD}) - 3,279.10^{-4} \quad (1)$$

onde:

C_{lig} = Concentração de lignina no hidrolisado (g/L).

A_T = absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação a 280 nm.

A_{PD} = (CHMF x ϵ_{HMF} + CFurfural x $\epsilon_{\text{Furfural}}$).

ϵ_{HMF} = absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g⁻¹)

$\epsilon_{\text{Furfural}}$ = absortividade do hidroximetilfurfural (146,85 L.g⁻¹)

CHMF= Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L) previamente determinada por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência)

CFurfural= Concentração de furfural no hidrolisado (g/L) previamente determinada por HPLC.

$$\%lignina\ solúvel = \left(\frac{C_{lignina\ solúvel} * V_{filtrado} * FD}{M_b} \right) \times 100. \quad (2)$$

Onde:

Clignina solúvel: concentração de lignina solúvel (g/L).

Vfiltrado: Volume do hidrolisado 84+3 = 87 mL ou 0,087 L.

FD: fator de diluição do hidrolisado.

M_b: massa do bagaço utilizada na hidrólise em base seca.

2.3.3.3. Determinação de açúcares monoméricos e ácido acético

Os teores de açúcares monoméricos e ácido acético na fração solúvel foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os teores de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético presentes nos hidrolisados foram analisados por HPLC (Thermo Fisher Scientific, modelo SRVYER, San Jose, EUA) equipado com um injetor automático (SRVYER-ASP), uma bomba quaternária (SRVYER-LPMPP) e detector de índice de refração (SRVYER-RI).

As condições de análise foram as mesmas adotadas por Martins et al. (2015), e os compostos foram separados em uma coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H) a 30 °C equipada com uma pré-coluna. A fase móvel foi preparada com uma solução de H₂SO₄ a 5 mM em água deionizada. A fase móvel foi filtrada a vácuo em membrana de filtração de Nylon com 0,45 µm (Analítica, SP, Brasil). O volume de injeção das amostras utilizado foi de 20 µL e fase móvel com fluxo de 0,6 mL/min no modo isocrático. A separação dos compostos foi monitorada com um detector de índice de refração (IR) a 35 °C durante 20 min. Os teores de açúcares e ácido acético (g/L), em triplicata, foram determinados através de padronização externa com curvas analíticas de 6 pontos na faixa de concentração de 0,1 a 0,6 g/L ($r^2 > 0,99$) com padrões de D-(+) celobiose, D- glicose, D- xilose, D-arabinose e ácido acético.

2.3.3.4. Determinação do teor de furfural e hidroximetilfurfural

Os teores de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinados por HPLC no licor proveniente da hidrólise da biomassa seca (subitem 2.3.3.1.). A análise cromatográfica foi realizada em HPLC Agilent (modelo Agilent 1260 Infinity, Santa Clara, CA, EUA), equipado com uma bomba quaternária (G1311C), uma válvula de injeção Rheodyne com loop de 20 μ L, um forno (G1316A) e um detector DAD (G1328C). Para as análises cromatográficas, as amostras e os solventes foram filtrados utilizando membranas de 0,22 e 0,45 μ m, respectivamente (Millipore, Billerica, MA, EUA).

As condições de análise foram as mesmas adotadas por Martins et al., (2015), sendo utilizada uma coluna Nova-Pak C18 (Waters, Milford, MA, EUA) para a separação de furfural e de hidroximetilfurfural, utilizando como fase móvel isocrática com acetonitrila/água (1:8, v/v) com 1% de ácido acético, e volume de injeção de 20 μ L, taxa de fluxo de 0,80 mL/min, coluna a 30°C, e o cromatograma foi monitorado a 280 nm durante 20 min. Os teores de furfural e HMF (g/L) foram determinados, em triplicata, por padronização externa através da construção de curvas analíticas de 11 pontos na faixa de concentração de 0,001 a 0,1 g/L ($r^2 > 0,99$) com padrões de furfural e HMF.

2.3.3.5. Cálculo para a determinação do teor dos carboidratos estruturais

Os teores de celobiose e glicose foram convertidos em celulose, utilizando os fatores de conversão de 0,95 e 0,90, respectivamente, assim como os teores de xilose e arabinose foram convertidos em hemiceluloses, empregando-se o fator de conversão de 0,88. Para a conversão dos grupos acetil utilizou-se o fator de conversão do ácido acético para acetato de 0,717, e para o cálculo das massas de furfural e HMF foram utilizados os fatores de conversão de 1,375 e 1,286, respectivamente, sendo o furfural convertido para hemicelulose e o HMF para celulose. Os valores de conversão fazem parte da estequiometria envolvida na reação, envolvendo suas respectivas massas moleculares durante as conversões (Sluiter et al., 2006).

2.4. Determinação das melhores condições de hidrólise ácida da biomassa seca

As melhores condições para o pré-tratamento da biomassa seca foram determinadas a partir do teste da eficiência de dois ácidos diluídos: sulfúrico (H_2SO_4) a fosfórico (H_3PO_4), utilizando um planejamento composto central rotacional 2^3 variando

a concentração do ácido (1 a 4% m/v), tempo de hidrólise (30 a 90 min) e concentração de sólidos (5 a 20 % m/v) (Tabela 1), totalizando 17 experimentos para cada ácido testado, incluindo 3 repetições no ponto central, sendo as faixas de variação selecionadas baseadas nos resultados obtidos por Martins et al. (2015) e Oliveira et al. (2014).

Tabela 1 - Faixa das variáveis estudadas no planejamento experimental para o pré - tratamento ácido do caroço de açaí utilizando H₂SO₄ e H₃PO₄.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração de ácido (% m/v)	0	1	2,5	4	5
Tempo de tratamento (min)	9,5	30	60	90	110
Concentração de sólidos (% m/v)	0,1	5	10	20	25

Para a realização do pré-tratamento, a biomassa seca foi pesada, transferida para frascos de borosilicato, adicionadas das diferentes concentrações de ácido e submetidos ao aquecimento em autoclave a 121 ° C nos diferentes tempos. Após a etapa de hidrólise ácida, a biomassa foi retirada dos frascos, filtrada à vácuo em papel de filtro qualitativo previamente tarado, sendo a fase sólida lavada com água destilada até a água de lavagem atingir pH próximo a neutralidade (pH 6,0-7,0). O material sólido foi seco em estufa a 105 °C com circulação forçada de ar até atingir massa constante. O Fator de Severidade (SFC) do tratamento ácido, calculado conforme a equação 3 (Garrote et al., 1999)

$$\log (R_0) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{T - T_{ref}}{14,75} \right) \right] - pH \quad (3)$$

Onde: t é o tempo de reação (min), T é temperatura de reação (°C), T_{ref} é a temperatura de referência (100 °C), pH é da solução de ácido diluído; 14,75 é constante arbitrária ω baseada na energia de ativação da reação quando assumida a cinética de pseudo-primeira ordem.

A variável de resposta para o planejamento experimental utilizando H₂SO₄ ou H₃PO₄ foram o teor de açúcares redutores totais (ART), determinado por espectrofotometria a 540 nm, conforme o método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) (MILLER, 1959), sendo os teores de ART (g/L, em triplicata) obtidos por padronização

externa através de construção de curvas analíticas de padrão de D-glicose com 10 pontos variando de 0,1 a 1 g/L ($r^2 > 0,99$).

Para o planejamento experimental em que o ácido testado apresentou os maiores rendimentos de ART, foram determinados também os teores de hidroximetilfurfural (HMF) por espectrofotometria a 284 e 336 nm, segundo a metodologia da AOAC (1995), os teores de rendimentos mássicos (R) (Equação 4) e a massa solubilizada (MS) da fração sólida do caroço hidrolisado (Equação 5).

$$R (\%) = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (4)$$

onde, R é o rendimento mássico da etapa, $m_{inicial}$: massa inicial seca do material lignocelulósico, e m_{final} é a massa final seca de material lignocelulósico.

$$MS (\%) = R - 100 \quad (5)$$

Onde, MS é a massa solubilizada do material lignocelulósico, R é o rendimento mássico da etapa.

2.5 Caracterização do licor obtido na melhor condição de pré-tratamento por hidrólise ácida

As melhores condições obtidas após a análise do planejamento experimental, para o pré-tratamento por hidrólise ácida da biomassa seca do caroço de açaí, foram repetidas ($n = 3$) para a caracterização do licor hidrolisado quanto aos teores de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, HMF (conforme item 2.3.3.), rendimento mássico e massa solubilizada (conforme item 2.4.).

2.6. Caracterização do caroço de açaí por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O caroço de açaí seco triturado “*in natura*” e o pré-tratado com ácido sulfúrico diluído (melhor condição) foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observar as modificações superficiais resultantes dos tratamentos aplicados. AS foram amostras fixadas com fita de carbono em suporte de alumínio, em seguida foram submetidas a um recobrimento metálico de 10 nm de ouro em um metalizador. As

amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais resultantes dos tratamentos aplicados.

2.7. Análise estatística

Os resultados (media $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) foram analisados pelo software Statistica 7.0 software (Statsoft Inc.) através da Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de tukey ($p < 0,05$). As melhores condições de pré-tratamento por hidrólise ácida do caroço de açaí foram determinadas pela metodologia de superfície de resposta e analisadas utilizando o software Statistica® 7.0. Os coeficientes de regressão foram obtidos através dos dados experimentais ajustados ao modelo quadrático. A adequação do modelo foi determinada pela falta de ajuste, coeficiente de determinação (R^2) e pelos valores do teste de Fisher (*F-value*) obtidos pela ANOVA. A significância estatística dos modelos e das variáveis foram analisadas a 10% ($\alpha=0,1$) e 5% ($\alpha=0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da biomassa seca de caroço de açaí

O caroço do açaí é um resíduo agroindustrial ainda pouco explorado, com poucos dados científicos disponíveis na literatura, e a sua composição físico-química torna-se, portanto, essencial para viabilizar a aplicação nos mais diversos estudos, além de conhecer mais detalhadamente seus componentes. Desta forma, é possível observar na Tabela 2 a caracterização físico-química da biomassa seca do caroço de açaí estudado.

Tabela 2 – Composição físico-química da biomassa seca do caroço de açaí.

Parâmetro	Teor
Umidade (%)	5,55 $\pm$ 0,09
Proteínas (%)	4,63 $\pm$ 0,10
Lipídeos (%)	1,93 $\pm$ 0,41
Cinzas (%)	1,52 $\pm$ 0,04
Carboidratos totais (%)	86,39
pH	5,77 $\pm$ 0,10
Acidez total (meq NaOH/100 g)	2,79 $\pm$ 0,02

Com base nos resultados da Tabela 2, o constituinte majoritário da biomassa seca foi representado pelos carboidratos totais (86,39%), e devido a este teor elevado de material lignocelulósico, o caroço de açaí torna-se promissor como substrato fermentescível para a produção de produtos de alto valor agregado por vias biotecnológicas (ARRUDA *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2016; RAMBO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014; RODRIGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2008). No entanto, a determinação de carboidratos totais por diferença engloba os extrativos e a lignina presente na biomassa estudada, superestimando, desta forma, o valor do mesmo. Portanto, esta razão, neste estudo, foi realizada a determinação do teor de extrativos, carboidratos estruturais e da lignina separadamente.

O valor de umidade encontrado neste trabalho (5,55%) foi inferior ao encontrado por Rambo *et al.*, (2015) (13,27%) e Oliveira *et al.* (2014) (8,1%). Após o despolpamento do fruto de açaí, as sementes podem ficar expostas ao sol por longos períodos, afetando, desta forma, a umidade presente na biomassa. Além disso, quando esta biomassa é usada com a finalidade de produzir combustão ou para liberação de açúcares fermentescíveis através de hidrólise ácida, a umidade torna-se um fator preponderante, pois elevados valores da mesma diminuem a capacidade calorífica na combustão deste resíduo, além de diluírem a concentração das soluções ácidas, diminuindo a eficiência da hidrólise (NREL, 2009; RUALES-SALCEDO *et al.*, 2018).

Os valores de proteínas encontrados neste trabalho (4,63%) foram semelhantes aos encontrados por outros estudos, sendo relatados valores de proteínas que variaram de 1,7 a 4,3% (ARRUDA *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2016; RAMBO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014), enquanto os valores de lipídeos (1,93%), por sua vez, foram semelhantes aos encontrados por Ferreira *et al.* (2016) (1,70 %). Além disso, com base nos valores de pH e acidez total (Tabela 2), a biomassa seca do caroço de açaí pode ser considerada como um produto de baixa acidez.

As variações encontradas neste trabalho quanto ao teor de umidade, proteína, lipídeos e cinzas podem ser atribuídas as condições de plantio, estágio de maturação dos frutos, clima, localização geográfica, período da colheita, tempo de exposição do caroço ao sol, além da própria variabilidade genética do material.

3.2 Carboidratos estruturais presentes na biomassa seca de caroço de açaí

Na Tabela 3 estão discriminados os resultados da caracterização dos extrativos, carboidratos estruturais e lignina na biomassa seca de caroço de açaí para a obtenção detalhada da composição química da biomassa estudada.

Tabela 3 - Composição química da biomassa seca do caroço de açaí quanto aos carboidratos estruturais, extrativos e lignina.

Componentes	%
Celulose	3,62 ± 0,1
Hemicelulose	58,61 ± 1,72
Lignina Total	11,63 ± 1,85
Extrativos	14 ± 1,6
Grupos acetila	0,72 ± 0,16
Proteína	4,63 ± 0,10
Cinzas	1,52 ± 0,04
Lipídeos	1,93 ± 0,41
Total	96,66

Basicamente, a biomassa celulósica é composta de cadeias de celulose unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (formados principalmente por D-xilose e pequenas quantidades, D-manose, L- arabinose, D-galactose, D-glicose, além de ácido glucurônico e ácido manurônico) e lignina, sendo a celulose a maior fração lignocelulósica da maioria das biomassas. De acordo com Oliveira et al. (2014), as fibras de açaí da palmeira *Euterpe oleracea* apresentam 38,14% de celulose, 18,37% de lignina e 24,70% de hemicelulose, e em outro estudo, Martins *et al.* (2009) relatou que as fibras do caroço de açaí são compostas por 37% de hemicelulose, 33% de lignina e 33% de celulose. Contudo, trabalhos recentes demonstraram que o caroço do açaí possui principalmente hemicelulose com grande concentração de manano - um polímero de manose - correspondendo a aproximadamente 80% do total de carboidratos da semente e a cerca de 50% do seu peso seco (MONTEIRO *et al.*, 2019), confirmando os dados encontrados neste trabalho.

3.3 Influência das variáveis do processo de pré-tratamento da biomassa seca de caroço de açaí por hidrólise ácida utilizando H_3PO_4 e H_2SO_4

A Tabela 4 demonstra o rendimento de ART após o pré-tratamento da biomassa seca de caroço de açaí com H_3PO_4 e H_2SO_4 .

Tabela 4. Teores de açúcares redutores totais (ART) produzidos durante o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida da biomassa seca do caroço de açaí utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	X_1	X_2	X_3	H_3PO_4		H_2SO_4	
				FSC	ART (g/L)	FSC	ART (g/L)
1	1	30	5	0,96	$2,93 \pm 1,5^k$	1,06	$12,25 \pm 0,1^a$
2	4	30	5	1,12	$3,93 \pm 0,1^m$	1,21	$17,65 \pm 0,03^b$
3	1	90	5	1,43	$4,59 \pm 0,1^n$	1,53	$14,76 \pm 0,1^c$
4	4	90	5	1,59	$7,13 \pm 0,3^o$	1,68	$25,40 \pm 0,5^d$
5	1	30	20	0,96	$11,92 \pm 1,3^p$	1,06	$28,98 \pm 0,1^e$
6	4	30	20	1,12	$15,32 \pm 1,1^q$	1,21	$59,60 \pm 0,2^f$
7	1	90	20	1,43	$22,13 \pm 0,7^r$	1,53	$57,54 \pm 0,6^f$
8	4	90	20	1,59	$33,97 \pm 0,8^s$	1,68	$103,12 \pm 0,5^g$
9	0	60	12,5	*	$9,62 \pm 0,3^t$	*	$6,93 \pm 0,4^h$
10	5	60	12,5	1,48	$30,07 \pm 0,3^u$	1,62	$44,70 \pm 0,7^i$
11	2,5	9,54	12,5	0,55	$11,04 \pm 0,8^v$	0,69	$15,93 \pm 0,4^c$
12	2,5	110	12,5	1,61	$22,77 \pm 0,7^r$	1,75	$51,34 \pm 0,2^j$
13	2,5	60	0,1	1,35	NA	1,49	NA
14	2,5	60	25	1,35	$29,51 \pm 0,4^u$	1,49	$63,95 \pm 3,6^k$
15	2,5	60	12,5	1,35	$20,00 \pm 0,9^r$	1,49	$49,06 \pm 0,3^l$
16	2,5	60	12,5	1,35	$22,19 \pm 0,9^r$	1,49	$48,16 \pm 0,6^l$
17	2,5	60	12,5	1,35	$21,29 \pm 1,8^r$	1,49	$48,92 \pm 0,1^l$

X_1 : Concentração do ácido (% m/v). X_2 : Tempo de hidrólise (min). X_3 : Concentração de sólidos (% m/v). Letras iguais (coluna ou linha) não diferem significativamente ($p < 0,05$) para o teste de Tukey. NA: Não detectado pela técnica. FSC: Fator de Severidade Combinado. *O fator de severidade não foi calculado dada a concentração de 0% do ácido diluído.

Durante o tratamento com ácido diluído há a hidrólise do material lignocelulósico ocasionando a liberação de monômeros de açúcar (Da SILVA et al., 2013). Apesar do H_3PO_4 possuir um custo mais elevado quando comparado a outros ácidos, como o H_2SO_4 e clorídrico (HCl), este pode ser considerado um ácido mais fraco em relação aos ácidos citados anteriores, sua utilização implica em um menor impacto ambiental, além de ser menos corrosivo e tóxico, este ácido possui a presença de fósforo, o qual pode ser utilizado como nutriente pelos micro-organismos para a etapa de fermentação pós-hidrólise (NAIR et al., 2015; LÓPEZ-LINARES et al., 2013).

Se o tratamento ácido for realizado sob condições suaves de concentração de ácido e temperatura, a fração de hemicelulose pode ser extraída sem afetar significativamente o conteúdo de celulose e de lignina da biomassa (Da SILVA et al., 2013). Nesse sentido, o fator de severidade (FSC) deve ser avaliado para garantir a liberação de monômeros glicosídicos ao mesmo tempo em que se evita ou minimiza o acúmulo de produtos de degradação dos açúcares.

De acordo com Tabela 4 a concentração de ART para o tratamento com H_3PO_4 variou de 0,2 a 33,97 g/L. O aumento do FSC contribuiu para maiores concentrações de açúcares nos hidrolisados, sendo a maior concentração obtida no ensaio nas condições de 4% de ácido, 90 min e 20% de sólidos (33,97 g/L). Ao compararmos o ensaio 12 (2,5% de ácido, 110 min e 20% de sólidos) com os ensaios 15,16,17 (2,5% de ácido, 110 min e 20% de sólidos), podemos observar que o aumento do FSC contribuiu para a redução dos ART, e este fato pode ser explicado devido a severidade do tratamento induzir a degradação dos açúcares e consequentemente a formação de produtos de degradação dos mesmos (MAURYA et al., 2015).

Ainda em relação ao tratamento com ácido fosfórico, ao compararmos o ensaio 10 (5% de ácido, 60 min, 12,5% de sólidos) com o ensaio 14 (2,5% de ácido, 60 min, 25% de sólidos), nota-se que os resultados apresentaram semelhança estatística a 5% de significância mesmo em condições diferentes de hidrólise, que pode ter ocorrido devido ao maior FSC do ensaio 10; no entanto, a maior concentração de sólidos do ensaio 14 também contribuiu para este resultado, pois elevados teores de sólidos podem contribuir para maiores concentrações de açúcares. Contudo, de acordo com a literatura, a utilização de concentrações demasiadamente altas de substrato diminui a eficiência da hidrólise devido a redistribuição da lignina e as modificações estruturais do material lignocelulósico (MARTINS et al., 2015; RAMOS et al., 1992).

Apesar de diversos estudos demonstrarem que os tratamentos realizados a baixas temperaturas e longos tempos de permanência podem ser eficazes utilizando soluções de H_3PO_4 com concentração relativamente elevada (2–6%) (VÁZQUEZ *et al.*, 2007; GÁMEZ *et al.*, 2006; GÁMEZ *et al.*, 2004; UM *et al.*, 2003; ISRAILIDES *et al.*, 1978), as temperaturas mais elevadas e menores tempos também são fontes de estudo. Nair *et al.*, (2015) ao realizar o pré-tratamento do farelo de trigo com H_3PO_4 diluído (0,5 - 3% m/v), temperatura de reação (150 - 210 °C), tempo (5 – 20 min), e mantendo constante a proporção de sólidos em 15% (m/v), constataram que a condição de pré-tratamento que apresentou o maior teor de açúcares no licor (40,21 g/L) foi a concentração de ácido a 1,75 %, temperatura 190 °C e tempo 10 min.

Ao analisar as concentrações de ART dos hidrolisados tratados com o H_2SO_4 diluído, percebe-se a mesma tendência de aumento da concentração de ART com o aumento do FSC. A concentração de açúcares variou de 6,93 a 103,12 g/L (Tabela 9), sendo a maior a concentração obtida no ensaio nas condições de 4% de ácido, 90 min e 20% de sólidos (103,12 g/L), seguindo desta forma a mesma tendência do planejamento com o H_3PO_4 . Em todos os ensaios, as concentrações de ART tratados com o H_2SO_4 foram superiores aos tratados com ácido fosfórico. Em geral, as leveduras necessitam de grandes concentrações de açúcares como substrato para a fermentação (VALDUGA *et al.*, 2009). Por esta razão, o tratamento da biomassa com o H_2SO_4 foi escolhido como o ácido mais eficiente para a produção de ART, para posteriormente serem consumidos durante a produção de produtos de alto valor agregado pela levedura do gênero *Rhodotorula*.

3.4 Influência do pré-tratamento da biomassa seca de caroço de açaí com H_2SO_4 nos teores de ART, HMF e massa solubilizada

Após estabelecer que o pré-tratamento com o H_2SO_4 diluído apresentava as melhores concentrações de ART, avaliou-se a viabilidade do processo, pois o tratamento ácido age principalmente na solubilização das hemiceluloses, contudo, tratamentos muito severos degradam os açúcares resultantes da hidrólise, formando inibidores microbiológicos, como por exemplo, o HMF, o qual afeta o processo de fermentação (MAURYA *et al.*, 2015). Dessa forma, a avaliação dos teores de inibidores produzidos

durante o pré-tratamento é de extrema importância, além disso, a solubilização dos componentes lignocelulósicos também nos trazem dados relevantes sobre a eficiência do processo, e estes dados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5. Teores de açúcares redutores totais (ART), hidroximetil furfural (HMF) e massa solubilizada obtidos durante o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida da biomassa seca do caroço de açaí utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Variáveis independentes				Variáveis dependentes			
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	FSC	ART (g/L)	HMF (mg/L)	Massa solubilizada (%)
1	1	30	5	1,06	12,25 ± 0,1 ^a	5,60 ± 0,4 ^m	27,93
2	4	30	5	1,21	17,65 ± 0,03 ^b	33,68 ± 0,5 ⁿ	38,58
3	1	90	5	1,53	14,76 ± 0,1 ^c	12,82 ± 0,4 ^o	31,94
4	4	90	5	1,68	25,40 ± 0,5 ^d	90,30 ± 0,5 ^p	48,83
5	1	30	20	1,06	28,98 ± 0,1 ^e	19,92 ± 1,1 ^q	21,53
6	4	30	20	1,21	59,60 ± 0,2 ^f	82,06 ± 1,0 ^r	35,23
7	1	90	20	1,53	57,54 ± 0,6 ^f	14,79 ± 0,6 ^s	29,25
8	4	90	20	1,68	103,12 ± 0,5 ^g	448,83 ± 8,2 ^t	48,49
9	0	60	12,5	*	6,93 ± 0,4 ^h	1,49 ± 0,6 ^u	11,56
10	5	60	12,5	1,62	44,70 ± 0,7 ⁱ	148,90 ± 3,0 ^v	49,58
11	2,5	9,54	12,5	0,69	15,93 ± 0,4 ^c	NA	23,52
12	2,5	110	12,5	1,75	51,34 ± 0,2 ^j	191,34 ± 3,2 ^x	41,22
13	2,5	60	0,1%	1,49	NA	0,59 ± 0,3 ^z	NA
14	2,5	60	25%	1,49	63,95 ± 3,6 ^k	87,01 ± 1,2 ^y	33,28
15	2,5	60	12,5	1,49	49,06 ± 0,3 ^l	70,05 ± 0,6 ^w	37,13
16	2,5	60	12,5	1,49	48,16 ± 0,6 ^l	70,58 ± 0,4 ^w	38,50
17	2,5	60	12,5	1,49	48,92 ± 0,1 ^l	72,53 ± 0,6 ^w	37,18

X₁: Concentração do ácido (% m/v). X₂: Tempo de hidrólise (min). X₃: Concentração de sólidos (% m/v). FSC: Fator severidade. Letras iguais (coluna ou linha) não diferem significativamente ($p < 0,05$) para o teste de Tukey ART: Açúcares Redutores totais. HMF: Hidroximetilfurfural .NA: Não detectado pela técnica. * O fator severidade não foi calculado dado a concentração de 0% de ácido. Análises realizadas em triplicata.

De acordo com Tabela 5, a concentração de ART para o tratamento com ácido sulfúrico variou de 6,93 a 103,12 g/L. O aumento do FSC contribuiu para maiores concentrações de açúcares nos hidrolisados, sendo a maior a concentração obtida no ensaio nas condições de 4% de ácido, 90 min e 20% de sólidos (103,12 g/L). No entanto, o aumento do FSC também contribuiu para o aumento do teor de HMF no licor hidrolisado, sendo a maior concentração encontrada no ensaio 8 (448 mg/Kg), o qual corresponde ao maior fator de FSC (1,68). A toxicidade do HMF está associada a danos às células da levedura, pois a presença do grupo hidroximetil proporciona uma redução da hidrofobicidade e baixa permeabilidade da membrana, acarretando em taxas reduzidas da conversão deste composto. Desta forma, os micro-organismos fermentativos redirecionam a energia do fluxo celular para reparar os danos causados por esses compostos, proporcionando a redução dos níveis intracelulares de ATP e NADPH, causados pela inibição enzimática ou pelo consumo/regeneração de cofatores (SEHNEM *et al.*, 2013).

Os teores de HMF variaram de 0,59 a 448 mg/L, sendo as maiores concentrações encontradas nos ensaios que apresentavam os maiores FSC, como o ensaio 10 (5% de ácido, 60 min e 12,5 % de sólidos), ensaio 12 (2,5% de ácido, 110 min e 12,5% de sólidos) e ensaio 8 (4% de ácido, 90 min e 20% de sólidos) com os valores de HMF de 148,90; 191,34 e 448,83 mg/L, respectivamente. Oliveira et al., (2014), em seu estudo, realizou o pré-tratamento da biomassa do caroço de açaí utilizando o H₂SO₄ diluído nas condições experimentais de concentração de ácido (0,5 a 1% m/v), tempo de tratamento (9,5 a 111 min) e concentração de sólidos (1,6 a 18%), e reportou teores de HMF variando na faixa de 1 a 221 mg/L. As condições mais brandas de FSC e menores concentrações de sólidos podem ter contribuído para que o autor obtivesse menores concentrações deste composto.

Ao aumentar a quantidade de prótons na solução aquosa através da adição de ácido promove-se o aumento da reação de hidrólise, que segundo Herrera et al., (2003) pode ser dividida em sete etapas: (1) difusão de prótons pela matriz lignocelulósica umedecida; (2) protonação da ligação éter-oxigênio entre os açúcares monoméricos; (3) quebra da ligação éter (glicosídica) e produção de um carbocátion intermediário; (4) solvatação do carbocátion com água; (5) regeneração de prótons e açúcares monoméricos, oligômeros ou polímeros dependendo de qual ligação éter foi quebrada; (6) distribuição de produtos na fase líquida e (7) retorno do processo ao segundo passo. Desta forma, o aumento da

concentração de ácido de 0 (ensaio 9) para 2,5% (ensaio 15,16,17) promoveu um aumento de aproximadamente sete vezes na concentração de ART.

Ao analisar o ensaio 12 (concentração do ácido 2,5%; tempo 110 min; concentração de sólidos 12,5%), com os pontos centrais 15,16,17 (concentração do ácido 2,5%; tempo 110 min; concentração de sólidos 12,5%), observa-se que o aumento do tempo de 60 para 110 min não promoveu um aumento esperado no teor de ART. Tal fato pode ser explicado devido a severidade do pré-tratamento aplicado a biomassa ter possibilitado que os açúcares obtidos fossem degradados, ocorrendo a formação de produtos de degradação e acarretando em uma declínio de concentração dos açúcares (ALVIRA *et al.*, 2010; MAURYA *et al.*, 2015).

Em relação aos teores de massa solubilizada das frações sólidas da biomassa do caroço de açaí, obtidos após o pré-tratamento utilizando o H_2SO_4 diluído, ocorreu uma variação de 11,56% a 49,58% (Tabela 5). Neste sentido, pode-se afirmar que os maiores teores de massa solubilizada ocorreram sob as condições dos ensaios 8 (48,49%), 4 (48,83%) e 10 (49,58%) e que utilizaram as seguintes condições de estudo: ensaio 8 (4% de concentração de ácido, 90 min e 20% de sólidos), ensaio 4 (4% de concentração de ácido, 90 min e 5% de sólidos) e ensaio 10 (5% de concentração de ácido, 60 min e 12,5% de sólidos).

De acordo com a literatura, o pré-tratamento ácido da maioria dos materiais lignocelulósicos resulta na quase completa solubilização de hemicelulose e de uma digestão parcial da celulose levando ao fornecimento de açúcares monoméricos ou oligoméricos (KIM *et al.*, 2005; LÓPEZ-LINARES *et al.*, 2013; NAIR *et al.*, 2015).

3.5 Metodologia de superfície de resposta para a determinação das melhores condições de pré-tratamento da biomassa seca do caroço de açaí utilizando o H_2SO_4 e H_2SO_4

3.5.1. Pré-tratamento da biomassa seca utilizando H_3PO_4

A influência de cada variável no tratamento da biomassa com H_3PO_4 pode ser acompanhada pelo gráfico de Pareto (Figura 4), o qual demonstra que todas as variáveis do processo e as interações das variáveis apresentaram efeito significativo no teor de ART

oriundos do tratamento do caroço de açaí com H_3PO_4 em um nível de significância de 10%.

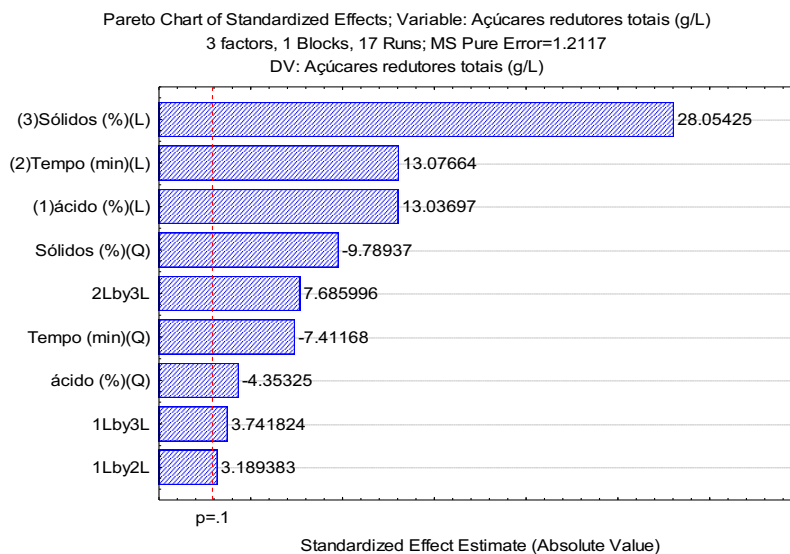


Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes no teor de açúcares redutores totais (g/L) após o tratamento utilizando H_3PO_4 .

Na Figura 4 é possível verificar que as componentes lineares (L) com valores positivos das variáveis concentração de sólidos, seguidas pelas variáveis tempo e concentração de ácido foram as que mais exibiram influência nos teores de ART obtidos após o pré-tratamento da biomassa com H_3PO_4 diluído, o que significa que ao variarmos do menor nível para o maior nível, observamos o aumento nos teores de ART.

Na Tabela 6 podem ser visualizados os resultados da ANOVA para verificar a significância e a capacidade preditiva do modelo matemático proposto pela metodologia de superfície de resposta para prever os teores de ART após a aplicação do pré-tratamento da biomassa seca com H_3PO_4 .

Tabela 6. ANOVA (10% de significância) para a determinação do teor de açúcares redutores totais (ART) após aplicação do pré-tratamento com ácido fosfórico (H_3PO_4).

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor F	R ²
Regressão	1608,54	9	178,73	11,15	0,9348
Resíduos	112,21	7	16,03		
Falta de ajuste	109,78	5	21,96	18,12	
Erro puro	2,42	2	1,21		
Total	1720,74	16			

$F_{0,1; 9; 7} = 2,72$. (Valor de F Tabelado – Teste de Fisher, $p < 0,1$)

$F_{0,1; 5; 2} = 9,29$. (Valor de F Tabelado – Teste de Fisher, $p < 0,1$)

O coeficiente de determinação (R^2) do modelo obtido foi de 0,9348, indicando, desta forma, que o modelo consegue explicar 93,48% da variação dos dados experimentais. Contudo, após a análise estatística dos dados, o modelo matemático proposto para a predição do teor de ART após o processo de hidrólise ácida utilizando H_3PO_4 foi considerado significativo, porém não foi preditivo. Dessa forma, apesar de o modelo matemático e a superfície de resposta não poderem ser gerados para fins preditivos, foi possível plotar as curvas de contorno apenas para ilustrar o processo e determinar as melhores condições de hidrólise utilizando o H_3PO_4 na faixa testada (FIGURA 5).

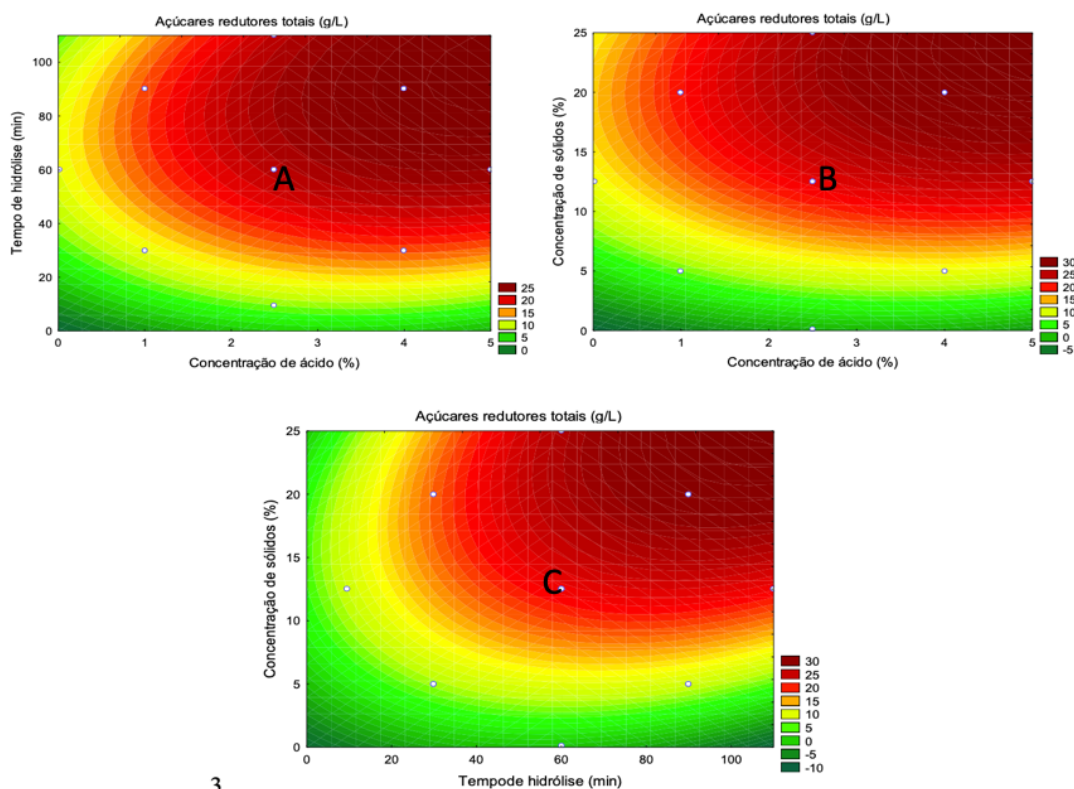


Figura 5. Curvas de contorno para ilustrar as melhores condições de hidrólise do caroço de açaí, utilizando H_3PO_4 , para a produção de açúcares redutores (g/L). A= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de ácido (%) na variável dependente ART (g/L); B = Influência dos parâmetros concentração de ácido (%) e concentração de sólidos (%) na variável dependente ART (g/L); C= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de sólidos (%) na variável dependente ART (g/L)

Com base na visualização das curvas de contorno e com base nos experimentos realizados, é possível verificar que as melhores condições de hidrólise do caroço de açaí para a obtenção de maiores teores de ART utilizando H_3PO_4 é realizando o tratamento do material com 5% de ácido, 25% de sólidos durante 110 min em autoclave.

3.5.2. Pré-tratamento da biomassa seca utilizando H₂SO₄

A influência de cada variável (tempo, concentração de sólidos e concentração de ácido) no tratamento da biomassa com H₂SO₄ diluído pode ser acompanhada pelo gráfico de Pareto (Figura 6), que demonstra que todas as variáveis do processo apresentaram efeito significativo no teor de ART oriundos do tratamento do caroço de açaí com H₂SO₄ em um nível de significância de 10%.

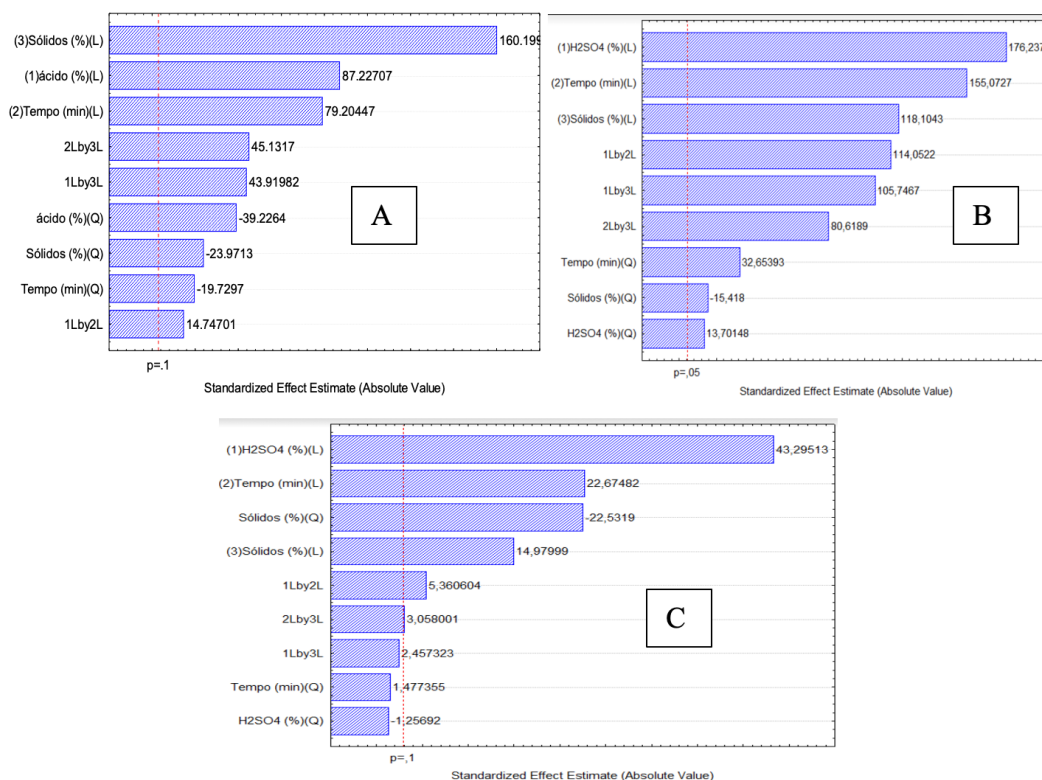


Figura 6. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes no teor de açúcares redutores totais (g/L) (A), teores de hidroximetilfurfural (mg/L) (B) e massa solubilizada (%) (C) após o pré-tratamento utilizando H₂SO₄.

O gráfico de Pareto demonstra que o efeito que mais influenciou no teor de ART foi a concentração de sólidos (quanto maior a concentração de sólidos, maior o teor de açúcares) e a concentração de ácido (quanto maior a concentração de ácido, maior o teor de açúcares). Da mesma forma, os valores positivos do tempo também apontam que os maiores teores de açúcares serão nos tratamentos com maior tempo de hidrólise.

O gráfico de Pareto também demonstrou que todas as variáveis do processo apresentam efeito no teor de HMF (em um nível de significância de 10%), sendo a concentração de ácido e o tempo as variáveis que mais influenciaram para a formação deste composto. Estes resultados eram esperados, pois a utilização de elevadas concentrações de ácido, aliado a altas temperaturas promovem a desidratação das hexoses e consequentemente a produção de furanos (ALVIRA *et al.*, 2010; MAURYA *et al.*, 2015).

Além disso, na Figura 6 é possível acompanhar a influência de cada variável no tratamento da biomassa com ácido sulfúrico diluído, o qual demonstrou que a concentração de ácido foi a variável que apresentou o maior efeito significativo, altas concentrações de ácido durante o tratamento provocam a hidrólise dos açúcares, mesmo que esses posteriormente se transformem em outros compostos (Tabela 5). O tempo foi a segunda variável que apresentou maior efeito significativo, esta variável quando aliada a concentrações de ácido, mesmo em concentrações baixas ou nulas, provocam a hidrólise da biomassa e consequentemente afetam a sua massa solubilizada. A concentração de sólidos apresentou efeito negativo, ou seja, altas concentrações de biomassa dificultavam sua solubilização, isto é explicado, devido a transferência de massa durante a hidrólise, pois altas concentrações do material lignocelulósico dificultam o deslocamento do ácido na biomassa, além da lignina se redistribuir no material provocando modificações estruturais lignocelulósicas dificultando a hidrólise, afetando de maneira negativa a massa solubilizada (Martins *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 1992).

Na Tabela 7 podem ser visualizados os resultados da ANOVA para verificar a significância e a capacidade preditiva dos modelos matemáticos propostos pela metodologia de superfície de resposta para prever os teores de ART, HMF e massa solubilizada após a aplicação do pré-tratamento da biomassa seca com H_2SO_4 .

Tabela 7. ANOVA (10% de significância) para a determinação do teor de açúcares redutores totais (ART), hidroximetilfurfural (HMF) e massa solubilizada após aplicação do pré-tratamento com ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor F	R ²
Açúcares redutores totais					
Regressão	10649,55	9	1183,28	19,78	0,9622
Resíduos	418,79	7	59,83		
Falta de ajuste	418,32	5	83,66	356,73	
Erro puro	0,47	2	0,23		
Total	11068,34	16			
HMF					
Regressão	173049,33	9	19227,70	6,92	0,8989
Resíduos	19453,51	7	2779,07		
Falta de ajuste	19450,1	5	9,8863	3,31	
Erro puro	3,4	2	2,9883		
Total	192502,8	16			
Massa solubilizada					
Regressão	1955,42	9	217,27	1,93	0,8989
Resíduos	786,45	7	112,35		
Falta de ajuste	785,247	5	104,294	0,83	
Erro puro	1,207	2	126,158		
Total	2741,865	16			

$F_{0,1; 9; 7} = 2,72$. (Valor de F_{Tabelado} – Teste de Fisher)

$F_{0,1; 5; 2} = 9,29$. (Valor de F_{Tabelado} – Teste de Fisher)

De acordo com a ANOVA, para a predição dos teores de ART, o modelo matemático proposto é significativo, pois o valor de F calculado da regressão é maior do que o F_{Tabelado} pelo Teste de Fisher; contudo, o modelo não é preditivo, pois o valor F da Tabela para a falta de ajuste deveria ser menor do que o F_{tabelado} . Portanto, não é possível

utilizar o modelo matemático, nem obter superfície de resposta para fins preditivos. Da mesma forma, para a predição da porcentagem da massa solubilizada, o modelo proposto apesar de ter sido considerado preditivo, não apresentou significância estatística ($p < 0,1$) e, portanto, não foi utilizado para a determinação da otimização das condições do processo.

Por outro lado, o modelo matemático proposto para a determinação dos teores de HMF foi significativo, pois o valor de F calculado da regressão é maior do que o F_{Tabelado} pelo Teste de Fisher, e preditivo, pois o valor F da Tabela para a falta de ajuste é menor do que o F_{Tabelado} (Tabela 7). O teste de Fisher para o $F_{\text{regressão}}$ foi de 2,54 vezes maior que o F_{Tabelado} e para o $F_{\text{FaltadeAjuste}}$ foi 2,81 vezes menor, contudo, para ser considerado um bom modelo significativo e preditivo o $F_{\text{regressão}}$ e $F_{\text{FaltadeAjuste}}$ deveria ser 5 vezes maior e menor respectivamente, além de possuir um elevado R^2 (aproximadamente 1), explicando desta forma, a totalidade das variâncias do resultados (Box *et al.*, 1978).

Para fins de ilustração das tendências do processo, nas condições testadas, foram construídas curvas de contorno para os teores de ART, HMF e MS para melhor visualização das melhores condições de hidrólise ácida da biomassa seca de caroço de açaí utilizando o H_2SO_4 (Figura 7,8 e 9).

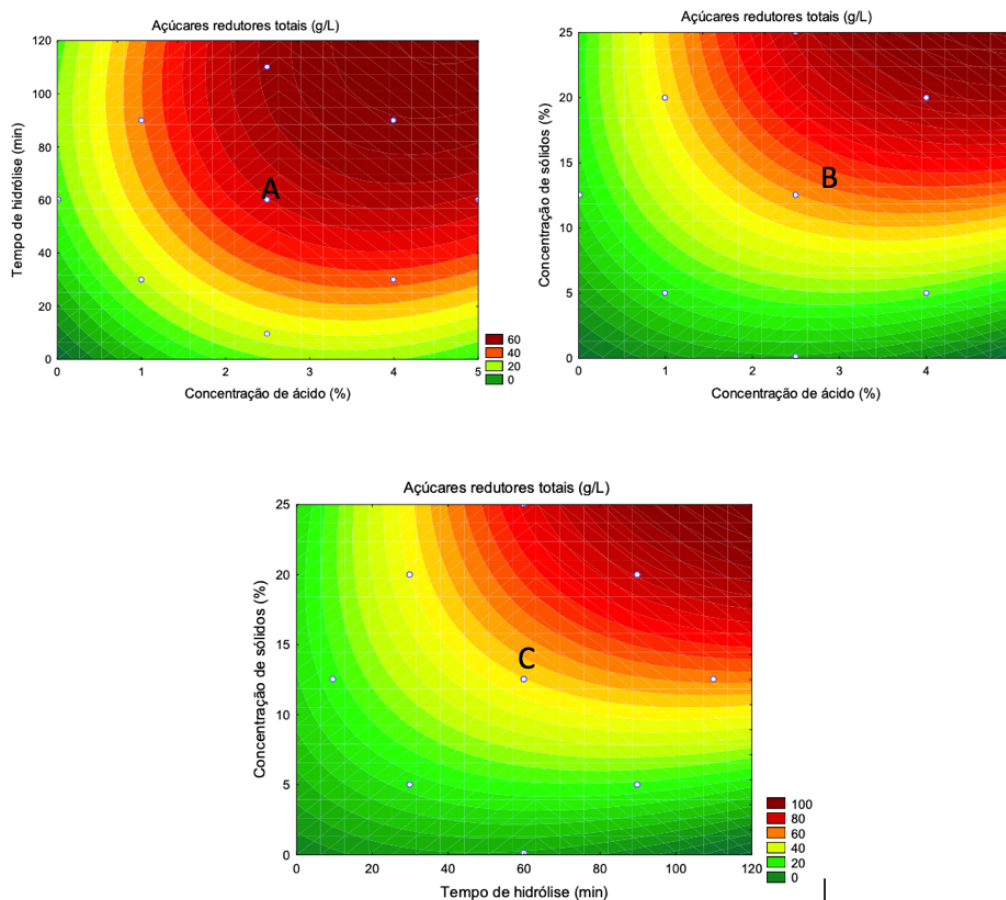


Figura 7. Curvas de contorno para ilustrar as melhores condições de hidrólise do caroço de açaí, utilizando H_2SO_4 , para a produção de açúcares redutores (g/L). A= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de ácido (%) na variável dependente ART (g/L); B = Influência dos parâmetros concentração de ácido (%) e concentração de sólidos (%) na variável dependente ART (g/L); C= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de sólidos (%) na variável dependente ART (g/L)

Com base na análise gráfica, as melhores condições de hidrólise do caroço de açaí para a obtenção de maiores teores de ART utilizando H_2SO_4 é realizando o tratamento do material com 4% de H_2SO_4 , 25% de sólidos durante 110 min em autoclave.

As curvas de contorno para a formação do HMF são encontradas na Figura 8, onde é possível determinar a tendência do processo através da visualização das condições que favorecem a formação deste composto. É possível constatar que a formação de HMF acontece em maiores tempos, concentração de ácidos e concentração de sólidos. No entanto, de acordo com a Figura 8a, ainda seria possível aumentar o tempo de hidrólise,

quando as concentrações de ácido são inferiores a 2% sem que haja um aumento expressivo na concentração de HMF. O mesmo ocorre quando a concentração de sólidos é aumentada e a concentração de ácido mantida abaixo de 2% (Figura 8b). São necessário tempos maiores que 40 min para que haja a formação do HMF, mesmo com baixas concentrações de sólidos (<5%). (Figura 8c).

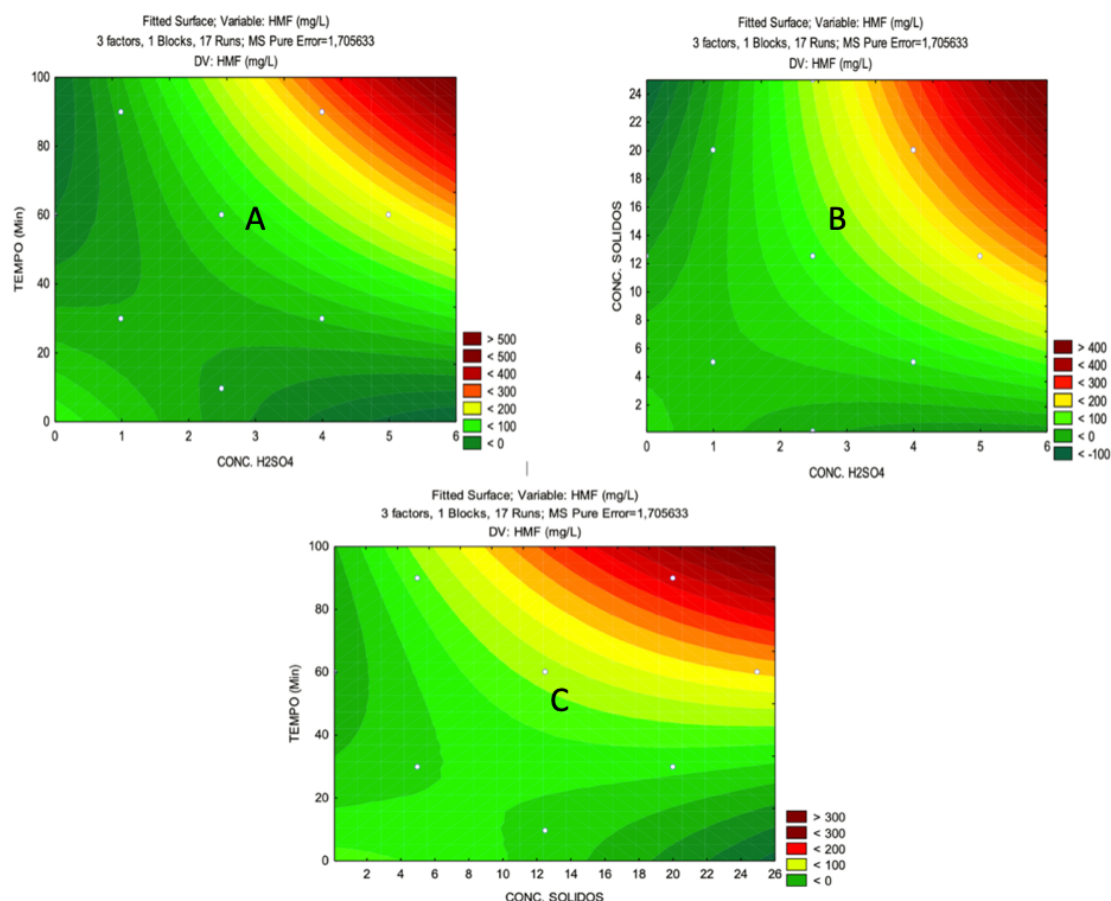


Figura 8. Curvas de contorno para ilustrar as melhores condições para a formação de Hidroximetilfurfural do caroço de açaí utilizando H₂SO₄. A= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de ácido (%) na variável dependente HMF (mg/L); B = Influência dos parâmetros concentração de ácido (%) e concentração de sólidos (%) na variável dependente HMF (mg/L); C= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de sólidos (%) na variável dependente HMF (mg/L).

Na figura 9 é possível analisar as curvas de contorno e suas influências para a massa solubilizada.

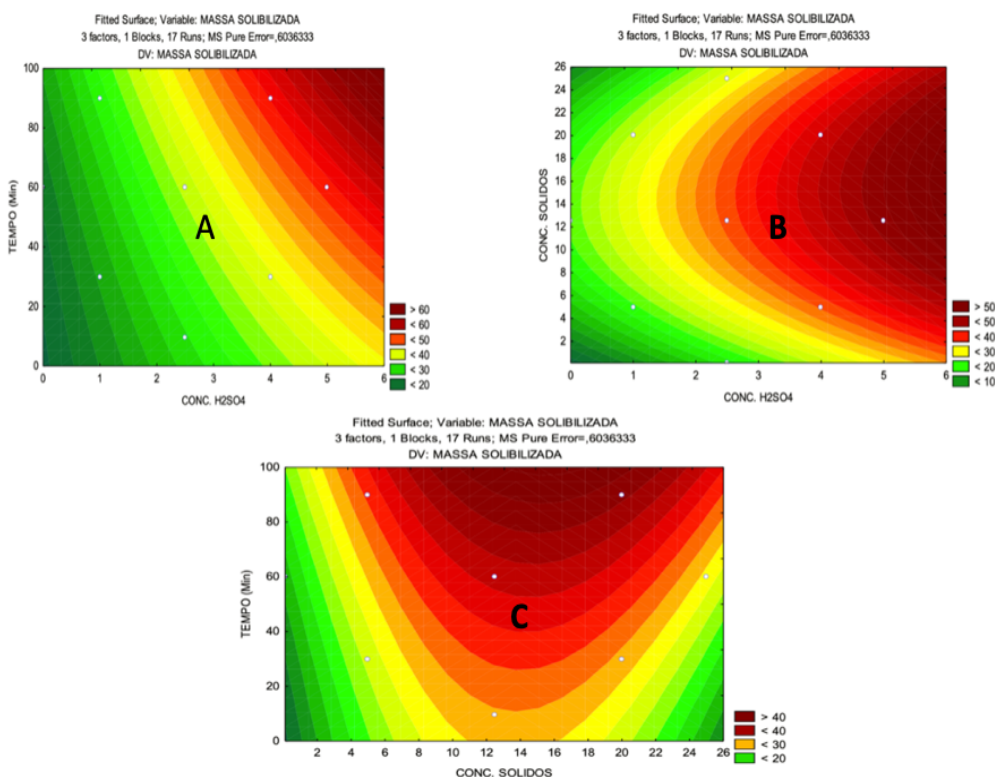


Figura 9. Curvas de contorno para ilustrar as melhores condições para solubilização lignocelulósica do caroço de açaí utilizando H₂SO₄. A= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de ácido (%) na variável dependente massa solubilizada (%); B = Influência dos parâmetros concentração de ácido (%) e concentração de sólidos (%) na variável dependente massa solubilizada (%); C= Influência dos parâmetros tempo de hidrólise (min) e concentração de sólidos (%) na variável dependente massa solubilizada (%).

Na Figura 9a é possível observar que maiores concentrações de tempo aliados a maiores concentrações de ácido provocam maiores solubilizações do material lignocelulósico, em geral, tratamentos ácidos provocam uma maior solubilização dos componentes hemicelulósicos (LÓPEZ-LINARES et al; VASCONCELOS et al., 2013). Pode-se constatar também que maiores concentrações de sólidos demandaram maiores concentrações de ácido para a solubilização do material (Figura 9b), além disso, elevadas concentrações de sólidos demandavam tempo demasiadamente longos para a solubilização da biomassa (Figura 9c).

3.6 Função desejabilidade para a melhor condição do processo de pré-tratamento da biomassa seca do caroço de açaí com H_2SO_4

A função de desejabilidade foi utilizada neste trabalho com o propósito de indicar a tendência na faixa estudada, pois as maiores concentrações de ART (103,12 g/L) foram obtidas através das maiores concentrações de H_2SO_4 e maiores tempos; no entanto, as maiores concentrações de inibidores também foram geradas nestas condições (Tabela 5). Desta forma, objetivou-se diminuir o FSC e minimizando as concentrações de compostos de degradação e inibitórios. A função de desejabilidade para a otimização das respostas do pré-tratamento da biomassa do caroço de açaí encontram-se discriminadas na Figura 10.

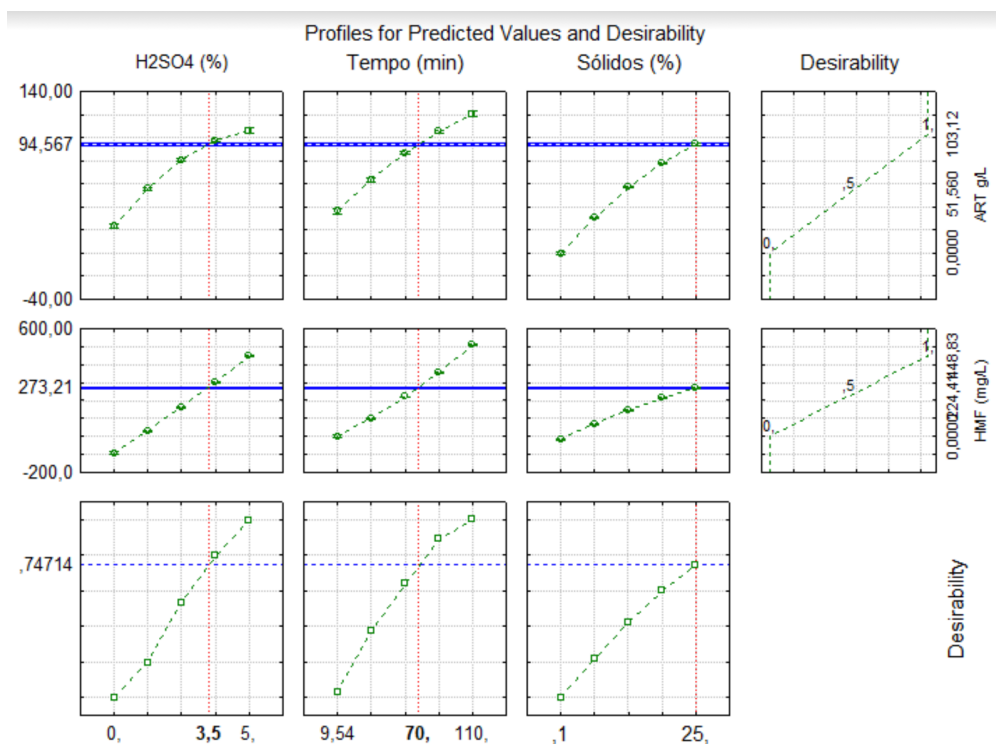


Figura 10. Função desejabilidade para as melhores condições do processo de pré-tratamento ácido da biomassa seca de caroço de açaí [concentração de ácido (%), tempo reacional (min.) e concentração de sólidos (m/v) para a obtenção dos maiores teores de açúcares redutores totais (ART).

A concentração de ácido, tempo e concentração de sólidos (Figura 10) foram selecionadas para que fornecessem resultados viáveis industrialmente, pois em escalas industriais, para que o processo possa ser economicamente viável, deve-se considerar que

grandes concentrações de ácidos podem ocasionar a corrosão dos reatores elevando o preço de manutenção, a grande necessidade energética aliada a elevados tempos podem ser economicamente inviáveis, também deve-se levar em consideração a necessidade de custos adicionais para a neutralização do licor. Além disso, altas concentrações de ácidos aliadas a elevadas temperaturas promovem a produção de produtos de degradação que podem inviabilizar o processo de fermentação se não forem retirados dos licores através de uma etapa de purificação, aumentando o custo do processo (MAURYA et al., 2015). Portanto, neste estudo, a concentração de ácido de 3,5% (m/v), tempo de 70 min e concentração de sólidos de 25% (m/v) foram as condições de processo selecionadas e os resultados teóricos e experimentais para os teores de ART, HMF e massa solubilizada estão expostos na tabela 8.

Tabela 8. Resultados preditos e experimentais do pré-tratamento ácido com H_2SO_4 obtidos a partir da função desejabilidade para os teores de açúcares redutores totais (ART), hidroximetilfurfural (HMF) e massa solubilizada utilizando a concentração de ácido de 3,5% (m/v), tempo de 70 min e concentração de sólidos de 25% (m/v).

	Teórico	Experimental	CV
ART (g/L)	94,56	$82,02 \pm 1,7$	2,07%
HMF (mg/L)	273,21	$264,73 \pm 1,2$	0,45
Massa solubilizada (%)	-	$41,44 \pm 1,33$	

Resultados experimentais realizados em triplicada. CV: coeficiente de variação.

Os resultados teóricos ficaram próximos aos resultados experimentais, indicando que o processo possui uma boa predição dentro das variáveis estudadas. A concentração de ART, HMF e MS nas condições experimentais foram de 82,02g/L, 264,73 mg/L e 41,44% respectivamente.

3.7. Caracterização dos açúcares e compostos inibidores no licor recém-hidrolisado e no licor neutralizado para utilização como substrato em processos fermentativos

Na tabela 9 é possível verificar os teores de açúcares e inibidores após hidrólise, no entanto, o pH do meio nestas condições foi inferior a 1, impossibilitando o processo fermentativo, portanto foi realizada uma neutralização com sulfato de cálcio até que o meio apresentasse pH próximo a neutralidade. Os resultados por HPLC da hidrólise com

ácido sulfúrico a 3,5% (m/v); tempo 70 (min) e concentração de sólidos de 25% estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Teores de açúcares e compostos inibidores microbiológicos no licor recém-hidrolisado e após a neutralização para utilização em processos fermentativos.

	Licor recém-hidrolisado	Licor hidrolisado e neutralizado*
Xilose (g/L)	50,93 ± 0,71	42,10 ± 0,09
Glicose (g/L)	1,30 ± 0,11	1,04 ± 0,09
Arabinose (g/L)	1,92 ± 0,23	1,39 ± 0,16
Celobiose (g/L)	0,93 ± 0,08	0,72 ± 0,07
Soma dos açúcares (g/L)	55,08 ± 1,13	45,25 ± 0,41
Fufural (mg/L)	9,8 ± 1,0	8,8 ± 0,7
Hidroximetilfurfural (mg/L)	337,9 ± 50,0	238,2 ± 20,0
Ácido acético (g/L)	1,83 ± 0,11	1,76 ± 0,04

*Licor hidrolisado nas condições estabelecidas, seguido de neutralização com K₂SO₄, autoclavados a 121 °C por 15 min e filtrado, conforme procedimento a ser adotado para aplicação em processos fermentativos.

A hidrólise com ácido sulfúrico a 3,5% (m/v); 70 min e concentração de sólidos de 25% possibilitou a obtenção de um licor contendo 55,08 g/L de açúcares, sendo a maior concentração desses açúcares compostos por xilose (50,93 g/L). Oliveira et al., (2014), ao realizar a hidrólise do caroço de açaí utilizando a concentração de H₂SO₄ de 1,5 (m/v), tempo de 90 min e concentração de sólidos de 15% (m/v) obteve no licor proveniente da hidrólise 24,88 g/L de xilose. Logo, o tratamento com as condições apresentadas no presente estudo possibilitou um aumento de aproximadamente duas vezes o teor de xilose (50,93 g/L).

As leveduras do gênero *Rhodotorula spp*, como por exemplo a *R. graminis*, a *R. mucilaginosa* e a *R. rubra* apresentam capacidade de metabolizar a xilose (MUNCNER & AUGUSTIN, 1995; HARI et al., 1992; XU et al., 2011), justificando o potencial de utilização da biomassa de caroço de açaí como substrato para o crescimento microbiano. Silva et al., (2011) cultivaram uma cepa de *R. glutinis* em um meio de cultura contendo quantidade inferiores de xilose (28 g/L) (Tabela 9). Os autores paralelamente utilizaram como controle um meio contendo glicose, seus estudos revelaram que após 111 h de

fermentação a concentração máxima de biomassa foi quase a mesma para as duas fontes de carbono (4,14 e 4,30 g/L para glicose e xilose, respectivamente); no entanto, a taxa de crescimento específico para glicose (0,1 h) foi maior que a observada para xilose (0,05 h). Outro estudo realizado com a *R. toruloides* utilizou uma concentração de xilose menor que a deste estudo (40 g/L); os autores relataram que a taxa de crescimento da levedura em meio contendo glicose foi o dobro da xilose, sendo que a fase de crescimento exponencial da glicose durou 72 h em comparação com a xilose (40 h), (TIUKOVA et al., 2019).

As concentrações de furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético foram 9,8, 337,9 e 1,83 g/L, respectivamente. Estes compostos são considerados inibidores para o crescimento de diversos microorganismos. (ALVIRA et al. 2010; MAURYA et al., 2015). No entanto, Zhang et al., (2011) compararam o crescimento de *R. glutinis* em glicose pura (20 g/L) e xilose (20 g/L) com 0,3 mL/L de furfural e 0,26 g de ácido acético/g de açúcar presente. O estudo indicou que a presença de 0,26 g/Kg de ácido acético no açúcar presente e 0,3 mL/L de furfural tem efeitos inibitórios sobre o crescimento de *R. glutinis* na glicose; porém estes compostos não apresentaram efeitos inibitórios quando a levedura foi inoculada na xilose.

Lin et al (2017) relataram um efeito inibitório na *R. glutinis* quando a concentração de ácido acético atingiu 12 g/L; a concentração de furfural de 800 mg/L também provocou a inibição de crescimento da levedura durante 12 h e o HMF quando adicionado a concentração de 200mg/L não apresentou efeito inibitório no crescimento da levedura; no entanto, concentrações de 400 mg/L de HMF apresentam efeito inibitório na biomassa. Vajzovic et al. (2012) relataram que concentrações menores que 3 g/L de furfural não apresentaram efeito inibitório para o crescimento da levedura *R. mucilaginosa*, e que o metabolismo da xilose pelo micro-organismo foi afetada negativamente somente a partir desta concentração.

Os teores de açúcares liberados no licor hidrolisado da biomassa seca de caroço de açaí após o pré-tratamento com H₂SO₄, assim como os baixos teores de inibidores microbiológicos, caracterizam o produto como um excelente substrato com elevado potencial para ser utilizado em processos biotecnológicos para leveduras capazes de metabolizarem xilose.

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa de caroço de açaí antes e após o pré-tratamento com H_2SO_4

As micrografias da biomassa de caroço de açaí antes e após o tratamento com H_2SO_4 diluído nas condições podem ser visualizadas na Figura 11.

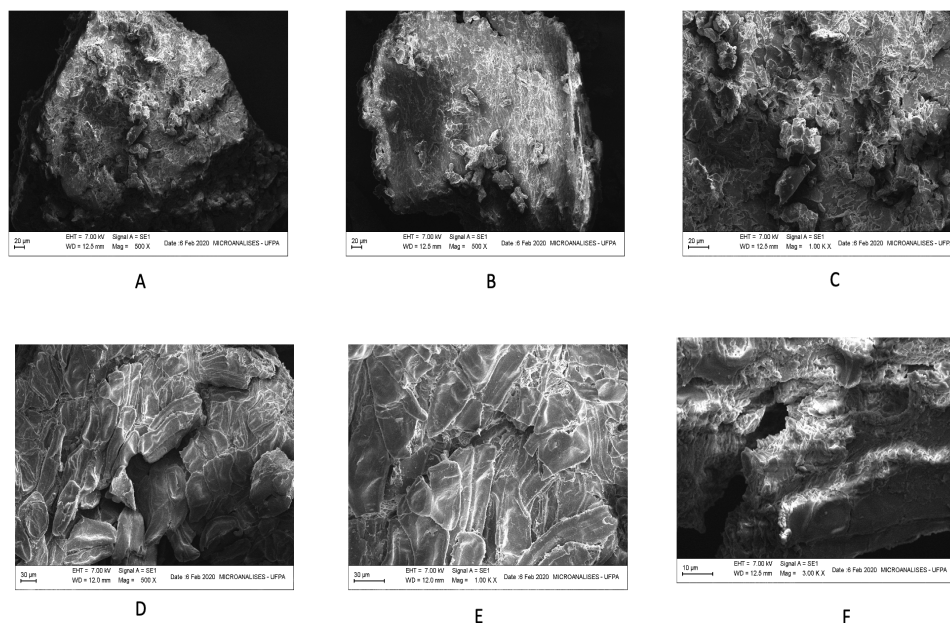


Figura 11. Micrografias da biomassa antes e pós tratamento com ácido sulfúrico diluído nas condições (3,5% (m/v); tempo 70 (min) e concentração de sólidos de 25%). A,B,C: caroço de açaí *in natura*. D,E,F: caroço de açaí após pré-tratamento com H_2SO_4 diluído nas condições (3,5% (m/v); tempo 70 (min) e concentração de sólidos de 25%)

Através das micrografias obtidas por MEV, foi possível observar que a biomassa de caroço de açaí antes do pré-tratamento (Figura 11a,b,c) apresenta características recalcitrantes, sem danos ou fissuras, apresentando pequenas protuberâncias irregulares devido ao processo de moagem do fruto. No entanto, após o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído (Figura 11d,e,f) foi possível observar a perda da densidade mássica, fissuras e rompimento celular acentuado promovendo uma desorganização estrutural parcial, tornando o material mais poroso e amorfo; sendo estas modificações resultantes da massa solubilizada pelo ácido (principalmente a hemicelulose) e modificação parcial da cristalização da celulose. Além disso, as fissuras e rupturas observadas podem ser

decorrentes da quebra de ligações entre os carboidratos e lignina (OLIVEIRA et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

O pré-tratamento com H_2SO_4 mostrou-se mais eficiente que o pré-tratamento com HP_3O_4 . A melhor condição estabelecida para a hidrólise dos carboidratos do açaí visando processos fermentativos proporcionaram uma concentração de 55,08 g/L de açúcares, constituído majoritariamente de xilose (93%) e baixos teores de inibidores. O caroço de açaí é um resíduo agroindustrial com elevado potencial para ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos, contribuindo para uma estratégia ambiental e socioeconômica de aproveitamento de resíduos agroindustriais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Projeto 403121/2016-7). W.S. Igreja agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado (código 001, Processo 00214342204).

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Almeida, A.V.C., Melo I.M., Pinheiro I.S., Freitas J.F., Melo, A.C.S. Revalorização do caroço de açaí em uma beneficiadora de polpas do município de Ananindeua/PA: proposta de estruturação de um canal reverso orientado pela PNRS e logística reversa. GEPROS. Gestão da Produção, Operações e Sistema, 12, 59–83, 2017.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 101, 4851–4861, 2010
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12, 26, 1995.

- AOCS - American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the American oil chemists society. Champaign, 1997.
- Arruda, J. De C.B., de Fonseca, L.A.B., Pinto, L.C.P., Pinheiro, H.C.O., Monteiro, B.T.O., Manno, M.C., Lima, K.R.S., Lima, A.R. Açaí seed bran in the feed of slow-growth broilers. *Acta Amazonica*, 48, 298–303, 2018.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. *Statistics for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. John Wiley & Sons. New York. 1978.
- Da Silva, A. S., Sobral Teixeira, R. S., Oliveira, R. de, Santana, V., de Barros, R. da R. O., Antonieta, M., & da Silva Bo, E. P. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercializatio*, 2013.
- EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Disponível em < https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52276433/amazonia-em-foco-debate-desenvolvimento-rural-da-regiao?p_auth=XvNXOFir> acessado em 10/11/2020.
- Ferreira, D.S., Gomes, A.L., Silva, M.G, Alves A.B., Agnol, W.H.D., Ferrari, R.A., Carvalho, P.R.N., Pacheco, M.T.B. Antioxidant Capacity and Chemical Characterization of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Fractions. *Food Science and Technology* 4, 95-102, 2016.
- Gámez, S., González-Cabriales, J. J., Ramírez, J. A., Garrote, G., & Vázquez, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, 74, 78–88, 2006.
- Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*. 1999 Jun; 57(3): 191–202. doi:10.1007/s001070050039
- Hari, R. P. K., Patel, T., & Martin, A. A new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. *Journal of Industrial Microbiology*, 11, 43–51, 1992.
- Herrera, A., Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. Production of Xylose from Sorghum Straw Using Hydrochloric Acid. *Journal of Cereal Science*, 37, 267–274, 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura*, 2018- Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por

- tipo de produto extrativo Disponível em
<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado> acessado em 14 de abril de 2020.
- Israilides C.J., Grant. G.A., Han Y.M. Sugar level, fermentability, and acceptability of straw treated with different acids. *Appl Environ Microbiol*, 36, 43-6, 1978.
- Kim, S.; Holtzapple, M.T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.*, 96, 1994–2006, 2005.
- Lin, Z., Zhou, Y., Wu, J., Liu, H., & Zhang, J. Effect of Multiple Inhibitions in Corn cob Hydrolysate on the Lipid Production by *Rhodotorula glutinis*. *Energy & Fuels*, 31, 12247–12255, 2017.
- López-Linares, J. C., Cara, C., Moya, M., Ruiz, E., Castro, E., & Romero, I. Fermentable sugar production from rapeseed straw by dilute phosphoric acid pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 50, 525–531, 2013.
- Martins LH S, Rabelo SC, Costa AC. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 2015 Mai; 191: 312–321. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.024
- Martins, M.A; Mattoso, L.H.; Pessoa, J.D.C Comportamento térmico e caracterização morfológica das fibras de mesocarpo e caroço do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) *Revista Brasileira Fruticultura*, v.31.n.4, p.1150-1157, 2009.
- Maurya, D. P., Singla, A., Negi, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5, 597–609, 2015
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 3, 426-429, 1959.
- Monteiro, A.F., Miguez, I.S., da Silva, J.P.R., Silva, A.S. High concentration and yield production of mannose from açaí (*Euterpe oleracea*) seeds via diluted-acid and mannanase-catalyzed hydrolysis. *bioRxiv* 513168, 2019.
- Muncner, D., & Augustin, J. Assimilation of benzoate by *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis* and *Rhodospiridium toruloides*, as affected by glucose or xylose. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 240–241, 1995
- Nair, R. B., Lundin, M., Brandberg, T., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent

- ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. *Industrial Crops and Products*, 69, 314–323, 2015.
- NREL - National Renewable Energy Laboratory. *Biodiesel: Handling and Use Guide*. TP-540-43672, 4, 2009.
- Oliveira J.A.R., Komesu A., Filho RM. Hydrothermal pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of seeds of açaí (*euterpe oleracea*) and sugar recovery. *Chem. Eng. Trans*; 37: 787-792, 2014
- Oliveira J.A.R., Komesu A., Martins L.H., Maciel Filho R. Evaluation of microstructure of açaí seeds biomass untreated and treated with H_2SO_4 and $NaOH$ by SEM, RDX and FTIR, *Chem. Eng. Trans*, 50, 379-384, 2016
- Rambo, M. K. D., Schmidt, F. L., & Ferreira, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*, 144, 696–703, 2015.
- Ramos, L.; Breuil, C., Sasdler, J. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 34, 37-48, 1992.
- Rocha, M.V.P., Rodrigues, T.H.S., de Albuquerque, T.L., Gonçalves, L.R.B., de Macedo, G.R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Journal*, 243, 234–243, 2014.
- Rodríguez-Zúñiga, U.F., Lemo, V.; Farinas, C. S., Bertucci, N., COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS - SBPMat, 7., 2008, Guarujá; BRAZILIAN MRS MEETING, 7., 2008
- Ruales-Salcedo, Á. V., Prado-Rubio, O. A., & Rojas González, A. F. Harnessing lignocellulosic waste for energy storage and generation for off-grid rural areas. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20, 1515–1526, 2018.
- Sehnem, N. T., da Silva Machado, A., Leite, F. C. B., de Barros Pita, W., de Moraes, M. A., & Ayub, M. A. Z. . 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. *Bioresource Technology*, 133, 190–196, 2013.

- Silva L., T., Feijão, D., Roseiro, J. C., Reis, A. Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCM1 145 physiological response and oil production growing on xylose and glucose using multi-parameter flow cytometry. *Bioresource Technology*, 102, 2998–3006., 2011.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Technical Report NREL, 2006.
- Sluiter A, Ruiz R, Scarla TAC, Sluiter J, Templeton D. Determination of extractives in biomass. (b) Technical Report, National Renewable Energy Laboratory 2008. - NREL/TP-510-42618.
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. (a) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report, National Renewable Energy Laboratory . 2008. NREL/TP-510-42618.
- Tiukova L.A., Brandenburg J., Blomqvist J., Sampels S., Mikkelsen N., Skaugen M., Arntzen M., Nielsen J., Sandgren M., Kerkhoven E.J. Proteome analysis of xylose metabolism in *Rhodotorula toruloides* during lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 137, 2019.
- Um, B.-H., Karim, M. N., & Henk, L. L. Effect of Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments on Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105(1-3), 115–126, 2003.
- Vajzovic, A., Bura, R., Kohlmeier, K., & Doty, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 2012.
- Valduga, E., Valerio, A., Treichel, H., Furigo Júnior, A., Luccio, M.D. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the Production of Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in Synthetic and Agroindustrial Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 61- 69, 2009.
- Vasconcelos, S. M., Santos, A. M. P., Rocha, G. J. M., & Souto-Maior, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresource Technology*, 135, 46–52, 2013.
- Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S. J., & Ramírez, J. A. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresource Technology*, 98, 3053–3060, 2007.

- Xu, P., Bura, R., & Doty, S. L. Genetic analysis of D-xylose metabolism by endophytic yeast strains of *Rhodotorula graminis* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 471–478, 2011.
- Zhang, G., French, W. T., Hernandez, R., Alley, E., & Paraschivescu, M. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy*, 35, 734–740, 2011.

CAPÍTULO III

**Produção de carotenoides por leveduras *Rhodotorula rubra* utilizando caroço de
açai (*Euterpe oleracea* Mart.) como substrato para a fermentação**

Produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra* utilizando caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como substrato para a fermentação

Willen Silva Igreja¹, Felipe de Andrade Maia², Alessandra Santos Lopes^{1,2}, Renan Campos Chisté^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

²Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

Resumo

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis presentes em plantas, animais e também em microrganismos, possuindo ampla aplicação biotecnológica, farmacêutica e alimentícia. As leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de biosintetizar carotenoides no interior de suas células quando são submetidas a condições adversas do meio, esse processo biotecnológico pode ser industrialmente viável se o custo de produção puder ser minimizado através do uso de subprodutos de baixo custo como fontes de nutrientes. Portanto o objetivo deste trabalho foi a produção de carotenoides utilizando o caroço de açaí como substrato para a fermentação da levedura *Rhodotorula rubra*. O caroço de açaí foi submetido a uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico diluído, o qual proporcionou um licor com 45,25 g/L de açúcares, sendo constituído majoritariamente de xilose (93%), e baixas concentrações de inibidores (0,0088 g/L de furfural; 0,2382 de hidroximetilfurfural e 1,76 ± de ácido acético). Com relação ao cultivo da levedura, observou-se que as melhores condições de cultivo para a produção de biomassa foram as condições (pH 7, 40°C e 200 rpm) enquanto as melhores condições para a biossíntese de carotenoides foram (pH 7, 30°C e 200 rpm), estas condições proporcionaram 2,0040 g de biomassa seca e uma concentração de carotenoides de 37,59 µg/g de biomassa seca. Dentre os carotenoides identificados, o β-caroteno (77%), *cis*-γ-Caroteno (6,9%) e toruleno (4,5%) foram os carotenoides majoritários produzidos. Portanto a levedura *R.*

rubra exibiu alto potencial para biosintetizar carotenoides usando o caroço do açaí como substrato.

Palavras-chaves: Carotenoides, *Rhodotorula rubra*, açaí, resíduos agroindustriais.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis presentes em plantas, animais e também em microrganismos. São amplamente utilizados como corantes alimentícios (β -caroteno, licopeno, luteína, astaxantina, bixina), sua ingestão vem sendo associado ao fortalecimento do sistema imunológico e também à diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular, entre outras (LAVECCHIA et al., 2013).

A produção de carotenoides por microrganismos vem despertando o interesse econômico e industrial nos últimos anos devido seu apelo natural. Nesse contexto, as leveduras podem ser destacadas pelo seu uso como fonte proteica e pela capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar (VALDUGA et al., 2009). As leveduras do gênero *Rhodotorula* são unicelulares pigmentadas não-fotossintéticas, possuindo capacidade de produzir carotenoides no interior de suas células, sob determinadas condições de estresse no meio em que se encontram (SQUINA et al., 2003; VALDUGA et al., 2009). Seu crescimento vem sendo relatado em diversos resíduos agroindustriais de baixo custo visando o barateamento da produção de carotenoides por via biotecnológica (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014), neste contexto, vários resíduos agroindústrias vêm sendo utilizados como substrato para a produção de carotenoides em leveduras do gênero *Rhodotorula*, por exemplo, efluentes de cervejaria, efluente residual da fécula da batata, caldo de cana e resíduos de café (SCHNEIDER et al, 2013; KOT et al, 2017; BONADIO et al., 2018; MOREIRA et al., 2018)

A Amazônia possui uma vasta participação no mercado agroindustrial, sendo o açaí um dos principais produtos explorados (IBGE, 2018), a polpa ou vinho é o produto obtido da cadeia produtiva do açaí e corresponde a 15% do beneficiamento do fruto, sendo 85% restante constituído do caroço e fibras, os quais são descartados (ALMEIDA

2017). O estudo de utilização de novos meios industriais de fermentação a partir de resíduos agroindústrias vem se intensificado nos últimos anos (ROCHA et al., 2014; MARTINS et al., 2015), podendo ser produzido a partir de vários complexos lignocelulósicos representando uma fonte barata, renovável e farta (MAURYA et al., 2015), possibilitando uma produção sustentável e rentável.

A levedura *Rhodotorula rubra* é capaz de biosintetizar carotenoides sob condições de estresse em diversos substratos agroindustriais (FRENGOVA et al., 2006; BANZATTO et al., 2013; BONADIO et al., 2018), o caroço de açaí possui um elevado potencial para a aplicação e viabilização de barateamento da produção de carotenoides naturais. O caráter inovador desta pesquisa baseia-se no fato de não há dados na literatura que avaliem o potencial deste resíduo para este propósito (produção de carotenoides).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo do substrato a partir do caroço de açaí

Os caroços de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) (25 kg) foram doados por uma fábrica processadora do fruto na cidade de Castanhal, Pará, Brasil, cujos frutos foram provenientes da cidade de Igarapé-Miri, no mesmo estado. O acesso à matéria-prima foi cadastrado no Sistema Nacional e Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, (Cadastro: AF18EDC). A coleta dos caroços foi realizada logo após o despulpamento dos frutos para a obtenção da polpa (suco) do açaí

2.2. Preparo da biomassa seca de caroço de açaí

Os caroços de açaí foram lavados com água corrente para a retirada dos resíduos da coleta e outras impurezas, seguido de sanitização com solução de hipoclorito de sódio (100 mg/L /10 min) e secagem em estufa com circulação forçada de ar (65 °C/48 h) até que atingissem umidade < 10%, conforme recomendado pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL, 2009).

A biomassa seca foi triturada em um moinho de facas, e a biomassa utilizada foi aquela que passou na peneira de 20 mesh (0,841 mm) e foi retida na peneira de 60 mesh (0,250 mm).

2.3. Preparo do pré-tratamento para obtenção do licor

Para a realização do pré-tratamento, a biomassa seca foi submetida a uma hidrólise ácida com H_2SO_4 em frascos de borosilicato, sendo as condições: Concentração de H_2SO_4 3,5% (m/v), temperatura (121°C), tempo (70 min) e concentração de sólidos 25% (m/v). Após a etapa de hidrólise ácida, a biomassa foi retirada dos frascos, filtrada à vácuo em papel de filtro qualitativo previamente tarado, sendo o licor resultante neutralizado com uma solução de sulfato de cálcio (CaSO_4) 2M até que atingisse um pH de 7.

O substrato foi novamente autoclavado a 121°C por 15 min e filtrado para remoção da lignina decantada durante o processo. O substrato/licor foi caracterizado ao final do processo e continha $42,10 \pm 0,09$ g/L de xilose; $1,04 \pm 0,09$ g/L de glicose; $1,39 \pm 0,16$ g/L de arabinose; $0,72 \pm 0,07$ de celobiose; $0,0088 \pm 0,00071$ g/L de furfural; $0,2382 \pm 0,02$ de hidroximetilfurfural e $1,76 \pm 0,04$ de ácido acético, conforme caracterização prévia (Capítulo I, sessão 2.).

2.4. *Rhodotorula rubra* e preparo do inóculo

A levedura *Rhodotorula rubra* (CCT 3456) (Figura 1) foi adquirida da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). A cepa foi mantida na UFPA (Laboratório de Biotecnologia) por repiques mensais em meios inclinados em tubos de ensaio contendo meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*) e YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*).

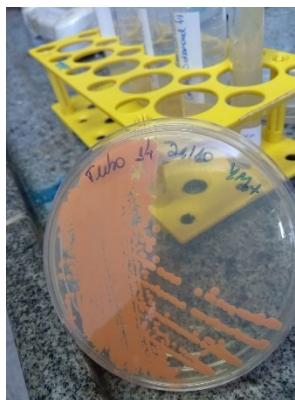


Figura 1. *Rhodotorula rubra* em meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*).

Uma alçada da levedura *R. rubra* foi retirada do meio de manutenção YEPD e transferida para um erlenmeyer contendo 20 mL de meio de cultivo YEPA (1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glicose), sendo agitados à 100 rpm durante 24 h a 25°C . Após o tempo determinado, o inóculo foi transferido para um

erlenmeyer contendo 180 mL do licor hidrolisado obtido a partir da biomassa seca do caroço de açaí (substrato).

2.5. Determinação das melhores condições de bioprodução de carotenoides e biomassa

A determinação das melhores condições de bioprodução de carotenoides e de biomassa de *R. rubra* foi realizada a partir do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com três variáveis independentes (pH, temperatura e agitação do meio), dois níveis (-1 e +1), três pontos centrais e seis axiais, totalizando 17 ensaios (Tabela 1), sendo as variáveis de resposta: concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$ de biomassa liofilizada) e concentração de biomassa liofilizada (g). Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 250 mL acoplados a uma estufa incubadora shaker contendo 200 mL do resíduo selecionado (180 mL do hidrolisado + 20 mL de inoculo), durante 120 horas sob presença de luz intensa (luzes de LED).

Após o período de incubação, a suspensão de células foi recolhida por centrifugação (200 rpm/10 min), congelada, liofilizada, pesada e mantida sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o procedimento de extração de carotenoides.

Tabela 1. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR): níveis das variáveis independentes (originais e codificadas).

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	1,6	3	5	7	8,4
Temperatura	21	25	30	35	39
Agitação	66	100	150	200	234

2.6 Determinação do teor de carotenoides totais

Após o período de incubação, foi realizado o procedimento de extração exaustiva dos carotenoides segundo Mandelli *et al.* (2012). Resumidamente, o método consiste em duas etapas, sendo a primeira responsável pela ruptura das paredes celulares através de

força mecânica com o auxílio de almofariz e pistilo para a extração exaustiva dos carotenoides usando acetato de etila, seguido por metanol (1:1, v/v). Os carotenoides totais foram determinados após extração exaustiva do pigmento da biomassa liofilizada e o teor foi determinado por espectrofotometria a 450 nm (MANDELLI *et al.*, 2012). Os resultados foram expressos em μg de carotenoides/g de biomassa liofilizada (base seca), utilizando o coeficiente de absorção específico do β -caroteno em éter de petróleo (2592) (MANDELLI *et al.*, 2012).

2.7 Perfil de carotenoides na condição otimizada

O perfil de carotenoides foi determinado na biomassa resultante da melhor condição estabelecida através do planejamento experimental. Os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent, modelo Agilent 1260 Infinity, Santa Clara, CA, EUA), equipado com uma bomba quaternária (G1311C), uma válvula de injeção *Rheodyne* com *loop* de 20 μL , um forno (G1316A) e um detector de arranjo de diodos (DAD) (G1328C). Para as análises cromatográficas, as amostras e os solventes foram filtrados utilizando membranas de 0,22 e 0,45 μm , respectivamente, (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Para a análise de carotenoides, os extratos obtidos a partir da extração exaustiva da biomassa seca foram submetidos à partição líquido-líquido, com éter de petróleo/éter etílico (1:1, v/v), lavados com água destilada, saponificados *overnight* (≈ 16 h) com 10% de KOH em metanol (1:1, v/v), re-particionado e secos sob fluxo de N_2 , seguindo os mesmos procedimentos descritos por De Rosso & Mercadante (2007). Os extratos saponificados secos foram re-solubilizados em MTBE (éter metil-*terc*-butílico) e injetados no HPLC. Os carotenoides da biomassa seca foram separados em uma coluna C30 YMC (5 μm , 250 mm $\times$ 4,6 mm) com um gradiente linear de metanol/MTBE a 0,9 mL/min e com temperatura na coluna ajustada a 29 °C (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012). Os espectros UV-Vis foram registrados entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm. Os carotenoides foram identificados de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção, co-cromatografia com padrão autêntico, características dos espectros UV-visível [$(\lambda_{\text{máx}}$, estrutura fina espectral (% III/II) e intensidade do pico *cis* (%AB/AII)] e de massa, em comparação com os dados disponíveis na literatura

(SQUINA *et al.*, 2003; BRITTON, 2004). O teor de carotenoides foi expresso como porcentagem relativa (%) considerando a área dos picos assinalados a 450 nm, considerando três procedimentos de extração independentes (n = 3, base seca).

2.7 Análise estatística

Os resultados (media $\pm$ desvio padrão) foram analisados pelo software Statistica 7.0 software (Statsoft Inc.) através da Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de tukey ($p < 0,05$). As melhores condições para a produção de carotenoides foram determinadas pela metodologia de superfície de resposta e analisada utilizando o software Statistica® 7.0. Os coeficientes de regressão foram obtidos através dos dados experimentais ajustados ao modelo quadrático. A adequação do modelo foi determinada pela falta de ajuste, coeficiente de determinação (R^2) e pelos valores do teste de Fisher (*F-value*) obtidos pela ANOVA. A significância estatística dos modelos e das variáveis foram analisadas a 5% ($\alpha=0,05$). O modelo quadrático foi utilizado para construir os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula rubra*

Na Tabela 2, é possível acompanhar a produção de carotenoides pela levedura *R. rubra* utilizando como substrato o caroço de açaí pré-tratado com H_2SO_4 . A produção de carotenoides variou de 0,80 a 37,59 $\mu\text{g/g}$ de biomassa seca, enquanto a produção de biomassa variou de 0,0909 a 2,004 g, sendo a maior concentração de carotenoides encontrados no ensaio 6 (pH 7, temperatura 30 e 200 rpm). O pH inicial do meio de cultivo vem sendo objeto de diversos estudos durante a carotenogênese, pois durante a fermentação há o decréscimo do pH decorrente da produção de dióxido de carbono e ácidos orgânicos produzidos pelos microorganismos, alterando o pH inicial e afetando o sistema enzimático das leveduras influenciando seu crescimento e sua carotenogênese (FRENGOVA *et al.*, 1994; NAGHAVI *et al.*, 2014; KOT *et al.*, 2017).

Tabela 2. Produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula rubra* utilizando como substrato o caroço de açaí pré-tratado com H₂SO₄.

Variáveis independentes				Variáveis dependentes	
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Biomassa (g)	Carotenoides totais (µg/g)
1	3	30	100	0,2401	0,80
2	7	30	100	0,3318	19,63
3	3	40	100	0,2316	9,06
4	7	40	100	0,1360	17,79
5	3	30	200	0,0909	18,38
6	7	30	200	1,1004	37,59
7	3	40	200	0,1603	1,09
8	7	40	200	2,0040	24,08
9	8,4	35	150	0,2715	7,51
10	1,6	35	150	0,1718	8,33
11	5	43	150	0,1940	26,67
12	5	27	150	1,0385	31,69
13	5	35	234	0,8446	15,94
14	5	35	66	0,2288	14,82
15	5	35	150	0,2020	9,60
16	5	35	150	0,2047	9,53
17	5	35	150	0,2033	9,54

X₁: pH. X₂: Temperatura (°C). X₃: Agitação (RPM).

Através da Tabela 2 é possível observar ao longo dos ensaios que houve uma redução na produção de carotenoides em pH mais baixos (pH 3), assim como em pH mais elevados (8,4), contudo é possível observar que a *R. rubra* tolera meios alcalinizados (ensaio 10 – Tabela 2), diferentemente de algumas leveduras do seu gênero, como por exemplo, a levedura *R. mucilaginosa* (NAGHAVI *et al.*, 2014).

Ao compararmos o ensaio 1 (pH 3, 30 °C e 100 rpm) com o ensaio 2 (pH inicial 7, 30 °C e 100 rpm), foi possível observar a influência do pH no crescimento celular e na carotenogênese: ao aumentarmos o pH de 3 para 7, foi observado o aumento do crescimento celular de 0,2401 g para 0,3318 g correspondendo a um aumento de 38%, enquanto a produção de carotenoides aumentou de 0,80 para 19,63 µg/g, correspondendo

em um aumento de aproximadamente 2460%. Em um estudo semelhante, Mihalcea et al. (2011) ao estudarem o efeito do pH nas leveduras *R. rubra* também concluíram que a produção de carotenoides foi afetada no pH 3, assim como o crescimento celular foi limitado no pH 8. Anteriormente, outros autores já haviam indicado que a biossíntese de carotenoides e crescimento celular na *R. rubra* foi afetada em pH entre 3 e 4,5, relatando uma inibição de crescimento em pH 3 (SHIH & HANG, 1996). Na levedura *R. mucilaginosa*, o aumento do pH de 3 para 7 também resultou em um aumento no acúmulo de carotenoides (69,8 µg/g) (AKSU & EREN, 2005).

A temperatura em um processo fermentativo exerce grande influência na concentração de enzimas, assim como em suas ativações e desnaturações, sendo um dos fatores que mais influenciam no crescimento e carotenogênese nas leveduras, devidos as alterações nas vias biosintéticas (HAYMAN et al., 1974; Valduga et al., 2009b). De acordo com a literatura, temperaturas entre 20-30°C não apresentaram efeito significativo na concentração de biomassa e carotenoides nas leveduras *R. rubra* (MIHACEA et al., 2011); portanto, foram estudadas temperaturas superiores a 30 °C (Tabela 2), sendo possível observar através dos ensaios 1 (pH inicial 3, 30 °C e 100 rpm) e 3 (pH inicial 3, 40 °C e 100 rpm) que o acúmulo de carotenoides aumentou de 0,80 para 9,06 µg/g (aumento de 1132%) quando o pH inicial do meio era 3 e a temperatura aumentou de 30 para 40 °C. Contudo, quando o pH inicial do meio foi 7, a mudança de temperatura de 30 (ensaio 2) para 40 °C (ensaio 4) ocasionou uma redução no teor de carotenoides totais de 19,63 µg/g para 17,79 µg/g, e de biomassa de 0,3318 g para 0,1360 g, respectivamente.

Foi observado que a levedura *R. rubra* possui um efeito semelhante ao observado em outras espécies de *Rhodotorula* que possuem seu sistema enzimático desnaturado em temperaturas superiores a 35 °C (AKSUN & EREN, 2005;2007), influenciando no crescimento celular e na concentração de carotenoides. A levedura *R. rubra* apresentou redução na produção de biomassa, variando de 1,03 g (ensaio 12) para 0,2 g de biomassa (ensaios 15,16,17), resultando em uma redução de 500%. Contudo, a concentração de carotenoides totais aumentou de 9,45 (médias dos pontos centrais) para 26,67 µg/g (aumento de 282%), quando sua temperatura aumentou de 35 para 43 °C.

Ao analisarmos o efeito da temperatura em conjunto com o pH 7, através dos ensaios 6 (pH 7, 30 °C e 200 rpm) e 8 (pH 7, 40 °C e 200 rpm), foi possível observar que nestas condições de pH, o aumento da temperatura de 30 para 40 °C resultou no aumento

do acúmulo de biomassa de 1,10 para 2,00 g (aumento de 90%); no entanto, a síntese de carotenoides diminuiu de 37,59 para 24,08 $\mu\text{g/g}$ acarretando em uma diminuição de aproximadamente 35%. Dessa forma, foi possível observar que as melhores condições para o crescimento da biomassa não são as mesmas que para a produção de carotenoides.

A taxa de agitação também promoveu efeitos significativos na produção de carotenoides e no crescimento celular. Ao compararmos os ensaios 13 (pH inicial 5, 35 °C e 234 rpm) e 14 (pH inicial 5, temperatura 35 °C e 66 rpm) com os ensaios 15, 16 e 17 (pH inicial 5, 35 °C e 150 rpm), é possível observar que taxas de agitações inferiores a 100 rpm promoveram um menor crescimento celular (0,8446 g), enquanto as taxas de agitações superiores a 200 rpm favoreceram tanto o crescimento celular quanto a síntese de carotenoides (0,2288 g e 14,73 $\mu\text{g/g}$ respectivamente).

Estudos semelhantes utilizando leveduras deste gênero já prediziam tal comportamento, sendo relatado que baixas taxas de agitação (100 a 150 rpm) promoviam um menor crescimento celular na levedura *R. glutinis* devido a falta de nutrientes na superfície das células enquanto taxas elevadas de agitação (>250 rpm) promovem a ruptura celular e consequentemente a diminuição da taxa de crescimento e da síntese de carotenoides (TINOI, et al., 2005).

3.2. Metodologia de superfície de resposta para determinação das melhores condições de bioprodução de carotenoides e biomassa

A influência de cada variável na produção de biomassa e carotenoides pode ser acompanhada pelo gráfico de Pareto (Figura 2), o qual demonstra que todas as variáveis do processo e as interações das variáveis apresentaram efeito significativo para ambas as variáveis dependentes em um nível de significância de 5%.

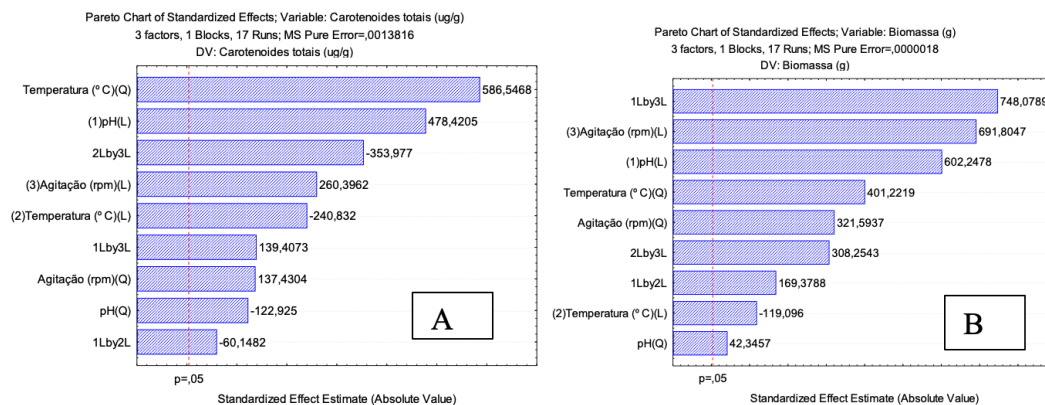


Figura 2. Gráfico de Pareto para os efeitos do pH, temperatura e agitação durante o planejamento experimental; (A). Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$); (B). biomassa ($\mu\text{g/g}$).

Conforme o gráfico de Pareto (Figura 2), observa-se que todas as variáveis independentes tiveram influência sobre o teor de carotenoides totais e quantidade de biomassa produzida. Para a produção de carotenoides totais observa-se que o aumento das variáveis independentes temperatura e pH foram as variáveis que mais influenciaram no processo, indicando que a produção de carotenoides é proporcional a estas variáveis, ou seja, um aumento na temperatura e no pH (nível mais baixo para o nível mais alto) proporcionam um aumento na produção de carotenoides.

Para a concentração de biomassa, no entanto, as variáveis que mais influenciaram no processo foi a interação entre as variáveis dependentes pH e agitação, indicando que a interação entre estas é capaz de promover um aumento significativo na produção de biomassa.

Após a realização da análise de variância (ANOVA), o modelo proposto apresentou coeficiente de determinação de 76,70 % ($R^2 = 0,7670$) para o teor de carotenoides totais e 77,25 % ($R^2 = 0,7725$) para a quantidade de biomassa produzida (Tabela 3).

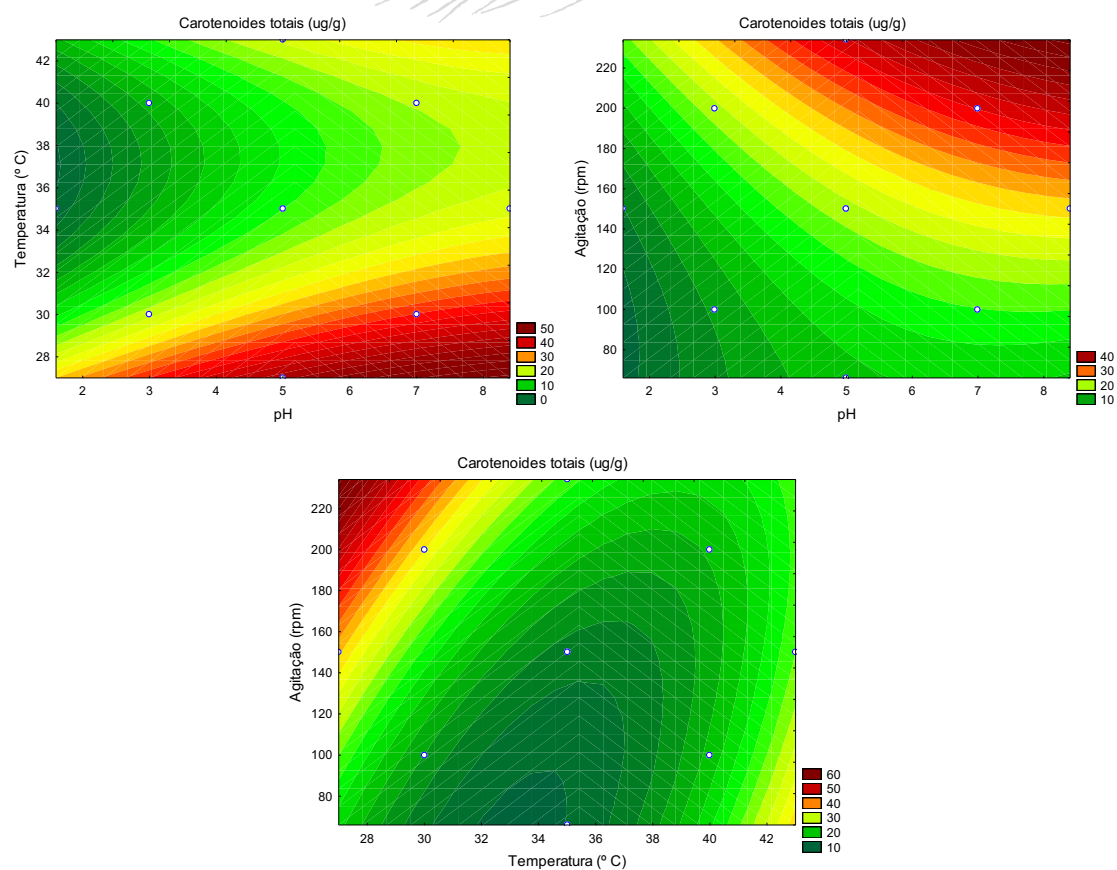
Tabela 3. Anova dos efeitos na biomassa e produção de carotenoides durante o processo fermentativo utilizando como substrato o caroço de açaí usando um modelo de superfície de resposta quadrática.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	R ²
Carotenoides					
totais (µg/g)					
Regressão	1296,05	9	144,01	2,56*	0,7670
Resíduos	393,68	7	56,24		
Falta de ajuste	393,679	5	78,7358	56987,20**	
Erro puro	0,003	2	0,0014		
Total	1689,730	16			
Biomassa (g)					
Regressão	3,22	9	0,36	2,64*	0,7725
Resíduos	0,95	7	0,14		
Falta de ajuste	0,947137	5	0,189427	103890,71**	
Erro puro	0,000004	2	0,000002		
Total	4,163439	16			

$F_{0,05; 9; 7} = 2,56$; $F_{0,05; 5; 2} = 19,3$ (F = Valor tabelado – Teste de Fisher). *Modelo não significativo ($p \leq 0.05$). **Modelo não preditivo ($p \leq 0.05$).

Os valores calculados para o teste de Fisher relacionados a regressão e falta de ajuste do planejamento demonstraram que os modelos gerados para as duas variáveis dependentes não foram significativos e nem preditivos, nesse sentido, para a faixa de variação selecionada neste estudo, os modelos gerados não podem explicar o comportamento do processo.

Apesar de o modelo matemático e a superfície de resposta não poderem ser gerados para fins preditivos, foi possível plotar as curvas de contorno apenas para ilustrar a tendência de processo para a produção de carotenoides totais e biomassa dentro da faixa testada (Figuras 3 e 4).



Curvas de contorno para ilustrar as melhores condições de produção de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$) durante a fermentação utilizando como substrato o caroço de açai.

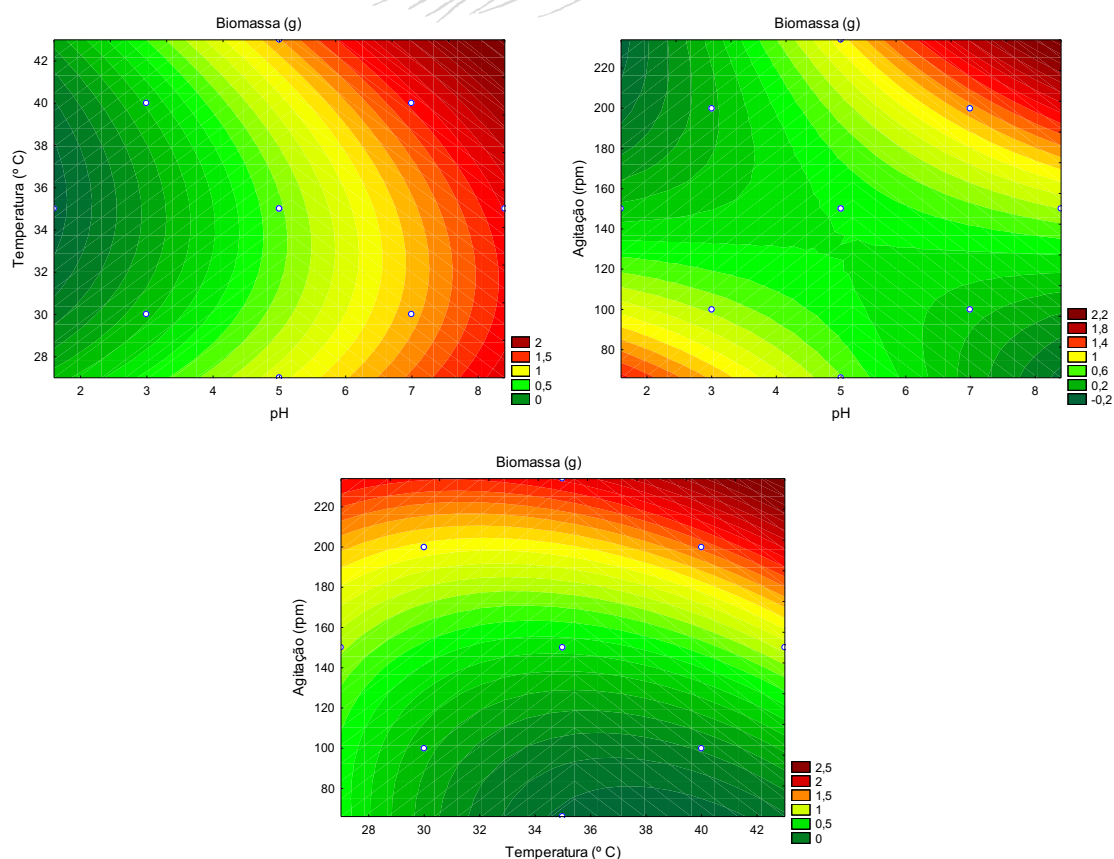


Figura 4. Curvas de contorno para ilustrar as melhores condições de produção de biomassa ($\mu\text{g/g}$) durante a fermentação utilizando como substrato o caroço de açaí.

Segundo as curvas de contorno (Figura 3), as maiores concentrações de carotenoides tendem a ser biosintetizados nas condições de cultivo próximas ao pH 7, com temperaturas de 30°C e taxa de agitação próximas a 200 rpm, em relação a todas as variáveis independentes estudadas.

O mesmo comportamento não pode ser observado para a produção de biomassa (Figura 4), a qual foi favorecida em temperaturas mais elevadas (40°C), pH próximo a neutralidade (7) e agitações próximas a 200 rpm, promovendo um aumento na taxa de oxigênio dissolvido e maior contato entre a biomassa e os nutrientes do meio, indicando desta forma que as melhores concentrações para a produção de biomassa não são as mesmas que para a produção de carotenoides.

Com base nos resultados obtidos a partir do planejamento experimental, a melhor condição de cultivo para a levedura *Rhodotorula Rubra* utilizando o caroço de açaí como como fonte de substrato foram pH igual a 7, temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm.

3.3 Perfil de carotenoides produzidos pela *R. rubra* utilizando o caroço de açaí como fonte de substrato

A Figura 5 apresenta o cromatograma com o perfil de carotenoides obtidos em HPLC a partir do extrato da biomassa de *Rhodotorula rubra* cultivadas na melhor condição (pH igual 7, temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm). Um total de 7 carotenoides foram identificados (majoritários), dos quais 1 não pode ter a estrutura química identificada com as informações obtidas pela técnica aplicada. A eluição dos pigmentos ocorreu em 60 min e a identificação dos picos e estruturas dos carotenoides estão apresentadas na Tabela 4.

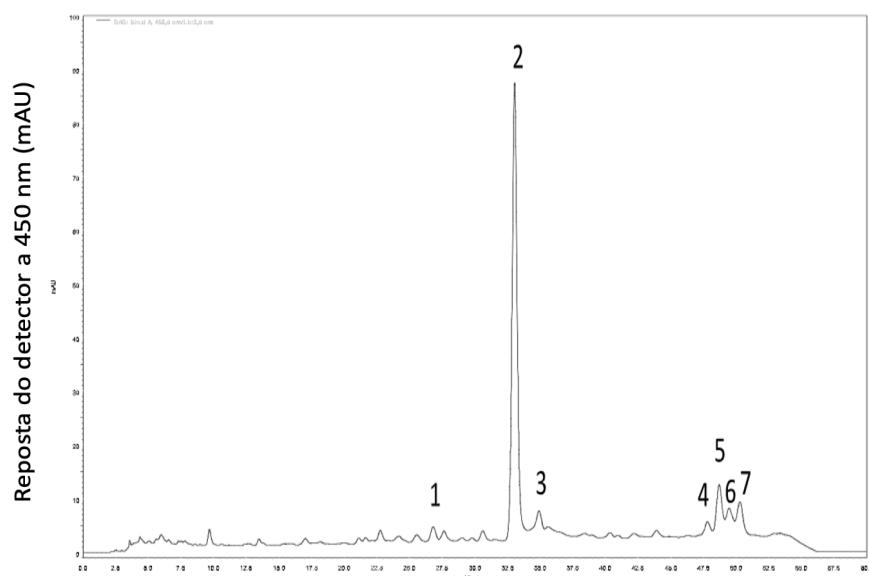


Figura 5. Cromatograma obtido por HPLC-DAD dos carotenoides durante a fermentação utilizando o caroço de açaí como substrato.

Tabela 4. Características e composição dos carotenoides majoritários ($\mu\text{g/g}$ de biomassa seca) produzidos pela levedura *Rhodotorula rubra* a partir da utilização do caroço de açaí como substrato.

Pico ^a	Carotenoides	Porcentagem relativa (%) [*]	t_R (min) ^b	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ^c	%III/II	%A _B /A _{II}
1	13- <i>cis</i> - β -Caroteno	$2,1 \pm 0,1$	26,7	340, 419, 442, 470	20	55
2	β -Caroteno	77 ± 4	32,9	420, 452, 478	30	0
3	9- <i>cis</i> - β -Caroteno	3 ± 1	34,8	346, 420, 448, 472	20	21
4	<i>cis</i> -Toruleno	$1,9 \pm 0,4$	47,7	378, 450, 480, 510	16	66
5	<i>cis</i> - γ -Caroteno	$6,9 \pm 1,2$	48,6	346, 435, 462, 492	55	0
6	Não-identificado	$3,0 \pm 1,7$	49,3	440, 472, 510	nc	nc
7	Toruleno	$4,5 \pm 0,5$	50,2	460, 484, 518	39	0

^aNúmero do pico de acordo com o cromatograma (Figura 5). ^bTempo de retenção na coluna C₃₀. ^cFase móvel: metanol/ éter metil-*terc*-butílico (MTBE). Nc= não calculado.

^{*}Calculado considerando a área dos picos assinalados.

Todos os picos majoritários, foram correlacionados e quantificados quanto a curva padrão de β - Caroteno. A porcentagem relativa dos picos variou de 1,9 a 77% (Tabela 4). Dentre os compostos químicos identificados, 5 apresentam atividade de provitamina A: o all-*trans*- β -caroteno, o 9-*cis*- β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, *cis*- γ -Caroteno o e toruleno, sendo o β -caroteno o mais estudado, pois é o que possui a maior atividade provitamina A (KRINSKY & JOHNSON, 2005), sendo amplamente relatada sua produção microbiológica em diversos microrganismo como *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU *et al.*, 2008), *Phaffia rhodozyma* (LIU *et al.*, 2006), *Rhodospiridium toruloides* (DIAS *et al.*, 2015), *Sporidiobolus salmonicolor* (VALDUGA *et al.*, 2009) e leveduras do gênero *Rhodototula* (SQUINA *et al.*, 2003; AKSU & EREN., 2005; Cheng & Yang, 2016).

Há uma escassez de dado na literatura que avaliem a potencial carotenogênese da levedura *Rhodotorula rubra* usando como substrato resíduos agroindustriais. Banzatto *et al.* (2013) relatou a produção de carotenoides por *R.rubra* cultivadas em meios à base de caldo, melaço e xarope de cana, os principais carotenoides produzidos foram toruleno, torularodina e β - caroteno. Frengova *et al.* (2006) relataram que β -Caroteno (51,1%) é o

principal carotenoide produzido pela levedura *R. rubra* usando soro de leite como substrato, seguidos de torularodina (33,7%) e toruleno (12,9%).

Em estudos com a linhagem *R. mucilaginosa* para carotenogênese a partir de resíduos alimentares, foi reportado a utilização de melaço como substrato, neste resíduo a levedura *R. mucilaginosa* biosintetizou carotenoides naturais com uma composição de 67,5% de toruleno, 23,8% de β -caroteno e 8,7% de torularodina (Cheng & Yang, 2016).

Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a levedura *Rhodotorula rubra* foi capaz de biosintetizar a xilose presente no licor, utilizando o açúcar para produção de carotenoides. Através da rota metabólica deste pigmento aliada aos carotenoides identificados (Tabela 4), pode-se concluir que a levedura foi capaz de formar γ -caroteno, o qual sofreu uma ciclização para formar para β -caroteno e/ou duas para formar toruleno, contudo, as condições de cultivo podem ter impossibilitado a levedura de hidroxilar e oxidar o toruleno para a formação da torularodina.

4. CONCLUSÃO

A levedura *Rhodotorula rubra* conseguiu utilizar a o caroço de açaí como fonte de substrato para a biossíntese de carotenoides sem a necessidade de suplementação do meio fermentativo, sendo os carotenoides majoritários β -caroteno (77%), *cis*- γ -Caroteno (6,9%) e toruleno (4,5%), evidenciando o agregado valor biotecnológico e industrial na utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de carotenoides por leveduras do gênero *Rhodotorula rubra*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Projeto 403121/2016-7). W.S. Igreja agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado (código 001, Processo 00214342204).

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Aksu, Z., Eren, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40, 2985–2991, 2005.
- Aksu, Z., Eren, A.T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 107–113, 2007.
- Almeida AVC, Melo IM, Pinheiro IS, Freitas JF, Melo ACS. Revalorização do caroço de açaí em uma beneficiadora de polpas do município de Ananindeua/PA: proposta de estruturação de um canal reverso orientado pela PNRS e logística reversa. *GEPROS*. 2017, set; 12(3): 59–83, DOI: <https://doi.org/10.15675/gepros.v12i3.1668>
- Banzatto, D., de Freitas, L.A., Mutton, M.J.R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33, 14–18, 2013.
- Bonadio, M. de P., Freitas, L. A. de, & Mutton, M. J. R. Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* 102. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (Eds.). *Carotenoids*, 2004.
- Buzzini, P., Martini, A. Production of Carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* Cultured in Raw Materials of Agro-Industrial Origin. *Bioresource Technology*, 71, 41-44, 1999.
- Cheng, Y.-T., & Yang, C.-F. Using the *Rhodotorula mucilaginosa* lineage to produce carotenoids using food waste. *Journal of the Institute of Chemical Engineers of Taiwan*, 61, 270-275, 2016.
- Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 5884–5892, 2012.
- De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p.5062–5072, 2007.
- Dias, C., Sousa, S., Caldeira, J., Reis, A, Silva, T.L. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, 189, 309-318, 2015.

- Du, C., Guo, Y., Cheng, Y., Han, M., Zhang, W., & Qian, H. Torulene and torularhodin, protects human prostate stromal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the regulation of Bcl-2/Bax mediated apoptosis. *Free Radical Research*, 51, 113–123, 2017.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., & Beshkova, D.M. Beta-carotene-rich carotenoid-protein preparation and exopolysaccharide production by *Rhodotorula rubra* GED8 grown with a yogurt starter culture. *Journal of bioscience*, 61, 571-7, 2006.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., Pavlova K., Beshkova, D.M., Grigorova D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 888–894, 1994.
- Hayman, E.P., Yokoyama, H., Chichester C., Simpson, K.L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bacteriology*, 120, 1339-1343, 1974.
- Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64–72, 2014.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura, 2018- Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado>> acessado em 14 de abril de 2020.
- Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17, 1-14, 2018.
- Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Bryś, J., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Reczek, L. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 25–31, 2017.
- Krinsky, N. I., Johnson, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516, 2005.
- Lavecchia, T., Rea, G., Antonacci, A., Giardi, M.T. Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 198–213, 2013.

- Liu, Y.-S., Wu, J.-Y., Ho, K. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 27, 331-335, 2006.
- Mandelli, F., Miranda, V.S., Rodrigues, E., Mercadante, A. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1781–1790, 2012.
- Mantzouridou, F., Roukas, T., Kotzekidou, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on B-carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 123- 135, 2002.
- Mihalcea, A., Ungureanu, C., Ferdes, M., Chirvase A.A., Tanase C., The Influence of Operating Conditions on the Growth of the Yeast *Rhodotorula Rubra* ICCF 209 and on Torularhodin Formation. *Revista de Chimie*, 62, 659-665, 2011
- Moreira, M.D., Melo, M.M., Coimbra, J.M., Reis, K.C., Schwan, R. F., Silva, C.F. Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. *Waste Management*, 82, 93–99, 2018.
- Naghavi F.S., Hanachi, P., Saboor, A. Effect of Temperature, pH and Salinity on carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Research in Biotechnology*, 5, 01-04, 2014.
- NAS-IOM- Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. WA: National Academy Press, p 92, 2001.
- NREL - National Renewable Energy Laboratory. Biodiesel: Handling and Use Guide. TP-540-43672, 4, 2009.
- Rodriguez-Amaya, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods, ILSI: Washington, 2001.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Pham, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, 61, 34–43, 2013.
- Shih, C.T., Hang, Y.D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 570–2, 1996.
- Squina, F.M.; Mercadante, A.Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, 309-318, 2003.

- Tinoi, J., Rakariyatham, N., Deming, R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40, 2551 – 2557, 2005.
- Valduga, E., Tatsch, P., Vanzo, L., Rauber, F., Di Luccio, M., Treichel H. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1060–1065, 2009.
- Valduga, E., Tatsch, P.O., Tiggeman, L., Treichel, H., Toniazzi, G., Zeni, J., Di Luccio, M.D. Produção de carotenoides: microorganismos como fontes de pigmentos naturais. *Química Nova*, 32, 2429-2436, 2009.
- Valduga, E., Tatsch, P.O., Tiggemann, L., Zeni, J., Colet, R., Cansian, J.M., Treichel, H., 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 & Technology*, 44, 2445–2451, 2009.
- Zhang, Z., Zhang, X., Tan, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, 157, 149–153, 2014.